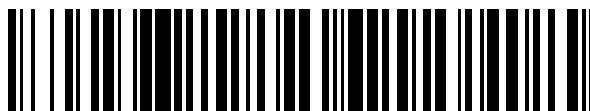


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 596**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2014** **PCT/IB2014/062098**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014** **WO14199297**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2014** **E 14741377 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019** **EP 3007725**

54 Título: **Beta-glicolípidos para uso como adyuvantes**

30 Prioridad:

10.06.2013 IT MI20130949

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

26.03.2020

73 Titular/es:

**CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
(100.0%)**

**National Research Council, Piazzale Aldo Moro 7
00185 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**FONTANA, ANGELO;
MANZO, EMILIANO;
CUTIGNANO, ADELE y
DE PALMA, RAFFAELE**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 750 596 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

Beta-glicolípidos para uso como adyuvantes

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a derivados de beta-glicolípidos, la preparación y uso de los mismos como adyuvantes en vacunas.

La presente invención se origina en el campo farmacéutico y en particular en el campo de los adyuvantes para vacunas.

10 Específicamente, la presente invención se refiere a derivados de beta-glicolípidos y al uso de los mismos como adyuvantes de vacunas, como adecuados para ser administrados conjuntamente con antígenos en vacunas para enfermedades bacterianas y virales.

Estado de la técnica

15 Los adyuvantes son sustancias que, cuando se administran junto con un antígeno, mejoran la respuesta inmune del organismo. Los adyuvantes utilizados en las formulaciones de vacunas tienen como objetivo desencadenar la respuesta inmune administrando la menor cantidad de antígeno posible y, por lo tanto, evitando cualquier posible riesgo derivado de una exposición a dosis masivas de antígeno. El procedimiento de la vacuna, realizado de esta manera, promueve la formación de una memoria inmune capaz de preparar una "respuesta secundaria" por su especificidad y memoria, y permite al organismo reconocer un antígeno extraño con menor eficiencia y rapidez en el curso de exposiciones repetidas. La respuesta secundaria, basada en la presencia de anticuerpos preformados y en una mayor frecuencia de células específicas de un antígeno dado, permite la eliminación rápida del patógeno (del cual se deriva el antígeno) y evita los procesos fisiopatológicos en los que las enfermedades inducidas por el patógeno en sí están basadas. Como tales, los adyuvantes son componentes indispensables en la formulación de vacunas, y de hecho han sido el requisito necesario para la formulación de formulaciones de vacunas modernas. Por ejemplo, están presentes en las formulaciones de vacunas contra la hepatitis A y B, el virus del papiloma humano (VPH), contra Haemophilus influenzae de tipo B, contra infecciones neumocócicas y muchas otras. Los adyuvantes, a pesar de aumentar la duración e intensidad de la respuesta inmune, no causan efectos específicos ni duraderos en el sistema inmune. Adicionalmente, también pueden usarse para otros fines, tales como la reducción de la toxicidad o la mejora de la estabilidad de las vacunas de componentes múltiples. Por estas razones, la selección del adyuvante es a menudo crucial para el uso de vacunas modernas que a menudo contienen sustancias antigénicas naturales o sintéticas para evitar los problemas inducidos por el uso de patógenos atenuados o inactivados.

30 Actualmente, los adyuvantes de las vacunas humanas más comúnmente utilizadas son sales de aluminio, típicamente hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sulfato de potasio y aluminio.

Más recientemente, los principios de la inmunidad innata se han utilizado para desarrollar nuevas clases de adyuvantes que comprenden diversos tipos de emulsiones de aceite o liposomas, productos bacterianos como el lípido A, productos virales y saponinas.

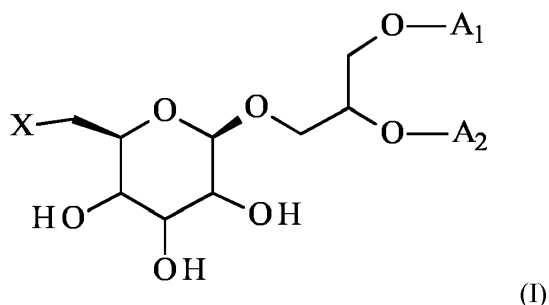
35 Para muchas de estas sustancias, aunque no se conoce el mecanismo exacto de acción, hay evidencia que sugiere que actúan a través del reclutamiento y los efectos de activación de las células del sistema inmune innato, mejorando la capacidad de procesamiento y presentación de antígenos por parte de las células específicamente destinadas a desencadenar la respuesta inmune específica, o incluso mecanismos específicos de focalización o efectos de almacenamiento. Recientemente, se ha determinado un gran impulso para la identificación y el desarrollo de nuevos adyuvantes por la necesidad de reducir la toxicidad en las vacunas que contienen antígenos altamente purificados y vacunas contra enfermedades crónicas, tales como por ejemplo VIH, enfermedades parasitarias y ciertas formas tumorales. Se conocen alfa-sulfoquinovosidas que están presentes en todos los organismos fotosintéticos, tales como algas y las plantas terrestres. (H. DANIEL, et al. 1961. The plant sulfolipid. Identification of 6-sulfo quinovose, JACS, 83, 1765-1766; M. LEPAGEH, et al. 1961. The Plant Sulfolipid. Isolation and Properties of Sulfoglycosyl Glycerol, JACS, 83, 157-159; M. MIYANO, et al. 1962. The Plant Sulfolipid. VI. Configuration of the Glycerol Moiety, JACS, 84, 57-58; L. Y. Okaya, 1964. The plant sulfolipid: a crystallographic study. Acta Cryst. 17, 1276-1282; Frank D. et al., The Lipid Handbook 3rd Edition, CRC Press, Boca Raton, 2007, pp. 123-128). Irina et al. 2004. Morphological and immunological characterization of immunostimulatory complexes based on glycoglycerolipids from Laminaria japonica. Acta Biochimica Polonica, 51(1): 263-272 divulga sulfoquinovosidas con configuración alfa para uso como adyuvantes.

50 Actualmente, por lo tanto, existe una gran necesidad de sustancias fisiológicamente aceptables que encuentren aplicación como adyuvantes de vacunas.

Es un objeto de la presente invención encontrar sustancias que sean adecuadas como adyuvantes farmacéuticamente aceptables en formulaciones de vacunas.

Resumen de la invención

Dicho objeto se logra mediante un derivado de beta-glicolípido que tiene la fórmula (I):



una sal o un complejo metálico del mismo,

en donde

- 5 el enlace acetálico del carbono anomérico tiene una configuración β (beta),

A_1 y A_2 son, independientemente entre sí, alquilo C_1 - C_{30} lineal o ramificado saturado o monoinsaturado, o son un acilo $-(CO)R_1$ and $-(CO)R_2$ respectivamente donde R_1 y R_2 son, independientemente uno del otro, saturado o alquilo C_1 - C_{29} lineal o ramificado monoinsaturado, y

X es un grupo sulfónico ($-SO_3H$),

- 10 para uso como adyuvante de vacuna.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un producto que contiene al menos un derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) y una vacuna como preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial para prevenir o tratar infecciones bacterianas y/o virales. En otro aspecto, la presente invención proporciona un producto que contiene al menos un derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) para uso en el tratamiento de etapas patológicas conectadas a una alteración de la respuesta inmune.

- 15

En otro aspecto, la presente invención proporciona un derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) para uso en la inmunización de un animal, opcionalmente en la administración conjunta con un antígeno contra el cual el animal tiene que inmunizarse.

Breve descripción de los dibujos

- 20 Las características y ventajas de la presente invención serán claras a partir de la siguiente descripción detallada, de ejemplos de trabajo proporcionados con fines ilustrativos y no limitativos, y de las Figuras adjuntas, en las que:

La Figura 1 muestra la estructura de algunos derivados de beta-glicolípidos de fórmula (I), obtenidos por síntesis química y analizados en sistemas in vitro e in vivo;

- 25 La Figura 2 muestra un esquema de síntesis preferido para la preparación de derivados de beta-glicolípidos de fórmula (I), donde R_1 = acilo 1, tal como palmitoilo, oleoilo, estearoilo, miristoilo, capriloilo, vaccenoilo o lauroilo, y R_2 = acilo 2, tal como palmitoilo, oleoilo, estearoilo, miristoilo, capiloilo, vaccenoilo o lauroilo;

- 30 La Figura 3 muestra una comparación en la expresión en células dendríticas humanas de la molécula HLA de Clase II coestimulada con TNF y mediante una mezcla de alfa-sulfoquinovosidos sintetizados en el modelo de compuestos naturales presentes en organismos fotosintéticos (Figura 3A) y mediante una mezcla de beta-sulfoquinovosidas sintéticas que tienen la fórmula general (I) (Figura 3B). La expresión de HLA de Clase II caracteriza la maduración de estas células y las hace capaces de desencadenar la respuesta inmune de manera efectiva. Los resultados muestran que los alfa-sulfoquinovosidos naturales son ineficaces para estimular las células dendríticas, mientras que los beta-sulfoquinovosidos determinan una variación profunda en el grado de maduración. El mismo resultado se logra con la coestimulación con lipopolisacárido en lugar de TNF o con la estimulación con las dos clases de sulfolípidos; (◇) Control; (⚡) Células dendríticas humanas estimuladas con TNF; (☆) Células dendríticas humanas coestimuladas con TNF y alfa-sulfoquinovosido; (★) Células dendríticas humanas coestimuladas con TNF y beta-sulfoquinovosido;

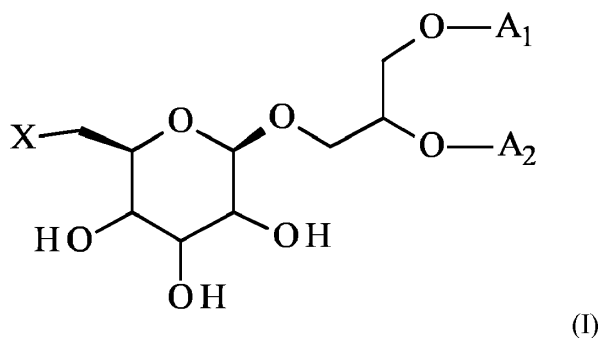
- 35 La Figura 4 muestra la interferencia de los beta-sulfoquinovosidos (en particular del compuesto preferido beta-sulfoquinovosil dipalmitoil-glicerol) en la expresión en células dendríticas humanas de la molécula HLA de Clase II estimulada por TNF y lipopolisacárido (LPS) (control positivo). La respuesta muestra la ausencia de interacción entre las diferentes clases de moléculas; (◇) control de células dendríticas humanas; (⚡) Células dendríticas humanas coestimuladas con TNF; (☆) Células dendríticas humanas coestimuladas con lipopolisacárido; (★) Células dendríticas humanas coestimuladas con TNF y lipopolisacárido y beta-sulfoquinovosil-di-palmitoil-glicerol;
- 40

