



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0706709-7 B1



(22) Data do Depósito: 15/01/2007

(45) Data de Concessão: 23/03/2021

(54) Título: COMPOSIÇÃO E PROCESSO PARA PREPARAR A COMPOSIÇÃO

(51) Int.Cl.: A61K 39/39; C07H 15/12; C07H 13/12.

(30) Prioridade Unionista: 20/06/2006 US 60/814,984; 26/01/2006 US 60/762,279.

(73) Titular(es): ZOETIS SERVICES LLC.

(72) Inventor(es): PAUL JOSEPH DOMINOWSKI; RAMASAMY MANNAR MANNAN; SANGITA MEDIRATTA.

(86) Pedido PCT: PCT IB2007000258 de 15/01/2007

(87) Publicação PCT: WO 2007/085962 de 02/08/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 23/07/2008

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES DE ADJUVANTES GLICOLIPÍDIOS Esta invenção está relacionada a composições e métodos de preparar soluções estoques estáveis diluentes de adjuvantes e soluções adjuvantes finais compreendendo glicolipídios, ácidos fracos, álcoois, tensoativos não-iônicos e tampões.

“COMPOSIÇÃO E PROCESSO PARA PREPARAR A COMPOSIÇÃO”

Campo da Invenção

[001]A presente invenção está relacionada a novas composições de adjuvantes glicolipídios, métodos para a sua utilização, e sua preparação. As novas composições da presente invenção são estáveis por um período prolongado sem floculação. Elas são particularmente úteis na aplicação de diversos medicamentos, incluindo vacinas.

Fundamentos da Invenção

[002]Vacinas são tipicamente usadas para proteger animais humanos e veterinários de infecções provocadas por bactérias, vírus e organismos parasitas. Os antígenos usados nas vacinas podem ser de qualquer variedade de agentes mas são tipicamente composto de organismos patogênicos mortos, organismos patogênicos que estão vivos porém modificados ou atenuados, proteínas, proteínas recombinantes ou fragmentos desses mencionados. Qualquer que seja a fonte do antígeno, é freqüentemente necessário acrescentar um adjuvante para melhorar a imuno-resposta do hospedeiro ao antígeno.

[003]Os adjuvantes são usados para cumprir dois objetivos: eles freiam a liberação dos antígenos oriundos do local da injeção e eles estimulam o sistema imuno.

[004]O primeiro adjuvante reportado na literatura foi o Adjuvante Completo de Freund (FCA). O FCA contém uma emulsão água-em-óleo e extratos de micobactéria. Os extratos de micobactéria proporciona moléculas imuno-estimulatórias em uma forma em bruto. A emulsão água-em-óleo atua para criar um efeito de depósito onde os antígenos são lentamente liberados. Infelizmente o FCA é pobremente tolerado e ele provoca uma inflamação descontrolada. Desde a descoberta do FCA há 80 anos atrás têm sido feitos esforços para reduzir os indesejados efeitos colaterais dos adjuvantes.

[005]Análogos glicolipídios compreendendo uma nova classe de compostos que possuem propriedades adjuvantes são agora conhecidas. A Patente U.S. No. 4.855.283, (daqui em diante '283) revela a síntese análogos glicolipídios, que incluem N-glicosilamidas, N-glicosiluréias, N-glicosilcarbamatos, e especificamente: Acetato de N-(2-desóxi-2-L-leucilamino- β -D-glicopiranosil)-N-octadecildodecanamida (conhecido como Bay R1005, O Lockhoff, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1991) 30:1611-1620. Os compostos descritos pa patente '283 são particularmente adequados para uso como adjuvantes.

[006]Formulações de adjuvantes glicolipídios precisam ser fáceis de fabricar e estáveis quando armazenadas por períodos prolongados sem apresentar floculação do componente lipídio. As formas não-acetato das glicolipídio-amidas ou glicosilamidas são altamente insolúveis e tipicamente se separam da solução por floculação quando do armazenamento tanto na temperatura ambiente ou em temperaturas mais baixas.

[007]As soluções e adjuvantes compreendendo glicosilamidas providas aqui apresentam pouca floculação e são bastante estáveis. Elas são fáceis para fabricar e podem se preparadas em escala comercial. As formulações líquidas de adjuvantes glicolipídios podem ser usadas como um diluente para re-hidratar uma preparação de antígeno liofilizado. Métodos para testar a estabilidade dessas formulações em tempo real e através de protocolos de testagem acelerada da estabilidade são também providos.

Sumário da Invenção

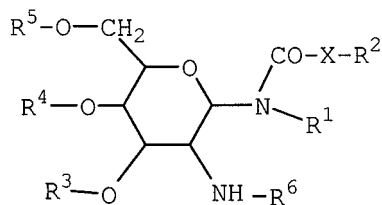
[008]Essa invenção compreende a composição e método de produzir ou de fabricar ambas a solução Estoque de Glicosilamida e Solução Adjuvante Glicolipídio. A Solução Estoque de Glicosilamida é preparada mediante dissolver um glicolipídio de Fórmula 1 em um álcool e combinar isto com uma quantidade apropriada de um ácido fraco mais um tensoativo "não-iônico". O ácido fraco é acrescentado à solução

alcoólica de glicolípídios, em excesso molar de ácido fraco com referência aos glicolípídios. Em uma modalidade o glicolípídio é hidroacetato de N-(2-desóxi- 2-L-leucilamino-β-D-glicopiranosil)-N-octadecildodecanoilamida. Em uma modalidade o álcool é etanol. Em uma modalidade ácido fraco é ácido acético. Em uma modalidades tensoativos não-iônicos são diversos sorbitanos (Span®) ou polioxietilenosorbitanos (Tween®) em particular os mono-lauratos de sorbitanos (Span 20®) e mono-lauratos de polioxietilenosorbitanos (Tween 20®). A Solução de Adjuvante Glicolípídio é preparada mediante introduzir uma quantidade apropriada da Solução Estoque de Glicosilamida num “tampão adequado”. O pH das Soluções de Adjuvante Glicolípídio finais estáveis descritas aqui deverá estar entre cerca de 6 e cerca de 8. Um pH final de entre cerca de 6 até cerca de 7 é preferido. Um pH final entre cerca de 6,3 até cerca de 6,4 é descrito. Altas concentrações salinas de Adjuvante Glicolípídio, aquelas acima de 30 mM NaCl, devem ser evitadas.

[009]Essas duas soluções são exemplificadas em mais detalhes como a seguir:

[0010]A Solução Estoque de Glicosilamida é uma composição que compreende:

a) um glicolípídio de Fórmula I; em que a Fórmula I é



em que

R¹ é hidrogênio, ou radical alquila saturado possuindo até 20 átomos de carbono;

X é -CH₂-, -O- ou -NH-;

R² é hidrogênio, ou um radical alquila saturado possuindo até 20 átomos de carbono;

R³, R⁴, e R⁵ são independentemente hidrogênio, -SO₄²⁻, -PO₄²⁻, -CO-alquilC₁₋₁₀;

R⁶ é L-alanil, L-alfa-aminobutil, L-arginil, L-asparginil, L-aspartil, L-cisteinil, L-glutamil, L-glicil, L-histidil, L-hidroxipropil, L-iso-leucil, L-leucil, L-lisil, L-metionil, L-ornitil, L-fenilalani, L-prolil, L-seril, L-treonil, L-tirosil, L-triptofanil, e L-valil ou seus D-isômeros;

em uma forma sal, onde a forma salina é derivada de um ácido fraco;

b) um álcool em que o álcool é HO-alquilC₁₋₃;

c) um ácido fraco, em que 1) o ácido fraco está em excesso molar com referência ao teor de glicolípido, e 2) é qualquer ácido que possui um valor de pKa entre cerca de 1,0 e cerca de 9,5 usando tabelas ou valores padrões; e

d) um tensoativo não-iônico, onde o tensoativo não-iônico é um agente que reduz a tensão superficial do material em que ele está dissolvido e possui um componente que é hidrofóbico e um outro componente que é hidrofílico.

[0011]A Solução de Adjuvante Glicolípido é uma composição que compreende:

a) uma Solução Estoque de Glicosilamida; e

b) um tampão adequado, onde o tampão é um apropriado para uso veterinário ou médico e pode manter um pH relativamente constante numa solução aquosa de entre cerca de 6,0 e cerca de 8,0.

Descrição Detalhada da Invenção

[0012]A menos que de outro modo estabelecido, os termos apresentados a seguir usados na especificação e reivindicações possuem os significados dados adiante.

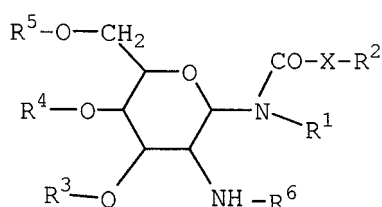
[0013]O termo “álcool” se refere a um composto de Fórmula: HO-C₁₋₃lquil.

Ele pode ser metanol, etanol, ou propanol em qualquer forma, tal como n-propanol ou iso-propanol. Etanol é preferido.

[0014]O termo “alquil” se refere a frações hidrocarbonetos saturados tanto lineares e ramificadas.

[0015]O termo “glicolipídios” se refere aos compostos de Fórmula I adiante. Esses compostos são descritos na Patente US No. 6.290.971, e Patente US No. 4.855.283, concedida em 8 de agosto de 1989. Tanto a Patente US No. 6.290.971, e Patente US No. 4.855.283 são aqui incorporadas por referência em suas totalidades. Um glicolipídio descrito em particular aqui, quando em sua forma acetato possui o nome comercial Bay R1005®, e o nome químico “acetato de N-(2-desóxi-2-L-leucilamino-β-D-glicopiranosil)-N-octadecildodecanamida” A forma amida desse composto tem o nome comercial Bay 15-1583® e o nome químico de “N-(2-desóxi-2-L-leucilamino-β-D-glicopiranosil)-N-octadecildodecanamida.”

[0016]Os glicolipídios de Fórmula I são:



fórmula I

em que

R¹ é hidrogênio, ou radical alquila saturado possuindo até 20 átomos de carbono;

X é -CH₂-, -O- ou -NH-;

R² é hidrogênio, ou radical alquila saturado possuindo até 20 átomos de carbono;

R³, R⁴, e R⁵ são independentemente hidrogênio, -SO₄²⁻, -PO₄²⁻, ou -CO-alquilC₁₋₁₀;

R⁶ é L-alanil, L-alfa-aminobutil, L-arginil, L-asparginil, L-aspartil, L-cisteinil, L-glutamil, L-glicil, L-histidil, L-hidroxiopropil, L-iso-leucil, L-leucil, L-lisil, L-metionil, L-ornitil, L-fenilalanil, L-prolil, L-seril, L-treonil, L-tirosil, L-triptofanil, e L-valil ou seus D-isômeros;

ou um sal farmacêuticamente aceitável desses mencionados.

[0017]Uma outra modalidade especificada descreve os glicolipídios de Fórmula 1 em que:

R¹ é hidrogênio, ou saturated alquilC₁₂₋₁₈;

R² é hidrogênio, ou saturated alquilC₇₋₁₁;

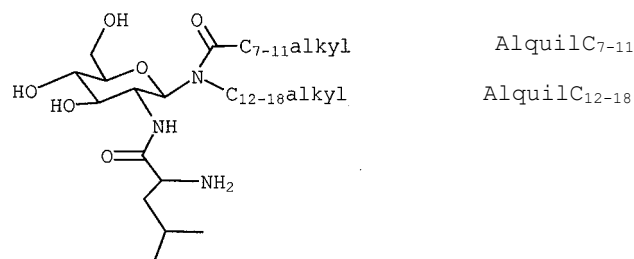
X é -CH₂,;

R⁴, e R⁵ são independentemente hidrogênio;

R⁶ é selecionado de L-leucil;

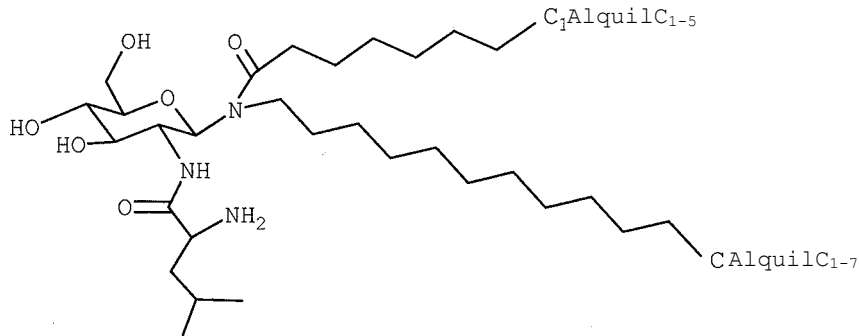
[0018]As variáveis para a Fórmula I são separadas e todas as combinações de variáveis são aqui descritas e reivindicadas.

