



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

08-75683

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: NUEVAS COMPOSICIONES COADYUVANTES GLICOLIPIDICAS

SOLICITANTE: PFIZER PRODUCTS INC

DIRECCIÓN: EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340 E.U.A

A G L K 39/39

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 22 de Julio de 2008

CS

OLARTE RAISBECK



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-075683- -00000-0000

Fecha: 2008-07-22 16:10:28 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYI Ene: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 102**PETITORIO - FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD****PATENTE PCT****ENTRADA EN FASE NACIONAL****P2008/000117****SOLICITUD DE:****1**☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2**SOLICITANTE
(71)****Nombre:** PFIZER PRODUCTS INC**Dirección:** Eastern Point Road, Groton,
CT 06340 E.U.A.**Nacionalidad o Domicilio:** E.U.A.**Lugar de Constitución:** Estadounidense**Teléfono:** _____ **Fax:** _____**E-mail:** _____**IDENTIFICACIÓN****C.C.**☐**NIT**☐**C.E.**☐**Otro**☐**Cual** _____**Número** _____**REPRESENTANTE
O APODERADO****Nombre:** CARLOS R. OLARTE**Dirección:** World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10**Teléfono:** 601-7700 **Fax:** 601-7799**E-mail:** office@olarteraisbeck.com**IDENTIFICACIÓN****C.C.**☒**NIT**☐**C.E.**☐**Otro**☐**Cual** _____**Número** 79782747Bta**TP** 74.295**INVENTOR (ES)
(72)****Nombre:** 1) Paul Joseph DOMINOWSKI; 2) Ramasamy Mannar
MANNAN; 3) Sangita MEDIRATTA**Dirección:** 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001, E.U.A.**Nacionalidad o Domicilio:** Estadounidenses**5****PCT (86)**Solicitud Internacional No. PCT/IB2007/000258

Fecha

Enero 15, 2007Publicación Internacional No. WO 2007/085962

Fecha

Agosto 2, 2007**6****Título (54)** NUEVAS COMPOSICIONES COADYUVANTES GLICOLIPÍDICAS**Clasificación Internacional (51)** A61K 39/39, C07H 15/12, C07H 13/12**Prioridad****SI**☒**NO**☐

(33) País de Origen

USUS

(32) Fecha

Enero 26, 2006Junio 20, 2006

(31) Número de Solicitud

60/762,27960/814,984**9****Comprobante de pago No.** 08-57,454**Fecha** Julio 18 de 2008

10

ANEXOS☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒Poderes, si fuere el caso. *Adjunto copia simple. Ver Exp. No. 07-033.679*☒

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

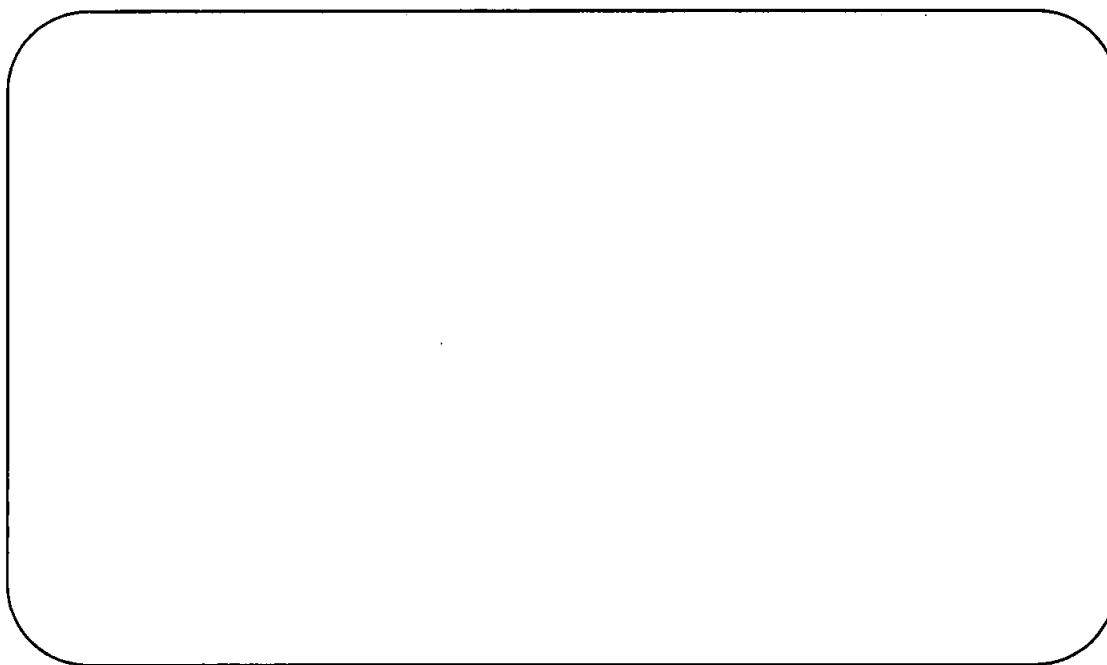
☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTEFIRMA: C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 809176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 57,454
FECHA : JULIO 18 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISREK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	4807180	18/07/2008	3,821,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

TRADUCCION OFICIAL No. 05-223

Efectuada el día 9 de diciembre de 2005, de un documento escrito en Inglés, al cual para su identificación se le estampa el sello de Sergio Andrés Rueda Iglesias, Traductor e Intérprete Oficial por Resolución No. 0138 expedida por el Ministerio de Justicia y del Derecho el 11 de febrero de 2002.

Traducción de las Autenticaciones Notariales y subsiguientes correspondientes a un Poder otorgado por PFIZER PRODUCTS, INC., a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro, documento este que viene en español, se explica por sí solo y fue firmado por Grover F. Fuller, Jr. el 17 de noviembre de 2005 en Nueva York, Estados Unidos de América.

También en inglés y en español viene Certificación Notarial mediante la cual se confirma el nombre y cargo de Grover F. Fuller, Jr, así como la existencia legal de la compañía. Dicha certificación notarial está firmada por Susan Z. Killian, Notario Público de Nueva York, cuyo cargo expira el 4 de octubre de 2008, según consta en su correspondiente sello notarial.

Suscrito y jurado ante mi el 17 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Susan Z. Killian


SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C. C. 37.2
TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCION NO. 0138 DEL 11 DE FEBRERO DE 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

ESTADO DE NUEVA YORK - CONDADO DE NUEVA YORK No. 467518

El suscrito, Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York, tribunal éste provisto de sello por ley, por medio de este documento certifico conforme a la ley ejecutiva del Estado de Nueva York que Susan Z. Killian, cuyo nombre aparece suscrito en la declaración jurada o certificado de reconocimiento anexo, desempeñaba en el momento de tomar el mismo, las funciones de Notario Público, en y para el Estado de Nueva York, estando debidamente comisionado bajo juramento y habilitado como tal; que conforme a la ley en mi despacho obra un certificado de su nombramiento con su firma autógrafa; que conozco bien la letra manuscrita de dicho Notario Público o he comparado la firma que aparece en el instrumento anexo con la que reposa en los archivos de mi oficina, y creo en conciencia que la misma es auténtica.

EN FE DE LO CUAL, firmo de mi puño y letra y estampo mi sello oficial, el día 22 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York.

SERGIO ANDRÉS RUEDA ILLERIAS
C. G. E. 1.773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
REGISTRACION No. 0130 DE FEBRERO DE 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
El presente documento público
2. Fue firmado por: Norman Goodman
3. Que actuó en su calidad de: Escribano del Condado
4. Lleva el sello del Condado de Nueva York
Se certificó:
5. En Nueva York, Nueva York
6. El 22 de noviembre de 2005
7. Por parte del Secretario de Estado, (Encargado) del
Estado de Nueva York
8. Bajo el Número NYC-10404952A
9. Aparece Sello del Estado de Nueva York
10. Firmado por: James Bizzarri, Secretario de Estado
Especial Encargado

Es traducción fiel y completa efectuada por:


Sergio Andrés Rueda Iglesias
c.c. 80.424.773 de Bogotá

SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C.C. 80.424.773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
REGISTRO NACIONAL DE TRADUCTORES Y 13/0002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

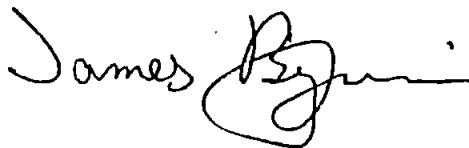
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: **United States of America**
This public document
2. has been signed by **Norman Goodman**
3. acting in the capacity of **County Clerk**
4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

5. At New York, New York
6. the 22nd day of November 2005
7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
8. No. NYC-10404952A
9. Seal/Stamp
10. Signature



James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Zayde Chahín
Zaava Ravi

Jacqueline Chaparr
Jose Luis Londoño
Camilo Alvarez
Felipe Mendez
Camilo Rodríguez
Santiago Pardo

Of Counsel
Guillermo Chahín
Graciela Mel

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

PFIZER PRODUCTS INC.,

domiciled in

domiciliado en

Eastern Point Road, Groton, State of Connecticut 06340, United States of America

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:

PFIZER PRODUCTS INC.,

By:

Grover F. Fuller, Jr.

Vice President, Attorney-In- Fact

Date/Fecha:

17 November 2005

City, Country/Ciudad, País: New York, NY USA

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date,

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies:

el Notario Público suscrito certifica:

1. That

1. Que

of legal age and domiciled in

Grover F. Fuller, Jr.

mayor de edad y domiciliado

Street 150 East 42nd Street

City New York

State New York 10017-5612 USA

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Vice President, Attorney-In-Fact of **PFIZER PRODUCTS INC.**

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de de

3. That **PFIZER PRODUCTS INC.**, having its principal place of business located in Groton, State of Connecticut 06340, United States of America is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

4. Que con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

NOTARY PUBLIC (Signature):

Susan Z. Killian



SUSAN Z. KILLIAN
Notary Public, State of New York
No. 01K16116521
Qualified in New York County
Commission Expires October 4, 2008

State of New York
County of New York
SWORN to and SUBSCRIBED before me
this 11th day of Nov. 2005
Susan Z. Killian

DISTRITO DE COLUMBIA
Apostilla

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
2. Este documento público ha sido firmado por: **BRIAN JACKSON, JR.**
3. obrando en su condición de **Notario Público del Distrito de Columbia**
4. lleva el sello/estampilla de: **BRIAN JACKSON, JR. Notario Público del Distrito de Columbia.**

Certificado

5. en Washington, D.C.
6. el **17 de junio de 2008**
7. por: Secretario del Distrito de Columbia.
8. No. **194706**

9. Sello / Estampilla

[Sellado]

10.Firma: **STEPHANIE D. SCOTT**

[Firmado]

CESIÓN

Por contraprestación valiosa pagada a nosotros por **PFIZER PRODUCTS INC.** sociedad constituida en virtud de las leyes del **estado de Conecticut, Estados Unidos de América**, cuya dirección postal completa es **Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, Estados Unidos de América**, por el presente vendemos y traspasamos a la citada **PFIZER PRODUCTS INC.**, todo nuestro derecho, título e interés en y sobre nuestro invento de una nueva y útil mejora en "**COMPOSICIONES NOVEDOSAS GLYCOLIPIDAS ADYUVANTES**", en cuanto respecta a la República de Colombia, tal como se indica y describe plenamente en la especificación y por el presente autorizamos y solicitamos al Comisionado de Patentes de Colombia expedir dicha patente a nombre de la citada **PFIZER PRODUCTS INC.**, de conformidad con esta cesión.

En fe de lo cual firmamos el presente el día de hoy.

(Fdo) Paul Joseph DOMINOWSKI

Kalamazoo, MI – 23 de Enero de 2007 - Paul Joseph DOMINOWSKI

(Fdo) Ramasamy Mannar MANNAN

Kalamazoo, MI – 01 de Febrero de 2007 - Ramasamy Mannar MANNAN

(Fdo) Sangita MEDIRATTA

Kalamazoo, MI – 18 de Enero de 2007 - Sangita MEDIRATTA

Por la presente certifico que este es el documento original

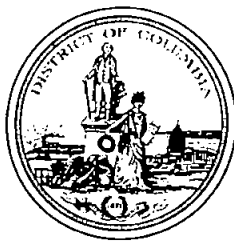
Distrito de Columbia: SS

Suscrito y juramentado antes ante mi
a los 17 días del mes de junio de 2008

Firma ilegible

Brian Jackson, Jr. Notario Público, D.C.

Mi Comisión Expira en Febrero 29 de 2012



Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *District of Columbia*
United States of America

2. This public document has been signed by BRIAN JACKSON, JR.

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA

4. bears the seal/stamp of BRIAN JACKSON, JR., NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE
DISTRICT OF COLUMBIA

CERTIFIED

5. at Washington, D.C.

6. the 17 day of JUNE 2008

7. by Secretary of the District of Columbia

8. No. 194706

9. Seal/Stamp



10. Signature

STEPHANIE D. SCOTT

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Stephanie D. Scott", written over a horizontal line.