La Figura 5 muestra el efecto dependiente de la dosis del compuesto preferido beta-sulfoquinovosil dipalmitoil-glicerol, sobre células dendríticas obtenidas de sangre periférica de donantes normales; Curva discontinua: control de células dendríticas humanas; Curvas sólidas: células dendríticas humanas estimuladas con concentraciones cada vez mayores de 10 ng/ml a 100 g/ml de beta-sulfoquinovosil-di-palmitoil-glicerol;

- 5 La Figura 6 muestra el efecto sobre la producción de interleucina 12 (IL12) a partir de células dendríticas estimuladas con: Fig. 6A = mezcla de glucolípidos naturales que contienen alfa-sulfoquinovosidos y galactolípidos purificados de microalgas; Fig. 6B = mezcla de sales de sodio de beta-glicolípidos de fórmula (I); Fig. 6C = mezcla 1:1 de sales de sodio de alfa-sulfoquinovosil-diestearoil glicerol y alfa-sulfoquinovosil-dipalmitoil glicerol; Fig. 6D = mezcla de sales de sodio de beta-sulfoquinovosidos de fórmula (I); Fig. 6E = mezcla 1:1 de sales de sodio de beta-sulfoquinovosil diestearoil-glicerol y beta-sulfoquinovosil dipalmitoil-glicerol; Fig. 6F = sal sódica de beta-sulfoquinovosil dipalmitoil-glicerol puro. - La Figura 7 muestra los valores del título de anticuerpo específico después de la inmunización in vivo de ratones inyectados con ovoalbúmina más el compuesto preferido beta-sulfoquinovosil dipalmitoil-glicerol (Sustancia). El experimento se realiza en comparación con animales inmunizados con ovoalbúmina y dos adyuvantes de grado comercial de nueva generación. Freund (emulsión acuosa de gotas de aceite y bacilos tuberculosos muertos) y TiterMax (emulsión oleosa que contiene escualeno). DMSO solo, utilizado como vehículo para la administración de beta-sulfoquinovosil dipalmitoil-glicerol, es el control negativo. Los valores específicos de IgG muestran un efecto adyuvante del beta-sulfoquinovosil dipalmitoil-glicerol, comparable al de los dos adyuvantes actualmente utilizados para la formulación de vacunas.

Descripción detallada de la invención

- 20 Por lo tanto, el objeto de la presente invención es un derivado de beta-glicolípido que tiene la fórmula (I):



una sal o un complejo metálico del mismo,

en donde

el enlace acetálico del carbono anomérico tiene una configuración β (beta),

- 25 A_1 y A_2 son, independientemente entre sí, alquilo C_1 - C_{30} lineal o ramificado saturado o monoinsaturado, o son un acilo $-(CO)R_1$ y $-(CO)R_2$ respectivamente donde R_1 y R_2 son, independientemente uno del otro, alquilo C_1 - C_{29} lineal o ramificado, saturado o monoinsaturado, y

X es un grupo sulfónico ($-SO_3H$),

para uso como adyuvante de vacuna.

- 30 La parte de carbohidrato deriva de una aldohexosa, o un análogo estructural sintético, con una configuración beta del carbono anomérico.

De hecho, sorprendentemente se ha encontrado que estos compuestos mejoran y/o modulan la respuesta inmune después de la administración de un antígeno al organismo.

- 35 Los beta-sulfoquinovosidos entre los compuestos de fórmula (I) solo se pueden obtener por síntesis química, ya que en la naturaleza solo hay alfa-sulfoquinovosidos que tienen una configuración alfa del carbono anomérico del azúcar y los procesos de extracción en la actualidad no permiten aislarlos como compuestos puros, sino solo como mezclas.

Preferiblemente, A_1 y A_2 o R_1 y R_2 son independientemente entre sí alquilo C_6 - C_{24} lineal saturado o monoinsaturado; por ejemplo, A_1 y A_2 o R_1 y R_2 son, independientemente uno del otro, unidades estructurales de ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico o ácido lignocérico.

- 40 Más preferiblemente, A_1 y A_2 o R_1 y R_2 son independientemente uno de otro alquilo C_{14} - C_{18} lineal saturado o monoinsaturado.

En realizaciones preferidas, A_1 y A_2 son un acil $-(CO)R_1$ y un acil $-(CO)R_2$ respectivamente, donde R_1 y R_2 son independientemente uno del otro una unidad estructural de ácido pentadecanoico, ácido palmítico, ácido heptadecanoico o ácido esteárico.

En otras realizaciones, el derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) está en forma de una sal del mismo, en donde

5 X es $-SO_3Na$ o $-SO_3K$.

En realizaciones adicionales, el derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) está en forma de un complejo del mismo con aluminio.

10 En algunos aspectos, la invención proporciona un adyuvante de vacuna que comprende al menos un derivado de beta-glicolípido de fórmula (I), una sal o complejo farmacéuticamente aceptable del mismo. Ejemplos de sal farmacéuticamente aceptable del derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) comprenden sales de un catión monovalente tal como sodio o potasio.

Los compuestos particularmente preferidos de fórmula (I) son:

sal de sodio o potasio de 1,2-diacil-3-[1'β- (6-sulfo)-quinovosil]-glicerol,

1,2-diestearoil-3-[1'β- (6-sulfo)-quinovosil]-glicerol,

15 1,2-dipalmitoil-3-[1'β- (6-sulfo)-quinovosil]-glicerol,

1-palmitoil-2-estearoil-3-[1'β- (6-sulfo)-quinovosil]-glicerol, y

1-estearoil-2-palmitoil-3-[1'β- (6-sulfo)-quinovosil]-glicerol.

20 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) y un antígeno o vacuna como preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial para prevenir o tratar enfermedades infecciosas.

Típicamente, los compuestos de la invención encuentran aplicación en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades infecciosas de tipo bacteriano, viral o mixto.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del derivado beta-glicolípido de fórmula (I) como adyuvante de vacuna.

25 De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención proporciona un derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) para uso en el tratamiento o prevención de etapas patológicas conectadas a una alteración de la respuesta inmune.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención proporciona un derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) para uso en la inmunización de un mamífero, opcionalmente en la administración conjunta con un antígeno contra el cual el mamífero tiene que inmunizarse.

30 Los compuestos de la invención, o las composiciones farmacéuticas que los comprenden, encuentran aplicación en particular en el tratamiento de humanos.

Se descubrió además que el derivado beta-glicolípido de fórmula (I) estimula la producción de grupos específicos de citocinas por los monocitos circulantes de la sangre periférica. En particular, el derivado beta-glicolípido de fórmula (I) es capaz de aumentar la producción de interleucinas (por ejemplo, IL-12) y sostener una respuesta inmune específica.

35 Como quedará claro a partir de los siguientes ejemplos, a diferencia del derivado de beta-glicolípidos de fórmula (I), los glicolípidos naturales con una configuración alfa de carbono anomérico de azúcar, incluidos los alfa-sulfoquinovósidos naturales obtenidos de algas y plantas terrestres, no tienen actividad adyuvante (Figura 3).

40 De acuerdo con este aspecto, la presente invención proporciona además un método para aumentar la producción de inmunoglobulinas y linfocinas, y mantener una respuesta inmune específica que administra a un organismo una cantidad efectiva de al menos un derivado de beta-glicolípido de fórmula (I).

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) para uso en el tratamiento o prevención de infecciones bacterianas o virales.

45 La composición farmacéutica de la presente invención incluye cualquier composición producida mezclando un derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal composición es adecuada para uso farmacéutico en un animal o en humanos. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más derivados de beta-glicolípidos de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones pueden presentarse convenientemente en una forma de dosis única y prepararse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica farmacéutica.

Una composición farmacéutica puede contener opcionalmente otros ingredientes activos, típicamente una o más vacunas.

- 5 El término "vehículo" incluye cualquier excipiente o diluyente, con el cual se administra un glicolípido de la invención.

Cualquier vehículo o excipiente adecuado para la preparación deseada para administración se contempla para uso con el derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) descrito anteriormente. El vehículo puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, oral o parenteral (incluida la administración intravenosa). En la preparación de las composiciones para la forma de dosificación oral, es posible usar cualquier medio farmacéutico habitual, tal como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservantes, agentes colorantes y similares en el caso de preparaciones orales líquidas, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones; o portadores, tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, agentes lubricantes, agentes aglutinantes, agentes de desagregación y similares en el caso de preparaciones orales sólidas, tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y tabletas duras y blandas, prefiriéndose las preparaciones orales sólidas con respecto a las preparaciones líquidas.

15

En algunas realizaciones, el derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) de la presente invención puede usarse con otro compuesto que tenga la misma o diferente actividad para preparar una composición farmacéutica.

En ciertas realizaciones, el derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) de la presente invención puede combinarse con una vacuna en una mezcla con un vehículo y/o excipiente farmacéutico adecuado de acuerdo con las técnicas de fabricación convencionales de compuestos farmacéuticos.

20

Las composiciones incluyen composiciones adecuadas para administración parenteral que incluyen administración subcutánea, intramuscular e intravenosa, administración pulmonar, nasal, rectal, tópica u oral.

Una ruta de administración de ejemplo es la ruta parenteral. Por ejemplo, el derivado de beta-glicolípido de fórmula (I), o una composición farmacéutica que lo contiene como ingrediente activo, puede administrarse por vía intramuscular, intravenosa, intracutánea o subcutánea. Una composición o preparación farmacéutica para administrar por vía parenteral puede formularse disolviendo, suspendiendo o emulsionando al menos un derivado de beta-glicolípido de fórmula (I), en un disolvente acuoso o a base de aceite adecuado, tal como por ejemplo un aceite vegetal, un glicérido con un ácido graso, un éster de un ácido graso superior utilizando técnicas farmacéuticas comúnmente utilizadas. La composición o preparación farmacéutica para uso parenteral puede contener al menos un excipiente o vehículo, tal como, por ejemplo, un agente solubilizante, un agente de suspensión, un agente emulsionante, un agente estabilizante y un conservante.