[0019]Em uma outra modalidade, os glicolipídios são aqueles descritos pela Fórmula II(a):



Fórmula II(a)

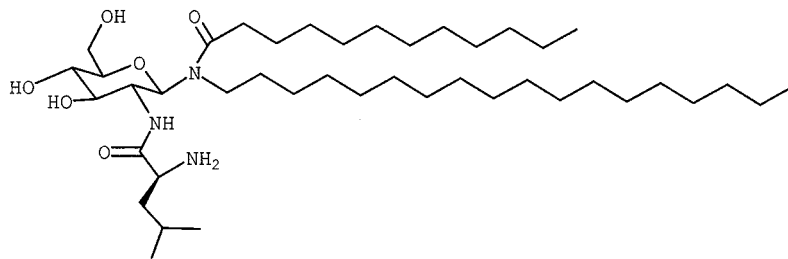
[0020]Em uma outra modalidade, os glicolipídios são aqueles descritos pela Fórmula II(b):



Fórmula II(b)

[0021]Em uma outra modalidade, os glicolipídios possuem a estrutura da

Fórmula III:

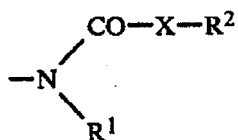


Fórmula (III)

[0022]Um composto de Fórmula III pode existir em uma ou outra de forma amida ou forma acetato. A forma amida desse composto tem o nome comercial Bay 15-1583®. A forma acetato tem o nome comercial Bay R1005®.

[0023]Os glicolipídios de Fórmula I podem ser feitos usando os procedimentos seguintes, tomados da Patente U.S. No. 4.855.283.

[0024]Como pode ser visto a partir da Fórmula 1, os compostos de acordo com a invenção são baseados numa 2-amino-2-desóxi-hexose substituída. Esses açúcares são sempre ligados por N-glicosida por meio de C-1, o átomo de carbono anomérico, ao grupo acilamido, carbamido ou alcoxicarbonilamido



(I)

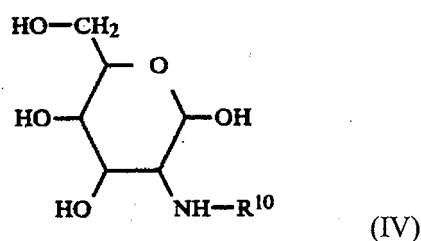
com os significados mencionados acima para R¹, R² e X.

[0025]O grupo 2-amino dos amino-açúcares nos compostos de acordo com a invenção, de Fórmula I, está ligado por amida a um α -aminoácido ou um derivado α -aminoácido.

[0026]Os aminoácidos são os L-aminoácidos naturais tais como

glicina, sarcosina, ácido hipúrico, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, cisteína, metionina, ornitina, citrulina, arginina, ácido aspártico, asparagina, glutamic ácido, glutamina, fenilalanina, tirosina, prolina, triptofano e histidina. Também são descritos D-aminoácidos, tal como D- alanina, ou aminoácidos carboxílicos, tal como ácido alfa-aminobutírico, ácido α -aminovalérico, ácido α -aminocapróico ou ácido α -amino-heptanóico, ambos na forma-E e forma-L, para atuar como substituintes no amino-açúcar.

[0027]Os processos para a preparação dos compostos de acordo com Fórmula I são também providos. Isso enseja iniciar a partir de um derivado 2-amino-2-desóxiciglicopirranose (Fórmula IV), que está protegido no grupo amino,



em que R¹⁰ representa um grupo protetor para a proteção de grupos amino, que é conhecido a partir da síntese de peptídeos e pode, onde apropriado, ser seletivamente eliminado.

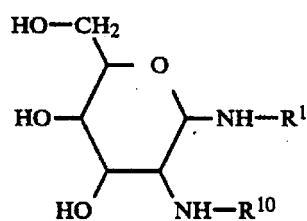
[0028]Exemplo de grupos protetores adequados são grupos acil, tal como grupos trifluoroacetil ou tricloroacetil, o-nitrofenilsulfenil, 2,4-dinitrofenilsulfenil ou grupos alcóxicarbonil inferiores opcionalmente substituídos tais como metóxicarbonil, t-butíloxicarbonil, benzíloxicarbonil, p-metóxicarbóloxicarbonil ou 2,2,2-

tricloroetiloxicarbonil groups. Adequados derivados amino-hexose N-protetidos são conhecidos. Por exemplo, M. Bergmann e L. Zervas, Ber. 64, 975 (1931); D. Horton, J. Org. Chem. 29, 1776 (1964); P. H. Gross e R. W. Jeanloz, J. Org. Chem. 32, 2759 (1967); M. L. Wolfrom e H. B. Bhat, J. Org. Chem. 32, 1821 (1967); general: J. F. W. McOmie (Editor). Prot. Groups. Org. Chem., Plenum Press (1973); Geiger em "The Peptides" Vol. 3, p 1-99, (1981) Academic Press; e Literature cited there). Grupos amino-protetores preferidos para a preparação dos compostos de acordo com Fórmula I são o grupo BOC group (ter- butiloxicarbonil) ou o grupo Z (benziloxicarbonil).

[0029]Os derivados amino-açúcar bloqueados (IV) são reagidos, numa primeira etapa de reação, com aminas (Fórmula V),



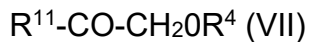
onde R^1 tem o significado acima mencionado, para produzir glicosilaminas (Fórmula VI)



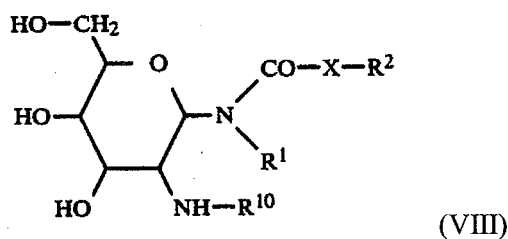
(VI)

[0030]Preparações de glicosilamina desse tipo são conhecidas em princípio (ELLIS, Advances em Carbohydrate Chemistry 10, 95 (1955)) e são, especificamente, descritas em DE-OS (German Published Specification) No. 3.213.650.

[0031]Na segunda etapa de reação, as glicosilaminas (VI) são reagidas ou com adequados derivados ácidos carboxílicos (Fórmula VII), tal como haletos de carboxila, ou anidridos carboxílicos,



R^2 possuindo o significado acima mencionado, e R^{11} representando halogênio tal como, por exemplo, cloro, ou representando -O-CO-R^2 com o significado acima mencionado para R^2 , ou representando -O-CO-O- alquila inferior. Desse modo, glicosilamidas (Fórmula VIII)



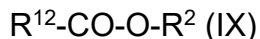
em que R^1 , e R^2 possuem os significados acima mencionados, e R^{10} é igual como R^6 e X representa $\text{-CH}_2\text{-}$, são obtidos. As condições para as N-acilações desse tipo estão indicadas em DE-OS (German Published Specification) No. 3.213.650.

[0032]Em uma modalidade preferida, as glicosilaminas de Fórmula VI são reagidas com um a dois equivalentes de um cloreto de carbonila (Fórmula VII) ou com um a dois equivalentes de um anidrido misto o qual foi obtido a partir do ácido carboxílico pertinente $R^2\text{-CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$ e cloroformiato de etila ou cloroformiato de isobutila, em presença de uma base orgânica auxiliar, através de métodos conhecidos da literatura, para produzir a glicosilamida de Fórmula VIII com $X=\text{-CH}_2\text{-}$.

[0033]Isto é realizado em solventes orgânicos ou solventes aquosos-orgânicos entre 0°C e 50°C , onde apropriado em presença de uma base inorgânica ou orgânica. Adequados diluentes são álcoois, tal como metanol, etanol, 1-propanol ou 2-propanol, ou éteres, tal como éter dietílico, tetraidrofurano ou 1,4-dioxano, ou hidrocarbonetos halogenados, tal como diclorometano, triclorometano ou 1,2-dicloroetano, ou N,N-dimetilformamida.

[0034]Quando as glicosilaminas (VI) que são obtidas na primeira etapa são

reagidas com ésteres halogeno-fórmicos (IX)



R^{12} representando halogênio tal como, por exemplo, cloro ou bromo, e R^2 possuindo o significado acima mencionado, então os glicosilcarbamatos (VIII) são obtidos, X na Fórmula VIII representando oxigênio.

[0035]Em uma modalidade, as glicosilaminas de Fórmula VIII são reagidas com um a dois equivalentes de um éster clorocarbônico IX para produzir o glicosilcarbamato. Isto é preferivelmente realizado em solventes orgânicos ou solventes aquosos-orgânicos em temperaturas entre 0° C e 50° C, mas particularmente preferivelmente na temperatura ambiente. Solventes adequados são álcoois, éteres, hidrocarbonetos halogenados ou dimetilformamida, tal como são mencionados acima.

[0036]Quando glicosilaminas (VI) as quais são obtidas na primeira etapa são reagidas com um a dois equivalentes de um isocianato orgânico (Fórmula X)



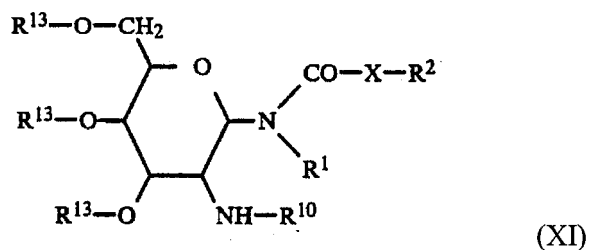
com R^2 possuindo o significado acima mencionado, glicosiluréias de Fórmula VIII são obtidas, e X é -NH-. Essa reação de acilação, como as reações acima mencionadas, é preferivelmente realizada em solventes orgânicos, com as temperaturas de reação estando entre -20° C e 60° C, preferivelmente entre 0° C e 25° C. Solventes adequados são os acima mencionados álcoois, éteres, hidrocarbonetos halogenados, ou dimetilformamida.

[0037]As glicosilamidas (Fórmula VIII, X= -CH₂-), glicosilcarbamatos (Fórmula VIII, X= -O-) ou glicosiluréias (Fórmula VIII, X= -NH-) obtidos desse modo são isolados na forma de sólidos cristalinos ou amorfos através de processos conhecidos individualmente e, se necessário, são purificados através de procedimentos padrões tais como recristalização, cromatografia, extração, etc.

[0038]Em muitos casos, é também vantajoso realizar, em paralelo com ou

em lugar das acima mencionadas etapas de purificação, uma derivação química que leve a um derivado das glicosilamidas, -carbamatos e -uréias de Fórmula VIII, os quais possuam boas propriedades de cristalização. Derivações químicas desse tipo são, no caso das glicosilamidas, glicosilcarbamatos e glicosiluréias de acordo com a invenção, por exemplo reações de esterificação nos grupos hidroxila dos resíduos açúcar. Exemplos de adequados grupos éster são grupos acetil, benzoil ou p-nitrobenzoil.

[0039] Para preparar os derivados tri-O-acil das glicosilamidas, glicosiluréias ou glicosilcarbamatos, os correspondentes trióis (Fórmula VIII) são reagidos com agentes de acilação em presença de bases auxiliares orgânicas ou inorgânicas. Adequados agentes de acilação são cloretos ácidos, tal como cloreto de acetila, cloreto de benzoil ou cloreto de p-nitrobenzil, ou anidridos, tal como, por exemplo, anidrido acético. Isso resulta na formação de ésteres de acordo com Fórmula XI



com R^1 , R^2 , R^{10} e X possuindo os significados acima mencionados e R^{13} representando acetil, benzoil ou p-nitrobenzoil.