ASSIGNMENT

For valuable consideration paid to me (us) by **PFIZER PRODUCTS INC.** a corporation organized under the laws of the State of Connecticut, United States of America whose full post office address is **Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, United States of America**, I (we) do hereby sell and assign to the said **PFIZER PRODUCTS INC.**, all my (our) right, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful Improvement in **NOVEL GLYCOLIPID ADJUVANT COMPOSITIONS** so far as the Republic of Colombia is concerned, as fully set forth and described in the specification, and I (we) do hereby authorize and request the Commissioner of Patents of Colombia to issue said patent to the said **PFIZER PRODUCTS INC.** in accordance with this assignment.

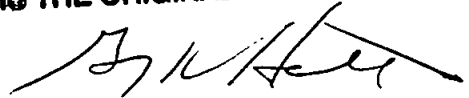
In witness whereof I (we) have hereunto set my (our) hand(s) this

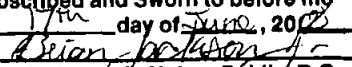
Kalamazoo, MI 23 Jan 07 Paul Joseph Dominowski
Place, date and signature - Paul Joseph DOMINOWSKI

Kalamazoo, MI 01 Feb 07 R. Mannar Mannan
Place, date and signature - Ramasamy Mannar MANNAN

Kalamazoo, MI 18th Jan 2007 Sangita Mediratta
Place, date and signature - Sangita MEDIRATTA

I HEREBY CERTIFY THAT THIS
IS THE ORIGINAL DOCUMENT



District of Columbia: SS
Subscribed and Sworn to before me
this 17th day of June, 2008

Brian Jackson, Jr. Notary Public, D.C.
My Commission Expires February 29, 2012

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
2 August 2007 (02.08.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/085962 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 39/39 (2006.01) C07H 13/12 (2006.01)
C07H 15/12 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/IB2007/000258

(22) International Filing Date: 15 January 2007 (15.01.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/762,279 26 January 2006 (26.01.2006) US
60/814,984 20 June 2006 (20.06.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **PFIZER PRODUCTS INC.** [US/US]; Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **DOMINOWSKI, Paul, Joseph** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US). **MANNAN, Ramasamy, Mannar** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US). **MEDIRATTA, Sangita** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US).

(74) Agent: **FULLER, Grover, F., Jr.**; c/o LAWRENCE, Jackie, Pfizer Inc. MS8260-1615, Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
27 December 2007

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: NOVEL GLYCOLIPID ADJUVANT COMPOSITIONS

(57) Abstract: This invention relates to compositions and methods of preparing stable adjuvant diluent stock solutions and final adjuvant solutions comprising glycolipids, weak acids, alcohols, nonionic surfactants and buffers.

WO 2007/085962 A3

NOVEL GLYCOLIPID ADJUVANT COMPOSITIONS

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to novel compositions of glycolipid adjuvants, methods for their use, and their preparation. The novel compositions of the present invention are stable for a long duration without flocculation. They are particularly useful in the delivery of various medicines, including vaccines.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 Vaccines are typically used to protect humans and veterinary animals from infectious diseases caused by bacteria, viruses and parasitic organisms. The antigens used in vaccines may be any variety of agents but are typically composed of killed pathogenic organisms, pathogenic organisms which are alive but modified or attenuated, proteins, recombinant proteins or fragments thereof. Whatever the source of the antigen, it is often necessary to add
15 an adjuvant to enhance the host immune response to the antigen.

 Adjuvants are used to accomplish two objectives: they slow the release of the antigens from the injection site and they stimulate the immune system.

 The first adjuvant reported in the literature was Freund's Complete Adjuvant (FCA). FCA contains a water-in-oil emulsion and extracts of mycobacterium. The mycobacterium
20 extracts provide immunostimulatory molecules in a crude form. The water-in-oil emulsion acts to create a depot effect where the antigens are slowly released. Unfortunately FCA is poorly tolerated and it can cause uncontrolled inflammation. Since the discovery of FCA over 80 years ago efforts have been made to reduce the unwanted side effects of adjuvants.

 Glycolipid analogues comprising a new class of compounds having adjuvant
25 properties are now known. U.S. Patent No. 4,855,283, (hereinafter '283) discloses the synthesis of glycolipid analogues, including N-glycosylamides, N-glycosylureas, N-glycosylcarbamates, and specifically: N-(2-deoxy-2-L-leucylamino- β -D-glucopyranosyl)-N-octadecyldodecanamide acetate (known as Bay R1005, O Lockhoff, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1991) 30:1611-1620. The compounds described in the '283 patent are particularly
30 suitable for use as adjuvants.

 Glycolipid adjuvant formulations need to be easy to manufacture and stable when stored for long periods of time without showing flocculation of the lipid component. The non-acetate forms of the glycolipid amides or glycosylamides are highly insoluble and typically flocculate out of solution upon storage either at room or lower temperatures.

35 The solutions and adjuvants comprising glycosylamides provided here show little flocculation and are quite stable. They are easy to manufacture and can be prepared on a

commercial scale. The liquid glycolipid adjuvant formulations can be used as a diluent to rehydrate a lyophilized antigen preparation. Methods to test the stability of these formulations in real time and through accelerated stability testing protocols are also provided.

SUMMARY OF THE INVENTION

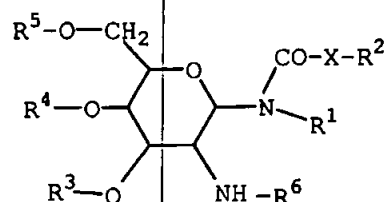
5 This invention comprises the composition and method of making or manufacturing both **Glycosylamide Stock Solution** and **Glycolipid Adjuvant Solution**. The **Glycosylamide Stock Solution** is prepared by dissolving a glycolipid of Formula 1 in an alcohol and combining this with an appropriate amount of a weak acid plus a "non-ionic" surfactant. The weak acid is added to the glycolipid alcohol solution, in molar excess of
 10 weak acid with reference to the glycolipid. In one embodiment the glycolipid is N-(2-deoxy-2-L-leucylamino-β-D-gulucopyranosyl)-N-octadecyl dodecanoylamide hydroacetate. In one embodiment the alcohol is ethanol. In one embodiment the weak acid is acetic acid. In one embodiment the non-ionic surfactants are various sorbitans (Span®) or polyoxyethylenesorbitans (Tween®) in particular the monolaurate sorbitans (Span
 15 20®) and monolaurate polyoxyethylenesorbitans (Tween 20®). The **Glycolipid Adjuvant Solution** is prepared by introducing an appropriate amount of the **Glycosylamide Stock Solution** into a "suitable buffer". The pH of the final stable **Glycolipid Adjuvant Solutions** described here should be between about 6 and about 8. A final pH of between about 6 to about 7 is preferred. A final pH between about 6.3 to about 6.4 described. High
 20 salt concentrations of **Glycolipid Adjuvant**, those in excess of 30 mM NaCl, should be avoided.

These two solutions are exemplified in more detail as follows.

The **Glycosylamide Stock Solution** is a composition comprising:

a) a glycolipid of Formula I,

wherein Formula I is



wherein

R¹ is hydrogen, or saturated alkyl radical having up to 20 carbon atoms,

X is -CH₂-, -O- or -NH-,

R² is hydrogen, or a saturated alkyl radical having up to 20 carbon atoms,

R³, R⁴, and R⁵ are independently hydrogen, -SO₄²⁻, -PO₄²⁻, -COC₁₀alkyl,

R⁶ is L-alanyl, L-alpha-aminobutyl, L-arginyl, L-asparaginyl, L-aspartyl, L-cysteinyl, L-glutamyl, L-glycyl, L-histidyl, L-hydroxypropyl, L-isoleucyl, L-leucyl, L-lysyl, L-methionyl, L-ornithinyl, L-phenylalanyl, L-prolyl, L-seryl, L-threonyl, L-tyrosyl, L-tryptophanyl, and L-valyl or their D-isomers;

- 5 in a salt form, where the salt form is derived from a weak acid;
- b) an alcohol wherein the alcohol is HO-C₁₋₃ alkyl;
- c) a weak acid, wherein 1) the weak acid is in molar excess with reference to the glycolipid content, and 2) is any acid having a pKa value between about 1.0 and about 9.5 using standard tables or values; and
- 10 d) a non-ionic surfactant, where the non-ionic surfactant is an agent that reduces the surface tension of the material it is dissolved in and has one component that is hydrophobic and another component that is hydrophilic.

The **Glycolipid Adjuvant** Solution is a composition comprising:

- a) a **Glycosylamide Stock** Solution; and
- 15 b) a suitable buffer, where the buffer is one appropriate for veterinary or medical use and can maintain a relatively constant pH in an aqueous solution of between about 6.0 and about 8.0.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Unless otherwise stated, the following terms used in the specification and claims

20 have the meanings given below.

The term "alcohol" refers to a compound of formula: HO-C₁₋₃ alkyl. It may be methanol, ethanol, or propanol in any form, such as n-propanol or iso-propanol. Ethanol is preferred.

The term "alkyl" refers to both straight and branched saturated hydrocarbon

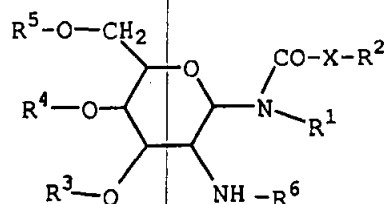
25 moieties.

The term "glycolipids" refers to the compounds of Formula I below. These compounds are described in U.S. Patent 6,290,971, and U.S. Patent No. 4,855,283, issued August 8, 1989. Both U.S. Patent 6,290,971, and U.S. Patent No. 4,855,283 are hereby incorporated by reference in their entirety. A glycolipid described in particular here, when in

30 its acetate form has the trade name Bay R1005®, and the chemical name "N-(2-deoxy-2-L-leucylamino-β-D-glucopyranosyl)-N-octadecyldodecanamide acetate" The amide form of this compound has the trade name Bay 15-1583® and the chemical name "N-(2-deoxy-2-L-leucylamino-β-D-glucopyranosyl)-N-octadecyldodecanamide."

The glycolipids of Formula I are:

35



Formula I

wherein

R¹ is hydrogen, or saturated alkyl radical having up to 20 carbon atoms;

5 X is -CH₂-, -O- or -NH-;

R² is hydrogen, or saturated alkyl radical having up to 20 carbon atoms;

R³, R⁴, and R⁵ are independently hydrogen, -SO₄²⁻, -PO₄²⁻, or -COC₁₋₁₀alkyl;

10 R⁶ is L-alanyl, L-alpha-aminobutyl, L-arginyl, L-asparagyl, L-aspartyl, L-cysteinyl, L-glutamyl, L-glycyl, L-histidyl, L-hydroxypropyl, L-isoleucyl, L-leucyl, L-lysyl, L-methionyl, L-ornithinyl, L-phenylalanyl, L-prolyl, L-seryl, L-threonyl, L-tyrosyl, L-tryptophanyl, and L-valyl or their D-isomers;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

Another specified embodiment describes the glycolipids of Formula 1 wherein:

R¹ is hydrogen, or saturated C₁₂₋₁₈ alkyl;

15 R² is hydrogen, or saturated C₇₋₁₁ alkyl;

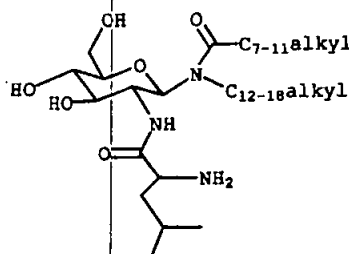
X is -CH₂;

R⁴, and R⁵ are independently hydrogen;

R⁶ is selected from L-leucyl;

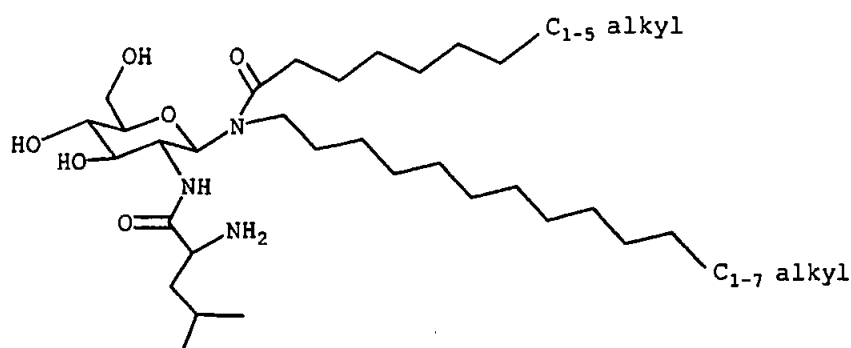
20 The variables for Formula I are separate and independent and all combinations of variables are herein described and claimed.