25

En ciertas realizaciones, tales composiciones y preparaciones pueden contener al menos 0.1% de al menos un derivado de beta-glicolípido de fórmula (I). La proporción de glicolípido en estas composiciones puede, por supuesto, variar y puede ser convenientemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 60% en peso unitario. La cantidad de derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) en tales composiciones profilácticas o terapéuticamente útiles es tal que se logrará una dosificación terapéutica o profilácticamente efectiva.

35

La administración de las composiciones se lleva a cabo siguiendo un protocolo y una dosificación suficientes para determinar o aumentar la respuesta inmune en el sujeto tratado. En ciertas realizaciones, en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, el derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) se formula generalmente en unidades de dosificación. La unidad de dosificación puede contener de 0.1 a 1000 mg de un derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) y por unidad de dosificación para la administración diaria. En algunas realizaciones, las cantidades efectivas para la formulación dependerán de la gravedad de la enfermedad, trastorno o condición, de la terapia previa, de la salud del individuo y de la respuesta al fármaco. En algunas realizaciones, la dosis está dentro del rango de 0.001% en peso a 60% en peso de la formulación. Cuando se usa en combinación con uno o más de otros ingredientes activos, típicamente vacunas, el derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) de la presente invención y los otros ingredientes activos se pueden usar en dosis más pequeñas que cuando se usa solo en cada uno. Con respecto a las formulaciones relativas a cualquier variedad de ruta de administración, se describen métodos adecuados y formulaciones adecuadas para la administración de fármacos en Remington's Pharmaceutical Sciences, XVII Edizione, Gennaro et al. Ed., Mack Publishing Co., 1985, y Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro AR ed. XX Edition, 2000, Williams & Wilkins PA, EE. UU., Y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, XXI Edition, Lippincott Williams & Wilkins Ed., 2005; y en Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, VIII Edición. Lippincott Williams & Wilkins Ed., 2005.

40

La dosificación de administración del derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) de la invención varía dependiendo de la forma y vía de administración y del tipo de enfermedad para prevenir o tratar.

A modo de ejemplo, en el caso de la administración parenteral, la dosificación diaria del derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) puede ser de 0.1 a 100 mg/kg de peso corporal.

55

Definiciones

Todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona de experiencia normal en la técnica, a menos que se indique otra cosa.

- 5 Los siguientes términos, utilizados en la especificación y en las reivindicaciones de la presente solicitud, tienen el significado especificado a continuación, a menos que se defina otra cosa.

Dentro del alcance de la presente invención, el término "alquilo" significa un grupo hidrocarburo saturado o monoinsaturado, lineal o ramificado, que contiene de 1 a 30 carbonos. En ciertas realizaciones, alquilo se refiere, en particular, a cadenas que tienen de 6 a 24 carbonos. Ejemplos de tal grupo incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, pentilo, eicosilo.

- 10 Cualquier grupo alquilo puede estar no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes.

El término "acilo" denota un grupo funcional correspondiente a un ácido carboxílico liberado de su grupo -OH.

El término "aldohexosa" significa un azúcar que tiene seis carbonos con la función aldehído en C-1.

- 15 Dentro del alcance de la presente invención, el término "vacunas" significa sustancias que proporcionan soporte y mejora de la respuesta inmune de un medicamento contra una enfermedad infecciosa. Tal medicación puede contener organismos inactivados por medios químicos o físicos mientras mantiene propiedades inmunogénicas apropiadas, organismos vivos que usualmente están libres de virulencia o que han sido tratados para mitigar su virulencia mientras mantienen propiedades inmunogénicas adecuadas, antígenos extraídos o secretados por agentes infecciosos, antígenos producidos por tecnología de ADN recombinante, un vector recombinante que produce antígenos in vivo en el huésped vacunado, plásmido de ADN, antígenos producidos por síntesis in vitro.

- 20 En una realización, el derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) de la invención se prepara de acuerdo con el esquema de síntesis descrito en la Figura 2 a partir de D-glucosa peracetilada.

- 25 Después de la desacetilación selectiva de la posición anomérica con bencilamina, el acoplamiento con glicerol 1,2-O-isopropilideno a través de la metodología del tricloroacetimidato conduce al derivado de glucolil-isopropilideno con rendimientos cercanos al 80%. Los grupos acetato, en particular el que está en la posición 2, determinan la alta estereoselectividad de la reacción con la orientación β del enlace glucosídico recién formado, como se muestra por el valor de $H-1'$ ($\delta = 4.51$, $J = 7.8$ Hz) en el espectro 1H -RMN.

- 30 Después de la hidrólisis selectiva de la unidad estructural isopropilideno por hexahidrato de nitrato de zinc en acetonitrilo, la condensación con uno o dos equivalentes de ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido esteárico o palmítico) produce alternativamente los derivados mono o di-acil. De esta manera, el método permite una introducción gradual de diferentes sustituyentes en las posiciones de glicerol. Dado que el hidroxilo primario se promueve ampliamente en la reacción de acoplamiento con una cantidad equimolar de reactivo, la secuencia de introducción permite controlar el tipo de sustitución en las posiciones sn-1 y sn-2 (sn = sustitución nucleofílica) de glicerol, estableciendo así la regiospecificidad de la sustitución en glicoglicerol sintético.

- 35 La eliminación selectiva de los grupos acetilo en la glucopiranososa con monohidrato de hidrazina produce los beta-glucosil-diacilgliceroles. En particular, utilizando 2.4 moles de hidrazina por acetilo y una temperatura inferior a 45 °C, la reacción conduce a los beta-glucosil-diacetilgliceroles con rendimientos superiores al 88%.

- 40 Después de la tritilación en el alcohol primario de azúcar (compuestos 13-15, 70%) y la acetilación de funciones secundarias (89%), se obtiene la introducción de dos grupos protectores ortogonales en grupos hidroxilo. La eliminación de tritilo (82%), seguida de la activación de la función hidroxilo primaria por tosilación (80%), permite introducir el enlace azufre-carbono a través de la formación con altos rendimientos (93%) de un tioacetato. La función tioéster de este último compuesto se oxida fácilmente al sulfonato correspondiente (65%) que, por hidrólisis selectiva con hidrazina, conduce a los beta-sulfoquinovosil diacilgliceroles, entre los compuestos preferidos beta-sulfoquinovosil-dipalmitoilglicerol (86%). La posibilidad de introducir diferentes ácidos orgánicos en el glicerol permite la aplicación de este esquema sintético a todos los derivados de beta-glicolípidos de fórmula (I). Adicionalmente, la
- 45 secuencia sintética de la Figura 2 también permite preparar derivados de diversas aldohexosas (por ejemplo, alosa, altrosa, manosa, gulosa y galactosa), sustituidas en la posición 6 con fosfato (H_2PO_4), fosfonato (H_2PO_3), sulfato (HSO_4), grupos sulfonato (HSO_3). Partiendo de 1,2-O-isopropilideno que tiene quiralidad conocida, el esquema sintético de la Figura 2 también permite la síntesis de sulfo- o fosfo-glicosil-1,2-diacil-gliceroles enantioméricamente puros.

- 50 Debe entenderse que también se describen de manera similar todas las combinaciones posibles de los aspectos preferidos del proceso como se informa aquí anteriormente.

Como se ilustra en las Figuras 3-7, los derivados de beta-glicolípidos de fórmula (I), en forma pura o en mezcla, son capaces de actuar sobre el sistema inmune desencadenando la respuesta celular in vitro e in vivo activando líneas celulares especializadas, generalmente conocidas como células presentadoras de antígeno (APC).

En particular, el proceso involucra células dendríticas que, presentando los antígenos para los linfocitos T vírgenes, desencadenan la respuesta inmune de *novo*. Las células dendríticas pueden existir esencialmente en un estado "inactivado" (células inmaduras) y "activado" (células maduras). La maduración implica el aumento en la producción de niveles de moléculas desencadenantes, como las citocinas específicas, capaces de ajustar la respuesta de las células T, y transforma las células para que puedan internalizar antígenos exógenos y procesarlos para la presentación posterior mediada por moléculas de MHC de clase II.

De acuerdo con estos mecanismos, los derivados de beta-glicolípidos de fórmula (I), en una mezcla o en forma pura, tal como por ejemplo beta-sulfoquinovosil-di-palmitoil-glicerol, son capaces de causar la maduración de las células dendríticas, como se muestra por el aumento en la expresión de las moléculas de MHC de clase II (Figuras 3-5) y por el aumento en la producción de citocinas, tales como por ejemplo la Interleucina 12 (Figura 6).

Por el contrario, como se ve en particular en la Figura 3, los compuestos naturales con configuración alfa del carbono anomérico del azúcar, incluidos los alfa-sulfoquinovósidos naturales obtenidos por algas y plantas terrestres, no poseen ninguna capacidad de estimular las células dendríticas.

La maduración inducida por los derivados beta de la presente invención conduce a un aumento en la inmunización y a una reducción en la capacidad de capturar y procesar el antígeno.

Como se ejemplifica con el compuesto preferido beta-sulfoquinovosil dipalmitoil glicerol, los derivados de beta-glicolípidos de fórmula (I) también se han usado como adyuvantes para inmunizar con ovalbúmina 4 grupos de ratones hembra C56 BL/6 ($n = 5$) (Figura 7). De acuerdo con el protocolo de inmunización convencional, se coadministran 50 μg de la proteína junto con 0.5 mg de beta-sulfoquinovosil dipalmitoil glicerol en DMSO. La capacidad inmunogénica del producto también se verificó comparando la respuesta de los ratones a la ovoalbúmina coadministrada con dos adyuvantes de última generación (Titermax y Freund) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para Titermax y Freund. Se usó un cuarto grupo de ratones como control y se trató con DMSO solo. Los ratones fueron sometidos a sangrado retroorbital a los 7, 15 y 21 días y los niveles de IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 se midieron por ELISA. La producción de inmunoglobulinas específicas de OVA, en particular de IgG1, fue comparable entre los dos adyuvantes y el betasulfoquinovosil dipalmitoil glicerol, lo que demuestra que los compuestos de la invención tienen propiedades inmunogénicas y pueden usarse como adyuvantes de vacunas.

