

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 156**

51 Int. Cl.:

C07H 13/06 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2011 PCT/NL2011/050393**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2011 WO11155822**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2011 E 11725217 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2580226**

54 Título: **Derivados de trisacáridos y su uso como adyuvantes**

30 Prioridad:

11.06.2010 EP 10165707

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

12.02.2018

73 Titular/es:

**IMMUNOVO B.V. (100.0%)
Onderwijsboulevard 225
5223 DE 's-Hertogenbosch, NL**

72 Inventor/es:

**VAN BREE, JOHANNES, GERNARDUS, MATHIAS,
MARIE;
SCHENKELAARS, EVERARDUS, JOANNES,
PETER, MARIA;
TURKSTRA, JOUWERT, ANNE;
KRIEK, MARIA, ALDEGONDA, JACOBA;
HOF, ROBERT, PATRICK y
SCHAAPER, WILHELMUS, MARTINUS, MARIA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 654 156 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

Derivados de trisacáridos y su uso como adyuvantes

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevos derivados de trisacáridos y a su uso como adyuvantes, derivados de trisacáridos que comprenden un núcleo de trisacárido sustituido, cuyo núcleo de trisacárido está completamente sustituido con grupos éster de ácidos grasos, y opcionalmente uno o más grupos aniónicos, la invención se refiere además a un método para preparar estos derivados de trisacáridos, a trisacáridos obtenibles por este método, y al uso del adyuvante en una vacuna.

Antecedentes de la invención

10 Los anticuerpos son sustancias contenidas en la sangre y otros líquidos del cuerpo, así como en los tejidos, y que se unen al antígeno para hacerlo inocuo. Los anticuerpos constituyen uno de los mecanismos naturales de defensa del cuerpo. Son muy específicos y matan, se unen o hacen inocuo al antígeno que provocó su formación.

El antígeno en contacto con el sistema inmunitario activa de este modo una compleja serie de interacciones celulares para eliminar el antígeno y/o restablecer el equilibrio anterior.

15 Dos de las propiedades características de los antígenos son su inmunogenia, es decir, su capacidad para provocar una respuesta inmunitaria *in vivo* (incluida la formación de anticuerpos específicos) y su antigenia, es decir, su capacidad para ser selectivamente reconocidos por los anticuerpos cuyos orígenes son los antígenos.

20 Se sabe cómo estimular la respuesta inmunitaria deliberadamente administrando de un antígeno específico por medio de una vacuna. El procedimiento permite la retención de un estado de respuesta inmunitaria en el organismo que permite una respuesta más rápida y más eficaz del organismo durante el contacto posterior con el antígeno.

Sin embargo, algunos antígenos tienen solo una débil inmunogenia y provocan una respuesta inmunitaria insuficiente para producir una protección eficaz para el organismo. Esta inmunogenia puede mejorarse significativamente si un antígeno se administra junto con un adyuvante.

25 Los adyuvantes son sustancias que mejoran la respuesta inmunitaria a los antígenos, pero no son necesariamente inmunógenos. Los adyuvantes pueden actuar reteniendo el antígeno localmente cerca del punto de administración para producir un efecto de depósito que facilita una liberación lenta y mantenida de antígeno a las células del sistema inmunitario. Los adyuvantes también pueden atraer células del sistema inmunitario a un depósito de antígeno y estimular dichas células para provocar respuestas inmunitarias.

30 Se han utilizado adyuvantes durante muchos años para mejorar la respuesta inmunitaria del anfitrión a, por ejemplo, vacunas. Adyuvantes intrínsecos son normalmente los componentes de las bacterias destruidas o atenuadas utilizadas como vacunas. Adyuvantes extrínsecos son inmunomoduladores que generalmente están unidos de forma no covalente a antígenos y se formulan para potenciar la respuesta inmunitaria del anfitrión.

35 El hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio (denominados en conjunto alumbre) se usan rutinariamente como adyuvantes en vacunas humanas y veterinarias. La eficacia del alumbre en el aumento de las respuestas de anticuerpos a las vacunas antidiéfrica y antitetánica está bien demostrada y, más recientemente, una vacuna HBsAg se ha utilizado alumbre como adyuvante.

40 Una amplia gama de adyuvantes extrínsecos puede provocar respuestas inmunitarias a antígenos. Estos incluyen saponinas complejadas con antígenos de proteínas de la membrana (complejos inmunoestimulantes), polímeros plurónicos con aceite mineral, micobacterias muertas en aceite mineral, adyuvante completo de Freund, productos bacterianos, como dipéptido muramilo (MDP).

Se han investigado adyuvantes definidos químicamente, tales como monofosforil-lípido A, conjugados de fosfolípidos (véase Goodman-Snitkoff *et al.*, *J. Immunol.*, 147:410-415 (1991) ya que tiene encapsulación de la proteína con un proteoliposoma (véase Miller *et al. J. Exp. Med.* 176:1739-1744 (1992)).

45 Los polímeros sintéticos también se han evaluado como adyuvantes. Estos incluyen los homopolímeros y copolímeros de ácido láctico y glicólico, que se han usado para producir microesferas que encapsulan antígenos (véase Eldridge *et al.*, *Mol. Immunol.* 28:287-294 (1993)).

50 Los copolímeros de bloque no iónicos son otro adyuvante sintético que se evalúa. Los efectos adyuvantes también se han investigado para copolímeros de bajo peso molecular en emulsiones en aceite (véase Hunter *et al.*, *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D.E.S.) John Wiley and Sons, NY, págs. 51-94 (1995)) y para copolímeros de alto peso molecular en formulaciones acuosas (Todd *et al.*, *Vaccine* 15:564-570 (1997)).

55 Las características deseables de los adyuvantes ideales son la falta de toxicidad y la capacidad de estimular una respuesta inmunitaria duradera. Uno de los adyuvantes más frecuentemente utilizados en seres humanos es el alumbre. Otros coadyuvantes, tal como Saponina, Quil A y el adyuvante de agua en aceite, de Freund con bacilos tuberculosos muertos (completo de Freund) o sin bacilos (incompleto de Freund), han tenido un uso limitado en

humanos debido a sus efectos tóxicos; y se han expresado preocupaciones con respecto a los efectos indeseables en los animales.

Resumiendo, se han descrito muchas formulaciones de adyuvantes, pero la mayoría nunca se han aceptado para vacunas de rutina, y pocas han sido aprobadas para su uso en la especie humana. Esto se debe principalmente a su toxicidad. Por ejemplo, los aceites minerales usados como adyuvantes en determinadas vacunas para animales no se degradan fácilmente y persisten en el punto de inyección, lo que provoca granulomas inaceptables; y, en general, formulaciones adyuvantes, tales como emulsiones de aceite de compuestos minerales, liposomas y microesferas poliméricas biodegradables provocan reacciones locales debido a la formación de depósitos en el punto de inyección.

Los ejemplos de adyuvantes actualmente aprobados en vacunas humanas incluyen alumbre, MF59 (emulsión de aceite en agua), MPL (un glucolípido), VLR, virosomas de gripe inmunopotenciadores redisueltos (IRIV) y vacuna contra el cólera (véase Reed *et al.* *Trends in Immunology* 30:23-32 (2008)).

Un grupo de adyuvantes conocidos en la técnica son los denominados sulfolipopolisacáridos, es decir, polisacáridos que contienen tanto ésteres de ácidos grasos como ésteres de sulfato (Hilgers *et al.*, *Immunology* 60, págs. 141-146, 1986). Se ha descrito un método para preparar estos compuestos en las es de patente internacional WO96/20222 y WO 96/20008. Estos métodos para preparar sulfolipopolisacáridos dan como resultado la formación de diferentes derivados de sulfolipopolisacáridos que varían en el número de ésteres de ácidos grasos presentes por molécula de polisacárido, el número de ésteres de sulfato presentes por molécula de polisacárido, el número de grupos hidroxilo por molécula de polisacárido y en la distribución de ésteres de ácidos grasos, de ésteres de sulfato y de grupos hidroxilo sobre la molécula de polisacárido. Esto significa que durante la preparación de estos sulfolipopolisacáridos se obtiene una mezcla de muchos sulfolipopolisacáridos diferentes. En consecuencia, el rendimiento del sulfolipopolisacárido deseado es relativamente bajo o el adyuvante necesita ser utilizado como una mezcla difícil de caracterizar que causa problemas de regulación.

En la patente europea EP 1233969 se reivindica una composición adyuvante cuyo adyuvante comprende sulfolipodisacáridos. También se describe un método para preparar estos sulfolipodisacáridos. En una de las realizaciones, los sulfolipodisacáridos preparados están completamente sustituidos con ésteres de ácidos grasos o grupos éster de sulfato. Sin embargo, como se describirá además a continuación, cuando estos sulfolipodisacáridos se utilizan como adyuvantes en animales, se producen efectos secundarios no deseados tales como la aparición de un aumento medio de la temperatura corporal (incluso fiebre) y una irritación local (hinchazón del tejido).

La patente europea EP 1104767 A1 describe mono- y disacáridos que contienen grupos tanto de éster de ácido graso como de éster de sulfato útiles entre otros como adyuvantes para vacunas.

Descripción detallada de la invención

En vista de lo anterior, un objeto de la presente invención es proporcionar compuestos que son relativamente fáciles y baratos de preparar, poseen buenas propiedades adyuvantes y provocan un mínimo de efectos secundarios indeseados cuando se usan en clínica. Otro objeto de la presente invención es proporcionar compuestos que se pueden usar en una composición adyuvante, por ejemplo en combinación con una vacuna, compuestos que tienen unas excelentes características de seguridad y efectos secundarios.

Un primer y segundo aspecto de la presente invención se refiere a derivados de trisacáridos y a su uso como adyuvante. Los derivados de trisacáridos según la presente invención comprenden un núcleo de trisacárido sustituido, núcleo de trisacárido que está completamente sustituido con grupos éster de ácido graso, y opcionalmente uno o más grupos aniónicos.