In another embodiment, the glycolipids are those described by Formula II(a):



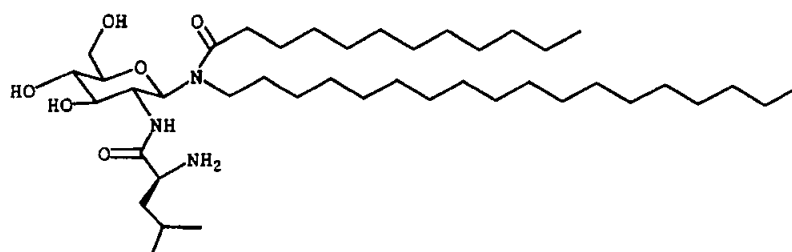
Formula II(a)

In another embodiment, the glycolipids are those described by Formula II(b):



Formula II(b)

In another embodiment, the glycolipids have the structure of Formula III:

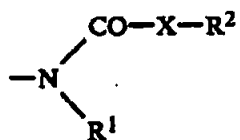


Formula III

A compound of Formula III can exist in either amide form or acetate form. The amide form of this compound has the trade name Bay 15-1583®. The acetate form has the trade name Bay R1005®.

The glycolipids of Formula I can be made using the following procedures, taken from US Patent No. 4,855,283.

As can be seen from Formula 1, the compounds according to the invention are based on a substituted 2-amino-2-deoxyhexose. These sugars are always N-glycosidically bonded via C-1, the anomeric carbon atom, to the acylamido, carbamido or alkoxycarbonylamido group



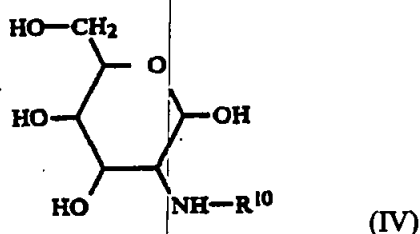
(I)

with the above mentioned meanings for R¹, R² and X.

The 2-amino group of the amino sugars in the compounds according to the invention, of the formula I, is amidically bonded to an α-amino acid or an α-amino acid derivative.

Amino acids are the natural L-amino acids such as glycine, sarcosine, hippuric acid, alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, cysteine, methionine, ornithine, citrulline, arginine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, phenylalanine, tyrosine, proline, tryptophan and histidine. Also described are D-amino acids, such as D-alanine, or amino carboxylic acids, such as alpha-aminobutyric acid, alpha-aminovaleric acid, alpha-aminocaproic acid or alpha-aminoheptanoic acid, both in the D-and the L-form, to act as substituents on the amino sugar.

The processes for the preparation of the compounds according to Formula I are also provided. This entails starting from a 2-amino-2-deoxyglycopyranose derivative (Formula IV), which is protected on the amino group,



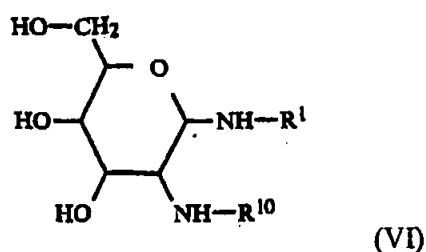
in which R¹⁰ represents a protective group for the protection of amino groups, which is known from the synthesis of peptides and can, where appropriate, be selectively eliminated.

Examples of suitable protective groups are acyl groups, such as trifluoroacetyl or trichloroacetyl, o-nitrophenylsulphenyl, 2,4-dinitrophenylsulphenyl or optionally substituted lower alkoxy carbonyl groups such as methoxycarbonyl, t-butyloxycarbonyl, benzyloxycarbonyl, p-methoxybenzyloxycarbonyl or 2,2,2-trichloroethyloxycarbonyl groups. Suitable N-protected amino-hexose derivatives are known. For example, M. Bergmann and L. Zervas, Ber. 64, 975 (1931); D. Horton, J. Org. Chem. 29, 1776 (1964); P. H. Gross and R. W. Jeanloz, J. Org. Chem. 32, 2759 (1967); M. L. Wolfrom and H. B. Bhat, J. Org. Chem. 32, 1821 (1967); general: J. F. W. McOmie (Editor). Prot. Groups. Org. Chem., Plenum Press (1973); Geiger in "The Peptides" Vol. 3, p 1-99, (1981) Academic Press; and Literature cited there). Preferred amino protective groups for the preparation of the compounds according to Formula I are the BOC group (tert. butyloxycarbonyl) or the Z group (benzyloxycarbonyl).

The blocked amino sugar derivatives (IV) are reacted, in a first reaction step, with amines (Formula V),



where R¹ has the abovementioned meaning, to give glycosylamines (Formula VI)

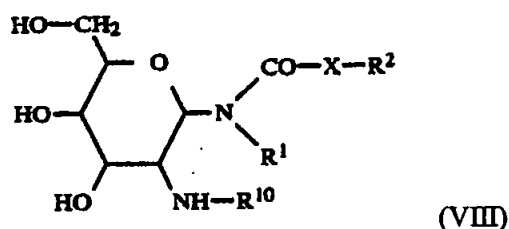


Glycosylamine preparations of this type are known in principle (ELLIS, Advances in Carbohydrate Chemistry 10, 95 (1955)) and are, specifically, described in DE-OS (German Published Specification) No. 3,213,650.

- 5 In the second reaction step, the glycosylamines (VI) are reacted either with suitable carboxylic acid derivatives (Formula VII), such as carboxyl halides, or carboxylic anhydrides,



- 10 R^2 having the abovementioned meaning, and R^{11} representing halogen such as, for example, chlorine, or representing $-O-CO-R^2$ with the abovementioned meaning for R^2 , or representing $-O-CO-O$ -lower alkyl. In this way, glycosylamides (Formula VIII)



- 15 in which R^1 , and R^2 have the abovementioned meanings, and R^{10} is the same as R^6 and X represents $-CH_2-$, are obtained. The conditions for N-acylations of this type are indicated in DE-OS (German Published Specification) No. 3,213,650.

- 20 In a preferred embodiment, the glycosylamines of Formula VI are reacted with one to two equivalents of a carbonyl chloride (Formula VII) or with one to two equivalents of a mixed anhydride which has been obtained from the relevant carboxylic acid $R^2-CH_2-CO_2H$ and ethyl chloroformate or isobutyl chloroformate, in the presence of an organic auxiliary base, by methods known from the literature, to give the glycosylamide of Formula VIII with $X=CH_2-$.

This is carried out in organic or aqueous-organic solvents between $0^\circ C$ and $50^\circ C$, where appropriate in the presence of an inorganic or organic base. Suitable diluents are alcohols, such as methanol, ethanol, 1-propanol or 2-propanol, or ethers, such as diethyl

ether, tetrahydrofuran or 1,4-dioxane, or halogenated hydrocarbons, such as dichloromethane, trichloromethane or 1,2-dichloroethane, or N,N-dimethylformamide.

When the glycosylamines (VI) which are obtained in the first step are reacted with halogenoformic esters (IX)



R^{12} representing halogen such as, for example, chlorine or bromine, and R^2 having the abovementioned meaning, then glycosylcarbamates (VIII) are obtained, X in Formula VIII representing oxygen.

In one embodiment, the glycosylamines of Formula VIII are reacted with one to two equivalents of a chlorocarbonic ester IX to give the glycosylcarbamate. This is preferably carried out in organic or aqueous-organic solvents at temperatures between 0° C and 50° C, but particularly preferably at room temperature. Suitable solvents are alcohols, ethers, halogenated hydrocarbons or dimethylformamide, such as are mentioned above.

When glycosylamines (VI) which are obtained in the first step are reacted with one to two equivalents of an organic isocyanate (Formula X)

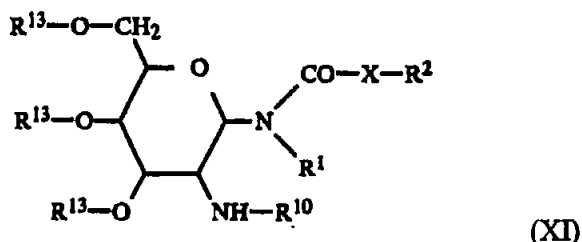


with R^2 having the abovementioned meaning, glycosylureas of Formula VIII are obtained, and X is -NH-. This acylation reaction is, like the abovementioned reactions, is preferably carried out in organic solvents, with the reaction temperatures being between -20° C and 60° C, preferably between 0° C. and 25° C. Suitable solvents are the abovementioned alcohols, ethers, halogenated hydrocarbons, or dimethylformamide.

The glycosylamides (Formula VIII, X=-CH₂-), glycosylcarbamates (Formula VIII, X=O-) or glycosylureas (Formula VIII, X=-NH-) obtained in this way are isolated in the form of crystalline or amorphous solids by processes known per se and, if necessary, are purified by standard procedures such as recrystallization, chromatography, extraction, etc.

In many cases, it is also advantageous to carry out, in parallel with or in place of the abovementioned purification steps, a chemical derivatization which leads to a derivative of the glycosylamides, -carbamates and -ureas of Formula VIII, which has good crystallization properties. Chemical derivatizations of this type are, in the case of the glycosylamides, glycosylcarbamates and glycosylureas according to the invention, for example esterification reactions on the hydroxyl groups of the sugar residues. Examples of suitable ester groups are acetyl, benzoyl or p-nitrobenzoyl groups.

To prepare the tri-O-acyl derivatives of the glycosylamides, glycosylureas or glycosylcarbamates, the corresponding triols (Formula VIII) are reacted with acylating agents in the presence of inorganic or organic auxiliary bases. Suitable acylating agents are acid chlorides, such as acetyl chloride, benzoyl chloride or p-nitrobenzyl chloride, or anhydrides, such as, for example, acetic anhydride. This results in the formation of the esters according to Formula XI



with R^1 , R^2 , R^{10} and X having the above mentioned meanings, and

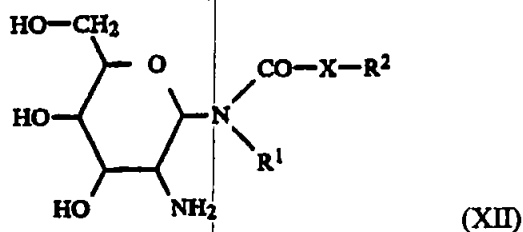
R^{13} representing acetyl, benzoyl or p-nitrobenzoyl.

The O-acylation reactions are preferably carried out in inert organic solvents. Those which may be used are halogenated hydrocarbons, such as dichloromethane, trichloromethane or 1,2-dichloroethane, ethers, such as tetrahydrofuran, or 1,4-dioxane, esters, such as ethyl acetate, and amides, such as dimethylformamide.

It is also possible for organic bases alone, such as triethylamine or pyridine, to be indicated as suitable solvents. The bases which can be used are all the bases used in organic chemistry for O-acylations. Preferably, triethylamine, pyridine or the mixture pyridine/4-dimethylaminopyridine are used. The triesters (Formula XI) can be readily crystallized from organic solvents. Particularly preferred for the crystallization are polar solvents, such as short-chain alcohols, that is to say methanol, ethanol, n-propanol or isopropanol. Other solvents suitable for the crystallization of the triesters (Formula XI) are mixtures of organic solvents with polar inorganic or organic solvents, for example tetrahydrofuran-methanol, tetrahydrofuran-water, ethanol-water, and isopropanol-water. The triesters (Formula XI) which have been purified by single or, where appropriate, multiple recrystallization are returned to the triols (Formula VIII) by hydrolysis or transesterification of the three O-acetyl groups. A multiplicity of types of ester cleavages are known in organic chemistry. For the preparation of the triols (Formula VIII) from the triesters (Formula XI) mentioned may be made of the transesterification of the acyl groups in the presence of methanol and catalytic amounts of sodium methanolate, which is known as the ZEMPLÉN hydrolysis in organic chemistry.

The third reaction step in the preparation of the compounds of Formula I according to the invention comprises the selective cleavage of the protective group of the 2-amino group on the sugar in the compounds of the Formula VIII. In this reaction, particular care has to be taken that there is no simultaneous elimination of the 1-amido or the 1-carbamido or the 1-
 5 (alkoxycarbonylamido) group on the sugar in the compounds of the Formula VIII.

The benzyloxycarbonyl group, which is preferably used, on C-2 of the aminohexanes can be quantitatively and selectively cleaved, with retention of the 1-amido, 1-carbamido or 1-alkoxycarbonylamido group, under the conditions of hydrogenolysis. This hydrogenolysis provides the glycosylamides, glycosylureas or glycosylcarbamates with a free 2-amino group
 10 on the sugar with the following structural Formula (XII)



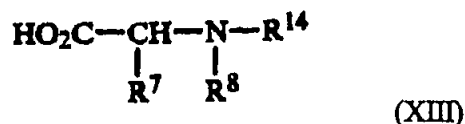
with the abovementioned meanings for R^1 , R^2 and X.