Debe entenderse que también se describen todas las combinaciones posibles de los aspectos preferidos de los compuestos de fórmula (I) de la invención descritos anteriormente y, por lo tanto, se prefieren de manera similar.

Debe entenderse además que todos los aspectos identificados como preferidos y ventajosos para los compuestos de fórmula (I) también deben considerarse igualmente preferidos y ventajosos para la preparación y uso de los mismos.

Ejemplos de trabajo de la presente invención se proporcionan a continuación con fines ilustrativos.

Ejemplos

Método general para sintetizar 1,2-o-diacil-3-[1'- β -glucosil]-glicerol: compuestos útiles para la síntesis de derivados de beta-glicolípidos de fórmula (I) (véase Figura 2)

1,2-O-isopropilideno glicerol: se añaden 2,2-dimetoxipropano (4 ml) y ácido paratoluenosulfónico (300 mg) al glicerol (2.0 g, 0.022 mol) disuelto en N,N-dimetilformamida (4 ml). Después de agitar durante la noche a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se extrae con hielo y diclorometano y la fase orgánica se purifica en una columna de sílica gel usando un gradiente de éter de petróleo y éter etílico para obtener el 1,2-O-isopropilideno glicerol (2.0 g, 0.015 mol, 68%).

Glucosa peracetilada: la D-glucosa (1.00 g, 0.0056 mol) se disuelve en piridina (13 ml) y anhídrido acético (5 ml). Después de 3 horas, la mezcla de reacción se extrae con cloroformo y agua y la fase orgánica se purifica en una columna de sílica gel usando un gradiente de éter de petróleo y éter etílico para obtener la glucosa peracetilada (2.10 g, 0.0054 mol, 94%). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 6.32 (1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-1', α -anómero), 5.71 (1H, d, $J = 8.18$ Hz, H-1', β -anómero), 5.46 (1H, dd, $J = 9.7, 9.7$ Hz, H-4'), 5.12 (1H, H-2'), 5.11 (1H, H-3'), 4.29 (1H, m, H-5'), 4.26 (1H, dd, $J = 6.37, 11.1$ Hz, H-6'a), 4.11 (1H, dd, $J = 6.7, 11.1$ Hz, H-6'b), 2.17-2.00 (15H, -COCH₃); HRESIMS m/z 413.1064 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (413.1060 calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}\text{Na}$).

Glucosa 2,3,4,6-tetraacetilada: se añaden 1.5 equivalentes de bencilamina a la glucosa peracetilada (1.00 g, 0.0026 mol) en tetrahidrofurano (10 ml). Después de una noche a temperatura ambiente y después de la extracción con agua y cloroformo, la fase orgánica se purifica en una columna de sílica gel usando un gradiente de éter de petróleo y éter etílico. Se obtienen 0.66 g de glucosa 2,3,4,6-tetraacetilada (0.0019 mol, 73%). HRESIMS m/z 371.0957 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (371.0954 calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_{10}\text{Na}$).

Glucosa 2,3,4,6-tetraacetil-1-tricloroacetimidato: la glucosa 2,3,4,6-tetraacetilada (0.66 g, 0.0019 mol) se disuelve en 6 ml de diclorometano anhidro. La mezcla se complementa luego con 10 equivalentes de tricloroacetinitrilo y 0.2 equivalentes de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU). Después de agitar durante 2 horas a 0 °C en tamices moleculares de 3Å, la mezcla de reacción se filtra y se purifica en una columna de sílica gel usando un gradiente de

éter de petróleo y acetato de etilo para obtener 0.77 g de glucosa 2,3,4,6-tetraacetil-1-tricloroacetimidato (0.0016mol, 82%). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 6.56 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-1'), 5.57 (1H, dd, $J = 9.2, 9.2$ Hz, H-3'), 5.18 (1H, dd, $J = 9.2, 9.2$ Hz, H-4'), 5.14 (1H, dd, $J = 3.5, 9.2$ Hz, H-2'), 4.28 (1H, m, H-6'a), 4.26 (1H, m, H-5'), 4.13 (1H, m, H-6'b), 2.09-2.01 (12H, COCH₃); HRESIMS m/z 514.0047 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (514.0050 calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{Cl}_3\text{NO}_{10}\text{Na}$).

- 5 1,2-O-isopropilideno-3-[1'- β -(2',3',4',6'-tetraacetil)-glucosil]-glicerol: Glucosa 2,3,4,6-tetraacetil-1-tricloroacetimidato (0.74 g, 0.0015 mol) se disuelve en diclorometano anhidro (6 ml) y se trata con 1.5 equivalentes de 1,2-O-isopropilideno glicerol y eterato de trifluoruro de boro (81 μl , 0.33 mmol) en argón a -20 °C en tamices moleculares. Después de agitar durante 2 horas, se añaden otros 81 μl de eterato de trifluoruro de boro (0.33 mmol) y la reacción se deja calentar lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. Después de agitar durante la noche, la mezcla de
10 reacción se neutraliza con trietilamina (130 μl) y se filtra sobre celite. El filtrado se purifica luego en una columna de sílica gel usando un gradiente de éter de petróleo y etil éter para obtener 0.55 g de 1,2-O-isopropilideno-3-[1'- β -(2',3',4',6'-tetraacetil)-glucosil]-glicerol (0.0012 mol, 80%). Los datos del espectro son los mismos que los de la literatura HRESIMS m/z 485.1639 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (485.1635 calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_{12}\text{Na}$).

- 15 2',3',4',6'-tetraacetilglucosil- (1' $\beta \rightarrow 3$)-glicerol: 1,2-O-isopropilideno-3-[1'- β -(2', 3', 4', 6'-tetraacetil)-glucosil]-glicerol (0.55 g, 0.0012 mol) y 5 equivalentes de hexahidrato de nitrato de zinc se suspenden en acetonitrilo (8 ml). Después de 6 horas a 50 °C, el disolvente se evapora a presión reducida y el producto crudo de reacción se purifica en una columna de sílica gel usando un gradiente de éter de petróleo y éter etílico. Se obtienen 0.38 g de 2',3',4', 6'-tetraacetilglucosil- (1' $\beta \rightarrow 3$)-glicerol (0.0009 mol, 75%). Los datos del espectro del compuesto son los mismos que los de la literatura, HRESIMS m/z 445.1319 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (445.1322 calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_{12}\text{Na}$).

- 20 1,2-diacil-3-[1'- β -(2',3',4',6'-tetraacetil)-glucosil]-glicerol: en condiciones anhidras, 1 equivalente de 2',3',4',6'-tetraacetilglucosil- (1' $\beta \rightarrow 3$)-glicerol, 2 equivalentes de dicitlohexilcarbodiimida y 0.1 equivalentes de DMAP en diclorometano anhidro (1 ml por derivado de glucosilo de 0.1 mmol). A la solución, se añaden lentamente 1.05 equivalentes de ácido graso y la mezcla de reacción se mantiene bajo agitación durante 12 h. a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se añaden a la solución 1.05 equivalentes adicionales de ácido graso que tiene la
25 misma estructura o una estructura diferente de la primera. La mezcla se mantiene bajo agitación durante 24 h. a temperatura ambiente. Después de la evaporación del disolvente a presión reducida, la mezcla de reacción cruda se purifica en una columna de sílica gel usando un gradiente de éter de petróleo y éter etílico. El método conduce a un rendimiento por encima del 90% de 1,2-diacil-3-[1'- β -(2',3',4', 6'-tetraacetil)-glucosil]-glicerol.

- 30 1,2-Diacil-3-[1'- β -glucosil]-glicerol: 1 equivalente de 1,2-diacil-3-[1'-(2',3',4',6'-tetraacetil)-glucosil]-glicerol y 1,1 equivalentes de monohidrato de hidrazina se disuelven en etanol/agua 85:15 (1.5 ml por derivado de glucosilo de 0.1 mmol). La mezcla de reacción se mantiene bajo agitación durante 6 h. a 44 °C y luego se secó bajo presión reducida. La subsecuente purificación en columna de sílica con un gradiente de cloroformo y metanol produce el 1,2-diacil-3-[1'-glucosil]-glicerol correspondiente con rendimientos cercanos al 90%. 1,2-dipalmitoil-3-[1'-glucosil]-glicerol: 1,2-
35 dipalmitoil-3-[1'-(2',3',4',6'-tetraacetil)-glucosil]-glicerol (0.416 g, 0.00044mol) y monohidrato de hidrazina (0.262g, 0.0052mol) se disuelven en 8 ml de etanol/agua 85:15. La mezcla de reacción se mantiene bajo agitación durante 6 h. a 44 °C y luego se secó bajo presión reducida. La subsecuente purificación en columna de sílica con un gradiente de cloroformo y metanol permite aislar 0.292 g de 1,2-dipalmitoil-3-[1'-glucosil]-glicerol (0.00037mol, 85%). Los datos espectroscópicos del compuesto son los mismos que los de la literatura; HRESIMS m/z 753.5497 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (753.5493 calculado para $\text{C}_{41}\text{H}_{78}\text{O}_{10}\text{Na}$).

- 40 1-palmitoil-2-estearoil-3-fr-glucosil]-glicerol: 1-palmitoil-2-estearoil-3-[1'-(2',3',4',6'-tetraacetil)-glucosil]-glicerol (0.402 g, 0.00043 mol) y el monohidrato de hidrazina (0.253 g, 0.0050 mol) se disuelven en 8 ml de etanol/agua 85:15. La mezcla de reacción se mantiene bajo agitación durante 6 h. a 44 °C y luego se secó a presión reducida. La subsecuente purificación en columna de sílica con un gradiente de cloroformo y metanol permitió aislar 0.283 g de 1-palmitoil-2-estearoil-3-[1'-glucosil]-glicerol (0.00036mol, 86%). Los datos espectroscópicos del compuesto son los mismos que
45 los de la literatura; HRESIMS m/z 781.5801 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (781.5806 calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{82}\text{O}_{10}\text{Na}$).