[0040] As reações de O-acilação são preferivelmente realizadas em solventes orgânicos inertes. Aqueles que podem ser usados são hidrocarbonetos halogenados, tal como diclorometano, triclorometano ou 1,2-dicloroetano, éteres, tal como tetraidrofurano, ou 1,4-dioxano, ésteres, tal como acetato de etila, e amidas, tal como dimetilformamida.

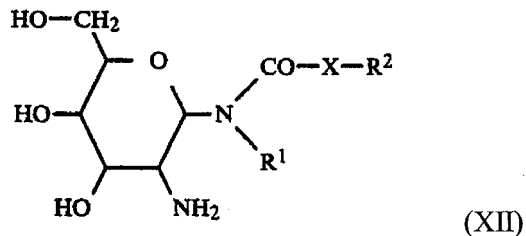
[0041] É também possível para bases orgânicas sozinhas, tal como trietilamina ou piridina, serem indicadas como solventes adequados. As bases que

podem ser usadas são todas as bases usadas na química orgânica para as O-acilações. Preferivelmente, trietilamina, piridina ou a mistura de piridina/4-dimetilaminopiridina são usados. Os triésteres (Fórmula XI) podem ser facilmente cristalizados a partir de solventes orgânicos. Particularmente preferidos para a cristalização são solventes polares, tal como álcoois de cadeia curta, que significa dizer metanol, etanol, n-propanol ou isopropanol. Outros solventes adequados para a cristalização dos triésteres (Fórmula XI) são misturas de solventes orgânicos com solventes inorgânicos ou orgânicos polares, por exemplo, tetraidrofurano-metanol, tetraidrofurano-água, etanol-água, e isopropanol-água. Os triésteres (Fórmula XI) os quais tenham sido purificados por meio de recristalização simples, ou onde apropriado por recristalização múltipla são retornados aos trióis (Fórmula VIII) por hidrólise ou transesterificação dos três grupos O-acetil. Uma multiplicidade de clivagens éster são conhecidas na química orgânica. A preparação dos trióis (Fórmula VIII) a partir dos triésteres (Fórmula XI) mencionada pode ser feita da transesterificação dos grupos acila em presença de metanol e quantidades catalíticas de metanolato de sódio, que é conhecido como hidrólise ZEMPLÉN na química orgânica.

[0042]A terceira etapa de reação na preparação dos compostos de Fórmula I de acordo com a invenção compreende a clivagem seletiva do grupo protetor do grupo 2-amino no açúcar nos compostos de Fórmula VIII. Nessa reação, precisa ser tomado cuidado particular pelo fato de que não existe a eliminação simultânea do grupo 1-amido ou do grupo 1-carbamido ou do grupo 1-(alcoxicarbonilamido) no açúcar nos compostos de Fórmula VIII.

[0043]O grupo benziloxycarbonil, o qual é preferivelmente usado, no C-2 dos amino-hexanos pode ser quantitativamente e seletivamente clivado, com a retenção do grupo 1-amido, 1-carbamido ou 1-alcoxicarbonilamido, sob as condições de hidrogenólise. A hidrogenólise proporciona as glicosilamidas, glicosiluréias ou

glicosilcarbamatos com um grupo 2-amino livre no açúcar, com a seguinte Fórmula Estrutural (XII)



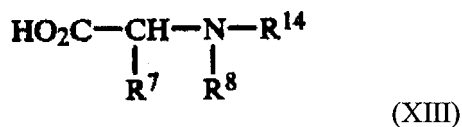
com o significado acima mencionados for R^1 , R^2 e X.

[0044]Exemplos de catalisadores adequados para a hidrogenólise são metais nobres tal como platina ou paládio os quais são adsorvidos sobre carvão ativo. Paládio/carvão (5% ou 10%) é preferivelmente usado. A hidrogenólise pode ser realizada sob pressão atmosférica ou pressão elevada em um vaso de pressão adequado. Solventes inertes são adequados para a hidrogenação, tal como, por exemplo, álcoois tal como metanol, etanol, ou propanol, éteres tal como tetraidrofurano ou 1,4-dioxano, ou ácidos carboxílicos tal como ácido acético, ou misturas desses mencionados. Onde apropriado, o solvente é misturado com água ou ácidos diluídos tal como ácido clorídrico ou ácido sulfúrico. Naturalmente, quando tais ácidos são acrescentados, as 2-amino-2-desóxi-glicosilamidas, -carbamatos e -uréias de acordo com Fórmula XII são obtidas como os sais amônio desses ácidos. O grupo protetor t-butiloxicarbonil, que é igualmente preferivelmente usado nos compostos de Fórmula VIII, pode ser clivado através de métodos conhecidos a partir da literatura usando ácidos minerais tal como ácido clorídrico ou ácido sulfúrico. Nesse caso também, as 2-amino-2-desóxi-glicosilamidas, -carbamatos e -uréias de Fórmula XII são seletivamente obtidas como os sais amônio dos ácidos usados para a clivagem.

[0045]A quarta etapa de reação para a síntese dos compostos de Fórmula I,

de acordo com a invenção, compreende a ligação das aminoglicosilamidas, amidas, -carbamatos ou -

uréias de acordo com Fórmula XII, ou de seus sais, com a adequados derivados aminoácidos. Adequados derivados aminoácidos são aminoácidos N-bloqueados Fórmula (XIII)



com R⁷ possuindo o significado acima mencionado,

R⁸ representando hidrogênio ou metil, e

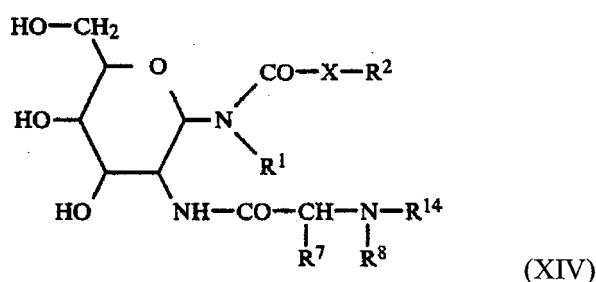
R¹⁴ representando um grupo protetor que é usualmente utilizado na síntese de peptídeos e pode ser seletivamente eliminado novamente embora mantendo a ligação peptídeo.

[0046]Os grupos protetores para o grupo amino na Fórmula XIII que são preferivelmente usados são os acima mencionados, e os grupos benziloxicarbonil ou t-butiloxicarbonil são particularmente preferidos. A ligação da 2-amino-2-desóxi-glicosilamida, -carbamato ou -uréia de Fórmula XII com um derivado aminoácido de Fórmula XI EI pode ser realizada por meio de métodos convencionais de síntese de peptídeos (E. Wunsch e outros: Synthese von Peptiden (Synthesis de peptides) em: Methoden der Org. Chemie (Methods de org. chemistry) (Houben-Weyl) (E. Muller, Editor), Vol XV/I e XV/2, 4th Edition, publicada por Thieme, Stuttgart (1974).

[0047]Exemplos de processos convencionais são a condensação do grupo amino no composto de Fórmula XII com um derivado aminoácido de Fórmula XIII em presença de agentes removedores de água, por exemplo, dicitloexilcarbodiimida ou diisopropilcarbodiimida.

[0048]A condensação dos compostos de Fórmula XII com aqueles de

Fórmula XIII pode ser também realizada quando o grupo carboxila está ativado. Um grupo carboxila ativado possível é, por exemplo, um anidrido ácido, preferivelmente um anidrido misto, tal como um acetato do ácido, ou uma amida do ácido, tal como uma imidazolida, ou um éster ativado. Exemplos de ésteres ativados são os ésteres de cianometila, ésteres de pentaclorofenila, e ésteres de N-hidroxiftalimida. Ésteres ativados podem ser também obtidos a partir do ácido (Fórmula XIII) e N-hidroxisuccinimida ou 1-hidroxibenzotiazol em presença de um agente de remoção de água, tal como carbodiimida. Os derivados aminoácidos são conhecidos e podem ser preparados em um modo conhecido. A condensação do amino-composto de fórmula XII com os compostos carboxílicos de Fórmula XIII opcionalmente ativados proporciona os peptidoglicolipídios de Fórmula XIV.

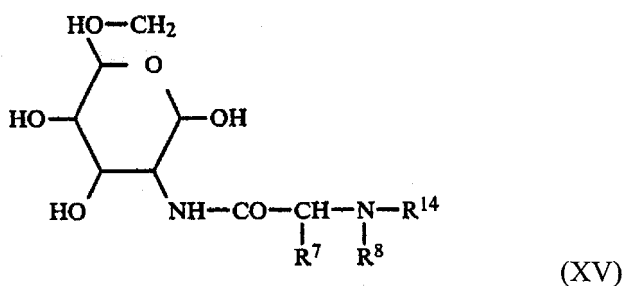


com os significados acima mencionados para R¹, R², R⁷, R⁸, R¹⁴ e X.

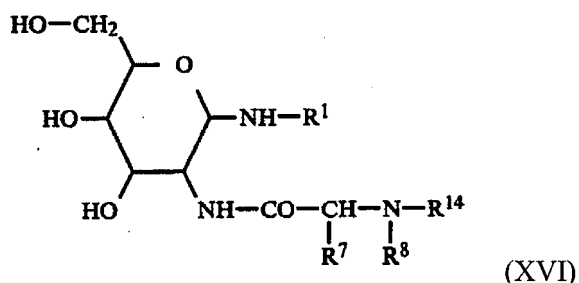
[0049] Numa etapa final do processo para a preparação dos compostos de acordo com Fórmula I, o grupo protetor R¹⁴ nos compostos de Fórmula XIV é eliminado. Deve ser tomado cuidado durante essa etapa para que os outros grupos amida, uretano ou uréia presentes nos compostos de Fórmula XIV não sejam clivados. Os grupos protetores R¹⁴ que são preferivelmente usados nos compostos de Fórmula XIV, o grupo N-carbobenzoxi e o grupo N-ter-butiloxycarbonil, podem ser eliminado embora mantendo o grupo amida, uretano ou uréia. O grupo carbobenzoxi pode ser seletivamente eliminado por hidrogenólise em presença de um metal nobre

tal como, por exemplo, paládio sobre carvão, em um solvente adequado tal como etanol, metanol, ácido acético glacial ou tetraidrofurano. Os solventes podem ser usados como o solvente puro ou combinados entre si ou com água. A reação pode ser realizada ou sob pressão atmosférica ou sob pressão elevada. O grupo tert-butiloxicarbonil R^{14} nos compostos de Fórmula XIV pode ser eliminado por meio de processos acidolíticos. Exemplos de condições adequadas são o uso de cloreto de hidrogênio nos solventes adequados, tal como, por exemplo, ácido acético glacial, éter dietílico, dioxano ou etil acetato, na temperatura ambiente. Processos desse tipo para a clivagem dos t-butil carbamatos são conhecidos em princípio. As peptidoglicosilamidas, -carbamatos e -uréias de Fórmula I que são obtidas desse modo, são isoladas na forma de sólidos cristalinos ou amorfos, através de processos conhecidos individualmente, e são, se necessário, purificadas através de métodos padrões, tal como recristalização, cromatografia, extração, etc.

[0050] Os compostos de acordo com a invenção, de Fórmula I, podem ser também preparados por meio de uma segunda rota sintética com resultados similarmente bons. Esta segunda rota sintética difere da primeira, a qual está descrita acima, pelo fato de que a seqüência da ligação dos sintons amino açúcar aminoácido, amina R^1 NH_2 e ácido carboxílico R^2-CH_2-H , ou derivado ácido carbônico R^2-O-CO -halogênio, ou R^2-NCO , com os significados acima de R^1 e R^2 , é diferente. Nesta segunda rota, 2-N-(aminoacil)amino-açúcares adequados de Fórmula XV



com o significado acima mencionado para R^7 e R^8 , e na qual R^{14} representa um grupo protetor amino conhecido na química de peptídeos, preferivelmente o grupo benziloxicarbonil ou o grupo t-butiloxicarbonil, são usados as o componente de partida. Os compostos de Fórmula XV que são desse modo obtidos são em seguida condensados com os compostos amino de Fórmula III para produzir glicosilaminas da Fórmula Geral XVI

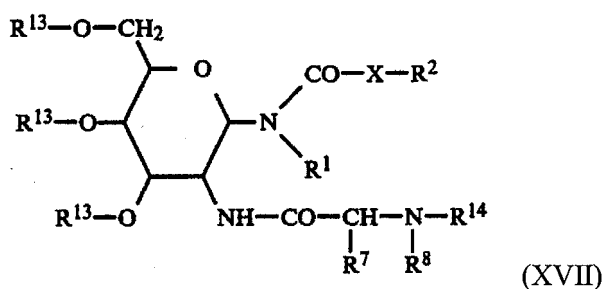


com R^1 , R^7 , R^8 e R^{14} possuindo significados consistentes com a Fórmula I e a definição de R^6 .