Los derivados de trisacáridos según la presente invención son muy adecuados para usar como adyuvantes para vacunas. Tienen unas características de efectos secundarios que son sorprendentemente mucho mejores que las características de efectos secundarios de otros adyuvantes a base de derivados de polisacáridos, tales como, por ejemplo, adyuvantes a base de disacáridos. Los animales que se han vacunado con una composición de antígeno y una composición adyuvante que comprende derivados de trisacáridos según la invención muestran un aumento menor en la temperatura corporal media en comparación con, por ejemplo, los derivados de disacáridos de la patente europea EP 1233969. También la aparición de reacciones locales (hinchazón tisular) alrededor el área de inyección es menor cuando se usa un adyuvante que comprende los derivados de trisacáridos según la invención.

El término antígeno tal como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier componente o material que provoca una reacción inmunológica en el cuerpo humano o animal, tal como un virus, una bacteria, un micoplasma, un parásito o una célula tumoral, una subunidad de un microorganismo, tal como una proteína, polisacárido, péptido, glucoproteína, conjugado polisacárido-proteína, conjugado péptido-proteína.

El antígeno puede consistir, por ejemplo, en uno o más organismos vivos, organismos inactivados o las denominadas subunidades (estas últimas, por ejemplo, se preparan por síntesis, o por procedimientos de ingeniería genética, o se aíslan de los organismos). El término antígeno se refiere además a cualquier componente que pueda provocar una reacción inmunitaria en el cuerpo humano o animal.

El núcleo de trisacárido de los derivados de la presente invención procede preferiblemente de rafinosa, melecitosa, maltotriosa, nigerotriosa, maltotriulosa o cestosa. Se prefiere particularmente que el núcleo de trisacárido proceda de

5 rafinosa, melecitosa o maltotriosa, más preferiblemente de rafinosa o maltotriosa. Estos trisacáridos tienen en su forma normal, es decir, insustituída once grupos OH que están disponibles para reacciones tales como, por ejemplo, esterificación con ácidos grasos. Sin embargo, también es posible que uno o más, preferiblemente uno, de los grupos OH haya reaccionado con un grupo aniónico, de modo que, por ejemplo, se obtenga un grupo éster sulfato o éster fosfato, preferiblemente se obtiene un grupo éster sulfato.

En una realización preferida de la presente invención, los derivados de trisacáridos según la invención no comprenden grupos aniónicos sino solo grupos de ácidos grasos, preferiblemente grupos de ácidos grasos idénticos.

10 Según otra realización preferida, los derivados de trisacáridos según la invención comprenden uno o dos grupos aniónicos con diez o nueve grupos de ácidos grasos, respectivamente, por núcleo de trisacárido sustituido. Preferiblemente, los grupos de ácidos grasos son idénticos.

15 La expresión grupo aniónico como se emplea en la presente memoria se refiere a un resto cargado negativamente (es decir, cargado negativamente a pH neutro o al pH del entorno en el que se aplica el derivado). Dicho grupo aniónico puede ser, por ejemplo, un sulfato, un sulfonato o un fosfato. Los grupos aniónicos preferidos incluyen grupos éster de sulfato o grupos éster de fosfato. Ejemplos de dichos grupos son $-O-SO_2-ONa$ u $-O-SO_2-ONH_4$, $-O-SO_2-OEA$ (es decir, sulfato de trietilamonio).

20 En una realización preferida de la presente invención, el grupo éster de ácido graso que está unido por enlace covalente al núcleo de trisacárido sustituido es un éster de un ácido graso lineal, ramificado, saturado o insaturado con una longitud de cadena de 4 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 6 a 18, más preferiblemente 8 a 16 átomos de carbono, aún más preferiblemente de 10 a 14 y sumamente preferido 12 átomos de carbono.

Aunque está dentro del alcance de la presente invención que el núcleo de trisacárido sustituido esté sustituido con más de un tipo de éster de ácido graso, se prefiere usar solo un tipo, es decir, que todos los ésteres de ácido graso sean idénticos.

25 El uso de ácidos grasos es sumamente preferido, sin embargo, también está contemplado por la presente invención que otros ácidos carboxílicos, preferiblemente estrechamente relacionados con ácidos grasos, puedan proporcionar resultados favorables.

30 Preferiblemente, el éster de ácido graso es el éster de ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados o ácidos grasos poliinsaturados, tales como ácido butírico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido ricinoleico, ácido vacénico, ácido araquídico, ácido gadoleico, ácido araquidónico, ácido oleico o ácido linoleico. Más preferiblemente ácido láurico.

En una realización preferida, el núcleo de trisacárido sustituido procede de rafinosa, melecitosa o maltotriosa y es el derivado de trisacárido completamente sustituido con grupos éster de ácidos grasos idénticos por trisacárido sustituido, es decir, el núcleo de trisacárido está sustituido con once grupos éster de ácidos grasos idénticos.

35 En otra realización preferida, el núcleo de trisacárido sustituido procede de rafinosa, melecitosa o maltotriosa y comprende uno o dos grupos aniónicos, tales como un grupo éster sulfato o éster fosfato, y diez o nueve, respectivamente, grupos éster de ácidos grasos idénticos por trisacárido sustituido. Más preferiblemente, el éster de ácido graso es el éster de ácido láurico.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar un derivado de trisacárido que comprende las etapas siguientes:

40 i) proporcionar un trisacárido y disolverlo en un disolvente; y ii) esterificar todos los grupos OH del trisacárido con un ácido graso, o una fuente del mismo, reaccionando opcionalmente al menos uno de los grupos OH del trisacárido con un agente aniónico.

45 Debido al hecho de que todos los grupos OH se hacen reaccionar con grupos aniónicos y/o ácidos grasos, se están formando pocas impurezas. Esto significa que es posible obtener, sin dilatadas etapas de purificación, una forma pura farmacéuticamente aceptable de un derivado de trisacárido contemplado. Si se usa solo un tipo de ácido graso, tal como ácido láurico, se necesita incluso menos purificación para obtener el derivado de trisacárido deseado en una forma pura farmacéuticamente aceptable. Otra ventaja del método de la presente invención es que los derivados de trisacáridos deseados se obtienen fácilmente en cantidades relativamente grandes, lo que hace que el método sea económicamente atractivo.

50 En una realización preferida de la presente invención, los derivados de trisacáridos preparados no comprenden grupos aniónicos sino solo grupos de ácidos grasos, preferiblemente grupos de ácidos grasos idénticos, es decir, todos los grupos OH han reaccionado con un ácido graso o una fuente del mismo.

55 Según otra realización preferida, los derivados de trisacáridos preparados comprenden uno o dos grupos aniónicos con diez o nueve grupos de ácidos grasos, respectivamente, por núcleo de trisacárido sustituido. Preferiblemente, los grupos de ácidos grasos son idénticos.

Los trisacáridos usados en el método mencionado anteriormente son preferiblemente rafinosa, melecitosa, maltotriosa, nigerotriosa, maltotriulosa o cestosa. Más preferiblemente, se usan rafinosa, melecitosa o maltotriosa, más preferiblemente maltotriosa o rafinosa.

5 El significado de ácidos grasos como se usa en el método mencionado anteriormente se refiere a cualquier fuente de ácidos grasos, incluidas las sales de ácidos grasos, haluros de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos y derivados. Preferiblemente, los ácidos grasos utilizados en el método reivindicado son ácidos grasos lineales, ramificados, saturados o insaturados con una longitud de cadena de entre 4 a 20 átomos de carbono, preferiblemente entre 6 y 18, más preferiblemente entre 8 y 16 átomos de carbono, aún más preferiblemente 10 a 14 átomos de carbono, sumamente preferidos de 12 átomos de carbono.

10 Preferiblemente, los ácidos grasos utilizados son ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados o ácidos grasos poliinsaturados, como ácido butírico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido ricinoleico, ácido vaccénico, ácido araquídico, ácido gadoleico, ácido araquidónico, ácido oleico o ácido linoleico. Más preferiblemente ácido láurico.

15 Como se ha mencionado anteriormente, en una realización preferida de la presente invención, al menos uno de los grupos OH se hace reaccionar con un reactivo aniónico. Preferiblemente, el agente aniónico usado es un agente sulfatante o fosfatante tal como SO_3 gaseoso, HClSO_3 , SO_3 piridina, SO_3 -2-metilpiridina, SO_3 -2,6-dimetilpiridina, SO_3 -dimetilformamida, SO_3 -trimetilamida, SO_3 -trietilamina, SO_3 -dimetilalanina, SO_3 -N-etilmorfolina, SO_3 -dietilalanina, SO_3 -dioxano y sus combinaciones. Aún más preferiblemente, el agente sulfonante es SO_3 piridina o SO_3 trietilamina.

20 El agente sulfatante más preferido es SO_3 piridina. Se prefiere además que la reacción de al menos uno de los grupos OH del trisacárido con un agente sulfatante se lleve a cabo antes de la esterificación del trisacárido con un ácido graso. La ventaja de realizar primero la reacción con un agente sulfatante es que el agente sulfatante reacciona primero con los denominados grupos OH primarios antes de reaccionar con otros grupos OH, reduciendo así el número de isómeros formados.

25 En una realización preferida, la relación trisacárido : agente aniónico : equivalentes de ácido graso es 1 : 0-3 : 8-11, preferiblemente 1 : 0-1 : 10-11. Dentro de estos intervalos reivindicados, se obtiene eficientemente la sustitución completa de los grupos OH del trisacárido con ésteres de ácidos grasos y opcionalmente el grupo aniónico, tal como un éster de sulfato.

Preferiblemente, el disolvente utilizado para llevar a cabo la reacción es una mezcla de piridina y dimetilformamida.

30 En una etapa adicional del presente método, los derivados de trisacáridos se someten a una etapa adicional de mezcla con un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, de forma que se obtiene una composición adyuvante.

35 Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a composiciones adyuvantes que comprenden derivados de trisacáridos según la invención, o una mezcla de los mismos. Cuando dichos derivados de trisacáridos se formulan en una composición adyuvante, se mezclan preferiblemente con excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, la composición adyuvante se formula como una emulsión de aceite en agua. Los aceites adecuados para ser usados son, entre otros, aceites animales, aceites vegetales y aceites minerales, tales como aceite de pescado, vitamina E, escualano, escualeno. Preferiblemente, se usa escualano, preferiblemente en combinación con polisorbato.