- 1,2-diestearoil-3-[1'-glucosil]-glicerol: 1,2-diestearoil-3-[1'-(2',3',4',6'-tetraacetil)-glucosil]-glicerol (0.438 g, 0.00046mol) y monohidrato de hidrazina (0.276g, 0.0055mol) se disuelven en 8 ml de etanol/agua 85:15. La mezcla de reacción se mantiene bajo agitación durante 6 h. a 44 °C y luego se llevó hasta sequedad a presión reducida. La subsecuente purificación en columna de sílica con un gradiente de cloroformo y metanol permitió aislar 0.318 g de 1,2-diestearoil-
50 3-[1'-glucosil]-glicerol (0.00040 mol, 88%). Los datos espectroscópicos y espectrométricos del compuesto son los mismos que los de la literatura; HRESIMS m/z 809.6116 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (809.6119 calculado para $\text{C}_{45}\text{H}_{86}\text{O}_{10}\text{Na}$).

Método general para sintetizar 1,2-o-diacil-3-[1'-(6-sulfo)-quinovosil]-glicerol (véase Figura 2)

- 1,2-Diacil-3-[1'- β -(6'-tritol)-glucosil]-glicerol: 1 equivalente de 1,2-Diacil-3-[1'- β -glucosil]-glicerol obtenido como se ilustra anteriormente, 1.6 equivalentes de cloruro de tritilo y 0.4 equivalentes de DMAP se disuelven en piridina (10 ml por mmol de diacil glucosilglicerol). La mezcla de reacción se mantiene bajo agitación durante 3 h. a 60 °C y evaporado y purificado en columna de sílica gel usando un gradiente de cloroformo y metanol. El método típicamente permite
55 obtener al menos 70% de rendimiento molar de 1,2-diacil-3-[1'-(6'-tritol)-glucosil]-glicerol.

1,2-Diacil-3-[1'- β -(2',3',4'-triacetil-6'-tritol)-glucosil]-glicerol: 1 equivalente de 1,2-diacil-3-[1'-(6'-tritol)-glucosil]-glicerol se hace reaccionar con anhídrido acético (aproximadamente 10 ml por mmol de glucosilglicerol) en piridina anhidra (aproximadamente 20 ml por mmol de producto). Después de agitar durante 3 horas, la mezcla de reacción se extrae con cloroformo y agua y la fase orgánica se purifica en una columna de sílica gel usando un gradiente de éter de petróleo y éter etílico. El método conduce típicamente a rendimientos superiores al 90% de 1,2-diacil-3-[1'-(2',3', 4'-triacetil-6'-tritol)-glucosil]-glicerol.

1,2-Diacil-3-[1'- β -(2',3',4'-triacetil)-glucosil]-glicerol: 1 equivalente de 1,2-diacil-3-[1'-(2',3', 4'-triacetil-6'-tritol)-glucosil]-glicerol se disuelve en una solución al 2% de yodo en metanol (aproximadamente 50 ml por mol de glucosilglicerol). Después de agitación continua durante 48 h. a 60 °C, la mezcla de reacción se purifica en una columna de sílica gel usando un gradiente de éter de petróleo y éter etílico para obtener el 1,2-diacil-3-[1'-(2',3',4'- triacetil)-glucosil]-glicerol con rendimientos típicamente superiores al 80%.

1,2-Diacil-3-[1'- β -(2',3',4'-triacetil-6'-tosil)-glucosil]-glicerol: 1 equivalente de 1,2-diacil-3-[1'-(2',3',4'-triacetil)-glucosil]-glicerol, 1 equivalente de cloruro de paratoluenosulfonilo y 1 equivalente de DMAP se disuelven en piridina anhidra (aproximadamente 30 ml por mmol de glucosilglicerol) a 0 °C y bajo argón . Después de agitar durante 14 horas, la mezcla de reacción se lleva hasta sequedad a presión reducida y se purifica sobre sílica usando un gradiente de éter de petróleo y éter etílico. El método permite obtener 1,2-diacil-3-[1'-(2',3',4'-triacetil-6'-tosil)-glucosil]-glicerol con rendimientos iguales o superiores al 80%.

1,2-diacil-3-[1'-(2',3',4'-triacetil-6'-tioacetil)-6'-desoxi-glucosil]-glicerol: 1 equivalente de 1,2-diacil-3-[1'-(2',3',4'-triacetil-6'-tosil)-glucosil]-glicerol y 2.5 equivalentes de acetato de potasio se disuelven en 2-butanona (100 ml por mol de glucosilglicerol). La mezcla de reacción se mantiene bajo agitación a 80°C durante 2,5 horas y luego se evapora a presión reducida. El producto bruto de reacción se purifica en una columna de sílica gel usando un gradiente de éter de petróleo y éter etílico para obtener el 1,2-diacil-3-[1'-(2',3',4'-triacetil-6'- tioacetil)-6'-desoxi-glucosil]-glicerol con rendimientos superiores al 90%.

1,2-diacil-3-[1'- β -(2',3',4'-triacetil-6'-sulfo)-quinovosil]-glicerol: 1 equivalente de 1,2-diacil-3-[1'-(2',3',4'-triacetil-6'-tioacetil)-6'-desoxi-glucosil]-glicerol se disuelve en una mezcla acuosa que contiene 5 equivalentes de acetato de potasio, 34% p/v de peróxido de hidrógeno (2.5 ml por mmol de glucosilglicerol) y ácido acético (aproximadamente 30 ml por mmol de glucosilglicerol). La mezcla de reacción se mantiene bajo agitación durante 14 h. a 40 °C antes de ser llevado hasta sequedad a presión reducida y luego secar por congelación. El producto crudo de reacción se purifica luego en una columna de sílica gel usando un gradiente de cloroformo y metanol para obtener 1,2-diacil-3-[1'- β -(2',3',4'-triacetil-6'-sulfo)-quinovosil]-glicerol con rendimientos superiores al 60%.

Sal de potasio de 1,2-diacil-3-[1'- β -(6'-sulfo)-quinovosil]-glicerol: 1 equivalente de 1,2-diacil-3-[1'- β -(2',3',4'-triacetil-6'-sulfo)-quinovosil]-glicerol y 10 equivalentes de monohidrato de hidrazina se disuelven en etanol/agua 85:15 (aproximadamente 10 ml por mmol de sulfoquinovosilglicerol). La mezcla se mantiene bajo reacción durante 3 h. a 44 °C antes de llevar hasta sequedad a presión reducida. La muestra se purifica en una columna de sílica para obtener 1,2-diacil-3-[1'- β -(6'-sulfo)-quinovosil]-glicerol con rendimientos iguales o superiores al 80%.

1,2-diestearoil-3-[1'- β -(6'-sulfo)-quinovosil]-glicerol: 1,2-diestearoil-3-[1'- β -(2,3,4'-triacetil-6'-sulfo)-quinovosil]-glicerol (0.044 g, 0.043 mmol), preparado de acuerdo con el esquema general ilustrado anteriormente, y el monohidrato de hidrazina (0.017 g, 0.361 mmol) se disuelve en 4.7 ml de etanol acuoso (85%). Después de 3 h a 44 °C, la mezcla de reacción se evapora y se purifica en una columna de sílica gel usando un gradiente de cloroformo y metanol para obtener 1,2-diestearoil-3-[1'- β -(6'-sulfo)-quinovosil]-glicerol (sal de potasio) (compuesto 24) (0.030 g, 0.034 mmol, 80%). R_f (cloroformo/metanol 7:3) = 0.15; IR (película líquida) $\nu_{\max}$ 3400, 2940, 2862, 1750, 1351, 1343 cm^{-1} ; ^1H -RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 5.29 (1H, m, H-2), 4.34 y 4.32 (cada uno para 1H, d, 7.8 Hz, H-1'), 4.19 (1H, m, H-1a), 4.11 (1H, m, H-3a), 4.09 (1H, m, H-1b), 3.79-3.75 (3H, m, H-3b, H-3', H-4'), 3.42 (1H , m, H-5'), 3.24 (1H, m, H-2'), 3.18 (1H, m, H-6'a), 2.98 (1H, m, H-6'b), 2.43-2.35 (4H, m, α metilenos de la cadena de alquilo), 1.69-1.58 (4H, m, β metilenos de la cadena de alquilo), 1.43-1.29 (protones de la cadena de alquilo), 0.94 (6H, 2 CH_3); HRESIMS m/z 911.5300 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (911.5297 calculado para $\text{C}_{45}\text{H}_{85}\text{NaO}_{12}\text{KS}$).

1,2-dipalmitoil-3-[1'- β -(6'-sulfo)-quinovosil]-glicerol: 1,2-dipalmitoil-3-[1'- β -(2',3',4'-triacetil-6'-sulfo)-quinovosil]-glicerol (0,022 g, 0,022 mmol), preparado de acuerdo con el esquema general ilustrado anteriormente, y el monohidrato de hidrazina (0.008 g, 0.180 mmol) se disuelve en 2.3 ml de etanol acuoso (85%). Después de 3 hrs. a 44 °C, la mezcla de reacción se evapora y se purifica en una columna de sílica gel usando un gradiente de cloroformo y metanol para obtener 1,2-dipalmitoil-3-[1'- β -(6'-sulfo)-quinovosil]-glicerol (sal de potasio) (0.014 g, 0.016 mmol, 74%) (compuesto 19); R_f (cloroformo/metanol 7:3) = 0.15; IR (película líquida) $\nu_{\max}$ 3400, 2940, 2862, 1750, 1351, 1343 cm^{-1} ; ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 5.29 (1H, m, H-2), 4.34 y 4.32 (cada uno para 1H, d, 7.8 Hz, H-1'), 4.19 (1H, m, H-1a), 4.11 (1H, m, H-3a), 4.09 (1H, m, H-1b), 3.79-3.75 (3H, m, H-3b, H-3', H-4'), 3.42 (1H , m, H-5'), 3.24 (1H, m, H-2'), 3.18 (1H, m, H-6'a), 2.98 (1H, m, H-6'b), 2.43-2.35 (4H, m, α metilenos de la cadena de alquilo), 1.69-1.58 (4H, m, β metilenos de la cadena de alquilo), 1.43-1.29 (protones de la cadena de alquilo), 0.94 (6H, 2 CH_3); HRESIMS m/z 855.4675 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (855.4671 calculado para $\text{C}_{41}\text{H}_{77}\text{NaO}_{12}\text{KS}$).