[0051] Todos os processos descritos acima para a preparação dos compostos da Fórmula Geral VI podem ser usados para a preparação dos compostos da Fórmula Geral XVI. Os compostos de Fórmula XVI são em seguida reagidos ou com os acima mencionados derivados ácidos carboxílicos (Fórmula VII) ou com ésteres halogeno-fórmicos (Fórmula IX) ou com isocianatos orgânicos (Fórmula X) para produzir as 2-(aminoacil)-aminoglicosilamidas de Fórmula XIV (com $X = -CH_2-$), ou os -carbamatos de Fórmula XIV (com $X = -O$), ou as - uréias de Fórmula XIV (com $X = -NH-$). Essas reações de acilação podem ser realizadas geralmente por meio dos processos descritos acima para a reação de glicosilaminas com derivados de ácido carboxílico ou de ácido carbônico.

[0052] Os intermediários (Fórmula XIV) que são obtidos desse modo podem

ser purificados através do método físico de purificação anteriormente mencionado. Entretanto, é preferível converter os compostos de Fórmula XIV, através dos métodos de O-acilação descritos acima, na forma dos tri-O-acetatos ou dos tri-O-benzoatos da Fórmula Geral XVII



com os significados para as variáveis consistentes com a fórmula 1.

[0053]Esses compostos podem ser facilmente cristalizados, preferivelmente a partir de solventes polares tal como metanol ou etanol, e desse modo purificados. Os derivados cristalinos purificados derivados da Fórmula XVII são então convertidos nos trióis de Fórmula XIV por meio dos métodos acima mencionados de hidrólise éster, os quais são amplamente usados especialmente na química do açúcar. A eliminação final dos grupos protetores no aminoácido nos compostos de Fórmula XIV já foram descritos acima para a preparação dos compostos de Fórmula I. A invenção também está relacionada aos sais dos compostos de Fórmula I. Estes são primordialmente os sais não tóxicos que podem ser usualmente utilizados em farmácia, por exemplo, cloretos, acetatos, e lactatos, ou sais inertes dos compostos de Fórmula I.

[0054]O termo “ácido fraco” significa qualquer ácido possuindo um valor de pKa (o -log da Ka) de entre cerca de 1,0 e cerca de 9,5 usando tabelas ou valores padrões. Embora não pretendendo limitar essa invenção, os exemplos apresentados a seguir de ácidos fracos, são descritos com nome, fórmula, e pKa aproximado. Ácido acético, $H(C_2H_3O_2)$ (pKa 4,76); ácido ascórbico (1), $H_2(C_6H_6O_6)$ (pKa 4,10);

ácido acetilsalicílico, $H_8(C_9O_4)$, (pKa 3,5,); ácido butanóico $H(C_4H_7O_2)$ (pKa 4,83); ácido carbônico formas 1, H_2CO_3 , (pKa 4,83); ácido crômico forma 2, $HCrO_4^-$ (pKa 6,49); ácido cítrico, $H_3(C_6H_5O_7)$ forma 1), (pKa 3,14); ácido cítrico forma 2, $H_2C_6H_5O_7^-$, (pKa 4,77); ácido cítrico forma 3, $(HC_6H_5O_7)^=$, (pKa 6,39); ácido fórmico, $H(CHO_2)$, (pKa 3,75); ácido fumárico, $H_4(C_4O_4)$ (pKa 3,03); ácido heptanóico, $H(C_7H_{13}O_2)$, (pKa 4,89); ácido hexanóico, $H(C_6H_{11}O_2)$, (pKa 4,84); ácido fluorídrico, HF, (pKa 3,20); isocitrato, $H_8(C_6O_7)$ (pKa 3,29); ácido lático, $H(C_3H_5O_3)$, (pKa 3,08); ácido maleico, $H_4(C_4O_4)$ (pKa 1,83); ácido nicotínico, $H_5(C_6NO_2)$ (pKa 3,39); ácido oxálico forma 1, $H_2(C_2O_4)$, (pKa 1,23); ácido oxálico forma 2, $(HC_2O_4)^-$, (pKa 4,19); ácido pentanóico, $H(C_5H_9O_2)$, (pKa 4,84); ácido fosfórico forma 1, H_3PO_4 , (pKa 2,16); ácido propanóico, $H(C_3H_5O_2)$, (pKa 4,86); ácido pirúvico, $H_4(C_3O_3)$ (pKa 2,39); ácido succínico $H_6(C_4O_4)$ (pKa 4,19) e ácido tricloroacético, $H(C_2C_{13}O_2)$ (pKa 0,70). Quaisquer combinações desses são também exemplificadas.

[0055]Ácido acético é preferido. Ácido acetilsalicílico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido fluorídrico, isocitrato, ácido maleico, ácido nicotínico, ácido fosfórico, ácido pirúvico, ácido succínico e ácido trifluoroacético são os ácidos fracos mais comuns que são materializados individualmente, em combinação e como uma coleção.

[0056]O termo “tensoativo não-iônico” significa um tensoativo que seja uma substância que reduza a tensão superficial do material no qual ele está dissolvido e não-iônico significa que ele possui um grupo polar que não está eletricamente carregado. O termo tensoativo anfifílico significa um tensoativo onde uma parte da molécula do tensoativo é hidrofóbica e uma parte é hidrofílica. Tensoativos adequados são tanto não-iônicos e anfifílicos e aceitáveis para uso veterinário ou médico. Se um tensoativo não-iônico em particular é ou não aceitável par uso médico ou veterinário isto pode ser facilmente determinado por aqueles usualmente versados na técnica. Existem muitos tensoativos não-iônicos adequados que podem

ser usados com essa invenção e numerosos exemplos são providos adiante.

[0057]Dois tipos bem conhecidos de tensoativos não-iônicos são incluídos aqui. Estes são conhecidos como sorbitanos, usualmente comercializados sob o nome comercial Span®, e polioxietileno sorbitanos, usualmente comercializados sob o nome comercial Tween®. Especificamente incluídos aqui são os seguintes: monolaurato de Sorbitano (Span 20®), monopalmitato de Sorbitano (Span 40®), monostearato de Sorbitano (Span 60®), tristearato de Sorbitano (Span 65®), monooleato de Sorbitano (Span 80®), trioleato de Sorbitano (Span 85®), monolaurato de Polioxietilensorbitano (Tween 20®), monopalmitato de Polioxietilensorbitano (Tween 40®), monosterato de Polioxietilensorbitano (Tween 60®), monooleato de Polioxietilensorbitano (Tween 80), e trioleato de Polioxietilensorbitano (Tween 85). Essas descrições são significadas incluir o nome comercial dos ingredientes, ou ingredientes equivalentes, como listados em catálogos de fornecedores para esses tensoativos. Os tensoativos podem ser usados individualmente ou em qualquer combinação.

[0058]Monolaurato de sorbitano (Span 20®), monolaurato de Polioxietilensorbitano (Tween 20®), monooleato de Sorbitano (Span 80®), trioleato de Sorbitano (Span 85®), monooleato de Polioxietilensorbitano (Tween 80), trioleato de Polioxietilensorbitano (Tween 85) são particularmente descritos.

[0059]O termo “tampão adequado” significa um tampão que é adequado para uso veterinário ou métrico e pode manter um pH relativamente constante numa solução aquosa de entre cerca de 6 e cerca de 8. Tampões fosfato são uma modalidade descrita aqui. Tampões fosfato podem ser feitos num pH específico numa faixa ampla por meio da mistura de sais monobásicos e dibásicos de fosfato de sódio e/ou fosfato de potássio em diferentes proporções. A fabricação e o uso de diversos tampões de sódio e potássio é bem conhecida por aqueles usualmente versados na técnica.

[0060]Outros exemplos de tampões são apresentados a seguir:

Ácido 2-(N-morfolino)etano-sulfônico (também conhecido como MES);

Ácido 3-(N-morfolino)propano-sulfônico (também conhecido como MOPS);

Ácido N-[tris (hidroximetil)-2-aminoetano-sulfônico (também conhecido como TES);

Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etano-sulfônico (também conhecido como HEPES);

[tris (hidroximetil)metil]glicina (também conhecido como TRIS).

[0061]Parte I. Preparação das soluções.

[0062]As novas formulações reveladas aqui são 1) Soluções Estoque de Glicosilamida e 2) Soluções de Adjuvante Glicolipídio

[0063]1) Uma Solução Estoque de Glicosilamida é preparada mediante dissolver um glicolipídio em um álcool e combinar quantidades apropriadas de um ácido fraco. O ácido fraco é acrescentado à solução alcoólica de glicolipídios, em excesso molar do ácido fraco com referência aos glicolipídios. Um tensoativo não-iônico é acrescentado mistura ácida alcoólica de glicolipídios para criar a Solução Estoque de Glicosilamida. O glicolipídio exemplificado é o acetato de N-(2-desóxi-2-L-leucilamino- β -D-glicopiranosil)-N-octadecildodecanoilamida. O álcool exemplificado é etanol. O ácido fraco exemplificado é ácido acético. Os tensoativos não-iônicos são as descritos acima.

Preparação de Soluções Estoque de Glicosilamida.

[0064]O ácido fraco é acrescentado a uma solução alcoólica contendo um glicolipídio. O ácido fraco é acrescentado em excesso molar com referência ao teor do glicolipídio. O ácido fraco componente deve ser acrescentado de 1,25 a 5 vezes a quantidade do glicolipídio, em equivalentes molares em relação ao glicolipídio. Em certas modalidades as seguintes quantidades relativas de ácido são recomendadas. A quantidade molar do ácido fraco deve ser 2,0 vezes, 2,5 vezes, 2,7 vezes, 3,0

vezes, e 5,0 vezes, e muito preferido de 2,7 vezes mais que a quantidade molar do glicolípido.

[0065]Um tensoativo não-iônico é acrescentado à mistura alcoólica de glicolípido apresentada acima, ou antes ou após o ácido fraco ser acrescentado, para criar a Solução Estoque de Glicosilamida final.

[0066]Em presença do ácido fraco, a glicosilamida é convertida na forma acetato do glicolípido. Os glicolípidos de Fórmula I não são totalmente solúveis quando simplesmente introduzidos diretamente nas soluções aquosas tamponadas. A solução obtida tipicamente a partir da dissolução de um glicolípido de Fórmula I numa solução aquosa tamponada é uma mistura leitosa. Pesquisadores anteriores tentaram produzir tais soluções na forma de misturas homogêneas mediante submeter a solução leitosa à ação sônica. Todavia, o efeito da ação sônica não garante que a solução irá permanecer homogênea durante a estocagem. A abordagem química de suspender esses compostos resulta numa solução totalmente solúvel, quase que opticamente limpa, de glicolípido tamponado em meio aquoso, em pH apropriado. Quando o ácido fraco é acrescentado em excesso de quantidade comparada com a dos glicolípidos é assegurado que a totalidade do glicolípido está convertida na forma solúvel, e sua reversão de volta à forma não solúvel é impedida.

[0067]O ácido fraco converte os glicolípidos em um sal farmacologicamente aceitável. Sais preferidos são sais não tóxicos, os quais são usualmente utilizados em preparações farmacêuticas e biológicas. Por exemplo, cloretos, acetatos, lactatos, e sais inertes dos compostos de fórmula I, são obtidos com os ácidos fracos descritos aqui.

[0068]Os álcoois usados para dissolver o glicolípido podem ser metanol, etanol, qualquer forma isomérica de propanol, ou qualquer combinação desses mencionados. A solução alcoólica de glicolípido resultante será opticamente limpa.