40 Aunque es posible usar solo un tipo de derivado de trisacárido, también está dentro del alcance de la invención usar en la composición adyuvante una mezcla de diferentes derivados de trisacáridos según la invención. En una realización preferida, se usa una mezcla de derivados de trisacáridos según la invención con un grupo aniónico, tal como un grupo éster de sulfato, y los mismos derivados de trisacáridos sin un grupo aniónico, p. ej., sulfo-lipo-rafinosa y lipo-rafinosa. Aún más preferiblemente, los ésteres de ácidos grasos de los derivados de trisacáridos usados en dicha mezcla son los mismos, tales como, por ejemplo, el éster del ácido láurico.

45 Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a una vacuna que comprende la composición adyuvante o derivado de trisacárido como se mencionó anteriormente.

50 Tanto la composición adyuvante, como la composición de antígeno o la vacuna se administran preferiblemente por vía parenteral. Los medios adecuados para administración parenteral incluyen administración intramuscular, subcutánea, subdérmica e intradérmica. Los dispositivos adecuados para administración parenteral incluyen inyectores de aguja (incluidas microagujas) y sistemas de administración transdérmica.

La formulación parenteral puede ser preparada fácilmente por algún experto en la materia según métodos normalizados. Preferiblemente, la formulación parenteral se prepara como una emulsión de aceite en agua.

La preparación de formulaciones parenterales en condiciones estériles, por ejemplo, por filtración, puede hacerse fácilmente empleando técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica.

55 La vacuna o la composición adyuvante según la invención se puede administrar a seres humanos y a muchos animales elegidos como objetivo diferentes, tales como, por ejemplo, cerdos, ganado vacuno, aves de corral, perros, gatos, caballos y similares.

Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a un equipo que comprende la composición adyuvante mencionada anteriormente y una composición de antígeno.

5 Puede ser deseable administrar una combinación de la composición adyuvante y la composición de antígeno o vacuna por separado. En tal caso, la composición adyuvante y la composición de antígeno pueden combinarse convenientemente en forma de un equipo. Dicho equipo podría ser, por ejemplo, un sistema de dos viales o una jeringa de doble cámara.

La invención se describirá ahora además mediante los siguientes ejemplos no restrictivos.

Ejemplos

Preparación de derivados de trisacáridos según la invención

10 Ejemplo 1: Síntesis general de sulfo-lipo-trisacáridos según la invención

Un trisacárido se seca en un horno de vacío para eliminar el agua cristalina. El trisacárido (5 g) se disuelve posteriormente, en una corriente de nitrógeno, en 30 ml de DMF y 14 ml de piridina en un matraz de fondo redondo de tres bocas de 100 ml, equipado con un condensador de reflujo. Se añaden 1,05 equivalentes de piridina.SO₃ en agitación vigorosa. Después de 1 hora, el matraz se enfría en agua con hielo y con agitación vigorosa se agrega gota a gota cloruro de lauroilo para evitar el calentamiento de la mezcla de reacción. Después de 15 minutos, el baño con hielo se calienta lentamente a 40°C. El avance de la reacción se controla por HPLC. Una vez completada la reacción, la mezcla se concentra al vacío en un evaporador rotativo (calentado hasta 60°C). El producto en bruto se recoge en 300 ml de heptano y 150 ml de salmuera. La capa orgánica se separa en un embudo de decantación de 500 ml, se seca sobre sulfato de sodio y se filtra. La solución en heptano se concentra al vacío. El aceite obtenido se disuelve en 200 ml de heptano y se agrega gota a gota trietilamina (2,37 ml). La solución obtenida se filtra y se concentra al vacío. El aceite se disuelve de nuevo en 100 ml de heptano, se filtra y la solución se concentra al vacío.

Ejemplo 2: Síntesis de sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma) vía piridina.SO₃

El producto del título se sintetizó siguiendo el método general descrito en el ejemplo 1 con los siguientes detalles: se secó maltotriosa (5,1 g, 10 mmol) en una estufa de vacío a <10 mbar durante 19 horas a 40°C y 48 horas a 70°C., rendimiento 4,9 g. La maltotriosa seca se disolvió en 30 ml de DMF y 14 ml de piridina y se sulfató con 1,6 g (1,05 eq) de piridina.SO₃, se puso en suspensión en 2 ml de DMF. Después de 1 hora, el sulfo-trisacárido se esterificó en un baño de hielo con 11 equivalentes (25,5 ml) de cloruro de lauroilo. La mezcla se calentó lentamente a 40°C y se hizo reaccionar durante 3 horas. Las etapas de reacción se siguieron por HPLC-ELSD. El producto se aisló después de extracción e intercambio de trietilamina. Rendimiento del jarabe espeso marrón amarillento: 15,5 g + 5,5 g (segunda recogida en el matraz de evaporación después de calentar a 50°C). Cromatograma HPLC-ELSD: véase la fig. 1A.

Ejemplo 3: Síntesis alternativa de sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma) vía piridina.SO₃

El producto del título se sintetizó siguiendo el método general descrito en el ejemplo 1 con los siguientes detalles: se secó maltotriosa (5,0 g, 10 mmol) en una estufa de vacío a <10 mbar durante 20 horas a 40°C y 90 horas a 70°C., rendimiento 4,9 g. La maltotriosa seca se disolvió en 30 ml de DMF y se añadieron 1,6 g (1,05 eq) de piridina.SO₃ en forma de una suspensión en 14 ml de piridina. Después de 1 hora, el sulfo-trisacárido se esterificó en un baño de hielo con 11 equivalentes (25,2 ml) de cloruro de lauroilo y se calentó lentamente a 40°C. Se tomaron muestras para el análisis HPLC-ELSD en puntos de tiempo regulares en el proceso. La reacción con cloruro de lauroilo se dejó durante la noche a temperatura ambiente. El tratamiento se realizó como se describe en el ejemplo 1. Rendimiento del jarabe marrón amarillento espeso: 24,7 g. Cromatograma HPLC-ELSD: véase la fig.1B.

Ejemplo 4 : Síntesis de sulfo-lipo-rafínosa (S1L10-Ra) vía piridina.SO₃

El producto del título se sintetizó como se describe en el ejemplo 1 con los siguientes detalles: se secó rafínosa pentahidratada (5,0 g, 10 mmol) en una estufa de vacío a <10 mbar durante 24 horas a 30°C y 90 horas a 60°C., rendimiento 4,3 g. La rafínosa seca se disolvió en 30 ml de DMF y 14 ml de piridina. Se añadió piridina.SO₃ (1,6 g, 1,05 eq) de una vez. Después de 1 hora, el sulfo-trisacárido se esterificó en un baño de hielo con 12 equivalentes (23,5 ml) de cloruro de lauroilo y se calentó lentamente a 40°C. Después de 4 horas, la mezcla se concentró al vacío, se extrajo y se trató con TEA como se describe en el ejemplo 1. Rendimiento del jarabe amarillo-marrón espeso: 18,0 g. Cromatograma HPLC-ELSD: véase la fig. 2.

Ejemplo 5: Síntesis de lipo-maltotriosa (L11-Ma)

50 El producto del título se sintetizó siguiendo el método general descrito en el ejemplo 1 con los siguientes detalles: Se secó maltotriosa hidratada (0,50 g) en una estufa de vacío. El trisacárido seco (0,49 g, 0,97 mmol) se disolvió en piridina (1,4 ml) y DMF (3 ml), se enfrió en un baño de hielo y se hizo reaccionar con cloruro de lauroilo (3,36 ml, 15 eq) durante 1 hora a 0°C., seguido de 16 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se convirtió en un gel, después de la adición de 3 ml de heptanos y la exposición a ultrasonidos el producto se disolvió. La adición de heptano se repitió dos veces. La fase orgánica (75 ml) se lavó con agua y se formó un sistema de tres capas. Solamente se aisló la capa orgánica, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para producir un jarabe espeso de color amarillo parduzco: 1,39 g. Cromatograma HPLC-ELSD: véase la fig. 3A.

Ejemplo 6: Síntesis de lipo-rafinosa (L11-Ra)

El pentahidrato de rafinosa (0,50 g) se secó en una estufa de vacío. La rafinosa seca (0,41 g, 0,86 mmol) en piridina (1,4 ml) y DMF (3 ml) se enfrió en un baño de hielo y se hizo reaccionar con cloruro de lauroílo (2,97 ml, 15 eq) durante 1 hora a 0°C, seguido de 18 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con heptano (50 ml) y se lavó con agua (25 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para dar un jarabe espeso amarillo parduzco: 2,33 g. cromatograma HPLC-ELSD: véase la fig. 3B.

Efecto de los adyuvantes que comprenden los derivados de trisacáridos según la invención sobre valores de anti-GnRH, concentraciones de testosterona en suero y aparición de efectos adversos.

Se han llevado a cabo experimentos en animales para evaluar la eficacia y los posibles efectos adversos asociados con el empleo de los trisacáridos según la invención como adyuvante. En este estudio en ratas, se probaron tres adyuvantes a base de sulfo-lipo-trisacáridos: sulfo-lipo-maltotriosa (un grupo éster de sulfato y diez grupos de éster lauroílico, S1L10-Ma), preparados según el ejemplo 3; sulfo-lipo-rafinosa (un grupo éster de sulfato y diez grupos de éster lauroílico, S1L10-Ra), preparados según el ejemplo 4; y lipo-rafinosa (rafinosa completamente sustituida con grupos éster lauroílico, L11-Ra), preparada según el ejemplo 6. Los adyuvantes que comprenden sulfo-lipo-maltotriosa también comprendían lipo-maltotriosa (completamente sustituida con grupos éster lauroílico, L11-Ma). Los adyuvantes que comprenden sulfo-lipo-rafinosa también comprendían lipo-rafinosa (completamente sustituida con grupos éster lauroílico, L11-Ra).

Los adyuvantes a base de sulfo-lipo se probaron en diferentes dosis que variaban de 0,008 a 8 mg por dosis. Los adyuvantes se probaron en combinación con un conjugado de GnRH-KLH con 0,7 µg de GnRH conjugada por dosis. La capacidad adyuvante de los adyuvantes se comparó con el adyuvante de referencia positiva, sulfo-lipo-sacarosa (disacárido con un grupo éster sulfato y siete grupos éster de ácido lauroílico, S1L7-Su) y con un adyuvante de referencia negativa que consistía en una emulsión de escualano en agua sin compuesto sacárido y un grupo que solo recibió PBS.