Examples of suitable catalysts for the hydrogenolysis are noble metals such as
 15 platinum or palladium which are adsorbed onto active charcoal. Palladium/charcoal (5% or 10%) is preferably used. The hydrogenolysis can be carried out under atmospheric pressure or elevated pressure in a suitable pressure vessel. Inert solvents are suitable for the hydrogenation, such as, for example, alcohols such as methanol, ethanol, or propanol, ethers such as tetrahydrofuran or 1,4-dioxane, or carboxylic acids such as acetic acid, or mixtures
 20 thereof. Where appropriate, the solvent is mixed with water or dilute acids such as hydrochloric acid or sulphuric acid. Of course, when such acids are added, the 2-amino-2-deoxy-glycosylamides, -carbamates and -ureas according to Formula XII are obtained as the ammonium salts of these acids. The t-butyloxycarbonyl protective group, which is likewise preferably used in the compounds of Formula VIII, can be cleaved by methods known from
 25 the literature using mineral acids such as hydrochloric acid or sulphuric acid. In this case too, the 2-amino-2-deoxy-glycosylamides, -carbamates and -ureas of Formula XII are selectively obtained as the ammonium salts of the acids used for the cleavage.

The fourth reaction step for the synthesis of the compounds of Formula I, according to the invention, comprises the linkage of the aminoglycosylamides, amides, -carbamates or-

ureas according to Formula XII, or of their salts, with a suitable amino acid derivative.

Suitable amino acid derivatives are N-blocked amino acids (Formula XIII)



with R⁷ having the abovementioned meaning,

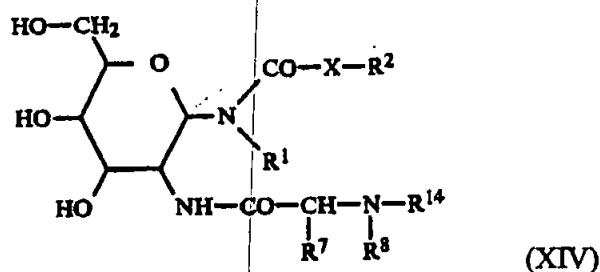
5 R⁸ representing hydrogen or methyl, and

R¹⁴ representing a protective group which is customarily used in peptide synthesis and can be selectively eliminated again while retaining the peptide bond.

The protective groups for the amino group in Formula XIII which are preferably used are the abovementioned, and the benzyloxycarbonyl or t-butyloxycarbonyl groups are particularly preferred. The linkage of the 2-amino-2-deoxy-glycosylamide, -carbamate or urea of Formula XII with an amino acid derivative of Formula XIII can be carried out by conventional methods of peptide synthesis (E. Wunsch et al. : Synthese von Peptiden (Synthesis of peptides) in: Methoden der Org. Chemie (Methods of org. chemistry) (Houben-Weyl) (E. Muller, Editor), Vol XV/I and XV/2, 4th Edition, published by Thieme, Stuttgart 15 (1974).

Examples of conventional processes are the condensation of the amino group in the compound of Formula XII with an amino acid derivative of Formula XIII in the presence of water-removing agents, for example dicyclohexylcarbodiimide or diisopropylcarbodiimide.

The condensation of the compounds of Formula XII with those of Formula XIII can also be carried out when the carboxyl group is activated. A possible activated carboxyl group is, for example, an acid anhydride, preferably a mixed anhydride, such as an acetate of the acid, or an amide of the acid, such as an imidazolid, or an activated ester. Examples of the activated esters are cyanomethyl esters, pentachlorophenyl esters, and N-hydroxyphthalimide esters. Activated esters can also be obtained from the acid (Formula XIII) and N- 20 hydroxysuccinimide or 1-hydroxybenzothiazole in the presence of a water-removing agent, such as carbodiimide. The derivatives of the amino acids are known and can be prepared in a known manner. The condensation of the amino compound of Formula XII with the optionally activated carboxyl compounds of Formula XIII provides the peptidoglycolipids of Formula XIV.

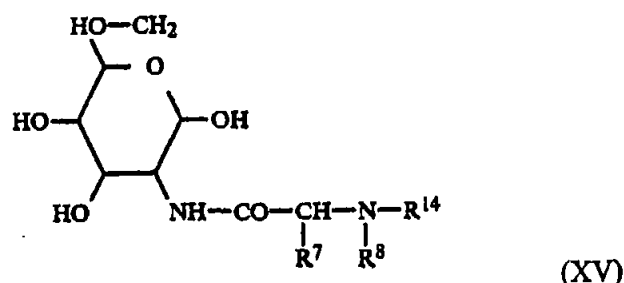


with the abovementioned meanings for R^1 , R^2 , R^7 , R^8 , R^{14} and X.

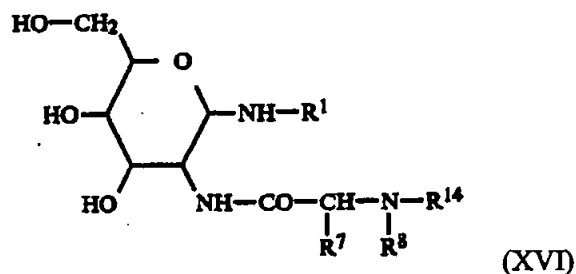
In a final process step for the preparation of the compounds according to Formula I, the protective group R^{14} in the compounds of Formula XIV is eliminated. Care has to be taken during this step that the other amide, urethane or urea groups present in the compounds of Formula XIV are not cleaved. The protective groups R^{14} which are preferably used in the compounds of Formula XIV, the N-carbobenzoxy group and the N-tert.-butoxycarbonyl group, can be eliminated while retaining the amide, urethane or urea group. The carbobenzoxy group can be selectively eliminated by hydrogenolysis in the presence of a noble metal such as, for example, palladium on charcoal, in a suitable solvent such as ethanol, methanol, glacial acetic acid or tetrahydrofuran. The solvents may be used as the pure solvent or combined with one another or with water. The reaction may be carried out under either atmospheric pressure or under elevated pressure. The tert.-butoxycarbonyl group R^{14} in the compounds of Formula XIV can be eliminated by acidolytic processes.

Examples of suitable conditions are the use of hydrogen chloride in suitable solvents such as, for example, glacial acetic acid, diethyl ether, dioxane or ethyl acetate, at room temperature. Processes of this type for the cleavage of the t-butyl carbamates are known in principle. The peptidoglycosylamides, -carbamates and -ureas of Formula I which are obtained in this manner, are isolated in the form of crystalline or amorphous solids, by processes known per se, and are, if necessary, purified by standard methods, such as recrystallization, chromatography, extraction etc.

The compounds according to the invention, of Formula I, can also be prepared by a second synthetic route with similarly good results. This second synthetic route differs from the first, which is described above, in that the sequence of the linkage of the synthons amino sugar amino acid, amine R^1-NH_2 and carboxylic acid $R^2-CH_2-CO_2-H$, or carbonic acid derivative $R_2-O-CO-halogen$, or R^2-NCO , with the above mentioned meanings of R^1 and R^2 , is different. In this second route, suitable 2-N-(aminoacyl)aminosugars of Formula XV



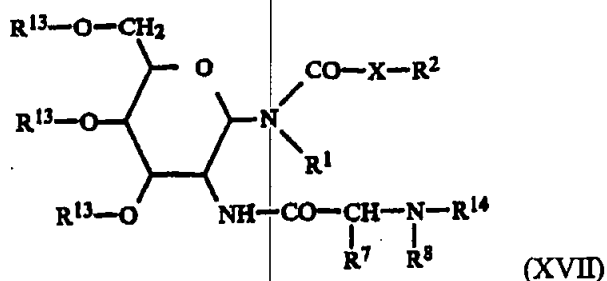
with the abovementioned meaning for R^7 and R^8 , and in which R^{14} represents an amino protective group known in peptide chemistry, preferably the benzyloxycarbonyl or the t-butyloxycarbonyl group, are used as the starting component. The compounds of Formula XV
 5 which are thus obtained are then condensed with amino compounds of Formula III to give glycosylamines of the general formula XVI



with R^1 , R^7 , R^8 and R^{14} having meanings consistent with Formula I and the definition of R^6 .

All the processes described above for the preparation of the compounds of the
 10 general Formula VI can be used for the preparation of the compounds of the general Formula XVI. The compounds of Formula XVI are then reacted either with the abovementioned carboxylic acid derivatives (Formula VII) or with halogenoformic esters (Formula IX) or with organic isocyanates (Formula X) to give the 2-(aminoacyl)-aminoglycosylamides of
 Formula XIV (with $X=CH_2-$), or the -carbamates of Formula XIV (with $X=O-$), or the -
 15 ureas of Formula XIV (with $X=NH-$). These acylation reactions can generally be carried out by the processes described above for the reaction of glycosylamines with carboxylic or carbonic acid derivatives.

The intermediates (Formula XIV) which are obtained in this way can be purified by the abovementioned physical purification method. However, it is preferable to convert the
 20 compounds of Formula XIV, by the methods of O-acylation described above, into the tri-O-acetates or the tri-O-benzoates of the general Formula XVII



with meaning for the variables consistent with Formula 1.

These compounds can readily be crystallized, preferably from polar solvents such as methanol or ethanol, and thus purified. The purified crystalline derivatives of Formula XVII
 5 are then converted into the triols of Formula XIV by the abovementioned methods of ester hydrolysis, which are widely used especially in sugar chemistry. The final elimination of the protective groups in the amino acid in the compounds of Formula XIV has already been described above for the preparation of the compounds of Formula I. The invention also relates to salts of the compounds of Formula I. These are primarily the non-toxic salts which
 10 can customarily be used in pharmacy, for example chlorides, acetates and lactates, or inert salts of the compounds of Formula I.

The term "weak acid" means any acid having a pKa (the -log of the Ka) value of between about 1.0 and about 9.5 using standard tables or values. While not intending to limit this invention, the following examples of weak acids, are described with name, formula, and
 15 approximate pKa. Acetic acid, $H(C_2H_3O_2)$ (pKa 4.76); ascorbic acid(1), $H_2(C_6H_6O_6)$ (pKa 4.10); acetylsalicylic acid, $H_8(C_9O_4)$, (pKa 3.5); butanoic acid $H(C_4H_7O_2)$ (pKa 4.83); carbonic acid, H_2CO_3 , (pKa 4.83 form 1); chromic acid, $HCrO_4^-$ (pKa 6.49 form 2); citric acid, $H_3(C_6H_5O_7)$, (pKa 3.14 form 1); citric acid, $H_2C_6H_5O_7^-$, (pKa 4.77 form 2); citric acid, $(HC_6H_5O_7)^-$, (pKa 6.39 form 3); formic acid, $H(CHO_2)$, (pKa 3.75); fumaric acid, $H_4(C_4O_4)$
 20 (pKa 3.03); heptanoic acid, $H(C_7H_{13}O_2)$, (pKa 4.89); hexanoic acid, $H(C_6H_{11}O_2)$, (pKa 4.84); hydrofluoric acid, HF, (pKa 3.20); isocitrate, $H_8(C_6O_7)$ (pKa 3.29); lactic acid, $H(C_3H_5O_3)$, (pKa 3.08); maleic acid, $H_4(C_4O_4)$ (pKa 1.83); nicotinic acid, $H_5(C_6NO_2)$ (pKa 3.39); oxalic acid, $H_2(C_2O_4)$, (pKa 1.23 form 1); oxalic acid, $(HC_2O_4)^-$, (pKa 4.19 form 2); pentanoic acid, $H(C_5H_9O_2)$, (pKa 4.84); phosphoric acid, H_3PO_4 , (pKa 2.16
 25 form 1); propanoic acid, $H(C_3H_5O_2)$, (pKa 4.86); pyruvic acid, $H_4(C_3O_3)$ (pKa 2.39); succinic acid $H_4(C_4O_4)$ (pKa 4.19) and trichloroacetic acid, $H(C_2Cl_3O_2)$ (pKa 0.70). Any combinations of these acids are also exemplified.

Acetic acid is preferred. Acetylsalicylic acid, citric acid, formic acid, fumaric acid, hydrofluoric acid, isocitrate, maleic acid, nicotinic acid, phosphoric acid, pyruvic acid,

succinic acid and trichloroacetic acid are more common weak acids that are embodied individually, in combination and as a collection.

The term **"non-ionic surfactant"** means a surfactant which is a substance that reduces the surface tension of the material it is dissolved in and non-ionic means it has a polar group that is not electrically charged. The term amphiphilic surfactant means a surfactant where a part of the surfactant molecule is hydrophobic and a part is hydrophilic. Suitable surfactants will be both non-ionic and amphiphilic and acceptable for veterinary or medical use. Whether or not a particular non-ionic surfactant is acceptable for medical or veterinary use can be readily determined by those of ordinary skill in the art. There are many suitable non-ionic surfactants that can be used with this invention and numerous examples are provided below.