Qualquer reação química que possa converter a forma acetato do glicolípido de volta para a forma não acetato pode provocar a floculação do glicolípido contido na Solução aquosa. Quando ocorre a floculação do glicolípido, as moléculas do glicolípido saem da solução como escamas finas, sedimentando no fundo do recipiente. A concentração inicial do ácido fraco na Solução Estoque de Glicosilamida de glicolípido e álcool determina se irá ocorrer qualquer floculação do glicolípido. O ácido fraco deverá estar em excesso molar com referência ao glicolípido para evitar floculação.

[0069]2) Soluções de Adjuvante Glicolípido são preparadas mediante introduzir uma apropriada quantidade da Solução Estoque de Glicosilamida em um “tampão adequado”. O pH das soluções estáveis finais de Adjuvante Glicolípido descritas aqui deverá estar entre cerca de 6 e cerca de 8. Um pH final de entre cerca de 6 até cerca de 7 é preferido. Um pH final de entre cerca de 6,3 até cerca de 6,4 é descrito.

[0070]A Solução Estoque de Glicosilamida contém excesso de ácido de modo que ela deverá ser tamponada para uso como um adjuvante. Por exemplo, um tampão fosfato pode ser feito num pH específico numa faixa ampla mediante a mistura de sais monobásicos e dibásicos de fosfato de sódio ou fosfato de potássio em diferentes proporções. Se um tampão fosfato é usado ele pode ser feito em torno de 20 mM, e isso tem um pH de cerca de 7,8. Quando a Solução Estoque de Glicosilamida é acrescentada ao tampão, o pH do tampão é rebaixado. Uma solução tamponada em fosfato a pH 7,8 resulta numa Solução final de Adjuvante Glicolípido com um pH de cerca de 6,4. os ajustes finais do pH podem ser feitos nas tipicamente não são necessários.

[0071]A Solução Estoque de Glicosilamida contendo o ácido fraco e um glicolípido tem um pH muito baixo. Pode ser necessário elevar o pH até um nível aceitável. Uma base forte deve ser evitada para esse propósito porque a adição de

uma base forte pode converter a forma salina do glicolípido de volta à forma não salina, resultando em precipitação (floculação) da forma não sal no ambiente aquoso. Entretanto, se uma base forte é desejado, apenas pequenas quantidades deverão ser usadas. Por exemplo, é recomendado que não mais que 100 mM NaOH seja usado, ao passo que 4,0 mM ou menos é ótimo.

[0072]A solução tamponante pode opcionalmente incluir algum NaCl, mas não é necessário. As concentrações de NaCl podem variar na faixa de a partir de cerca de 1 até cerca de 50 mM. Quantidades menores de NaCl são preferidas sobre quantidades maiores. Exemplos aqui possuem ou nada de NaCl ou 15 mM NaCl. 100 mM NaCl não é adequado devido à ocorrência de floculação. Não é esperada floculação com concentrações de NaCl de 15 mM ou menos. Não é esperada floculação com concentrações de NaCl de 30 mM ou menos. Não é esperada floculação com concentrações de NaCl de 50 mM ou menos.

Parte II. Caracterização da Solução de Adjuvante Glicolípido.

[0073]A estabilidade da Solução de Adjuvante Glicolípido durante o armazenamento pode ser monitorada por meio de simples observação visual ou por meio da utilização de instrumentos analíticos apropriados. As moléculas de glicolípidos formam micelas quando em solução aquosa e é possível determinar o tamanho das micelas precisamente com um difratômetro a laser. Uma tal medição pode ser usada para determinar se existe floculação das moléculas d glicolípido.

[0074]Uma abordagem alternativa para a medição da estabilidade em tempo real é realizar os testes acelerados d estabilidade. Com a realização dos testes acelerados de estabilidade a solução de adjuvante é submetida a uma temperatura de cerca de 37° C por cerca de sete dias, seguido por incubação em torno de 4 °C por cerca de dois dias sob agitação constante. A incubação em torno de 37 °C por cerca de sete dias representa a armazenagem em cerca de 4 °C por a período de cerca de um ano. A incubação em torno de 4 C por cerca de dois dias com agitação

constante representa a condição de estresse que a Solução de Adjuvante Glicolípido deve enfrentar durante o transporte.

[0075]Para determinar se a Solução de Adjuvante Glicolípido está isotônica com o citoplasma, a osmolaridade pode ser determinada. Diferentes concentrações de cloreto de sódio podem ser acrescentadas e a osmolaridade da solução resultante determinada usando um osmômetro. Concentrações crescentes de cloreto de sódio, além de aumentar a osmolaridade, também tendem a tornar a solução mais turva. A turbidez é considerada ser causada por meio da agregação das micelas na forma de partículas maiores. Soluções que sejam difíceis ou impossíveis de filtrar usando um filtro de 0,2 μm não são geralmente aceitáveis para uso comercial porque a filtração terminal é freqüentemente usada para assegurar a esterilidade das soluções de adjuvante preparadas numa escala comercial. Uma análise por microscópio eletrônico pode ser usada para determinar se existe uma agregação das micelas como um resultado de muita concentração de sal.

[0076]Adjuvantes não-glicolípido adicionais podem ser usados na Solução de Adjuvante Glicolípido em combinação com aqueles descritos acima. Em uma outra modalidade da invenção, moléculas imunoestimulatórias adicionais são acrescentadas a uma solução de Adjuvante Glicolípido. As moléculas imunoestimulatórias são bem conhecidas na arte, e elas incluem saponinas, Quil A, brometo de dimetil dioctadecil amônio (DDA) e Carbopol.

[0077]Quil A é um extrato purificado proveniente da casca da árvore originária da América do Sul Quillaja saponaria. Quil A induz ambas as respostas humoral e célula-mediada. Quil A é freqüentemente usada com colesterol porque o colesterol elimina os efeitos colaterais menos desejáveis quando acrescentado em proporções apropriadas. O colesterol forma complexos insolúveis com a Quil A que forma estruturas do tipo helicóide à medida que o colesterol se liga com Quil A, expondo desse modo as unidades açúcar da molécula que ajudam a estimular a

imuno-resposta.

[0078]Brometo de dimetil dioctadecil amônio, (DDA), é um tensoativo catiônico com cadeias alquila de 18 carbonos. Ele é uma amina quaternária anfifílica. A interação direta do DDA e o antígeno é necessária para se obter uma imuno-resposta ótima, porque o DDA funciona como um veículo do antígeno através da ligação direta do antígeno na interface óleo/água. Ele estimula ambas as respostas humoral e a resposta célula-mediada.

[0079]Carbopol é uma outra molécula imunoestimulatória útil que pode ser usada com essa invenção. Ele é um homopolímero de ácido acrílico que é reticulado com um éter de polialquenila.

Parte III. Usos da Solução de Adjuvante Glicolipídio.

[0080]A Solução de Adjuvante Glicolipídio, em uma forma de sal farmacologicamente aceitável, pode ser misturada com um antígeno. Antígenos convenientes incluem: proteínas de patógenos microbianos, glicoproteínas, lipoproteínas, peptídeos, glicopeptídeos, lipopeptídeos, toxóides, carboidratos, e antígenos tumor-específicos. Os antígenos podem ser derivados a partir de uma variedade de fontes. Antígenos provenientes de patógenos virais incluem bactérias, vírus e organismos parasitas causadores de doenças. Misturas de dois ou mais antígenos podem ser empregadas. O antígeno pode ser morto, naturalmente atenuado, vivo modificado, ou um extrato de proteína, proteína produzida de modo recombinante, um peptídeo sintetizado quimicamente ou qualquer outra coisa que estimule uma imuno-resposta. O antígeno peptídeo pode existir como um peptídeo em estado livre ou conjugado ao glicolipídio ou conjugado a outros epitopos de célula-B ou célula-T conhecidos.

[0081]A solução estável de Adjuvante Glicolipídio pode ser combinada com adjuvantes ou componentes adicionais componentes os quais sejam conhecidos por possuir propriedades adjuvantes. Adjuvantes adicionais que podem ser

combinados com a Solução de Adjuvante Glicolípido incluem polímeros, compostos terpenóides naturalmente ocorrentes em sua forma bruta ou parcialmente purificada, amina quaternária anfifílica, derivados de materiais da parede celular bacteriana, e análogos sintéticos da parede celular bacteriana ou componentes DNA. A Solução de Adjuvante Glicolípido pode ser usada ou combinada com um ou mais agentes tais como antibióticos ou diferentes antígenos. Antígenos bacterianos ou virais podem ou estarem mortos ou vivos modificados. Antígenos virais mortos são preparados por meio do crescimento de vírus em cultura tecidual e a inativação dos vírus através de tratamentos químicos. Alguns vírus podem ser crescidos em ovos embrionados. O antígeno viral morto pode ser acrescentado à solução contendo a Solução de Adjuvante Glicolípido, e a solução resultante pode ser usada para vacinar os animais para conseguir proteção contra as infecções virais.

[0082]Em uma modalidade dessa invenção, a Solução de Adjuvante Glicolípido pode ser usada como um diluente para antígenos virais vivos modificados. Patógenos virais podem ser atenuados em sua virulência ou por meio da passagem deles em cultura tecidual por diversas gerações ou através de manipulações específicas do genoma viral. Tais cepas virais atenuadas podem ser crescidas até títulos muito altos em cultura tecidual e podem ser usadas como antígenos de vacina. Cepas virais atenuadas são referidas como antígenos virais vivos modificados. Embora essas cepas sejam menos virulentas, elas são ainda altamente imunogênicas quando usadas como um antígeno na vacina e oferecem proteção contra a infecção por meio de cepas virulentas. No caso da Solução de Adjuvante Glicolípido ser usada como um diluente para os antígenos virais vivos modificados, a Solução de Adjuvante Glicolípido deverá ser testada para assegurar que ela não possui nenhum efeito viricida sobre o vírus particular de interesse.

[0083]A propriedade viricida da Solução de Adjuvante Glicolípido sobre os antígenos virais vivos modificados pode ser determinada em um experimento em

vitro. Antígenos virais liofilizados são reidratados com a Solução de Adjuvante Glicolípido ou com água. As soluções virais resultantes são plaqueadas sobre uma monocamada de células permissivas. O título do antígeno viral é determinado mediante a contagem do número de placas formadas sobre a monocamada. A diferença nos títulos virais obtidos entre as amostras reidratadas com água e a Solução de Adjuvante Glicolípido pode ser usada para determinar qual, se houver, o efeito vifícida da Solução de Adjuvante Glicolípido sobre qualquer vírus vivo.

[0084]Antígenos virais vivos modificados podem ser liofilizados e providos como massas liofilizadas em uma preparação de vacina comercial. Em geral essas massas liofilizadas de antígenos virais vivos modificados são reidratadas com uma solução diluente e usadas para vacinação de modo parenteral.

[0085]Exemplos de diluentes incluem uma solução aquosa contendo salino tamponado em fosfato. Se a solução diluente contém uma molécula imunoestimulatória conhecida, a eficiência da vacinação com os antígenos virais vivos modificados pode ser aprimorada. Em uma modalidade da presente invenção, a Solução de Adjuvante Glicolípido é usada como uma solução diluente.

EXEMPLOS

Exemplo 1.

[0086]Preparação de uma composição glicosilamida insolúvel com concentração igual de Bay 15-5831® e ácido acético.

Tabela 1.

Uma composição não adequada para uso comercial.

Reagente	Quantidade (200 mL)
etanol	176,1 mL
Tween 20	4,0 mL
Ácido acético glacial	1,5 mL
Bay 15-5831®	18,4 g

[0087]Bay 15-5831® está registrado para the Bayer Company, é o nome comercial para N-(2-desóxi-2-L-leucilamino-β-D-glicopiranosil)-N-octadecildodecanoilamida. Quando esse composto é usado para fazer um adjuvante solução usando as composições descritas na Tabela 1, acima, onde o ácido acético é usado em concentração molar igual à do glicolípido, e o glicolípido está em sua forma base livre, o glicolípido é insolúvel e floclula.

Exemplo 2

[0088]Uma Solução Estoque de Glicosilamida solúvel que utiliza os mesmos componentes como no Exemplo 1, mas com um aumento na concentração de ácido acético relativamente à concentração do glicolípido, resulta numa Solução Estoque de Glicosilamida solúvel.

Tabela 2.

Composição de a Solução Estoque de Glicosilamida.