La eficacia se determinó mediante los valores de anticuerpos y los efectos biológicos de los anticuerpos inducidos sobre concentraciones de testosterona. Con el fin de determinar los efectos adversos de la inmunización con los adyuvantes, se realizaron observaciones clínicas diarias y se determinaron la temperatura corporal las reacciones en el punto de inyección.

Preparación de emulsiones adyuvantes

- Sacáridos: Sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma)

Sulfo-lipo-rafinosa (S1L10-Ra)

Lipo-rafinosa (L11-Ra)

- Escualano (A & E Connock)
- Polisorbato-80 (Fagron)
- PBS estéril con pH 7,4 (Mediabereiding ASG, Lelystad)
- Agua MilliQ
- Unidad de filtro impulsado por jeringa Millex 0,22 µm PES, 33 mm, 4.5 cm² (Millipore)
- Microfluidizador M-110S equipado con tipo de cámara de interacción: F20Y
- Sistema Analizador de Microtrac Nanotrac NPA-253

Los adyuvantes experimentales se prepararon de la manera siguiente.

40

Tabla 1. Composición de las emulsiones para los diferentes SLS

Grupo	Sacárido	Cantidad SLS (g)	Escualano (g)	Tween-80 (g)	MilliQ (g)	PBS-wit (g)
1	Sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma-8)	1,0018	4,0010	1,0019	0,2507	18,7495
2	Sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma-2)	0,2497	4,0051	1,0017	1,0007	18,7515
3	Sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma-0,8)	0,1007	4,0025	1,0030	1,1525	18,7524
4	Sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma-0,08)	0,0101	4,0040	1,0010	1,2439	18,7525
5	Sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma-0,008)	0,00225	9,0018	1,0006	1,2706	18,75
6	Sulfo-lipo-rafinosa (S1L10-Ra-8)	1,0029	4,0004	1,0009	0,2528	18,7495
7	Sulfo-lipo-rafinosa (S1L10-Ra-2)	0,2503	4,0007	1,0008	1,0015	18,7514
8	Sulfo-lipo-rafinosa (S1L10-Ra-0,8)	0,1004	4,0015	1,0020	1,1496	18,7526
9	Sulfo-lipo-rafinosa (S1L10-Ra-0,08)	0,0106	4,0003	1,0008	1,2386	18,7529
10	Sulfo-lipo-rafinosa (S1L10-Ra-0,008)	0,00154	6,1587	1,0045	1,2526	18,76
11	Ninguna	0,0000	3,9995	1,0011	1,2527	18,74
12	Lipo-rafinosa (L11-Ra-8)	1,0006	4,0067	1,0037	0,2502	18,76

Nota: para los grupos 5 y 10, el sacárido se disolvió en escualano. De estas soluciones, se usaron 4,0056 g (5) y 4,0006 g (10) para la preparación de emulsión adicional. El contenido en SLS en la emulsión final fue de 1 mg/25 ml.

Los componentes de la fase oleosa (sacárido, escualano, polisorbato-80 y agua MilliQ, cantidades indicadas en la tabla 1) se pesaron en un tubo Falcon de 50 ml. Los componentes se mezclaron usando un agitador y se calentaron en un baño de agua a 50°C hasta que se disolvió el sacárido. La fase de aceite caliente se añadió a la fase acuosa (PBS) y las dos fases se mezclaron mediante agitación y ultra-turrax a 24.000 min⁻¹ durante aproximadamente 30 segundos con intervalos. Posteriormente, la emulsión se formó mediante tratamiento con Microfluidizer. La presión de operación se ajustó a 500 kPa (5 bar) y cada mezcla se pasó tres veces por enfriamiento de la cámara de interacción en un baño de hielo. Cada emulsión se sometió a filtración estéril manual. El tamaño de partícula de la emulsión se midió usando un medidor de partículas Nanotrak.

10 Las vacunas 1-13 se formularon añadiendo un volumen igual de adyuvante (que comprende los compuestos sacáridos que se muestran en la tabla 2) a la fase acuosa (que contiene 0,7 µg de GnRH conjugada). La vacuna 14 consiste en PBS solamente. Se prepararon las siguientes vacunas:

Tabla 2. Diseño experimental

Grupo	Compuesto sacárido	Dosis adyuvante
1	sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma-8)	8 mg
2	sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma-2)	2 mg
3	sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma-0,8)	0,8 mg
4	sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma-0,08)	0,08 mg
5	sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma-0,008)	0,008 mg
6	sulfo-lipo-rafinosa (S1L10-Ra-8)	8 mg
7	sulfo-lipo-rafinosa (S1L10-Ra-2)	2 mg
8	sulfo-lipo-rafinosa (S1L10-Ra-0,8)	0,8 mg
9	sulfo-lipo-rafinosa (S1L10-Ra-0,08)	0,08 mg

Grupo	Compuesto sacárido	Dosis adyuvante
10	sulfo-lipo-rafinosa (S1L10-Ra-0,008)	0,008 mg
11	sin sacárido (NS)	0
12	lipo-rafinosa (L11-Ra)	8 mg
13	sulfo-lipo-sacarosa (S1L7-Su-8)	8 mg
14	Referencia PBS (sin antígeno, sin adyuvante)	0

Animales e inmunización

5 Se alojaron ratas macho Wistar, de 10 semanas de edad, con 3 ratas por jaula. Las ratas tenían acceso a discreción a comida y agua. Las ratas se inmunizaron los días 0, 14 y 28, según el diseño experimental (tabla 2) con 400 µl de vacuna que comprendía 200 µl de fase acuosa y 200 µl de adyuvante. Se inyectaron dos inyecciones intramusculares (100 µl cada una) en el muslo interno izquierdo y derecho y se inyectaron 2x100 µl por vía subcutánea en la región del cuello. Cada grupo consta de 5 ratas.

Se recogieron muestras de sangre para suero de todos los animales antes de las inmunizaciones y en el día 41 y 56.

Eficacia de las vacunas

10 Ensayos

15 Se determinaron por ELISA los anticuerpos específicos de GnRH. Las placas (96 pocillos) se recubrieron previamente con 0,2% de glutaraldehído en tampón fosfato (pH 5) durante 3 horas a temperatura ambiente, se lavaron con tampón de fosfato 0,1 M (pH 8) y se recubrieron con 100 µl por pocillo de una solución que contenía 10 µg de GnRH (Pepscan Presto, Lelystad, Holanda) por ml de tampón fosfato (pH 8) y se incubaron durante 3 horas a 37°C. Las placas recubiertas se lavaron con Tween-80 al 0,05%. Las muestras de suero se diluyeron (1/10) en PEM (1% de Tween-80 con 4% de suero de caballo). Esta dilución se diluyó además en la placa de 96 pocillos (100 µl por pocillo, 8 etapas) y se incubó 1 hora a 37°C. Después de lavar con Tween-80 al 0,05%, 100 µl de antisuero de cabra anti-rata conjugado con peroxidasa en PEM se agregó a los pocillos. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C y se lavaron 12 veces con Tween-80 al 0,05%. Posteriormente, 150 µl de una solución de sustrato que contiene 2,2-azino-bis-(ácido 3-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) más H₂O₂ se añadieron a los pocillos de las placas. Las placas se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 405 nm. El valor del anticuerpo se expresó como 10 log del factor de dilución que proporciona una densidad óptica de 4 veces el fondo (aprox. 100).

20 Las concentraciones séricas de testosterona se midieron usando un EIA de testosterona disponible en el mercado (Beckman Coulter, Woerden, Holanda) según las instrucciones del fabricante.

25 *Valores de anticuerpos GnRH*

30 Los valores de anticuerpos contra GnRH de los grupos tratados con sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma) y sulfo-lipo-rafinosa (S1L10-Ra) se representan en las figuras 4A y 4B. Ambos sulfo-lipo-trisacáridos produjeron valores de anticuerpos dependientes de la dosis contra GnRH. Los valores de anticuerpos fueron sustancialmente mayores para ratas tratadas con 0,08-8 mg de sulfo-lipo-trisacárido que en ratas tratadas con adyuvante sin sacárido (NS, grupo 11), lo que demuestra la contribución significativa del sulfo-lipo-trisacárido a la respuesta inmunitaria.

La figura 4C muestra claramente que los valores de anticuerpos contra GnRH de ratas que recibieron 8 mg de compuestos sacáridos según la invención, es decir, S1L10-Ma-8, S1L10-Ra-8 y L11-Ra-8 fueron sustancialmente mayores que en ratas tratadas con emulsión de escualano solamente (NS), enfatizando fuerte poder adyuvante de los trisacáridos tanto S1L10 como L11.

35 *Testosterona sérica*

40 La inmunización con el conjugado GnRH-KLH emulsionado con el adyuvante que comprende los sulfo-lipo-trisacáridos según la invención, es decir, S1L10-Ma y S1L10-Ra, produjo una disminución drástica de los concentraciones séricas de testosterona a partir de 0,08 mg de sulfo-lipo-trisacárido en adelante (figura 5A-B), mientras que los efectos de la dosis más baja de sulfo-lipo-trisacárido (0,008 mg) sobre la testosterona sérica fueron similares a la emulsión de aceite en agua sin compuesto de sacárido. La inmunización con el trisacárido lipidado (L11-Ra-8) también produjo la disminución de los niveles de testosterona (figura 5C)

Efectos adversos

Aumento de la temperatura corporal media

45 Se realizaron observaciones clínicas al menos una vez al día en todos los animales. Se determinó la temperatura corporal media (MBT) en todos los animales antes y después de cada inmunización por temperatura rectal. La temperatura corporal media por grupo (MBT) se representa respecto a los niveles de preinmunización en la figura 6.