Two well know types of non-ionic surfactants are embodied here. These are known as sorbitans, commonly sold under the Span® trademark, and polyoxyethylene sorbitans, commonly sold under the Tween® trademark, Specifically embodied here are the following:

Sorbitan monolaurate (Span 20®), Sorbitane monopalmitate (Span 40®), Sorbitane monostearate (Span 60®), Sorbitane tristearate (Span 65®), Sorbitane monooleate (Span 80®), Sorbitane trioleate (Span 85®), Polyoxyethylensorbitan monolaurate (Tween 20®), Polyoxyethylensorbitan monopalmitate (Tween 40®), Polyoxyethylensorbitan monostearate (Tween 60®), Polyoxyethylensorbitan monooleate (Tween 80), and Polyoxyethylensorbitan trioleate (Tween 85). These descriptions are meant to include the trade name ingredients, or equivalent ingredients, as listed in supply catalogues for these surfactants. Surfactants may be used individually or in any combination.

Sorbitan monolaurate (Span 20®), Polyoxyethylensorbitan monolaurate (Tween 20®), Sorbitane monooleate (Span 80®), Sorbitane trioleate (Span 85®), Polyoxyethylensorbitan monooleate (Tween 80), Polyoxyethylensorbitan trioleate (Tween 85) are particularly described.

The term **"suitable buffer"** means a buffer that is suitable for veterinary or medical use and can maintain a relatively constant pH in an aqueous solution of between about 6 and about 8. Phosphat buffers are one embodiment described here. Phosphate buffers can be made at a specific pH in a wide range by means of mixing monobasic and dibasic salts of sodium phosphate and/or potassium phosphate at different proportions. The making and use of various sodium and potassium buffers is well known to one skilled in the art.

Other examples of buffers are the following:

2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (also known as MES);

3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (also known as MOPS);

n- [tris (hydroxymethyl)-2-aminoethanesulfonic acid (also known as TES);

4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (also known as HEPES);
[tris (hydroxymethyl) methyl]glycine (also known as TRIS).

Part I. Preparation of the solutions.

The novel formulations disclosed here are 1) **Glycosylamide Stock Solutions** and 2)

5 **Glycolipid Adjuvant Solutions.**

1) A **Glycosylamide Stock Solution** is prepared by dissolving a glycolipid in an alcohol and combining appropriate amounts of a weak acid. The weak acid is added to the glycolipid alcohol solution, in molar excess of the weak acid with reference to the glycolipid. A non- ionic surfactant is added to the glycolipid alcohol acid mixture to create a
10 **Glycosylamide Stock Solution**. The glycolipid exemplified is N-(2-deoxy-2-L-leucylamino- β -D-gulucopyranosyl)-N-octadecyldodecanoylamide acetate. The alcohol exemplified is ethanol. The weak acid exemplified is acetic acid. The non-ionic surfactants are as described above.

Preparation of Glycosylamide Stock Solutions. Weak acid is added to an
15 alcoholic solution containing a glycolipid. The weak acid is added in molar excess with reference to the glycolipid content. The weak acid component should be added from 1.25 to 5 times the amount of the glycolipid, in molar equivalents to the glycolipid. In certain embodiments the following relative amounts of acid are recommended. The weak acid should be 2.0 times, 2.5 times, 2.7 times, 3.0 times, and 5.0 times, and most preferred is 2.7
20 times as many moles of acid as moles of glycolipid.

A non- ionic surfactant is added to the alcohol glycolipid mixture of above, either before or after the weak acid is added, to create the final **Glycosylamide Stock** solution.

In the presence of the weak acid, the glycosylamide is converted into the acetate form of the glycolipid. The glycolipids of Formula I are not fully soluble when simply introduced
25 directly into buffered aqueous solutions. The solution typically obtained from dissolving a glycolipid of Formula I into a buffered aqueous solution is a milky mixture. Earlier researchers have attempted to make such solutions of mixtures homogenous by means of sonicating the milky solution. However, sonication does not assure the solution will remain homogeneous during storage. The chemical approach to suspending these compounds results
30 in a fully soluble, nearly optically clear solution, of aqueous buffered glycolipid, at appropriate pH. When weak acid is added in excess amount compared to the glycolipid it ensures that all the glycolipid is converted into soluble form, and its reversion back to non-soluble form is prevented.

The weak acid converts the glycolipid into a pharmaceutically acceptable salt.
35 Preferred salts are non-toxic salts, which are customarily used in pharmaceutical and

biological preparations. For example, chlorides, acetates, lactates, and inert salts of the compounds of Formula I, are obtained with the weak acids described herein.

The alcohols used to dissolve the glycolipid may be methanol, ethanol, any isomeric form of propanol, or any combination thereof. The resulting glycolipid alcohol solution will be optically clear. Any chemical reaction that could convert the acetate form of glycolipid back to non-acetate form would cause flocculation of the glycolipids within the aqueous solution. When the flocculation of glycolipid occurs, the glycolipid molecules come out of solution as thin flakes, settling at the bottom of the container. The initial concentration of weak acid in the **Glycosylamide Stock Solution** of glycolipid and alcohol determines whether there will be any flocculation of glycolipid. The weak acid should be in molar excess with reference to the glycolipid to avoid flocculation.

2) **Glycolipid Adjuvant Solutions** are prepared by introducing an appropriate amount of the **Glycosylamide Stock Solution** into a "suitable buffer." The pH of the final stable **Glycolipid Adjuvant Solutions** described here should be between about 6 and about 8. A final pH of between about 6 to about 7 is preferred. A final pH of between about 6.3 to about 6.4 is described.

The **Glycosylamide Stock Solution** contains excess acid so it should be buffered for use as an adjuvant. For example, a phosphate buffer can be made at a specific pH in a wide range by means of mixing monobasic and dibasic salts of sodium phosphate or potassium phosphate at different proportions. If a phosphate buffer is used it can be made at about 20mM, and this has a pH of about 7.8. When the **Glycosylamide Stock Solution** is added to the buffer, the pH of the buffer is lowered. A phosphate buffered solution at pH 7.8 results in a final **Glycolipid Adjuvant Solution** with a pH of about 6.4. Final pH adjustments may be made but are typically not necessary.

The **Glycosylamide Stock Solution** containing weak acid and a glycolipid has a very low pH. It may be necessary to raise the pH to an acceptable level. A strong base should be avoided for this purpose because addition of a strong base can convert the salt form of the glycolipid back to the non-salt form, resulting in precipitation (flocculation) of the non-salt form in the aqueous environment. However, if a strong base is desired, only small amounts should be used. For example, it is recommended that no more than 100 mM NaOH be used, while 4.0 mM or less is optimal.

The buffering solution may optionally include some NaCl, but it is not required. NaCl concentrations can range from about 1 to about 50 mM. Lower amounts of NaCl are preferred over greater amounts. Examples here have either no NaCl or 15mM NaCl. 100mM NaCl is not suitable as flocculation occurs. No flocculation is expected with NaCl

concentrations of 15 mM or less. No flocculation is expected with NaCl concentrations of 30 mM or less. No flocculation is expected with NaCl concentrations of 50 mM or less.

Part II. Characterization of the Glycolipid Adjuvant Solution.

5 The stability of the **Glycolipid Adjuvant** Solution during storage may be monitored by simple visual observation or by using appropriate analytical instruments. Glycolipid molecules form micelles when in aqueous solution and it is possible to determine the size of the micelles precisely with a laser diffractometer. Such a measurement can be used to determine whether there is flocculation of glycolipid molecules.

10 An alternative approach to real time stability measurement is to perform accelerated stability testing. With accelerated stability testing the adjuvant solution is subjected to a temperature of about 37° C for about seven days, followed by incubation at about 4°C for about two days under constant shaking. The incubation at about 37°C for about seven days represents the storage at about 4°C for a period of about one year. The incubation at about 4°C for about two days with constant shaking represents the stress condition the **Glycolipid**
15 **Adjuvant** Solution could face during transportation.

To determine whether the **Glycolipid Adjuvant** Solution is isotonic with the cytoplasm, the osmolarity can be determined. Different concentrations of sodium chloride can be added and the osmolarity of the resulting solution determined using an osmometer. Increasing concentrations of sodium chloride, besides increasing the osmolarity, also tend to
20 make the solution more turbid. Turbidity is thought to be caused by aggregation of micelles into larger particles. Solutions that are difficult or impossible to filter using a 0.2 µm filter are generally not acceptable for commercial use because terminal filtration is often used to assure the sterility of adjuvant solutions prepared on a commercial scale. An electron microscopic analysis can be used to determine whether there is an aggregation of micelles as
25 a result of too much salt.

Additional non-glycolipid adjuvants may be used in the **Glycolipid Adjuvant** Solution in combination with those described above. In another embodiment of the invention, additional immunostimulatory molecules are added to the **Glycolipid Adjuvant** Solution. Immunostimulatory molecules are well known in the art, and they include saponins,
30 Quil A, dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA) and Carbopol.

Quil A is a purified extract from the bark of the South American tree *Quillaja saponaria*. Quil A induces both humoral and cell-mediated responses. Quil A is often used with cholesterol because cholesterol eliminates less desirable side effects when added in the appropriate proportions. Cholesterol forms insoluble complexes with Quil A that form helix-
35 like structures as the cholesterol binds with Quil A, thus exposing the molecule's sugar units that help stimulate the immune response.

Dimethyl dioctadecyl ammonium bromide, DDA, is a cationic surfactant with 18 carbon alkyl chains. It is an amphiphilic quaternary amine. Direct interaction of DDA and antigen is needed to obtain an optimal immune response, because DDA functions as a carrier of antigen through direct binding of the antigen at the oil/water interface. It stimulates both the humoral and the cell-mediated immune responses.

Carbopol is another useful immunostimulatory molecule that may be used with this invention. It is an acrylic acid homopolymer that is cross-linked with polyalkenyl ether.

Part III. Uses of the Glycolipid Adjuvant Solution.

The **Glycolipid Adjuvant Solution**, in a pharmaceutically acceptable salt form, can be mixed with an antigen. Convenient antigens include: microbial pathogens proteins, glycoproteins, lipoproteins, peptides, glycopeptides, lipopeptides, toxoids, carbohydrates, and tumor specific antigens. The antigens can be derived from a variety of sources. Antigens from microbial pathogens include disease causing bacteria, viruses, and parasitic organisms. Mixtures of two or more antigens may be employed. The antigen may be killed, naturally attenuated, modified live, or a protein extract, recombinantly produced protein, a chemically synthesized peptide or anything else that stimulates an immune response. The peptide antigen may exist as a free peptide or conjugated to the glycolipid or conjugated to other known B-cell or T-Cell epitopes.

The stable **Glycolipid Adjuvant Solution** can be combined with additional adjuvants or components which are known to have adjuvant properties. Additional adjuvants that can be combined with the **Glycolipid Adjuvant Solution** include polymers, naturally occurring terpenoid compounds in their crude or partially purified form, amphiphilic quaternary amine, derivatives of bacterial cell wall materials and synthetic analogues of bacterial cell wall or DNA components. The **Glycolipid Adjuvant Solution** may be used with or combined with one or more agents such as antibiotics or different antigens. Bacterial or viral antigens may either be killed or modified live. Killed viral antigens are prepared by growing viruses in tissue culture and inactivating the viruses through chemical treatments. Some viruses can be grown in embryonated eggs. The killed viral antigen can be added to solution containing **Glycolipid Adjuvant Solution**, and the resulting solution can be used to vaccinate the animals to achieve protection against the viral infections.

In one embodiment of this invention, the **Glycolipid Adjuvant Solution** can be used as a diluent for modified live viral antigens. Viral pathogens can be attenuated in their virulence either by passing them in tissue culture for several generations or through specific manipulations of the viral genome. Such attenuated strains of viruses can be grown to very high titers in tissue culture and can be used as vaccine antigens. Attenuated viral strains are referred to as modified live viral antigens. While these strains are less virulent, they are still

highly immunogenic when used as antigen in the vaccine and offer protection against the infection by virulent strains. Should the **Glycolipid Adjuvant Solution** be used as a diluent for modified live viral antigens, the **Glycolipid Adjuvant Solution** should be tested to ensure it does not have any viricidal effect on the particular virus of interest.

- 5 The viricidal property of the **Glycolipid Adjuvant Solution** on modified live viral antigens can be determined in an *in vitro* experiment. Lyophilized viral antigens are rehydrated with the **Glycolipid Adjuvant Solution** or with water. The resulting virus solutions are plated on a monolayer of permissive cells. The titer of the viral antigen is determined by means of counting the number of plaques formed on the monolayer. The
10 difference in the viral titers obtained between the samples rehydrated with water and the **Glycolipid Adjuvant Solution** can be used to determine what, if any, viricidal effect of the **Glycolipid Adjuvant Solution** on any live virus.

Modified live viral antigens may be lyophilized and provided as lyophilized cakes in a commercial vaccine preparation. In general these lyophilized cakes of modified live viral
15 antigens are rehydrated with a diluent solution and used for parenteral vaccination. Examples of diluents include a water solution containing phosphate buffered saline. If the diluent solution contains a known immunostimulatory molecule, the efficiency of vaccination with the modified live viral antigens can be improved. In one embodiment of the present invention, the **Glycolipid Adjuvant Solution** is used as a diluent solution.