Reagente	Quantidade (50 mL)
Etanol (60% v/vol)	44,64 mL
Tween 20	1,12 mL
Ácido acético glacial	0,68 mL
Bay 15-5831®	3,49 g

[0089]Aqui, etanol 60% (v/v) foi usado, e a relação molar de ácido acético em relação ao to glicolípido é de 2,0. O etanol da prova 200 do Exemplo 1 foi substituído com etanol 60% em água. A Solução Estoque de Glicosilamida resultante foi oticamente limpa e não havia sedimentação no fundo do recipiente. Essa Solução Estoque de Glicosilamida é acrescentada a diversos tampões para produzir uma Solução de Adjuvante Glicolípido no Exemplo 3, adiante.

Exemplo 3.

Preparação de Soluções de Adjuvante Glicolípido

[0090]Soluções tampão em fosfato em diferentes pHs foram preparadas.

Uma solução estoque 2M de fosfato monobásico de sódio foi preparada mediante dissolver 138 gramas de sal de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em 250 mL de água DI em um béquer e levando o volume final para 500 mL. De modo similar, uma solução estoque 2M de fosfato dibásico de sódio foi preparada mediante dissolver 142 gramas de Na_2HPO_4 em 300 mL de Água DI em um béquer trazendo o volume final a 500 mL. Ambas as soluções estoques foram esterilizadas por filtração usando um filtro de 0,2 micron.

Tabela 3.

Composições da solução estoque 1M da solução tampão de fosfato de sódio em diferentes pHs

pH calculado	Solução Na_2HPO_4 (mL)	Solução $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (mL)	Volume total da solução estoque 2M (mL)	Água DI estéril acrescentada (mL)	Volume total da solução estoque 1M (mL)
6,0	87,7	12,3	100	100	200
6,5	68,5	31,5	100	100	200
7,0	39,0	61,0	100	100	200
7,5	16,0	84,0	100	100	200
7,8	8,5	91,5	100	100	200

[0091]Diferentes volumes de soluções estoques 2M de fosfato monobásico de sódio e fosfato dibásico de sódio como mostradas na Tabela 3 foram preparados, em seguida solução 1M de soluções tampões de fosfato de sódio foram obtidas a diferentes níveis de pH. As soluções 1M de tampão fosfato foram em seguida diluídas 50X para obter tampões fosfato 20 mM.

[0092]Soluções de Adjuvante Glicolípido foram preparados usando esses tampões estoque e as soluções estoque de Glicosilamida do Exemplo 2.

[0093]A 96 mL de cada uma dessas soluções fosfato 20 mM, 5 mL de

solução Estoque de Glicosilamida como preparada no Exemplo 2 foi acrescentado. A Solução de Adjuvante Glicolípido resultante continha 12,5 mM de ácido acético e 6,33 mM glicolípido. O glicolípido está agora na forma acetato.

Exemplo 4.

[0094]Significância do pH final da Solução de Adjuvante Glicolípido

[0095]Em um outro conjunto de experimentos, a significância do pH final de diversas soluções foi testada para avaliar como o pH influencia a floculação. Um tampão fosfato 20 mM foi preparado num pH inicial de 7,8. A tabela 4 mostra os adjuvantes glicolípidos preparados usando a glicosilamida preparada como no Exemplo 1, onde o glicolípido e ácido acético foram usados em concentrações molares iguais. Nota, o pH final não caiu muito (Tabela 4), indicando a eficácia do tampão. As concentrações de NaCl variaram. As leituras da densidade ótica (O.D.) a 600 nm, na Tabela 4 foram comparadas às leituras similares na Tabela 5, onde as soluções de adjuvantes glicolípido foram preparadas com Soluções Estoque de Glicosilamida contendo duas vezes a relação molar de ácido acético em relação a do glicolípido, como preparado no Exemplo 2. Utilizando quantidade ou quantidade maior de ácido acético resulta em mínima floculação. A floculação foi maior na amostra não filtrada que nas amostras filtradas. Além disso, com o aumento da concentração de NaCl, existe um aumento na floculação e ainda na precipitação. A Solução de Adjuvante Glicolípido descrita na Tabela 5 foi preparado com um tampão fosfato possuindo um pH inicial de 8,0; o pH final da Solução de Adjuvante Glicolípido estava entre 6,8 e 7,0. Uma redução adicional no pH final da Solução de Adjuvante Glicolípido pode resultar numa Solução de Adjuvante Glicolípido com menos turbidez e sem floculação.

Tabela 4.

Preparação de composições de glicosilamida contendo quantidade equimolar de ácido acético e glicolípidos. (Ver Exemplo 1)

Concentração de NaCl (mM)	Volume de tampão (mL)	Volume das composições estoque de glicolípido (mL)	pH final	O.D. a 600 nm
0	480	25	7,42	1,693
15	480	25	7,39	1,873
100	480	25	7,33	2,742

Tabela 5.

Preparação de solução de Adjuvante Glicolípido usando Solução estoque de Glicosilamida contendo duas vezes a quantidade molar de ácido acético como glicolípido (ver Exemplo 2)

Concentração de NaCl (mM)	Volume de tampão (mL)	Volume das composições estoque de glicolípido (mL)	pH final	O.D. a 600 nm
0	480	25	6,93	0,146
15	480	25	6,88	0,487
100	480	25	6,84	2,826

[0096]Uma densidade ótica (O.D) de menos de 0,1 representa uma solução translúcida. Uma densidade ótica de entre 0,1 e 0,5 é homogênea com ligeira turbidez, uma densidade ótica de 0,5 a 1,0 possui alguma turbidez, uma densidade ótica de 1,0 a 1,5 é considerada turva. uma densidade ótica acima de 1,5 é turva e não provável de ser filtrável usando um filtro de 0,2 micron. A última seria geralmente não considerada comercialmente adequada.

Exemplo 5.

[0097]Titulação de adjuvante glicolípido com ácido acético para mostrar que a floculação pode ser revertida.

[0098]Para determinar se a adição de quantidade crescente de ácido acético ao adjuvante glicolípido que apresenta floculação pode reverter a floculação, um adjuvante glicolípido como descrito no Exemplo 1 foi preparado. Este adjuvante glicolípido apresentava floculação mesmo em ausência de qualquer NaCl.

Uma concentração crescente de ácido acético foi acrescentado a essa mistura de adjuvante glicolípido floculada. O ácido acético foi diluído 16,6 vezes com água para conseguir uma solução de trabalho de concentração 1 Molar. Em seguida, 15 µL dessa solução 1M foi acrescentada a 15 mL da mistura de adjuvante glicolípido para aumentar a concentração de ácido acético em 1 mM. Com concentração crescente de ácido acético, o pH dos adjuvantes glicolípidos reduziu e os floculados se dissolveram. Todavia, os adjuvantes glicolípidos permaneceram um tanto turvos. Essa observação confirma que o aumento da concentração de ácido acético converte a base livre de Bay 15-5381 numa forma acetato, a qual é mais solúvel em solução aquosa.

Tabela 7.

Titulação de adjuvante glicolípido com ácido acético.

Volume de adjuvante glicolípido	Volume de ácido acético 1N acrescentado	pH da solução
15 mL	0	7,25
15 mL	15 µL (1 mM)	7,21
15 mL	30 µL (2 mM)	7,10
15 mL	60 µL (4 mM)	6,97
15 mL	150 µL (10 mM)	6,44
15 mL	750 µL (50 mM)	4,57

Exemplo 6

[0099]Preparação de uma segunda solução estável de adjuvante glicolípido com e sem NaCl

[00100]Após estabelecer a importância de um aumento na quantidade de ácido acético na manutenção da estabilidade de soluções de glicolípido, foi decidido usar a composição mostrada na Tabela 8 para primeiramente preparar a Solução Estoque de Glicosilamida e em seguida utilizar esta para preparar uma outra

Solução de Adjuvante Glicolípido tanto com e sem NaCl. Essa solução estoque de Glicosilamida é similar à solução do Exemplo 2, com 4 vezes o volume total e quantidades relativamente maiores de ácido acético e Tween 20.

Tabela 8.

Composição de uma solução estoque de Glicosilamida

Reagente	Quantidade (200 mL)
60% etanol (v/v)	179 mL
Tween 20	4,0 mL
Ácido acético	3,0 mL
Bay 15-5381	13,96 gramas

[00101]Três diferentes Soluções de Adjuvante Glicolípido com concentrações variadas de NaCl foram preparados usando o tampão fosfato do Exemplo 3 e the Solução Estoque de Glicosilamida preparada como na Tabela 8.

[00102]Igual à formulação no Exemplo 4, Tabela 5, a Solução de Adjuvante Glicolípido foi feita para que contivesse 0 mM, 15 mM, e 100 mM NaCl. As soluções 0 mM e 15 mM NaCl puderam ser filtradas através de um filtro de 0,2 micron. A Solução de Adjuvante Glicolípido contendo 100 mM NaCl não pode ser filtrada através de um filtro de 0,2 micron.

Tabela 9

Preparação de Soluções de Adjuvante Glicolípido estáveis com e sem NaCl

Concentração de cloreto de sódio (mM)	Volume de tampão (mL)	Volume de solução estoque de glicosilamida (mL)	pH final	O.D. a 600 nm
0	465	35	6,39	0,039
15	465	35	6,37	0,073
100	465	35	6,29	0,439

[00103]20 mL de cada uma das soluções de adjuvante glicolípido foram

colocadas em frascos de vidro de 30 mL e incubadas na temperatura ambiente e a 4°C. Observações visuais foram feitas a intervalos regulares. Inicialmente a Solução de Adjuvante Glicolipídio com 0 mM NaCl estava ópticamente limpa. A Solução de Adjuvante Glicolipídio contendo 15 mM NaCl estava ligeiramente turva e tinha uma O.D. de 0,073 a 600 nm. A Solução de Adjuvante Glicolipídio contendo 100 mM NaCl era turva e tinha uma O.D. de 0,439 a 600 nm., Tabela 9. Nenhuma dessas Soluções de Adjuvantes Glicolipídio apresentou quaisquer sinais de floculação tanto na temperatura ambiente e a 4 °C. Essas Soluções de Adjuvantes Glicolipídio foram observadas durante um período de um ano sem alteração na aparência.

Exemplo 7

Titulação de Soluções estáveis de Adjuvante Glicolipídio

[00104]Inicialmente uma Solução de Adjuvante Glicolipídio ópticamente limpa e estável foi obtida sem NaOH. A fim de estabelecer que a eliminação ou o uso de uma quantidade mínima de NaOH era essencial para prevenir a floculação, é necessário mostrar que uma adição gradual de NaOH pode induzir floculação em uma mistura de outro modo estável de glicolipídio. Volumes apropriados de NaOH 1N foram acrescentados a 15 mL de solução de Adjuvante Glicolipídio sem qualquer NaCl adicionado, como preparado na Tabela 10, adiante. O NaOH foi aumentado gradualmente de 1 mM a 12 mM. (Tabela 10). A Solução de Adjuvante Glicolipídio usada nesse experimento foi preparada usando a Solução Estoque de Glicosilamida descrita no Exemplo 6. Com concentração crescente de NaOH na Solução de Adjuvante Glicolipídio, o pH da formulação aumentou gradualmente juntamente com o aparecimento de floculação.

Tabela 10.

Titulação de uma Solução estável de Adjuvante Glicolipídio com NaOH

Volume de adjuvante glicolipídio	Volume de NaOH 1N acrescentado (mM)	pH da solução

15 mL	0	6,21
15 mL	15 µL (1 mM)	6,38
15 mL	30 µL (2 mM)	6,48
15 mL	60 µL (4 mM)	6,68
15 mL	150 µL (10 mM)	7,11
15 mL	750 µL (50 mM)	12,17

Exemplo 8

Quantificação do componente glicolípido utilizando HPLC

[00105]A metodologia apresentada a seguir foi usada na análise HPLC de Bay 15-5831®. Os parâmetros de HPLC descritos na Tabela 11 foram usados.