A las 3 horas después de cada vacunación, se observó un ligero aumento en MBT en ratas tratadas con sulfo-lipo-trisacáridos solo a dosis de 8 y 2 mg, mientras que no se observaron efectos en MBT a 0,8, 0,08 y 0,008 mg. Al día

siguiente, 21 horas después de la vacunación, sin embargo, MBT se volvió a reducir a valores casi normales (figuras 6A y 6B). Por el contrario, la inmunización con el compuesto disacárido (S1L7-Su-8) que provocó un aumento ligeramente mayor de MBT que los compuestos trisacáridos 3 horas después de la vacunación, no mostró una disminución en MBT un día después de la inmunización, MBT todavía aumentó 21 horas después de la vacunación (figura 6C). El trisacárido lipidado (L11-Ra-8) no produjo ningún aumento en MBT. En la figura 6 por lo tanto, está claro que las vacunas que comprenden los compuestos según la invención (trisacáridos S1L10) como adyuvantes produjeron sorprendentemente efectos de temperatura significativamente más cortos en comparación con los derivados de disacáridos conocidos en la técnica anterior, mientras que el trisacárido lipidado (trisacárido L11) en similitud con la emulsión de aceite en agua sin un compuesto de sacárido (NS) no produjo ningún efecto de temperatura en absoluto.

Reacciones en el punto de inyección

Antes de la vacunación, se evaluaron la presencia de anomalías o reacciones locales existentes en los puntos de inyección. Si faltaban dichas anomalías o reacciones locales, el animal se inyectaba en ese punto. Después de cada inmunización, se inspeccionaron los puntos de inyección para determinar la hinchazón del tejido. Se midió el tamaño de los puntos de inyección subcutánea (diámetro en mm). Dado que las reacciones del punto de inyección intramuscular en la pata trasera son difíciles de determinar, solo se determinó la presencia de puntos de inyección intramuscular (hinchazón tisular) y se expresó en valores arbitrarios (presente = 10 mm, no presente = 0 mm). Se agregaron por rata puntuaciones de las reacciones en los puntos de inyección para los cuatro puntos de inyección en cada inspección, se calcularon los promedios por grupo. Los resultados se presentan en la figura 7.

Después de la inmunización, se observaron reacciones menores en el punto de inyección dependientes de la dosis en ratas tratadas con sulfo-lipo-trisacáridos, principalmente en ratas tratadas con 8 y/o 2 mg (figuras 7A y 7B). El tamaño de las reacciones en el punto de inyección disminuyó gradualmente el tercer día después de la inmunización y casi no se detectaron el día 5 después de la inmunización posterior. Las reacciones en el punto de inyección causadas por la inmunización con sulfo-lipo-disacárido (S1L7-Su-8) presentaban un patrón completamente diferente: las reacciones en los puntos de las inyecciones aumentaron de tamaño hasta el 4º día y fueron más de 4 veces mayores que con los sulfo-lipo-trisacáridos (véase la figura 7C), además, en la inspección final 5 días después de la inmunización, todavía estaban presentes reacciones significativas en el punto de inyección.

El trisacárido lipidado (L11-Ra-8) no provocó ningún efecto adverso en el punto de la inyección. Indudablemente, el sulfo-lipo-disacárido que comprende formulaciones de vacuna provocó más reacciones en el punto de inyección que las vacunas que comprenden sulfo-lipo-trisacáridos según la invención.

Figuras

Figura 1 A-B: Cromatograma HPLC-ELSD de sulfo-lipo-maltotriosa, sintetizada por la vía piridina.SO₃

Figura 2: Cromatograma HPLC-ELSD de sulfo-lipo-rafinosa, sintetizada por la vía piridina.SO₃

Figura 3 A-B: Cromatograma HPLC-ELSD de lipo-maltotriosa y lipo-rafinosa

Figura 4 A-C: Valor (medio) de anticuerpos contra GnRH de ratas inmunizadas con diversas formulaciones de vacunas

Figura 5 A-C: Concentraciones séricas de testosterona de ratas inmunizadas con diversas formulaciones de vacunas

Figura 6: Temperatura corporal media de ratas inmunizadas con diversas formulaciones de vacunas

Figura 7: Reacción en el punto de inyección de ratas inmunizadas con diversas formulaciones de vacunas

REIVINDICACIONES

1. Uso de un derivado de trisacárido que comprende un núcleo de trisacárido sustituido, cuyo núcleo de trisacárido está completamente sustituido con grupos éster de ácido graso, y opcionalmente uno o más grupos aniónicos como adyuvante.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, en donde el núcleo de trisacárido sustituido procede de rafinosa, melecitosa, maltotriosa, nigerotriosa, maltotriulosa o cestosa, preferiblemente rafinosa, melecitosa o maltotriosa, más preferiblemente rafinosa o maltotriosa.
3. Uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el núcleo de trisacárido sustituido comprende uno o dos grupos éster de sulfato o éster de fosfato como grupos aniónicos.
- 10 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el grupo aniónico es un éster de sulfato.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el grupo éster de ácido graso es un éster de un ácido graso lineal, ramificado, saturado o insaturado con una longitud de cadena de 4 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 6 a 18, más preferiblemente de 8 a 16 átomos de carbono, aún más preferiblemente 10 a 14 átomos de carbono, sumamente preferido de 12 átomos de carbono.
- 15 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el éster de ácido graso es el éster de ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico o ácido araquídico, preferiblemente ácido láurico.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde los grupos éster de ácido graso del núcleo de trisacárido sustituido son todos idénticos.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el núcleo de trisacárido sustituido procede de rafinosa, melecitosa o maltotriosa y en donde el derivado trisacárido está completamente sustituido con grupos éster de ácidos grasos idénticos por trisacárido sustituido.
- 20 9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el núcleo de trisacárido sustituido procede de rafinosa, melecitosa o maltotriosa y en donde el núcleo de trisacárido comprende un grupo éster de sulfato o éster de fosfato y diez grupos éster de ácidos grasos idénticos por trisacárido sustituido o dos grupos éster de sulfato o de fosfato y nueve grupos éster de ácido graso idénticos por trisacárido sustituido.
- 25 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde los grupos éster de ácido graso son los ésteres del ácido láurico.
11. Composición adyuvante que comprende un derivado de trisacárido según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o una de sus mezclas y un receptor y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 30 12. Composición adyuvante según la reivindicación 11 formulada como una emulsión de aceite en agua.
13. Composición adyuvante según la reivindicación 12, en donde la fase oleosa de la emulsión comprende escualano y/o polisorbato.
14. Formulación de vacuna que comprende una composición adyuvante según las reivindicaciones 11-13.
- 35 15. Un equipo que comprende una composición de antígeno y una composición adyuvante según las reivindicaciones 11-13.
16. Composición adyuvante según las reivindicaciones 11-13, formulación de vacuna según la reivindicación 14 o un equipo según la reivindicación 15 para uso como medicamento.
- 40 17. Derivado de trisacárido que comprende un núcleo de trisacárido sustituido, cuyo núcleo de trisacárido está completamente sustituido con grupos éster de ácido graso, y uno o más grupos aniónicos, en donde el núcleo de trisacárido sustituido procede de rafinosa, melecitosa o maltotriosa y en donde el núcleo de trisacárido comprende un grupo éster de sulfato o éster de fosfato y diez grupos éster de ácidos grasos idénticos por trisacárido sustituido o dos grupos éster de sulfato o de fosfato y nueve grupos éster de ácido graso idénticos por trisacárido sustituido, en donde el grupo éster de ácido graso es un éster de un ácido graso lineal, ramificado, saturado o insaturado con una longitud de cadena de 4 a 20 átomos de carbono.
- 45 18. Derivado de trisacárido según la reivindicación 17, en donde el éster de ácido graso es el éster de ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, o ácido araquídico.
19. Derivado de trisacárido según la reivindicación 18, en donde los grupos éster de ácido graso son los ésteres de ácido láurico.
20. Derivado de trisacárido según las reivindicaciones 17-19 para su uso como medicamento.
- 50 21. Procedimiento para la preparación de un derivado según cualquiera de las reivindicaciones 17-19, que comprende las etapas siguientes:

a) proporcionar un trisacárido y disolverlo en un disolvente, en donde el trisacárido es rafinosa, melecitosa o maltotriosa; y

5 b) esterificar todos los grupos OH del trisacárido, en donde al menos uno de los grupos OH del trisacárido se hace reaccionar con un agente aniónico, e donde el trisacárido se esterifica con un promedio de un éster de sulfato o éster de fosfato y diez grupos éster de ácido graso idénticos por trisacárido o con dos grupos éster de sulfato o de fosfato y nueve grupos éster de ácido graso idénticos por trisacárido, en donde el ácido graso es un ácido graso lineal, ramificado, saturado o insaturado con una longitud de cadena de 4 a 20 átomos de carbono.

10

Cromatograma HPLC-ELSD de sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma), sintetizada via piridina .SO₃