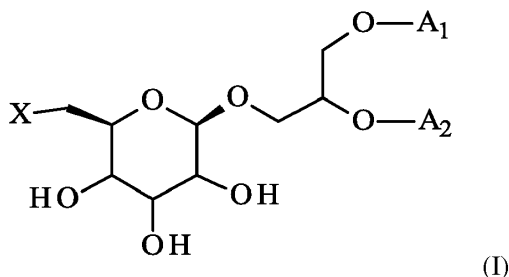
1-palmitoil-2-estearoil-3-[1'- β -(6'-sulfo)-quinovosil]-glicerol: 1-palmitoil-2-estearoil-3-[1'- β -(2',3',4'-triacetil-6'-sulfo)-quinovosil]-glicerol (0.035 g, 0.034 mmol), preparado de acuerdo con el esquema general ilustrado anteriormente, y el

5 monohidrato de hidrazina (0.014 g, 0.289 mmol) se disuelve en 4.7 ml de etanol acuoso (85%) (4.7 ml). Después de 3 horas a 44 °C, la mezcla de reacción se evapora y se purifica en una columna de sílica gel usando un gradiente de cloroformo y metanol para obtener 1-palmitoil-2-estearoil-3-[1'β- (6-sulfo)-quinovosil]-glicerol (sal de potasio) (0.021 g, 0.024 mmol, 70%). R_f (cloroformo/metanol 7: 3) = 0.15; IR (película líquida) $\nu_{\text{máx}}$ 3400, 2940, 2862, 1750, 1351, 1343 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 5.29 (1H, m, H-2), 4.34 y 4.32 (cada uno para 1H, d, 7.8 Hz, H-1'), 4.19 (1H, m, H-1a), 4.11 (1H, m, H-3a), 4.09 (1H, m, H-1b), 3.79-3.75 (3H, m, H-3b, H-3', H-4'), 3.42 (1H, m, H-5'), 3.24 (1H, m, H-2'), 3.18 (1H, m, H-6'a), 2.98 (1H, m, H-6'b), 2.43-2.35 (4H, m, α metilenos de la cadena de alquilo), 1.69-1.58 (4H, m, β metilenos de la cadena de alquilo), 1.43-1.29 (protones de la cadena de alquilo), 0.94 (6H, 2 CH_3); HRESIMS m/z 883.4986 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (883.4984 calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{81}\text{NaO}_{12}\text{KS}$).

10

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de beta-glicolípido de fórmula (I):



una sal o un complejo metálico del mismo,

5 en donde

el enlace acetálico del carbono anomérico tiene una configuración β (beta),

A_1 y A_2 son, independientemente entre sí, alquilo C_1 - C_{30} lineal o ramificado saturado o monoinsaturado, o son un acilo $-(CO)R_1$ y $-(CO)R_2$ respectivamente donde R_1 y R_2 son, independientemente uno del otro, alquilo C_1 - C_{29} lineal o ramificado saturado o monoinsaturado, y

10 X es un grupo sulfónico ($-SO_3H$),

para uso como adyuvante de vacuna.

2. El derivado de beta-glicolípido para uso de la reivindicación 1, en el que A_1 y A_2 o R_1 y R_2 son, independientemente uno del otro, alquilo C_6 - C_{24} lineal saturado o monoinsaturado.

15 3. El derivado de beta-glicolípido para uso de la reivindicación 2, en el que A_1 y A_2 o R_1 y R_2 son, independientemente uno del otro, unidades estructurales de ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico o ácido lignocérico.

4. El derivado de beta-glicolípido para uso de la reivindicación 2, en el que A_1 y A_2 o R_1 y R_2 son, independientemente uno del otro, alquilo C_{14} - C_{18} lineal saturado o monoinsaturado.

20 5. El derivado de beta-glicolípido para uso de la reivindicación 1, en el que A_1 y A_2 son acilo $-(CO)R_1$ y acilo $-(CO)R_2$ respectivamente, donde R_1 y R_2 son, independientemente uno del otro, una unidad estructural de ácido pentadecanoico, ácido palmítico, ácido heptadecanoico o ácido esteárico.

6. El derivado de beta-glicolípido para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) está en forma de una sal del mismo, en el que X es $-SO_3Na$ o $-SO_3K$.

25 7. El derivado de beta-glicolípido para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) está en forma de un complejo del mismo con aluminio.

8. El derivado de beta-glicolípido para uso de la reivindicación 1, siendo dicho derivado de beta-glicolípido sal de sodio o potasio de 1,2-diacil-3-[1' β -(6-sulfo)-quinovosil]-glicerol.

9. El derivado de beta-glicolípido para uso de la reivindicación 1, siendo dicho derivado de beta-glicolípido 1,2-diestearoil-3-[1' β -(6-sulfo)-quinovosil]-glicerol.

30 10. El derivado de beta-glicolípido para uso de la reivindicación 1, siendo dicho derivado de beta-glicolípido 1,2-dipalmitoil-3-[1' β -(6-sulfo)-quinovosil]-glicerol.

11. El derivado de beta-glicolípido para uso de la reivindicación 1, siendo dicho derivado de beta-glicolípido 1-palmitoil-2-estearoil-3-[1' β -(6-sulfo)-quinovosil]-glicerol o 1-estearoil-2-palmitoil-3-[1' β -(6-sulfo)-quinovosil]-glicerol.

35 12. Un adyuvante de vacuna que comprende al menos un derivado de beta-glicolípido de fórmula (I), una sal farmacéuticamente aceptable o un complejo metálico del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

13. Producto, composición o kit que contiene al menos un derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, y un antígeno o vacuna como preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en la prevención o el tratamiento de enfermedades infecciosas.

40 14. El derivado de beta-glicolípido de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para uso en la inmunización de un mamífero opcionalmente en coadministración con un antígeno contra el cual el mamífero tiene que inmunizarse.

15. Composición farmacéutica que comprende al menos un derivado de beta-glicolípido de fórmula (I) de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para uso en el tratamiento o prevención de infecciones bacterianas o virales.

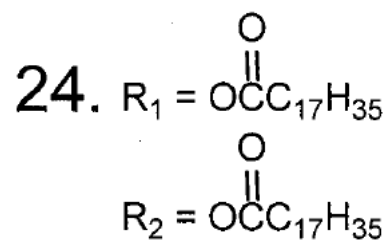
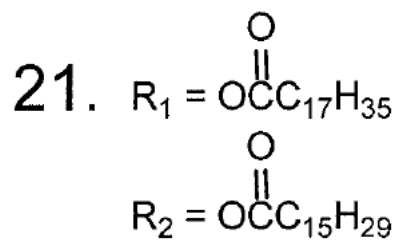
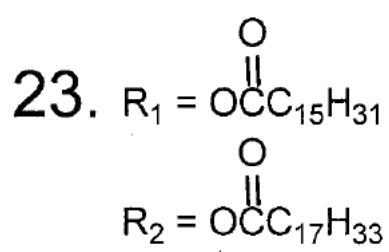
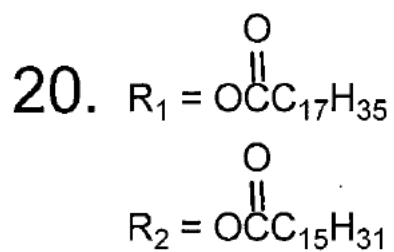
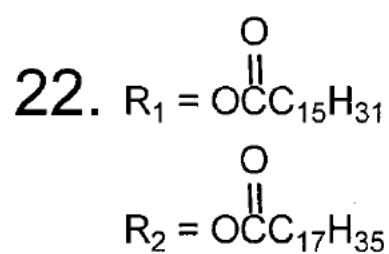
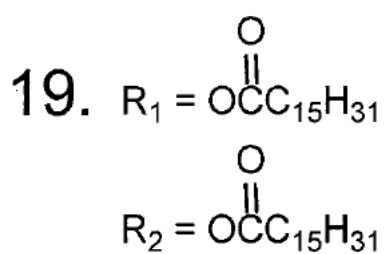
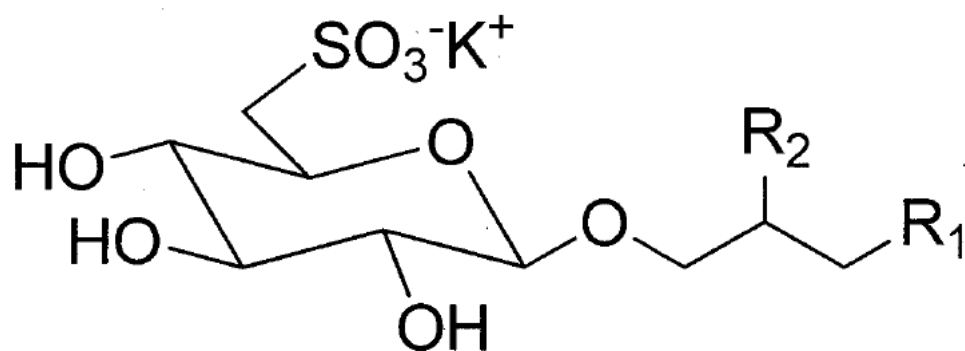