20

EXAMPLES

Example 1. Preparation of an insoluble glycosylamide composition with equal concentration of Bay 15-5831® and acetic acid.

Table 1. A composition not suitable for commercial use.

Reagent	Amount (200 ml)
Ethanol (100%)	176.1 ml
Tween 20	4.0 ml
Glacial Acetic acid	1.5 ml
Bay 15-5831®	18.4 gm

25

Bay 15-5831® is registered to the Bayer Company, is the trade name for N- (2-deoxy-2-L-leucylamino-β-D-gulucopyranosyl)-N-octadecyldodecanoylamide. When this compound is used to make an adjuvant solution using the compositions described in Table 1, above, where the acetic acid is used in equal molar concentration to the glycolipid, and the glycolipid is in its free base form, the glycolipid is insoluble and flocculates.

Example 2. A soluble **Glycosylamide Stock Solution** using the same components as **Example 1**, but with an increase in the acetic acid concentration relative to the concentration of glycolipid, results in a soluble **Glycosylamide Stock Solution**.

Table 2. Composition of a **Glycosylamide Stock Solution**.

Reagent	Amount (50 ml)
Ethanol (60% v/vol)	44.64 ml
Tween 20	1.12 ml
Glacial Acetic acid	0.68 ml
Bay 15-5831®	3.49 gm

5

Here, 60% ethanol (v/v) was used, and the molar ratio of acetic acid to glycolipid is 2.0. The 200-proof ethanol of Example 1 was replaced with 60% ethanol water. The resulting **Glycosylamide Stock Solution** was optically clear and there was no sedimentation at the bottom of the container. This **Glycosylamide Stock Solution** is added to various buffers to make a **Glycolipid Adjuvant Solution** in **Example 3**, below.

10

Example 3. Preparation of **Glycolipid Adjuvant Solutions**. Phosphate buffer solutions at different pH were prepared. A 2 M stock of monobasic sodium phosphate solution was prepared by dissolving 138 grams of $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ salt in 250 mL of DI water in a beaker and making the final volume to 500 mL. Similarly a 2M stock of dibasic sodium phosphate solution was prepared by dissolving 142 grams of NaH_2PO_4 in 300 mL of DI

15

water in a beaker and making the final volume to 500 mL. Both stock solutions were sterile filtered using a 0.2 micron filter.

Table 3. Compositions of 1M stock solution of sodium phosphate buffer solution at different pH.

Calculated pH	Na_2HPO_4 Solution (ml)	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Solution (ml)	Total Volume of 2M stock solution (ml)	Sterile DI water (ml) added	Total volume of 1M stock solution (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

20

Different volumes of 2M stock of monobasic sodium phosphate and dibasic sodium phosphate solutions as shown in Table 3 were prepared, then 1M stock solution of sodium

phosphate buffer solutions were obtained at a different pH levels. The 1M phosphate buffer solutions were then diluted 50X to get 20 mM phosphate buffers.

Glycolipid Adjuvant Solutions were prepared using these stock buffers and the **Glycosylamide Stock Solutions** from **Example 2**.

5 To 96 mL of each of these 20 mM phosphate solutions, 5 mL of Glycosylamide Stock Solution as prepared in **Example 2** was added. The resulting **Glycolipid Adjuvant Solution** contained 12.5 mM acetic acid and 6.33 mM glycolipid. The glycolipid is now in the acetate form.

Example 4. Significance of the final pH of the Glycolipid Adjuvant Solution.

10 In another set of experiments, the significance of the final pH of various solutions was tested to evaluate how pH affects flocculation. A 20 mM phosphate buffer was prepared at an initial pH of 7.8. **Table 4** shows the glycolipid adjuvant prepared using the glycosylamide prepared as in **Example 1**, where glycolipid and acetic acid were used in equal molar concentrations. Note, the final pH did not drop very much (**Table 4**), indicating
15 the effectiveness of the buffer. NaCl concentrations varied. The optical density readings (O.D.) at 600 nm, in **Table 4** were compared to similar readings in **Table 5**, where the **Glycolipid Adjuvant Solutions** were prepared with **Glycosylamide Stock Solutions** containing twice the molar ratio of acetic acid to glycolipid, as prepared in **Example 2**. Using the greater concentration or amount of acetic acid results in minimal flocculation.
20 The flocculation was higher in the non-filtered sample than in the filtered samples. Moreover, with increasing NaCl concentration, there is an increase in flocculation and even precipitation. The **Glycolipid Adjuvant Solution** described in **Table 5** was prepared with a phosphate buffer having an initial pH of 8.0; the final pH of the Glycolipid Adjuvant Solution was between 6.8 and 7.0. A further decrease in the final pH of the Glycolipid
25 Adjuvant Solution may result in a **Glycolipid Adjuvant Solution** with less turbidity and no flocculation.

Table 4 . Preparation of glycosylamide compositions containing equimolar amount of acetic acid and glycolipids. (See **Example 1**.)

NaCl Concentration (mM)	Volume of buffer (ml)	Volume of glycolipid stock compositions (ml)	Final pH	O.D. at 600 nm
0	480	25	7.42	1.693
15	480	25	7.39	1.873
100	480	25	7.33	2.742

Table 5. Preparation of Glycolipid Adjuvant Solution using Glycosylamide Stock
Solution containing twice the molar amount of acetic acid as glycolipid. (See Example 2.)

NaCl Concentration (mM)	Volume of buffer (ml)	Volume of Glycosylamide Stock Solution (ml)	Final pH	O.D. at 600 nm
0	480	25	6.93	0.146
15	480	25	6.88	0.487
100	480	25	6.84	2.826

An optical density (O.D.) of less than 0.1 represents a translucent solution. An optical density of between 0.1 and 0.5 is homogeneous with slight turbidity, an optical density of 0.5 to 1.0 has some turbidity, an optical density of 1.0 to 1.5 is considered turbid. An optical density over 1.5 is turbid and not likely to be filterable using a 0.2 micron filter. The latter would generally not be considered commercially suitable.

Example 5. Titration of glycolipid adjuvant with acetic acid to show flocculation can be reversed. To determine whether adding increasing amount of acetic acid to the glycolipid djuvant showing flocculation would reverse the flocculation, a glycolipid adjuvant as described in Example 1 was prepared. This glycolipid adjuvant showed flocculation even in the absence of any NaCl. An increasing concentration of acetic acid was added to this flocculated glycolipid adjuvant mixture. The acetic acid was diluted 16.6 times with water to get a working solution concentration of 1 Molar. Then 15 μ l of this 1M solution was added to 15 ml of glycolipid adjuvant mixture to increase the acetic acid concentration by 1 mM. With increasing concentration of acetic acid, the pH of the glycolipid adjuvant decreased and the flocculates dissolved. However, the glycolipid adjuvant remained somewhat turbid. This observation confirms that increasing acetic acid concentration converts the free base of Bay 15-5381 into an acetate form, which is more soluble in aqueous solution.

Table 7. Titration of glycolipid adjuvant with acetic acid.

Volume of glycolipid adjuvant	Volume of 1N Acetic Acid added	pH of the Solution
15 mL	0	7.25
15 mL	15 μ l (1 mM)	7.21
15 mL	30 μ l (2 mM)	7.10
15 mL	60 μ l (4 mM)	6.97
15 mL	150 μ l (10 mM)	6.44
15 mL	750 μ l (50 mM)	4.57

- Example 6.** Preparation of a second stable **Glycolipid Adjuvant Solution** with and without NaCl. After establishing the importance of an increase in the amount of acetic acid in maintaining the stability of glycolipid solutions, it was decided to use the composition shown in **Table 8** to first prepare a **Glycosylamide Stock Solution** and then use this to
- 5 prepare another **Glycolipid Adjuvant Solution** both with and without NaCl. This **Glycosylamide Stock Solution** is similar to the solution in **Example 2**, with 4 times the total volume and relatively greater amounts of acetic acid and Tween 20.

Table 8. Composition of a **Glycosylamide Stock Solution**.

Reagent	Amount (200 ml)
60% Ethanol (v/v)	179 ml
Tween 20	4.0 ml
Acetic acid	3.0 ml
Bay 15-5381	13.96 grams

- 10 Three different **Glycolipid Adjuvant Solutions** with varying concentrations of NaCl were prepared using the phosphate buffer from **Example 3** and the **Glycosylamide Stock Solution** prepared as in **Table 8**.

- Like the formulation in **Example 4**, **Table 5**, the **Glycolipid Adjuvant Solution** was made that contained 0 mM, 15 mM, and 100mM NaCl. The 0 mM and 15 mM NaCl
- 15 solutions could be filtered through a 0.2-micron filter. The **Glycolipid Adjuvant Solution** containing 100 mM NaCl could not be filtered though a 0.2-micron filter.

Table 9. Preparation of stable **Glycolipid Adjuvant Solutions** with and without NaCl.

Sodium chloride Concentration (mM)	Volume of buffer (ml)	Volume of glycosylamide stock solution (ml)	Final pH	O.D. at 600 nm
0	465	35	6.39	0.039
15	465	35	6.37	0.073
100	465	35	6.29	0.439

- 20 20 mL of each of the **Glycolipid Adjuvant Solutions** were placed into 30 ml glass vials and incubated at room temperature and at 4°C. Visual observations were made on a regular interval. Initially the **Glycolipid Adjuvant Solution** with 0 mM NaCl was optically

clear. The **Glycolipid Adjuvant** Solution containing 15 mM NaCl was slightly turbid and had an O.D. of 0.073 at 600 nm. The **Glycolipid Adjuvant** Solution containing 100 mM NaCl was turbid and had an O.D. of 0.439 at 600 nm. **Table 9**. None of these **Glycolipid Adjuvant** Solutions showed any signs of flocculation both at room temperature and at 4°C.

- 5 These **Glycolipid Adjuvant** Solutions were observed for a period of one year with no change in appearance.

Example 7. Titration of a stable **Glycolipid Adjuvant** Solution with NaOH.

- Initially an optically clear and stable **Glycolipid Adjuvant** Solution was obtained without NaOH. In order to establish that the elimination or use of a minimal amount of NaOH was essential to prevent flocculation, it is necessary to show that a gradual addition of NaOH would induce flocculation in an otherwise stable glycolipid mixture. Appropriate volumes of 1 N NaOH were added to 15 mL of **Glycolipid Adjuvant** Solution without any added NaCl, as prepared in Table 10, below. The NaOH was increased gradually from 1 mM to 12 mM. (**Table 10**) The **Glycolipid Adjuvant** Solution used in this experiment was prepared using the **Glycosylamide Stock** Solution described in **Example 6**. With increasing concentration of NaOH in the **Glycolipid Adjuvant** Solution, the pH of the formulation gradually increased along with the appearance of flocculation.

Table 10. Titration of a stable **Glycolipid Adjuvant** Solution with NaOH.

Volume of glycolipid adjuvant	Volume of 1N NaOH Added (mM)	pH of the Solution
15 ml	0	6.21
15 ml	15 μ l (1 mM)	6.38
15 ml	30 μ l (2 mM)	6.48
15 ml	60 μ l (4 mM)	6.68
15 ml	150 μ l (10 mM)	7.11
15 ml	750 μ l (50 mM)	12.17

- 20 **Example 8.** Quantification of the glycolipid component using HPLC.

The following methodology was used in the HPLC analysis of Bay 15-5831®. The HPLC parameters described in the **Table 11** were used.

Table 11. Summary of parameters used in HPLC method for quantifying Bay 15-5381.

Parameter	Details
Column	Hamilton PRP-1, 7 micron, 250 x 4.6 mm
Flow	1.5 ml/min
Injection Volume	10 μ l
Detector Wavelength	210 nm
Mobile Phase A	0.4% perchloric acid, v:v
Mobile Phase B	Acetonitrile
Gradient	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
Run time	65 min
Bay 15-5381 retention time	Approximately 25 minutes

Table 12. Standards of Bay 15-5831®.

Standard	Concentration
1	0.103 mM
2	0.206 mM
3	0.412 mM
4	0.618 mM
5	0.824 mM
6	1.03 mM

Standards in the range of 0.10 to 1.03 mM were prepared and injected into an HPLC.

5 A summary of the standards is shown in Table 12. Samples were warmed to room temperature and inverted 5 times before using. One ml of sample was added to 6 ml of methanol in a 10 ml volumetric flask. Samples were then sonicated for 10 minutes and then diluted to volume and mixed. Linear regression was performed on the standards with peak areas plotted against concentration. The samples were then calculated against the curve.

10 **Example 9.** Thirty (30) liter scale production. A 30 Liter batch of Glycolipid Adjuvant Solution with a composition as described in Example 6 was prepared. This batch contained 15 mM NaCl.