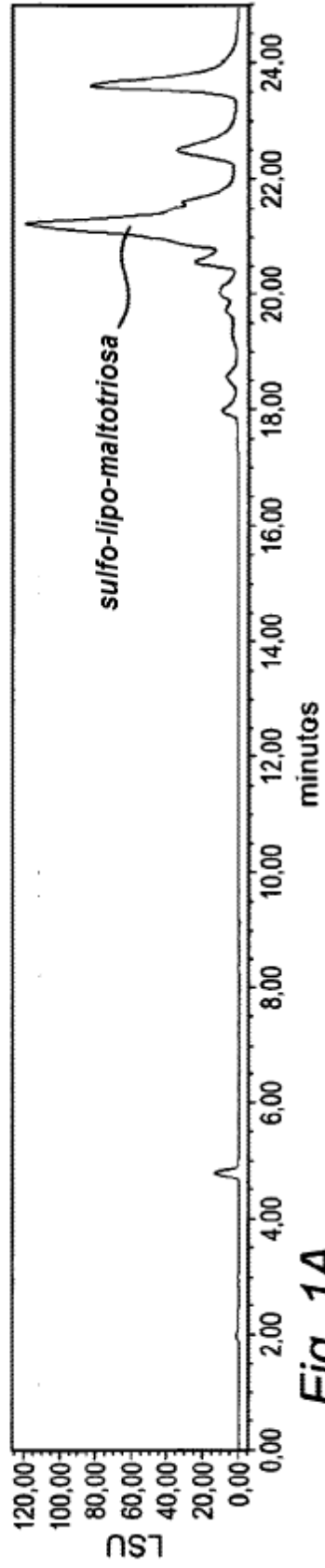


Fig. 1A

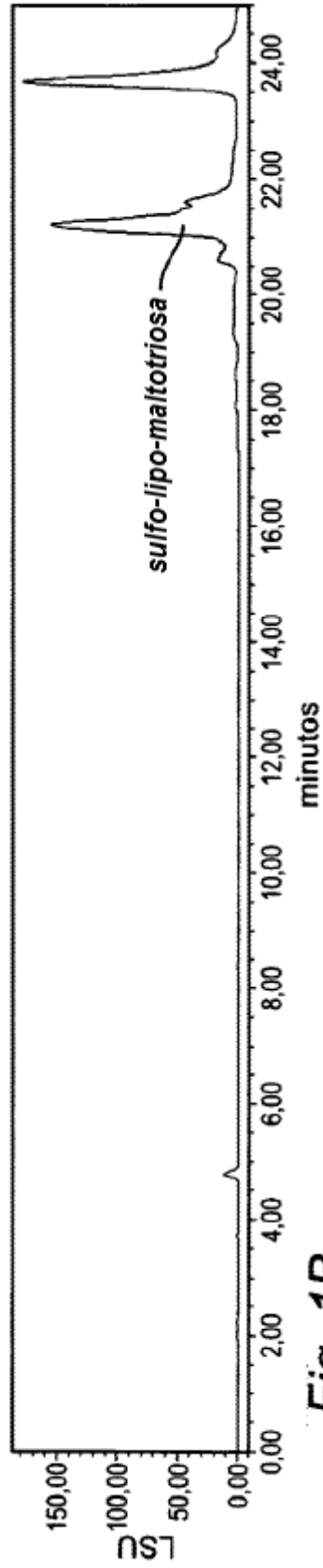


Fig. 1B

Cromatograma HPLC-ELSD de sulfo-lipo-rafínosa (S1L10-Ra), sintetizada via piridina.SO₃

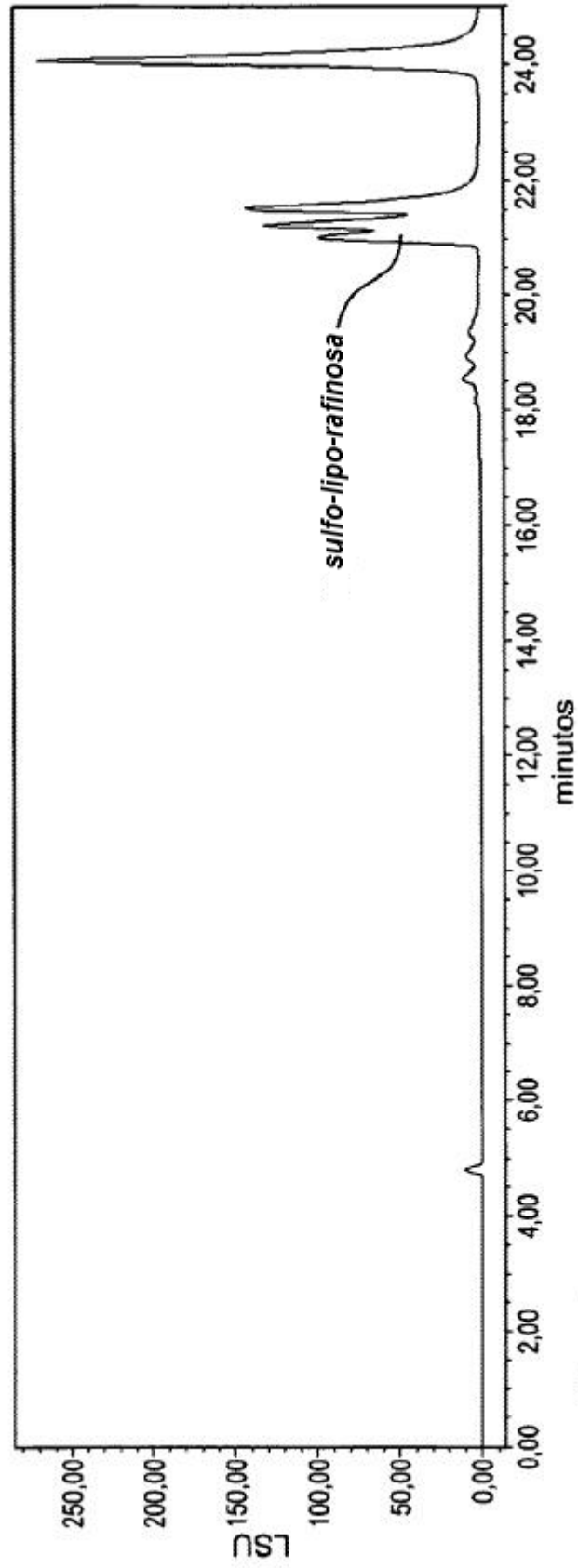


Fig. 2

Cromatograma HPLC-ELSD de lipo-maltotriosa (L11-Ma) y lipo-rafinosa (L11-Ra)