FIGURA 1

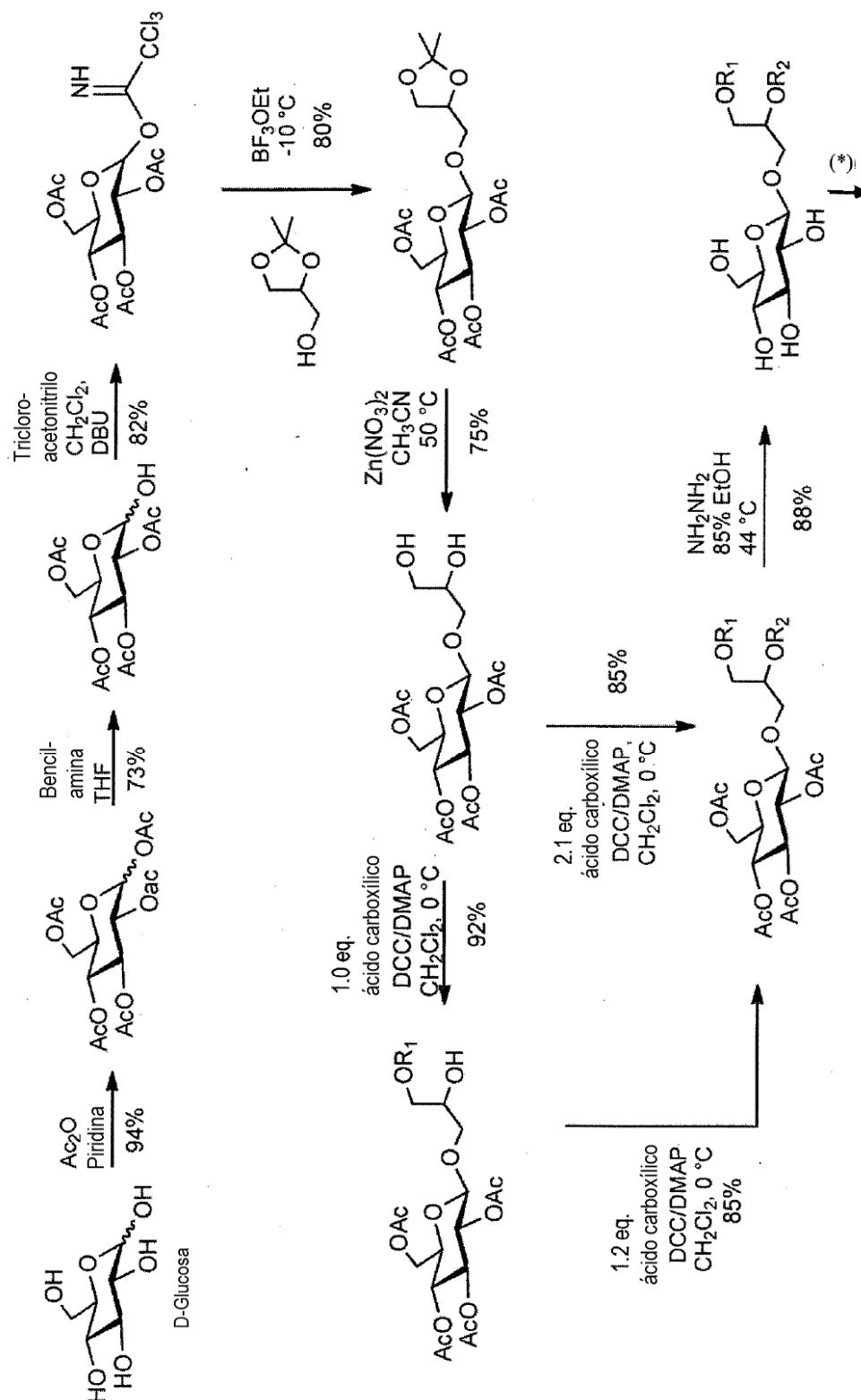


FIGURA 2

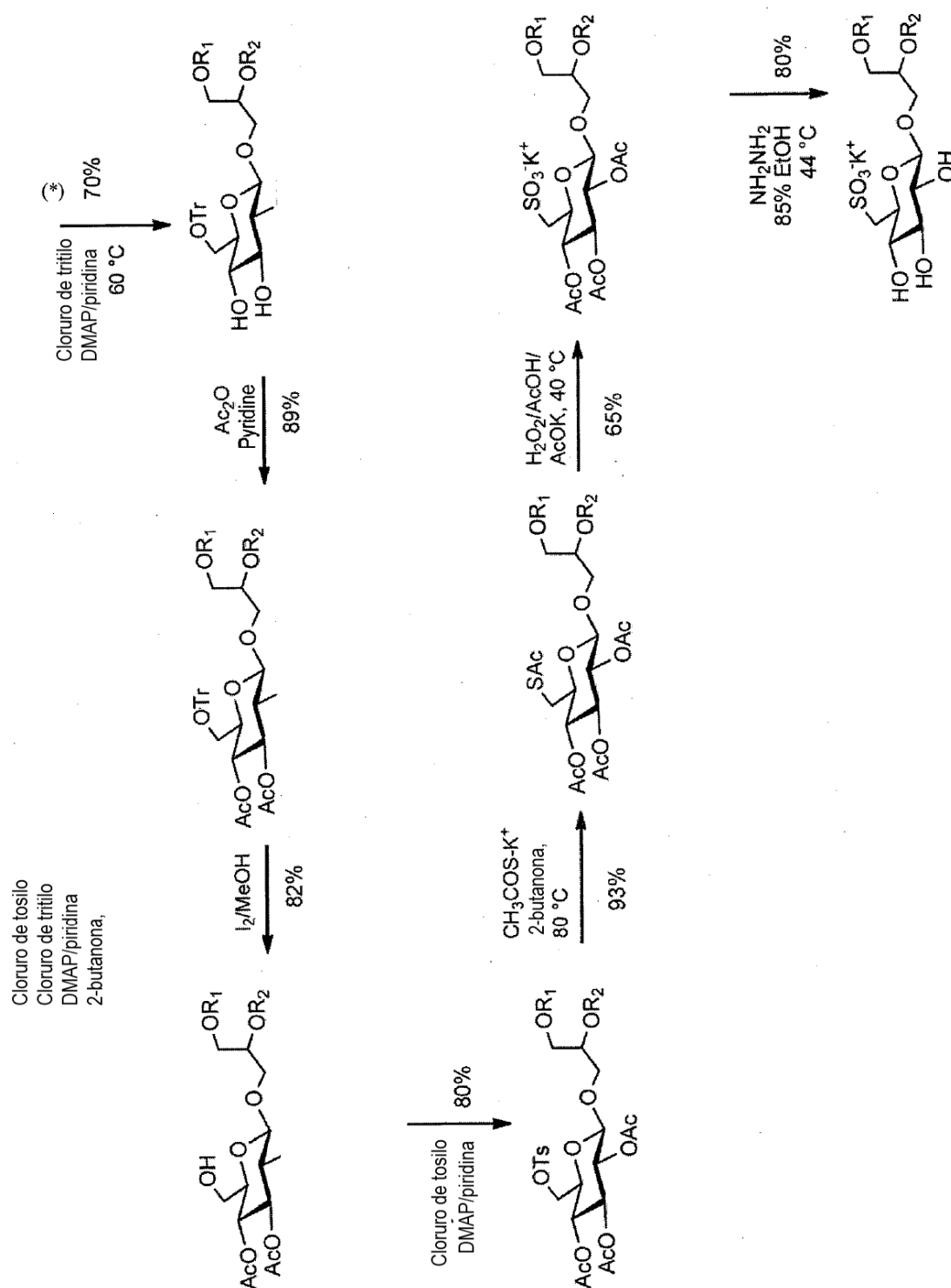


FIGURA 2 (continuación)