Using this 30 L preparation, five different sub-solutions were prepared with increasing concentration of NaOH. The NaOH concentration increased from 0 mM to 1mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM, and 12mM. The sample for each NaOH concentration was aliquoted for pH measurement and visual observation. With increasing amounts of NaOH, the pH of the glycolipid adjuvant increased along with increased flocculation. The flocculation started to appear at 2 mM NaOH concentration at room temperature, and at 4 °C, the flocculation started to appear at 4 mM NaOH.

20 **Table 13.** Characteristics of 30-L batch glycolipid adjuvant with increasing concentration of NaOH.

Sample No.	Description	Measured Concentration (mM)	O.D. at 600 nM	pH
30-L Sample 1	15 mM NaCl, 0 mM NaOH	6.21	0.218	6.42
30-L Sample 2	15 mM NaCl, 1 mM NaOH	6.3	0.137	6.52

30-L Sample 3	15 mM NaCl, 2 mM NaOH	6.24	0.137	6.59
30-L Sample 4	15 mM NaCl, 4 mM NaOH	6.17	0.15	6.80
30-L Sample 5	15 mM NaCl, 8 mM NaOH	6.26	0.129	7.06
30-L Sample 6	15 mM NaCl, 12 mM NaOH	6.15	0.062	7.54

The amount of Bay 15-5381 in all the six samples shown in the Table 13 was quantified using HPLC method described in Example 8. The samples with varying pH showed the same concentration of Bay 15-5381 suggesting that the adjuvant component is not degraded during the pH increase with the addition of NaOH and accompanying flocculation.

Example 10. Stability evaluations using accelerated stress testing. This example describes the methods and results of accelerated stress testing on the **Glycolipid Adjuvant Solution**. Three batches of **Glycolipid Adjuvant Solutions** as described in Example 6 were prepared at the 500 L scale. All three batches had 15 mM NaCl and contained no NaOH. The **Glycolipid Adjuvant Solutions** from these three 500 L batches were used for studying the stability of the glycolipid using an accelerated stability testing.

For accelerated stress testing, the **Glycolipid Adjuvant Solution** was subjected to shaking for seven days at 37°C, followed by shaking at 4°C for two days. The seven days of shaking at 37°C represents aging at 4°C for a year. The shaking at 4°C for two days represents stress during transportation.

One set of **Glycolipid Adjuvant Solution** was kept static at 37 °C for 7 days, then shaken at 100 rpm at 4 °C for an additional 2 days. At four time points, i.e. T=0, 3, 7, and 9 days, observation and photo picture were recorded. At 2 time points, i.e. T=0 and 9 days, Refractive Index and particle size analysis were then performed.

The second set of **Glycolipid Adjuvant Solution** was shaken at 100 rpm at 37°C for 7 days; then shaken at 100 rpm at 4°C for an additional 2 days. At four time points, i.e. T=0, 3, 7, and 9 days, observation and photo picture were recorded. At 2 time points, i.e. T=0 and 9 days, Refractive Index and particle size analysis were then performed.

The third set of **Glycolipid Adjuvant Solution** was static at 4 °C for 9 days as control. At four time points, i.e. T=0, 3, 7, and 9 days, observation and photo picture were recorded. At 2 time points, i.e. T=0 and 9 days, Refractive Index and particle size analysis were then performed.

There was no change in the particle size as the result of stress testing. All the samples maintained sub-micron particle size as observed in the samples immediately after it was prepared. Moreover, a HPLC measurement of Bay 15-5831® component in the samples kept at 4°C or subjected to stress at 37°C for seven days did not show any change in the amount of Bay 15-5831®.

Table 15. Quantification of Bay 15-5831® after stress testing.

Batch number of the Glycolipid Adjuvant Solution and treatment	Measured concentration (mM)
Batch 1 - 4°C	6.23
Batch 1 - 37°C Shaking	6.29
Batch 2 - 4°C	6.32
Batch 2 - 37°C Shaking	6.30
Batch 3 - 4°C	6.28
Batch 3 - 37°C Shaking	6.29

In Table 15, the control samples were kept at 4°C for seven days, while the test samples were shaken at 37°C for seven days. The samples shaken at 37°C for seven days have concentrations similar to those stored at 4°C.

Example 11. Viricidal testing of the Glycolipid Adjuvant Solution.

Viricidal testing was conducted on the **Glycolipid Adjuvant Solution** prepared in a 30L scale as described above in **Example 9**. This **Glycolipid Adjuvant Solution** contained 15mM NaCl and no NaOH.

The **glycolipid adjuvant** was tested for its suitability to use it as a diluent with modified live viruses. Modified live viral antigens are prepared as freeze dried plugs. Upon rehydration of these plugs with suitable **Glycolipid Adjuvant Solution**, it was confirmed that the **Glycolipid Adjuvant Solution** used does not kill the modified live viruses. The **Glycolipid Adjuvant Solution** was tested against three bovine viral antigens: Bovine Respiratory Syncytial virus (BRSV), Para-influenza Virus 3 (PI3), and Infectious Bovine Rhinotrachetis (IBR) virus.

Viral plugs were rehydrated using the **Glycolipid Adjuvant Solution**. After incubation at room temperature (RT) for 1 hour, the samples were plated on a monolayer of a permissive cell line with a serial dilution. By counting the number of viral plugs that appear on the monolayer, the 50% tissue culture infective dose per ml (TCID₅₀/ml) value was obtained for each viral antigen rehydrated with sterile water or **Glycolipid Adjuvant Solution**. In this assay, a decrease in the titer of 0.7 after rehydrating with the test **Glycolipid Adjuvant Solution** was treated as viricidal.

The results are presented in **Table 16**. **Glycolipid Adjuvant Solution** did not show any viricidal effect on these three bovine viruses.

Table 16. Viricidal assay for **Glycolipid Adjuvant Solution**.

Virus	Original titer	Final titer with Glycolipid adjuvant	Final titer with sterile water	Loss in the titer
tsIBR	7.3 ± 0.5	7.08	7.49	0.42

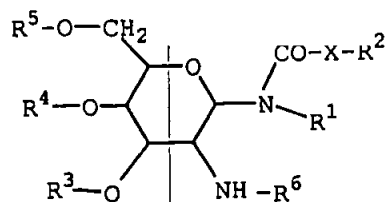
051404				
tsPI3	7.6 ± 0.5	7.74	7.49	-0.25
052604				
BRSV	6.4 ± 0.5	6.57	6.82	0.25
081103				

This example shows the **Glycolipid Adjuvant** Solution may be used in a commercial formulation of an Animal Health vaccine. Rispoval® contains three different bovine viral diseases using 3 modified live viral antigens. These bovine viral antigens are modified live bovine herpes virus, modified live bovine respiratory syncytial virus, and modified live parainfluenza virus 3. These viral antigens are produced as a lyophilized cakes and the **Glycolipid Adjuvant** Solution produced by this invention can be used as diluent solution for these antigens. The glycolipid used was N-(2-deoxy-2-L-leucylamino-β-D-glucopyranosyl)-N-octadecyldodecanamide acetate.

The examples are presented to illustrate the invention. They should not be taken as limiting the scope of the invention. Many changes, variations, modifications, and other uses and applications of this invention will be apparent to those skilled in the art.

What is claimed is:

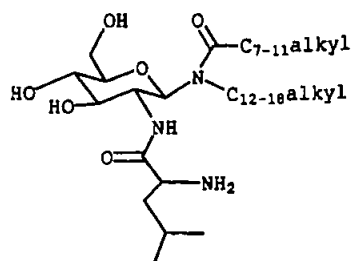
1. A composition comprising:
 - a) a glycolipid of Formula I;
- 5 wherein Formula I is



wherein

- R^1 and R^2 are independently hydrogen, or a saturated alkyl radical having up to 20 carbon atoms;
- 10 X is $-CH_2-$, $-O-$ or $-NH-$;
- R^2 is hydrogen, or a saturated or unsaturated alkyl radical having up to 20 carbon atoms;
- R^3 , R^4 , and R^5 are independently hydrogen, $-SO_4^{2-}$, $-PO_4^{2-}$, $-COC_{1-10}$ alkyl;
- 15 R^6 is L-alanyl, L-alpha-aminobutyl, L-arginyl, L-asparaginyl, L-aspartyl, L-cysteinyl, L-glutamyl, L-glycyl, L-histidyl, L-hydroxypropyl, L-isoleucyl, L-leucyl, L-lysyl, L-methionyl, L-ornithinyl, L-phenylalanyl, L-prolyl, L-seryl, L-threonyl, L-tyrosyl, L-tryptophanyl, and L-valyl or their D-isomers;
- in a salt form, where the salt form is derived from a weak acid,
- 20 b) an alcohol, wherein the alcohol is $HO-C_{1-3}$ alkyl;
- c) a weak acid, wherein the weak acid is, 1) in molar excess with reference to the glycolipid content, and 2) any acid having a pK_a (the $-\log$ of the K_a) value of between 1.0 and 9.5 using standard tables or values;
- 25 d) a non-ionic surfactant, where the non-ionic surfactant is an agent that reduces the surface tension of the material it is dissolved in and has a component that is hydrophobic and another component that is hydrophilic.

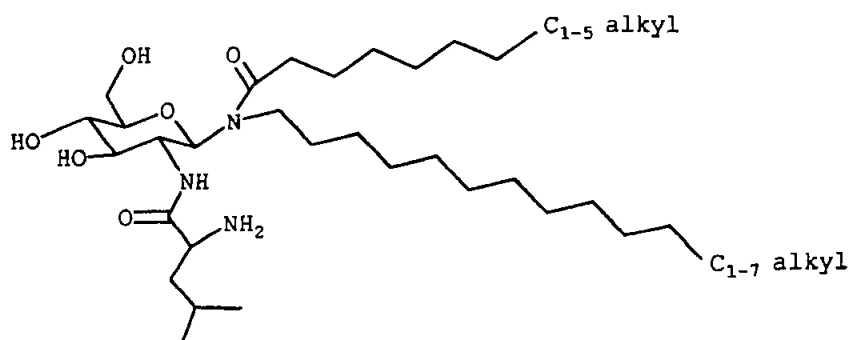
2. A composition of claim 1 wherein the glycolipid is a compound of Formula II(a)



Formula II(a)

- and the weak acid is selected from one or any combination of the following weak acids, acetic acid, H(C₂H₃O₂) (pKa 4.76); ascorbic acid(1), H₂(C₆H₆O₆) (pKa 4.10); acetylsalicylic acid, H₂(C₉O₄), (pKa 3.5); butanoic acid H(C₄H₇O₂) (pKa 4.83); carbonic acid, form 1, H₂CO₃, (pKa 4.83); chromic acid, form 2, HCrO₄⁻ (pKa 6.49); citric acid form 1, H₃(C₆H₅O₇), (pKa 3.14); citric acid form 2, H₂C₆H₅O₇⁻, (pKa 4.77); citric acid form 3, (HC₆H₅O₇)⁻, (pKa 6.39); formic acid, H(CHO₂), (pKa 3.75); fumaric acid, H₂(C₄O₄) (pKa 3.03); heptanoic acid, H(C₇H₁₃O₂), (pKa 4.89); hexanoic acid, H(C₆H₁₁O₂), (pKa 4.84); hydrofluoric acid, HF, (pKa 3.20); isocitrate, H₃(C₆O₇) (pKa 3.29); lactic acid, H(C₃H₅O₃), (pKa 3.08); maleic acid, H₂(C₄O₄) (pKa 1.83); nicotinic acid, H₂(C₆NO₂) (pKa 3.39); oxalic acid form 1, H₂(C₂O₄), (pKa 1.23); oxalic acid form 2, (HC₂O₄)⁻, (pKa 4.19); pentanoic acid, H(C₅H₉O₂), (pKa 4.84); phosphoric acid form 1, H₃PO₄, (pKa 2.16); propanoic acid, H(C₃H₅O₂), (pKa 4.86); pyruvic acid, H₂(C₃O₃) (pKa 2.39); succinic acid H₂(C₄O₄) (pKa 4.19) and trichloroacetic acid, H(C₂Cl₃O₂) (pKa 0.70).

3. A composition of claim 2, wherein the glycolipid is a compound of Formula II (b)



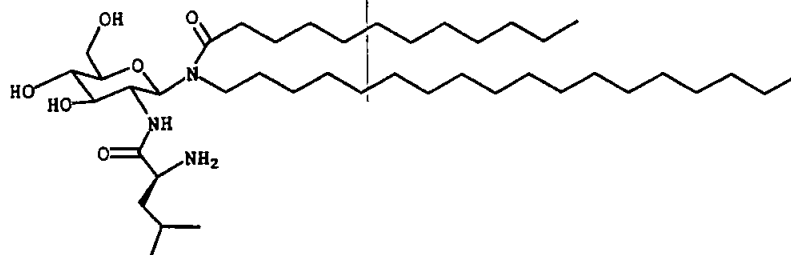
Formula II (b)

and

- the weak acid is selected from one or any combination of the following weak acids: Acetic acid, acetylsalicylic acid; citric acid; formic acid; fumaric acid; hydrofluoric acid;

isocitrate; maleic acid; nicotinic acid; phosphoric acid; pyruvic acid; succinic acid and trichloroacetic acid.