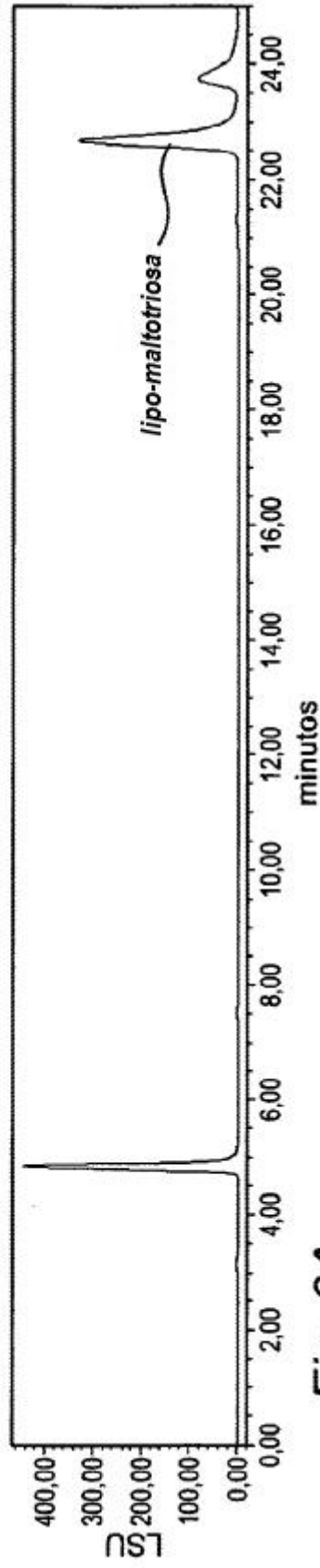


Fig. 3A

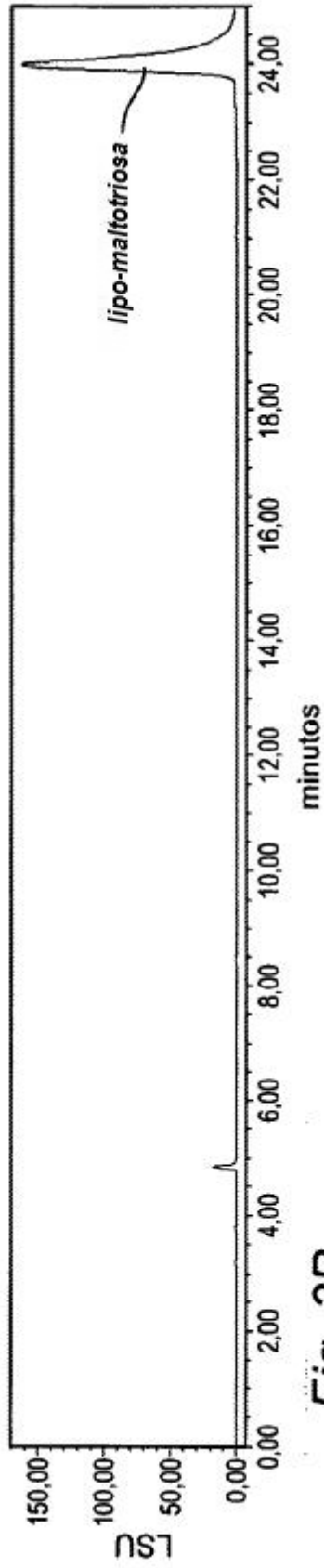
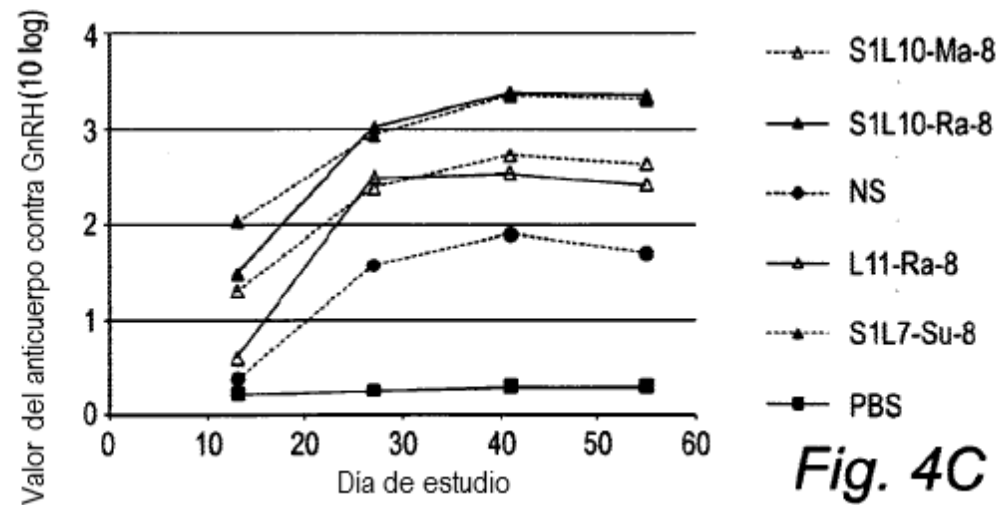
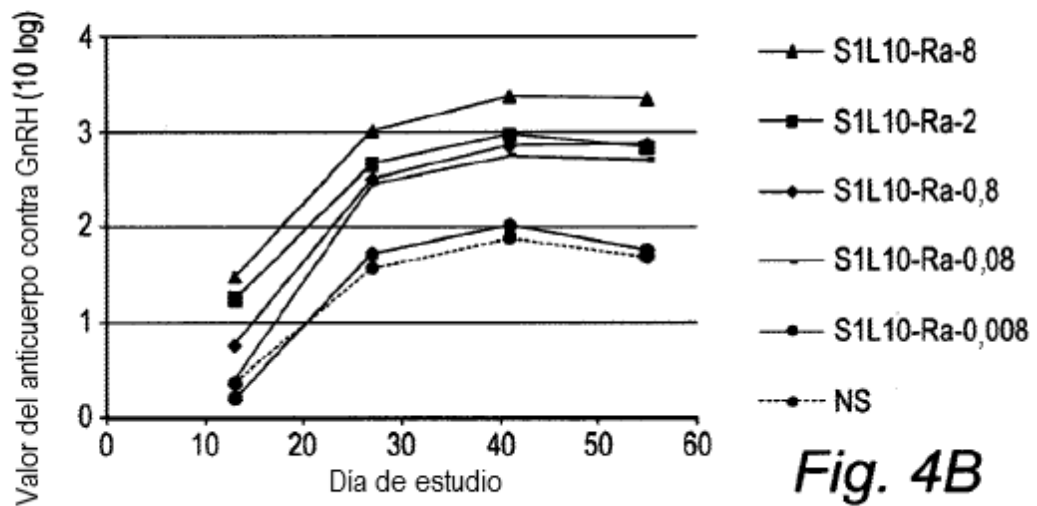
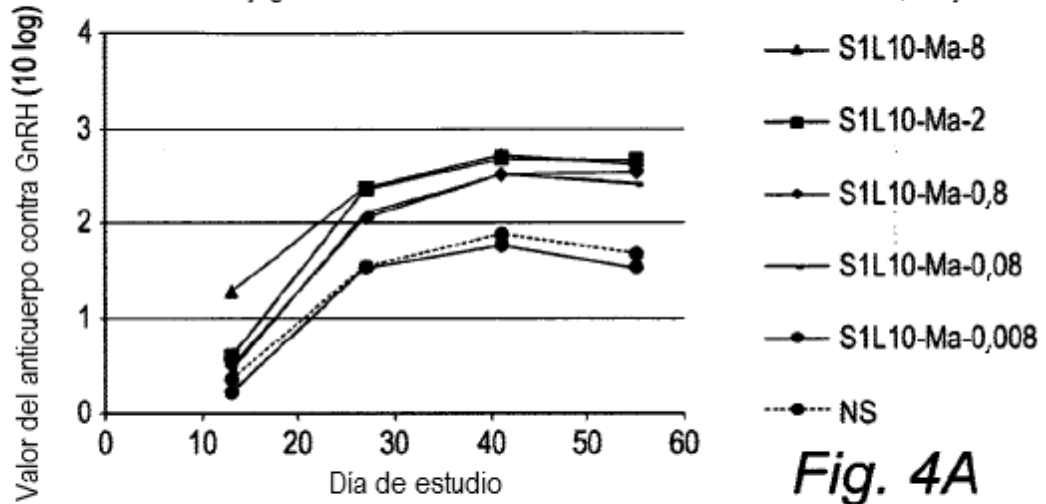


Fig. 3B

Evolución del valor (medio) del anticuerpo contra GnRH de ratas inmunizadas con conjugado GnRH-KLH en emulsión agua en aceite que contiene: A) sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma), B) Sulfo-lipo-rafinosa (S1L10-Ra) y C) compuestos sacáridos en dosis de 0 y 8 mg y referencias PBS sin conjugado GnRH-KLH. Las ratas se inmunizaron los días 0, 14 y 28.



Testosterona sérica (pmol/ml) de ratas inmunizadas con conjugado GnRH-KLH en emulsión aceite en agua que contiene: A) sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma), B) sulfo-lipo-rafínosa (S1L10-Ra) y C) compuestos sacáridos a dosis de 0 y 8 mg y referencias PBS sin conjugado GnRH-KLH. Las ratas se inmunizaron los días 0, 14 y 28.