Tabela 11

Sumário dos parâmetros usados no método HPLC para quantificar Bay 15-5381®

Parâmetro	Detalhes
Coluna	Hamilton PRP-1,7 micron, 250 x 4,6 mm
Fluxo	1,5 mL/min
Volume de injeção	10 µL
Comprimento de onda do detector	210 nm
Fase móvel A	0,4% ácido perclórico, v:v
Fase móvel B	acetonitrila
Gradiente	0 min 40% A / 60% B 15 min 30% A / 70% B 20 min 30% A / 70% B 35 min 10% A / 90% B 50 min 10% A / 90% B / 51 min 40% A
Tempo de corrida	65 min
Tempo de retenção Bay 15-5381®	Aproximadamente 25 minutos

Tabela 12

Padrões de Bay 15-5831®.

Padrão	Concentração
1	0,103 mM
2	0,206 mM
3	0,412 mM
4	0,618 mM
5	0,824 mM
6	1,03 mM

[00106] Padrões na faixa de 0,10 a 1,03 mM foram preparados e injetados numa HPLC. Um resumo dos padrões é mostrado na Tabela 12. As amostras foram aquecidas até a temperatura ambiente e invertidas 5 vezes antes da utilização. Um mL de amostra foi acrescentado a 6 mL de metanol em um frasco de volume 10 mL. As amostras foram em seguida submetidas a ação sônica por 10 minutos e em seguida diluídas até o volume e misturadas. A regressão linear foi realizada nos padrões com as áreas de pico marcadas em gráfico contra a concentração. As amostras foram em seguida calculadas contra a curva.

Exemplo 9.

Produção em escala (30 L)

[00107] Uma batelada de 30 litros de Solução de Adjuvante Glicolípido com a composição como descrita no Exemplo 6 foi preparada. Essa batelada continha NaCl 15 mM.

[00108] Usando essa preparação de 30 L, cinco diferentes sub-soluções foram preparadas com concentração crescente de NaOH. A concentração de NaOH aumentou de 0 mM a 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM, e 12 mM. A amostra para cada concentração de NaOH foi dividida em alíquotas para a medição do pH e observação visual.

Tabela 13

Características da batelada de 30 L de adjuvante glicolípido com o aumento da concentração de NaOH

No. amostra	Descrição	Concentração medida (mM)	O.D. a 600 nM	pH
30 L Amostra 1	15 mM NaCl, 0 mM NaOH	6,21	0,218	6,42
30 L Amostra 2	15 mM NaCl, 1 mM NaOH	6,3	0,137	6,52
30 L Amostra 3	15 mM NaCl, 2 mM NaOH	6,24	0,137	6,59
30 L Amostra 4	15 mM NaCl, 4mM NaOH	6,17	0,15	6,80
30 L Amostra 5	15 mM NaCl, 8 mM NaOH	6,26	0,129	7,06
30 L Amostra 6	15 mM NaCl, 12 mM NaOH	6,15	0,062	7,54

[00109]A quantidade de Bay 15-5381 em todas as seis amostras apresentadas na Tabela 13 foi quantificada usando o método de HPLC descrito no Exemplo 8. As amostras com variação de pH apresentaram a mesma concentração de Bay 15-5381 sugerindo que o componente adjuvante não é degradado durante o aumento do pH com a adição de NaOH e a floculação que acompanha.

Exemplo 10.

[00110]Avaliações da estabilidade usando realização de testes de estresse acelerado

[00111]Esse exemplo descreve os métodos e resultados da realização de

testes de estresse acelerado da Solução de Adjuvante Glicolípido. Três bateladas de Soluções de Adjuvantes Glicolípido como descrito no Exemplo 6 foram preparadas na escala de 500 L. Todas as três bateladas tinham 15 mM NaCl e não continham NaOH. As Soluções de Adjuvantes Glicolípido provenientes dessas três bateladas de 500 L foram usadas para o estudo da estabilidade dos glicolípídios usando uma realização de testes acelerados de estabilidade.

[00112]Para os testes acelerados do estresse, a Solução de Adjuvante Glicolípido foi submetida a agitação por sete dias a 37 °C, seguido por agitação a 4 °C por dois dias. Os sete dias de agitação a 37 °C representam um envelhecimento a 4 °C por um ano. Uma agitação a 4 °C por dois dias representa o estresse durante o transporte.

[00113]Um grupo de solução de Adjuvante Glicolípido foi mantido estático a 37 °C por 7 dias, em seguida agitado a 100 rpm a 4 °C por mais dois dias. Em quatro momentos no tempo, isto é T = 0, 3, 7, e 9 dias, foram registradas as observações e fotos. Em 2 momentos no tempo, isto é, T = 0 e 9 dias, o Índice Refrativo e a análise do tamanho de partícula foram em seguida realizados.

[00114]O segundo grupo de Solução de Adjuvante Glicolípido foi agitado a 100 rpm a 37 °C por 7 dias; em seguida agitado a 100 rpm a 40C por mais 2 dias. Em quatro momentos no tempo, isto é, T = 0, 3, 7, e 9 dias, foram registradas as observações e fotos. Em 2 momentos no tempo, isto é, T = 0 e 9 dias, o Índice Refrativo e a análise do tamanho de partícula foram em seguida realizados.

[00115]O terceiro grupo de Solução de Adjuvante Glicolípido ficou estático a 4 °C por 9 dias como controle. Em quatro momentos no tempo, isto é, T = 0, 3, 7, e 9 dias, foram registradas as observações e fotos. Em 2 momentos no tempo, isto é, T = 0 e 9 dias, o Índice Refrativo e a análise do tamanho de partícula foram em seguida realizados.

[00116]Não houve alteração no tamanho de partícula como o resultado da

realização dos testes de estresse. Todas as amostras mantiveram tamanho de partícula sub-mícron como observados nas amostras imediatamente após elas terem sido preparadas. Além disso, uma medição da HPLC do componente Bay 15-5831® nas amostras mantidas a 4 °C ou submetidas a estresse a 37 °C por sete dias não apresentou qualquer alteração na quantidade de Bay 15-5831®.

Tabela 15.

Quantificação de Bay 15-5831® após a realização dos testes de estresse

Número da batelada da solução de adjuvante glicolípido e tratamento	Concentração medida (mM)
Batelada 1 - 4 °C	6,23
Batelada 1 - 37 °C agitação	6,29
Batelada 2 - 4 °C	6,32
Batelada 2 - 37 °C agitação	6,30
Batelada 3 - 4 °C	6,28
Batelada 3 - 37 °C agitação	6,29

[00117]Na Tabela 15, as amostras controle foram mantidas a 4 °C por sete dias, enquanto que as amostras de teste foram mantidas em agitação a 37 °C por sete dias. As amostras agitadas a 37 °C por sete dias possuem concentrações similares às aquelas armazenadas a 4 °C.

Exemplo 11.

[00118]Realização dos testes viricidas da Solução de Adjuvante Glicolípido

[00119]A realização dos testes viricidas foi conduzida numa Solução de Adjuvante Glicolípido preparada numa escala de 30 L como descrito acima no Exemplo 9. Essa Solução de Adjuvante Glicolípido continha 15 mM NaCl e não continha NaOH.

[00120]O adjuvante glicolípido foi testado quanto à sua adequabilidade para utilização como diluente com vírus vivos modificados. Antígenos virais vivos

modificados são preparados como massas aglomeradas secadas por congelamento. Quando da reidratação dessas massas aglomeradas com adequada Solução de Adjuvante Glicolípido, foi confirmado que a Solução de Adjuvante Glicolípido utilizada não mata os vírus vivos modificados. A Solução de Adjuvante Glicolípido foi testada novamente contra três antígenos virais bovinos: Vírus Sincicial Respiratório Bovino (BRSV), Vírus Para-influenza Tipo 3 (PI3), e Vírus da Rinotraqueíte Bovina Infecciosa (DBR).

[00121]Massas aglomeradas virais foram reidratadas usando a Solução de Adjuvante Glicolípido. Após incubação na temperatura ambiente (RT) por 1 hora, a amostras foram plaqueadas sobre uma monocamada de uma linhagem celular com uma diluição serial. Através da contagem do número de massas aglomeradas virais que aparecem sobre a monocamada, o valor da dose infectiva para 50% da cultura tecidual por mL (TCID₅₀/mL) foi obtido para cada antígeno viral reidratado com água estéril ou Solução de Adjuvante Glicolípido. Nesse ensaio, uma redução no título de 0,7 após reidratação com a Solução de Adjuvante Glicolípido de teste foi tratada como viricida.

[00122]Os resultados estão apresentados na Tabela 16. A Solução de Adjuvante Glicolípido não apresentou qualquer efeito viricida sobre esses três vírus bovinos.

Tabela 16

Ensaio Viricida para a Solução de Adjuvante Glicolípido.

Vírus	Título original	Título final com adjuvante glicolípido	Título final com água estéril	Perda no título
tsIBR 051404	7,3 ± 0,5	7,08	7,49	0,42
tsIBR	7,6 ± 0,5	7,74	7,49	-0,25

052604				
BRSV 08103	6,4 ± 0,5	6,57	6,82	0,25

[00123]Esse exemplo mostra que a Solução de Adjuvante Glicolípido pode ser usada numa formulação comercial de uma Vacina de Saúde Animal. Rispoval® contém três diferentes doenças virais bovinas utilizando 3 antígenos virais vivos modificados. Esses antígenos virais bovinos são o vírus do herpes bovino modificado, vírus sincicial respiratório bovino modificado, e vírus para-influenza Tipo 3 vivo modificado. Esses antígenos virais são produzidos como massas liofilizadas e a Solução de Adjuvante Glicolípido produzida mediante essa invenção pode ser usada como uma solução diluente para esses antígenos. O glicolípido usado foi o acetato de N-(2-desóxi-2-L-leucilamino-β-D-glicopiranosil)- N-octadecildodecanamida.

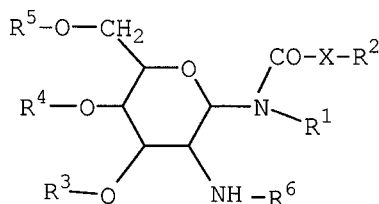
[00124]Os exemplos sa apresentados para ilustrar a invenção. Eles não deverão ser considerados como limitantes do escopo da invenção. Muitas alterações, variações, modificações, e outros usos e aplicações dessa invenção serão evidentes para aqueles usualmente versados na técnica.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

a) um glicolípido de Fórmula I;

em que a fórmula I é



em que

R¹ é hidrogênio, ou um radical alquila saturado tendo até 20 átomos de carbono;

X é -CH₂-, -O- ou -NH-;

R² é hidrogênio, ou um radical alquila saturado ou insaturado tendo até 20 átomos de carbono;

R³, R⁴, e R⁵ são independentemente hidrogênio, -COC₁₋₁₀-alquil;

R⁶ é L-alanil, L-alfa-aminobutil, L-arginil, L-asparginil, L-aspartil, L-cisteinil, L-glutamil, L-glicil, L-histidil, L-hidroxipropil, L-isoileucil, L-leucil, L-lisil, L-metionil, L-ornitínil, L-fenilalanil, L-prolil, L-seril, L-treonil, L-tirosil, L-triptofanil e L-valil, ou seus D-isômeros;

em uma forma salina, onde a forma salina é derivada de um ácido fraco;

b) um álcool em que o álcool é HO-C₁₋₃-alquil;

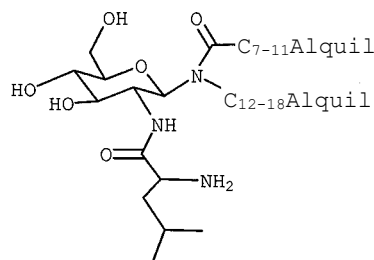
c) um ácido fraco, em que o ácido fraco 1) está em excesso molar com referência ao teor de glicolípido, e 2) é qualquer ácido tendo um valor de pKa (o -log da Ka) entre 1,0 e 9,5 usando tabelas ou valores padrões; e

d) um tensoativo não-iônico, em que o tensoativo não-iônico é um agente

que reduz a tensão superficial do material em que ele está dissolvido e possui um componente que é hidrofóbico e um outro componente que é hidrofílico;

adicionalmente em que a composição tem um pH de 6 a 8.