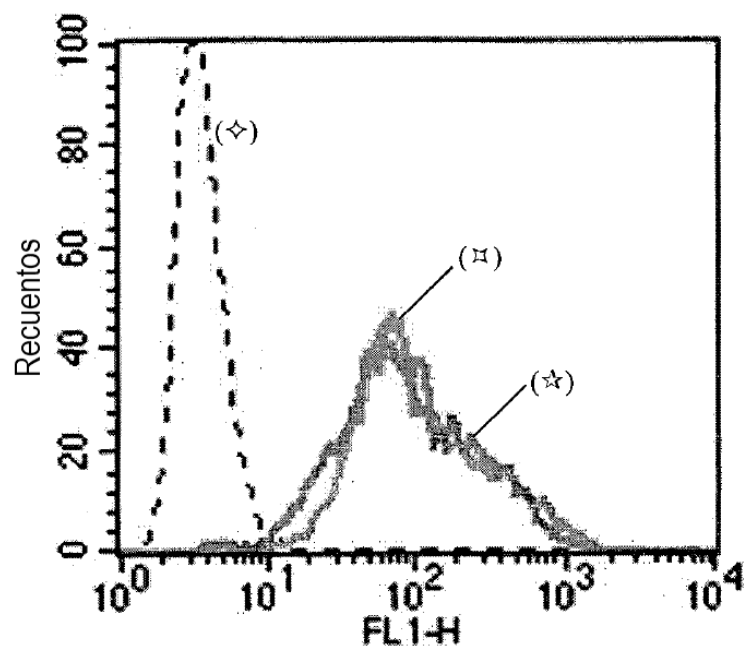


FIGURA 3A

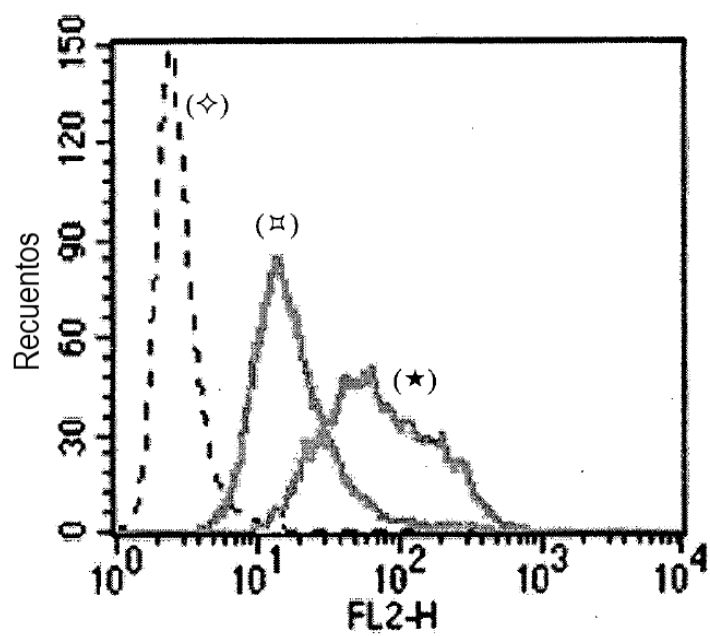


FIGURA 3B

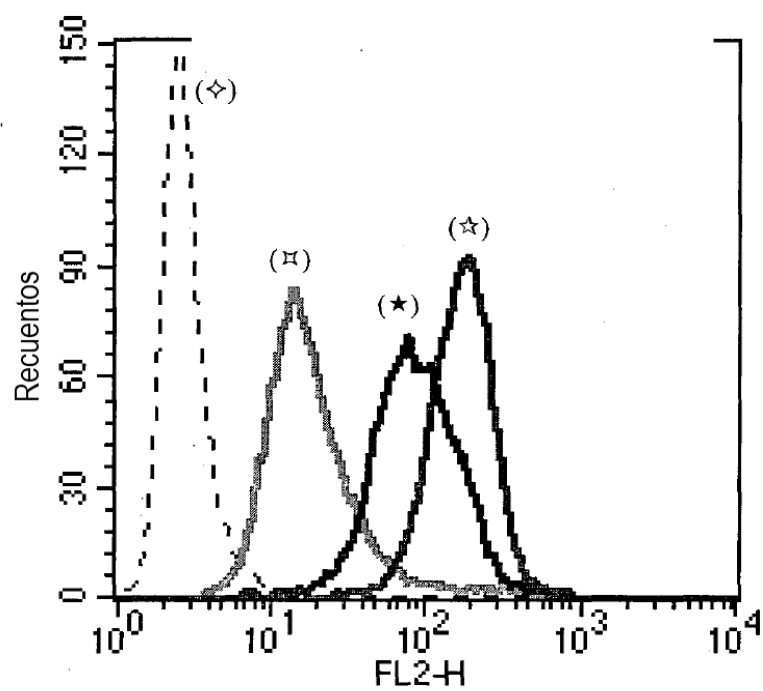


FIGURA 4

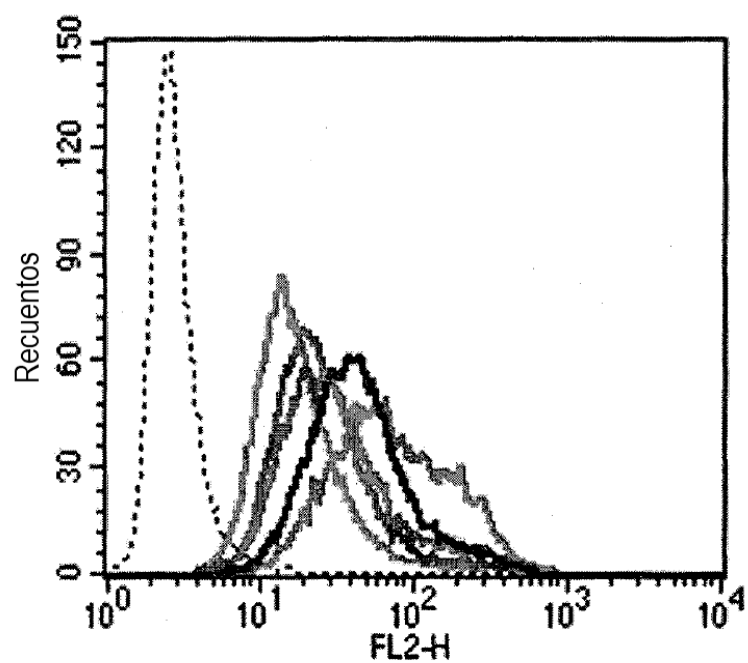


FIGURA 5

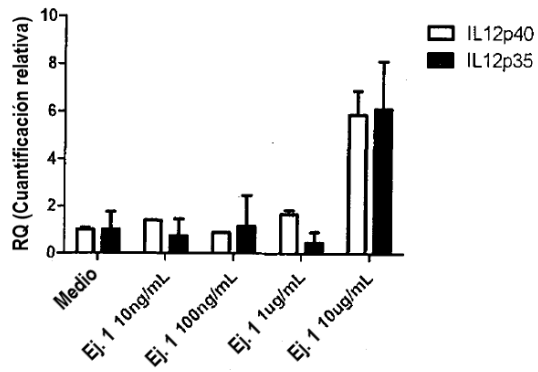


FIGURA 6A

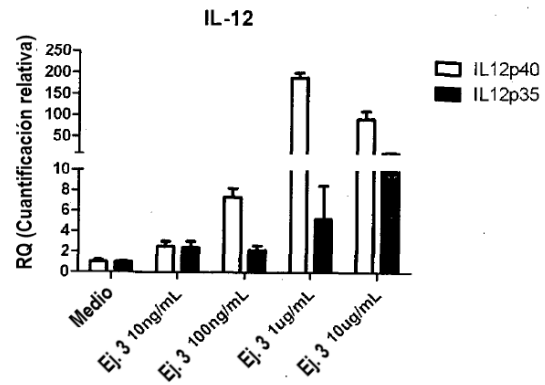


FIGURA 6B

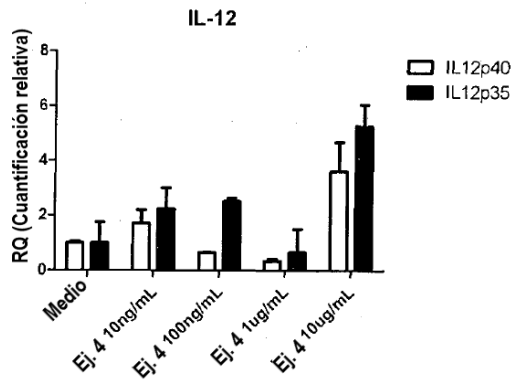


FIGURA 6C

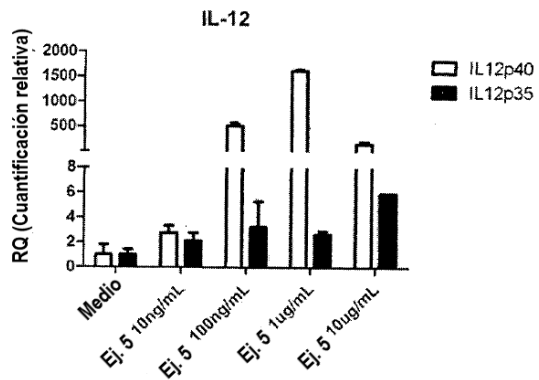


FIGURA 6D

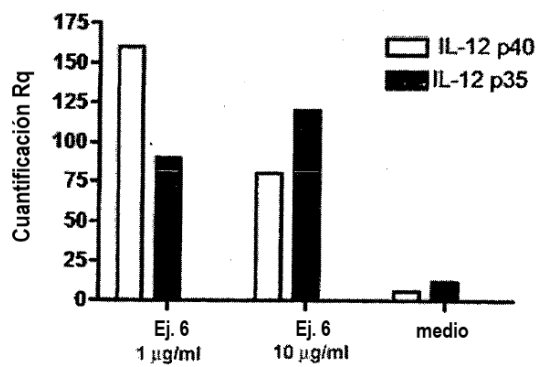


FIGURA 6E

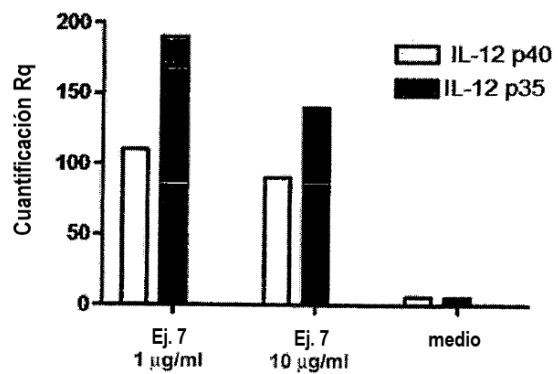


FIGURA 6F

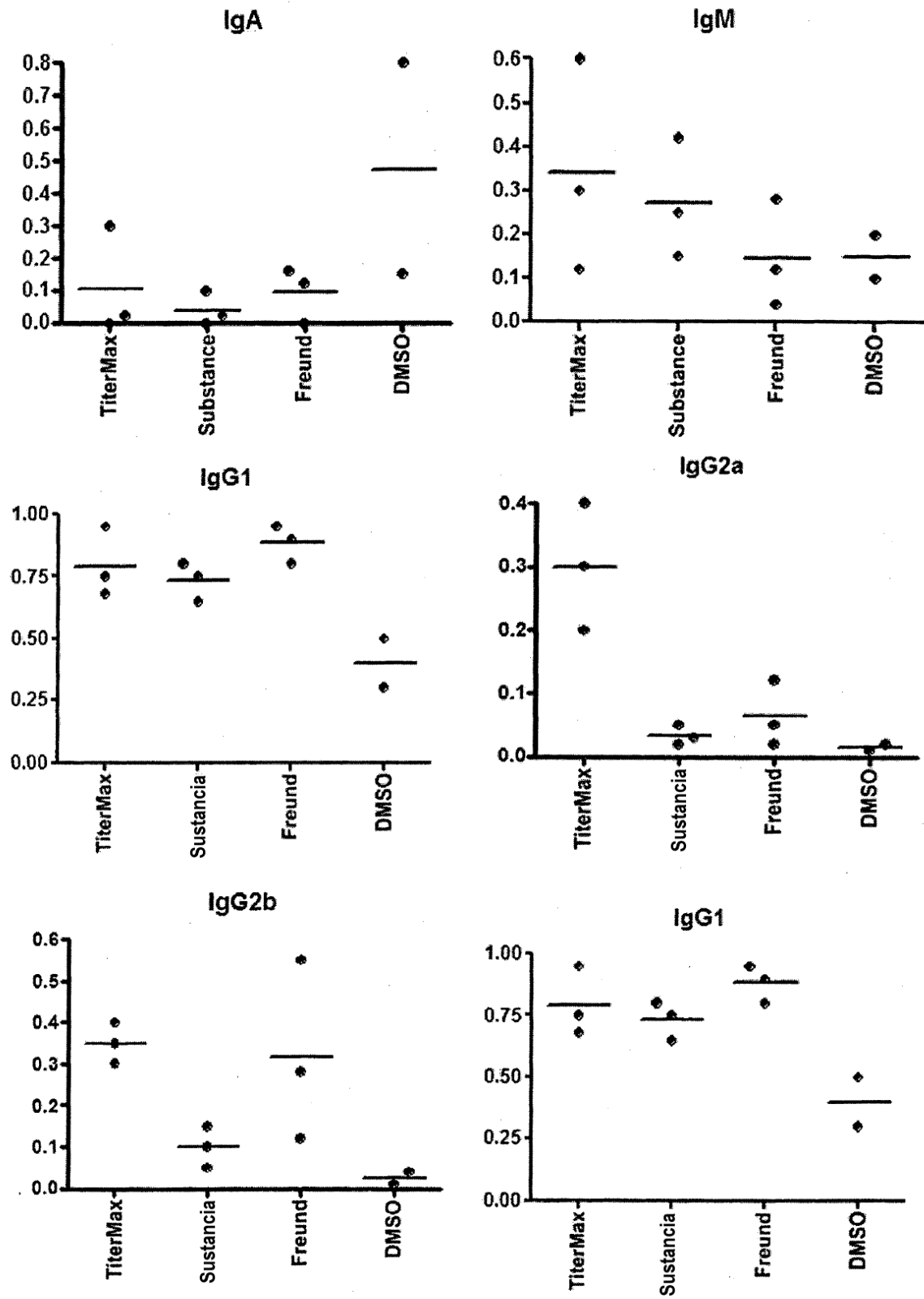


FIGURA 7