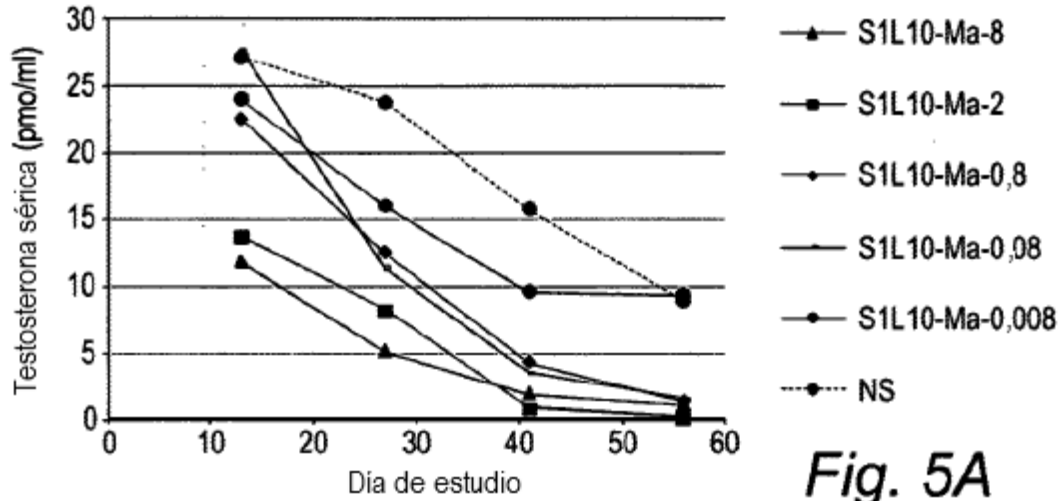


Fig. 5A

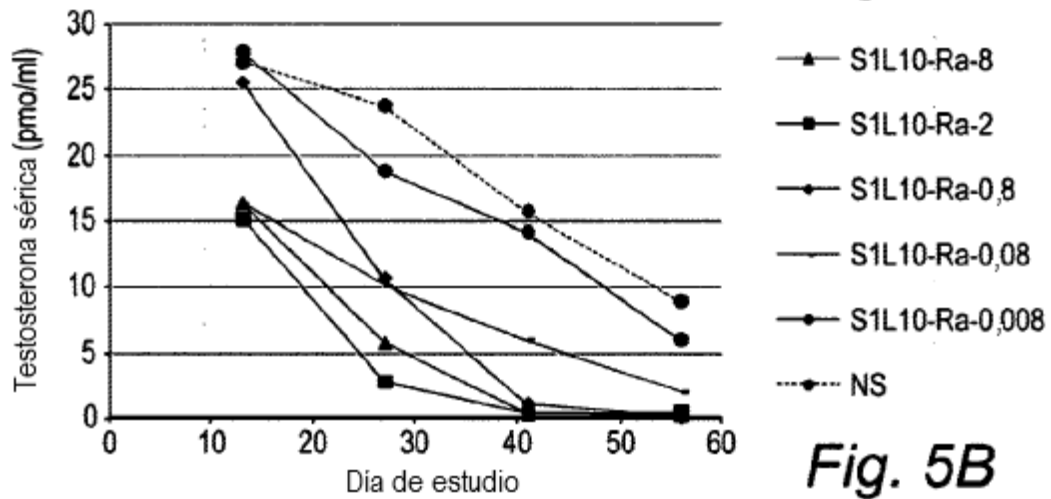


Fig. 5B

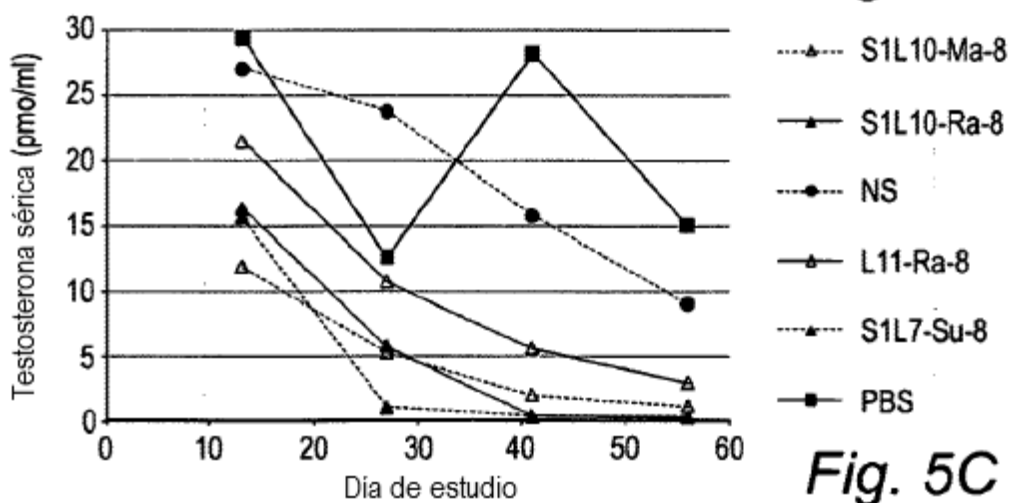
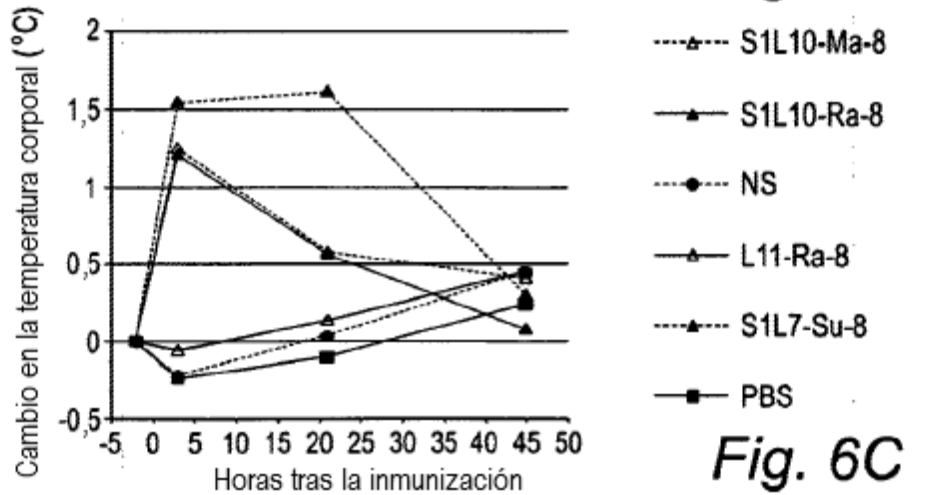
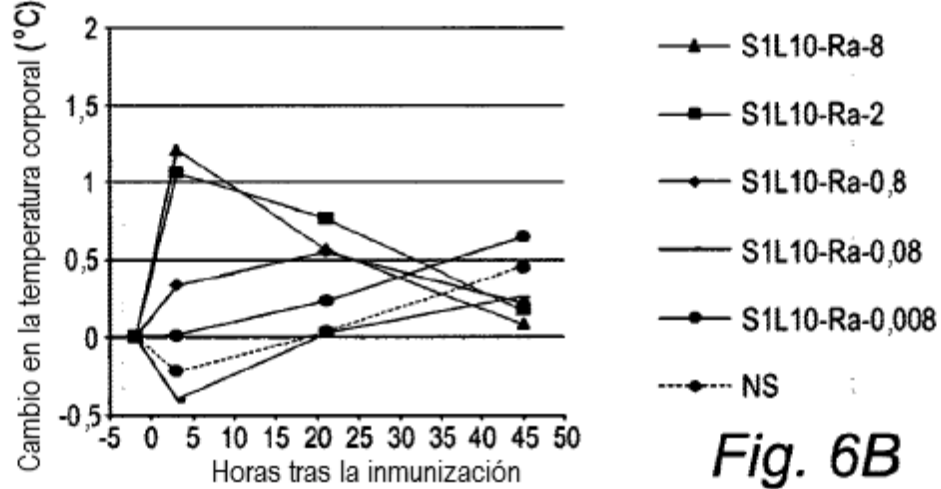
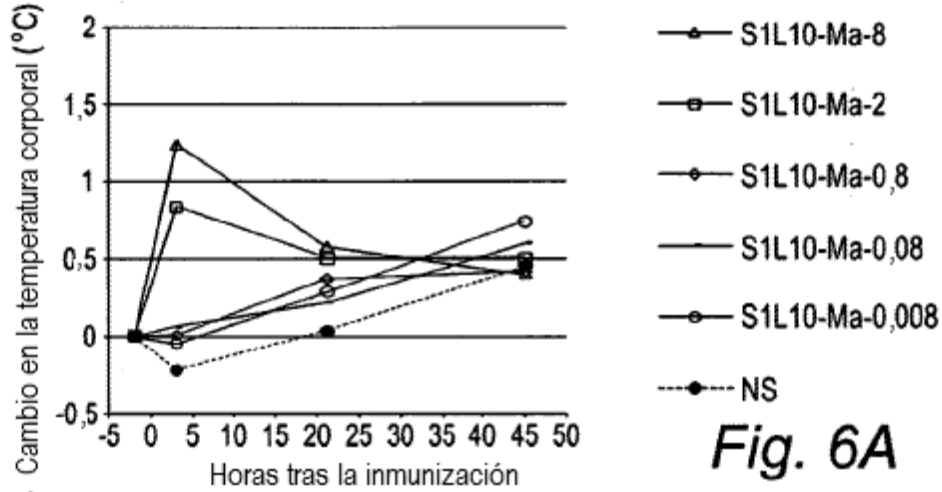


Fig. 5C

Temperatura media corporal de ratas (valor medio de 5 ratas y 3 inmunizaciones) como cambio de valores medidos justo antes de la inmunización (-2h). La temperatura corporal se midió 3 horas, 21 y 45 horas después de la inmunización.

Los gráficos muestran MBT de ratas inmunizadas con conjugado GnRH-KLH en emulsión aceite en agua que contiene: A) sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma), B) sulfo-lipo-rafinosa (S1L10-Ra) y C) compuestos sacáridos en dosis de 0 y 8 mg y referencias PBS sin conjugado GnRH-KLH.



Reacción en el punto de inyección tras la inmunización, tamaño acumulado de puntos de inyección por rata en mm descrito en Materiales y métodos, promediado por grupo de tratamiento y representado como media de 3 inmunizaciones posteriores (días 0, 14 y 28). Reacciones en el punto de inyección de ratas inmunizadas con conjugado GnRH-KLH en emulsión aceite en agua que contiene: A) sulfo-lipo-maltotriosa (S1L10-Ma), B) sulfo-lipo-rafinosa (S1L10-Ra) y C) compuestos sacáridos en dosis de 0 y 8 mg y referencias PBS sin conjugado GnRH-KLH.

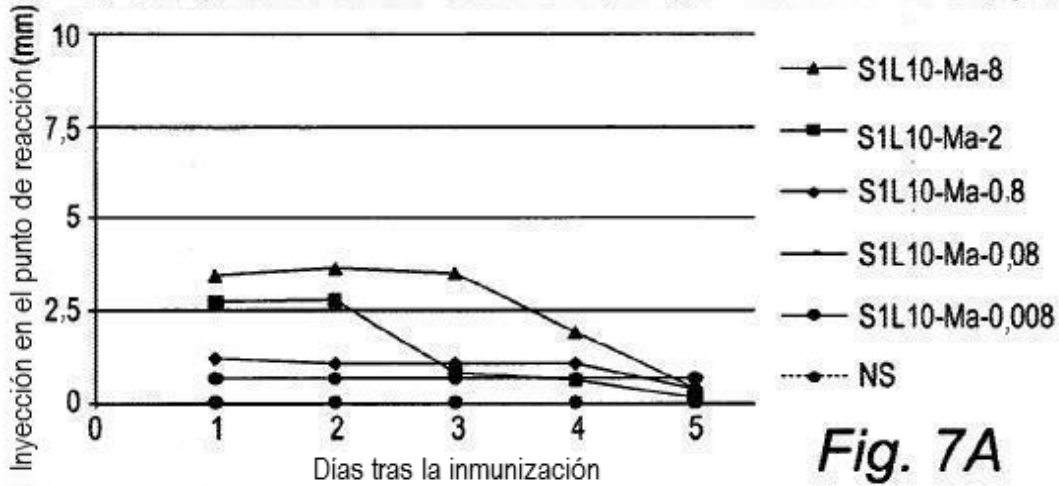


Fig. 7A

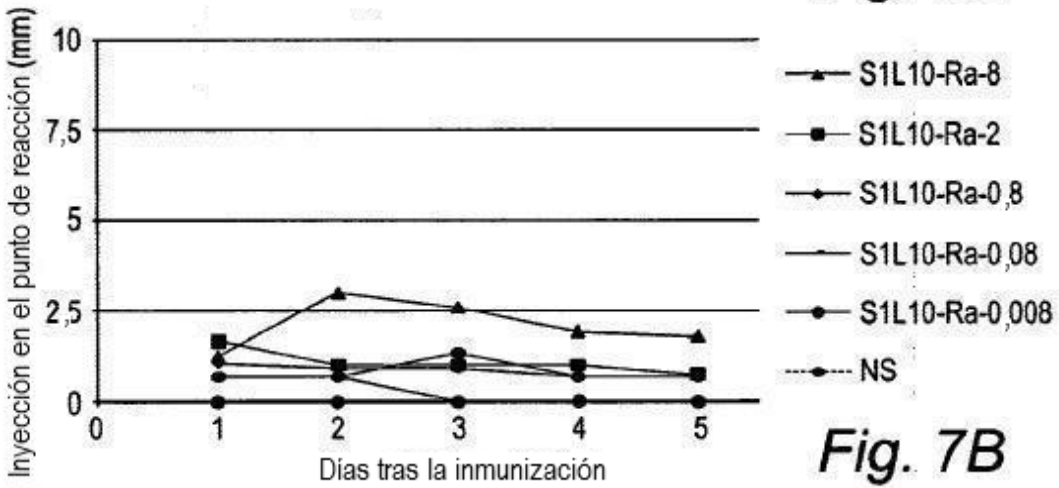


Fig. 7B

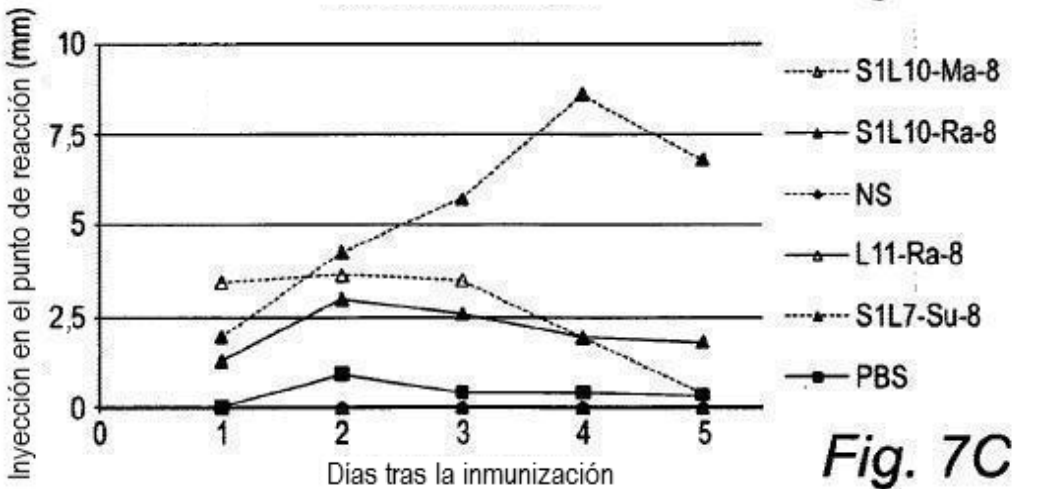


Fig. 7C