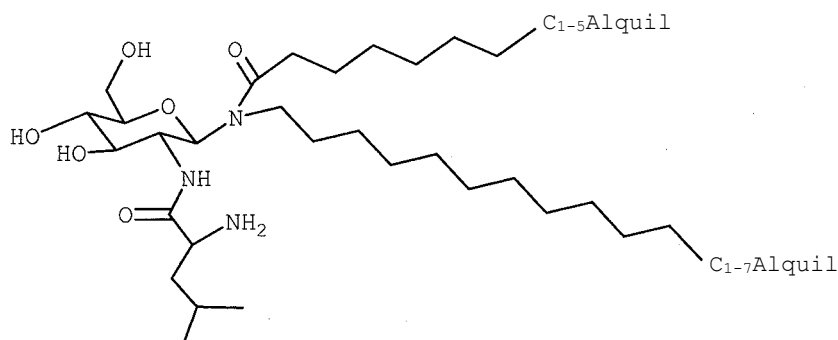
2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o glicolípido é um composto de Fórmula II(a):



Fórmula II(a)

e o ácido fraco é selecionado a partir de um ou qualquer combinação dos seguintes ácidos fracos, ácido acético, $H(C_2H_3O_2)$ (pKa 4,76); ácido ascórbico (1), $H_2(C_6H_6O_6)$ (pKa 4,10); ácido acetilsalicílico, $H_8(C_9O_4)$, (pKa 3,5,); ácido butanóico $H(C_4H_7O_2)$ (pKa 4,83); ácido carbônico, forma 1, H_2CO_3 , (pKa 4,83); ácido cítrico, forma 1, $H_3(C_6H_5O_7)$, (pKa 3,14); ácido cítrico forma 2, $H_2C_6H_5O_7^-$, (pKa 4,77); ácido cítrico, forma 3, $(HC_6H_5O_7)^-$, (pKa 6,39); ácido fórmico, $H(CHO_2)$, (pKa 3,75); ácido fumárico, $H_4(C_4O_4)$ (pKa 3,03); ácido heptanóico, $H(C_7H_{13}O_2)$, (pKa 4,89); ácido hexanóico, $H(C_6H_{11}O_2)$, (pKa 4,84); isocitrato, $H_8(C_6O_7)$ (pKa 3,29); ácido láctico, $H(C_3H_5O_3)$, (pKa 3,08); ácido maleico, $H_4(C_4O_4)$ (pKa 1,83); ácido nicotínico, $H_5(C_6NO_2)$ (pK 3,39); ácido oxálico forma 1, $H_2(C_2O_4)$, (pKa 1,23); ácido oxálico, forma 2, $(HC_2O_4)^-$, (pKa 4,19); ácido pentanóico, $H(C_5H_9O_2)$, (pKa 4,84); ácido fosfórico forma 1, H_3PO_4 , (pKa 2,16); ácido propanóico, $H(C_3H_5O_2)$, (pKa 4,86); ácido pirúvico, $H_4(C_3O_3)$ (pKa 2,39) e ácido succínico $H_6(C_4O_4)$ (pKa 4,19).

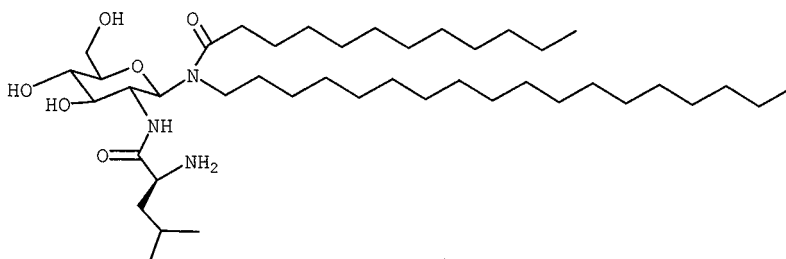
3. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o glicolípido é um composto de Fórmula II(b):



Fórmula II(b)

e o ácido fraco é selecionado a partir de um ou qualquer combinação dos seguintes ácidos fracos: ácido acético, ácido acetilsalicílico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido fumárico, isocitrato, ácido maleico, ácido nicotínico, ácido fosfórico, ácido pirúvico e ácido succínico.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o glicolípido é acetato de N-(2-deoxi-2-L-leucilamino-β-D-glicopiranosil)-N-octadecildodecanamida, possuindo uma estrutura de Fórmula III:



Fórmula III

e o ácido fraco é o ácido acético.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o ácido fraco é selecionado a partir do grupo que consiste em: ácido acético, ácido acetilsalicílico, ácido cítrico forma 1, ácido cítrico forma 2, ácido cítrico forma 3, ácido fórmico, ácido fumárico, isocitrato, ácido maleico, ácido nicotínico, ácido fosfórico forma 1, ácido pirúvico e ácido succínico.

6. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5,

CARACTERIZADA pelo fato de que o referido ácido fraco está em uma quantidade que é maior que o equivalente molar do glicolípido, ou está em uma quantidade maior que o equivalente molar do glicolípido na seguinte proporção;

- a) 1,25 vezes maior,
- b) 2,0 vezes maior,
- c) 2,5 vezes maior,
- d) 2,7 vezes maior,
- e) 3,0 vezes maior,
- f) 5,0 vezes maior,

que a quantidade de equivalente molar do glicolípido.

7. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6,

CARACTERIZADA pelo fato de que o álcool é o álcool etílico.

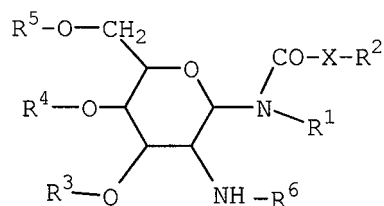
8. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7,

CARACTERIZADA pelo fato de que o referido tensoativo não-iônico é selecionado a partir de qualquer um ou uma combinação do grupo que consiste em: monolaurato de Sorbitano, monopalmitato de Sorbitano, monostearato de Sorbitano, tristearato de Sorbitano, monooleato de Sorbitano, trioleato de Sorbitano, monolaurato de Polioxietilensorbitano, monopalmitato de Polioxietilensorbitano, monosterato de Polioxietilensorbitano, monooleato de Polioxietilensorbitano, trioleato de Polioxietilensorbitano, e outros sorbitanos e polioxietileno sorbitanos comumente usados em vacinas.

9. Composição **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

a) um glicolípido de Fórmula I;

em que a fórmula I é:



em que

R¹ é hidrogênio, ou um radical alquila saturado possuindo até 20 átomos de carbono;

X é -CH₂-, -O- ou -NH-;

R² é independentemente hidrogênio ou um radical alquila saturado ou insaturado possuindo até 20 átomos de carbono;

R³, R⁴, e R⁵ são independentemente hidrogênio, -SO₄²⁻, -PO₄²⁻, -COC₁₋₁₀-alquil;

R⁶ é L-alanil, L-alfa-aminobutil, L-arginil, L-asparginil, L-aspartil, L-cisteinil, L-glutamil, L-glicil, L-histidil, L-hidroxipropil, L-iso-leucil, L-leucil, L-lisil, L-metionil, L-ornitil, L-fenilalani, L-prolil, L-seril, L-treonil, L-tirosil, L-triptofanil e L-valil, ou seus D-isômeros;

na forma de um sal, em que a forma de um sal é derivada de um ácido fraco;

b) um álcool em que o álcool é HO-C₁₋₃-alquil;

c) um ácido fraco, em que o ácido fraco 1) está em excesso molar com referência ao teor de glicolipídio, e 2) é qualquer ácido que possui um valor de pKa (o -log de Ka) entre 1,0 e 9,5 usando tabelas ou valores padrões; e

d) um tensoativo não-iônico, em que o tensoativo não-iônico é um agente que reduz a tensão superficial do material em que ele está dissolvido e possui um componente que é hidrofóbico e um outro componente que é hidrofílico; e

e) um tampão aquoso, em que o tampão aquoso apropriado é adequado para uso em vacina e pode manter o pH dos outros ingredientes dentro de uma faixa de pH de 6 a 8, com a condição de que não mais que 50 mM de NaCl seja usado;

adicionalmente em que a composição tem um pH de 6 a 8.

10. Composição, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o pH da solução é ajustado para um pH relativamente constante em uma solução aquosa de entre 6 e 7, e o tampão é selecionado a partir do grupo que

consiste em tampões fosfato tendo um ou outro ou ambos sais monobásico e dibásico de fosfato de sódio e/ou fosfato de potássio em proporções iguais ou diferentes.

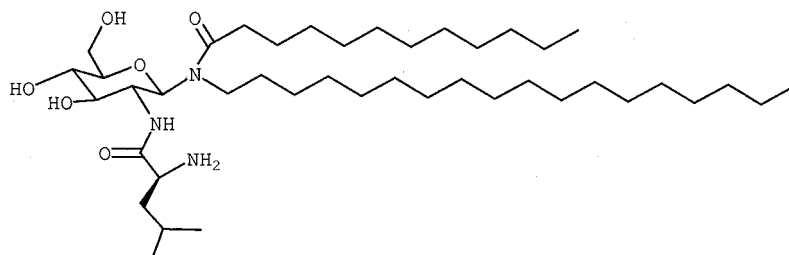
11. Composição, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o referido tampão é selecionado a partir do grupo:

- a) ácido 2-(N-morfolino)etano-sulfônico (também conhecido como MES);
 - b) ácido 3-(N-morfolino)propano-sulfônico (também conhecido como MOPS);
 - c) ácido N-[tris (hidroximetil)-2-aminoetano-sulfônico (também conhecido como TES);
 - d) ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etano-sulfônico (também conhecido como HEPES);
 - e) [tris (hidroximetil)metil]glicina (também conhecido como TRIS); e
 - f) fosfato de sódio ou potássio;
- ou qualquer combinação dos mesmos.

12. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **CARACTERIZADA** pelo fato de que adicionalmente compreende um antígeno selecionado a partir do grupo consistindo em vírus do herpes bovino vivo modificado, vírus sincicial respiratório bovino vivo modificado e vírus para-influenza vivo modificado Tipo 3, ou qualquer combinação dos mesmos.

13. Composição **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

- a) acetato de N-(2-desóxi-2-L-leucilamino- β -D-glicopiranosil)-N-octadecildodecanamida, possuindo uma estrutura de Fórmula III:



Fórmula III

b) etanol;

c) ácido acético;

d) tensoativo não-iônico, selecionado de: monolaurato de Sorbitano, monopalmitato de Sorbitano, monostearato de Sorbitano, tristearato de Sorbitano, monooleato de Sorbitano, trioleato de Sorbitano, monolaurato de Polioxietilensorbitano, monopalmitato de Polioxietilensorbitano, monosterato de Polioxietilensorbitano, monooleato de Polioxietilensorbitano, trioleato de Polioxietilensorbitano;

e) um tampão aquoso, em que o pH da solução é ajustado para um pH relativamente constante em uma solução aquosa tamponada de entre 6 e 7, e o tampão é selecionado a partir dos seguintes:

1) ácido 2-(N-morfolino)etano-sulfônico (também conhecido como MES);

2) ácido 3-(N-morfolino)propano-sulfônico (também conhecido como MOPS);

3) ácido N-[tris (hidroximetil)-2-aminoetano-sulfônico (também conhecido como TES);

4) ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etano-sulfônico (também conhecido como HEPES); e

5) [tris (hidroximetil)metil]glicina (também conhecido como TRIS);

ou qualquer combinação dos mesmos,

com a condição de que não mais que 15 mM de NaCl seja usado e;

6) um antígeno consistindo essencialmente de vírus do herpes bovino vivo modificado, vírus sincicial respiratório bovino vivo modificado e vírus para-influenza vivo modificado Tipo 3.

14. Processo para preparar uma composição **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende misturar juntos os seguintes:

A) um glicolípido de Fórmula I;

B) um álcool, em que o álcool é HO-C₁₋₃-alquil;

C) um ácido fraco, em que a quantidade do ácido fraco está em excesso molar com referência ao teor do glicolípido; e

D) um tensoativo não-iônico.

15. Processo para preparar uma composição **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende misturar juntos os seguintes:

A) um glicolípido de Fórmula I;

B) um álcool, em que o álcool é HO-C₁₋₃-alquil;

C) um ácido fraco, em que a quantidade do ácido fraco está em excesso molar com referência ao teor do glicolípido;

D) um tensoativo não-iônico; e em seguida acrescentar,

E) um tampão adequado.