4. A composition of claim 3, wherein the glycolipid is N-(2-deoxy-2-L-leucylamino- β -D-glucopyranosyl)-N-octadecyldodecanamide acetate, having a structure of Formula III:



Formula III

and the weak acid is acetic acid.

5. A composition of claim 2, where the weak acid is selected from the group consisting of: acetic acid; acetylsalicylic acid; citric acid form 1; citric acid form 2; citric acid form 3; formic acid; fumaric acid; hydrofluoric acid; isocitrate; maleic acid; nicotinic acid; phosphoric acid form 1; pyruvic acid, succinic acid, and trichloroacetic acid.

6. A composition of any of claims 1-5, where said weak acid is in an amount that is greater than the molar equivalent of the glycolipid, or is in an amount of the following times greater than the molar equivalent of the glycolipid;

- a) 1.25 times greater,
- b) 2.0 times greater,
- c) 2.5 times greater,
- d) 2.7 times greater,
- e) 3.0 times greater,
- f) 5.0 times greater,

than the molar equivalent amount of the glycolipid.

7. A composition of any of claims 1-6, wherein the alcohol is ethyl alcohol.

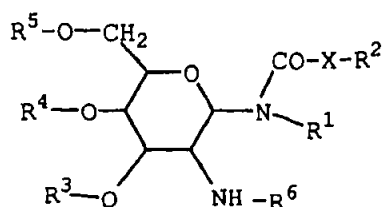
8. A composition of any of claims 1-7, wherein said non-ionic surfactant is selected from any one or a combination of the group consisting of: Sorbitan monolaurate, Sorbitane monopalmitate, Sorbitane monostearate, Sorbitane tristearate, Sorbitane monooleate, Sorbitane trioleate, Polyoxyethylensorbitan monolaurate, Polyoxyethylensorbitan monopalmitate, Polyoxyethylensorbitan monostearate, Polyoxyethylensorbitan monooleate,

Polyoxyethylensorbitan trioleate, and other sorbitans and polyoxyethylene sorbitans commonly used in vaccines.

9. A composition comprising:

5 a) a glycolipid of Formula I;

wherein Formula I is



wherein

10 R^1 and R^2 are independently hydrogen, or a saturated alkyl radical having up to 20 carbon atoms;

X is $-CH_2-$, $-O-$ or $-NH-$;

R^3 , R^4 , and R^5 are independently hydrogen, $-SO_4^{2-}$, $-PO_4^{2-}$, $-COC_{1-10}alkyl$;

15 R^6 is L-alanyl, L-alpha-aminobutyl, L-arginyl, L-asparaginyl, L-aspartyl, L-cysteinyl, L-glutamyl, L-glycyl, L-histidyl, L-hydroxypropyl, L-isoleucyl, L-leucyl, L-lysyl, L-methionyl, L-ornithinyl, L-phenylalanyl, L-prolyl, L-seryl, L-threonyl, L-tyrosyl, L-tryptophanyl, and L-valyl or their D-isomers;

in a salt form, where the salt form is derived from a weak acid,

b) an alcohol, wherein the alcohol is $HO-C_{1-3} alkyl$;

20 c) a weak acid, wherein the weak acid is 1) in molar excess with reference to the glycolipid content, and 2) any acid having a pK_a (the $-\log$ of the K_a) values of between about 1.0 and about 9.5 using standard tables or values;

d) a non-ionic surfactant, where the non-ionic surfactant is an agent that reduces the surface tension of the material it is dissolved in and has a component that is hydrophobic and another component that is hydrophilic; and

25 e) an aqueous buffer, wherein the suitable buffer is suitable for vaccine use and can maintain the pH of the other ingredients within a pH range of about 6 to about 8, with the proviso that not more than 50 mM NaCl is used.

30 10. A composition of claim 9, where the pH of the solution is adjusted to a relatively constant pH in an aqueous solution of between about 6 and about 7, and the buffer is selected from the group consisting of phosphate buffers having either or both monobasic and dibasic salts of sodium phosphate and/or potassium phosphate at the same or different proportions.

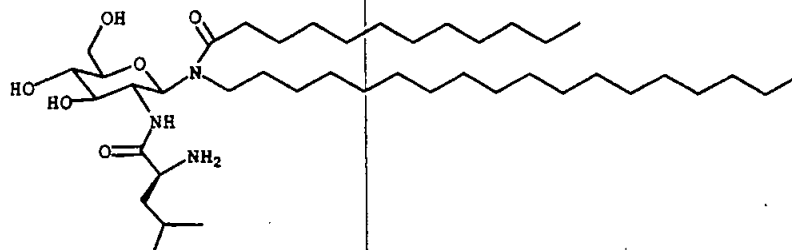
11. A composition of claim 9, where said buffer is selected from the group of:

- a) 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (also known as MES);
 b) 3-N-morpholino) propanesulfonic acid (also known as MOPS);
 c) n- [tris (hydroxymethyl)-2-aminoethanesulfonic acid (also known as TES);
 d) 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (also known as HEPES); and
 e) [tris (hydroxymethyl) methyl]glycine (also TRIS);
 or any combination thereof.

12. A composition of any of claims 1-11 further comprising an antigen selected from the group, or any combination thereof, consisting of modified live bovine herpes virus, modified live bovine respiratory syncytial virus, and modified live parainfluenza virus 3.

13. A composition comprising:

a) N-(2-deoxy-2-L-leucylamino- β -D-glucopyranosyl)-N- octadecyldodecanamide acetate, having a structure of Formula III:



Formula III

- b) ethanol;
 c) acetic acid;
 d) non-ionic surfactant, selected from; Sorbitan monolaurate, Sorbitane monopalmitate, Sorbitane monostearate, Sorbitane tristearate, Sorbitane monooleate, Sorbitane trioleate, Polyoxyethylensorbitan monolaurate, Polyoxyethylensorbitan monopalmitate, Polyoxyethylensorbitan monostearate, Polyoxyethylensorbitan monooleate, Polyoxyethylensorbitan trioleate,
 e) an aqueous buffer, where the pH of the solution is adjusted to a relatively constant pH in an aqueous buffered solution of between about 6 and about 7, and the buffer is selected from the group of;
 a) 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (also known as MES),
 b) 3-N-morpholino) propanesulfonic acid (also known as MOPS),
 c) n- [tris (hydroxymethyl)-2-aminoethanesulfonic acid (also known as TES),
 d) 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (also known as HEPES), and

- e) [tris (hydroxymethyl) methyl]glycine (also TRIS),
or any combination thereof,
with the proviso that not more than 15 mM NaCl is used and;
f) an antigen consisting essentially of modified live bovine herpes virus, modified
5 live bovine respiratory syncytial virus, and modified live parainfluenza virus 3.

14. A process for the preparation of a composition, comprising mixing together the following:

- A) a glycolipid of Formula I;
10 B) an alcohol, wherein the alcohol is HO-C₁₋₃ alkyl;
C) a weak acid, wherein the amount of weak acid is in molar excess with reference to the glycolipid content; and
D) a non-ionic surfactant.

15 15. A process for the preparation of a composition, comprising mixing together the following:

- A) a glycolipid of Formula I;
B) an alcohol, wherein the alcohol is HO-C₁₋₃ alkyl;
C) a weak acid, wherein the amount of weak acid is in molar excess with reference to
20 the glycolipid content;
D) a non-ionic surfactant; and then adding,
E) a suitable buffer.

NUEVAS COMPOSICIONES COADYUVANTES GLICOLIPÍDICAS

CAMPO DE LA INVENCION

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

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

El primer coadyuvante reseñado en la bibliografía fue el coadyuvante
completo de Freund (FCA). El FCA contiene una emulsión de agua en aceite y
extractos de micobacterias. Los extractos de micobacterias proporcionan
25 moléculas inmunoestimulantes en forma bruta. La emulsión de agua en aceite
actúa creando un efecto de depósito donde los antígenos se liberan
lentamente. Desgraciadamente, el FCA es poco tolerado y puede causar

inflamación incontrolada. Desde el descubrimiento del FCA hace 80 años, se han hecho esfuerzos para reducir los efectos secundarios indeseados de los coadyuvantes.

Son ahora conocidos análogos glicolipídicos que comprenden una
5 nueva clase de compuestos que tienen propiedades coadyuvantes. La patente de EE.UU. nº 4.855.283 (en adelante en la presente memoria 283) da a conocer la síntesis de análogos glicolipídicos, incluyendo *N*-glicosilamidas, *N*-glicosilureas, carbamatos de *N*-glicosilo y, específicamente: acetato de *N*-(2-desoxi-2-*L*-leucilamino- β -*D*-glucopiranosil)-*N*-octadecildodecanamida
10 (conocido como Bay R1005, O. Lockhoff, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., (1991) 30: 1611-1620). Los compuestos descritos en la patente 283 son particularmente adecuados para uso como coadyuvantes.

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

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

SUMARIO DE LA INVENCION

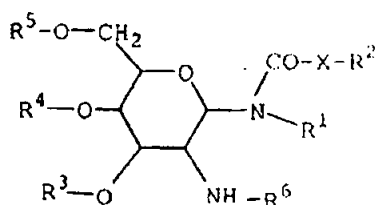
Esta invención comprende la composición y el procedimiento de

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

Estas dos soluciones se ejemplifican con más detalle a continuación:

La solución madre de glicosilamida es una composición que comprende:

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



en la que

R^1 es hidrógeno o radical alquilo saturado que tiene hasta 20 átomos de carbono;

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

R^2 es hidrógeno o radical alquilo saturado que tiene hasta 20 átomos de carbono;

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

10 R^6 es L-alanilo, L-alfa-aminobutilo, L-arginilo, L-asparginilo, L-aspartilo, L-cisteinilo, L-glutamilo, L-glicilo, L-histidilo, L-hidroxipropilo, L-isoleucilo, L-leucilo, L-lisilo, L-metionilo, L-ornitino, L-fenilalanilo, L-prolilo, L-serilo, L-treonilo, L-tirosilo, L-triptofanilo y L-valilo o sus isómeros D;

en una forma de sal, en la que la forma de sal deriva de un ácido débil;

15 b) un alcohol, en el que el alcohol es $\text{HO}-$ alquilo C_{1-3} ;

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

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

La solución coadyuvante glicolípídica es una composición que comprende:

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

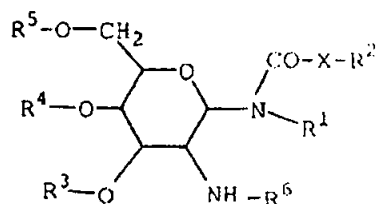
A menos que se indique otra cosa, los siguientes términos utilizados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones tienen los significados dados a continuación.

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

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

- 15 El término "glicolípidos" designa los compuestos de fórmula I siguientes. Estos compuestos se describen en la patente de EE.UU. 6.290.971 y la patente de EE.UU. nº 4.855.283, expedida el 8 de agosto de 1989. Tanto la patente de EE.UU. 6.290.971 como la patente de EE.UU. nº 4.855.283 se incorporan a la presente como referencia en su totalidad. Un
- 20 glicolípido descrito en particular aquí, cuando está en su forma acetato, tiene el nombre comercial Bay R1005® y el nombre químico "acetato de N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-β-D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanamida". La forma amida de este compuesto tiene el nombre comercial Bay 15-1583® y el nombre químico "N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-β-D-glucopiranosil)-N-
- 25 octadecildodecanamida.

Los glicolípidos de fórmula I son:



Fórmula I

en la que

R^1 es hidrógeno o radical alquilo saturado que tiene hasta 20 átomos
5 de carbono;

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

R^2 es hidrógeno o radical alquilo saturado que tiene hasta 20 átomos
de carbono;

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

R^6 es L-alanilo, L-alfa-aminobutilo, L-arginilo, L-asparginilo, L-aspartilo,
L-cisteinilo, L-glutamilo, L-glicilo, L-histidilo, L-hidroxipropilo, L-isoleucilo, L-
leucilo, L-lisilo, L-metionilo, L-ornitino, L-fenilalanilo, L-prolilo, L-serilo, L-
treonilo, L-tirosilo, L-triptofanilo y L-valilo o sus isómeros D;

15 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

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

R^1 es hidrógeno o alquilo C_{12-18} saturado;

R^2 es hidrógeno o alquilo C_{7-11} saturado;

20 X es $-\text{CH}_2-$;

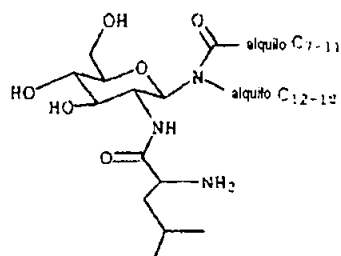
R^4 y R^5 son independientemente hidrógeno;

R^6 se selecciona de L-leucilo.

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

memoria.

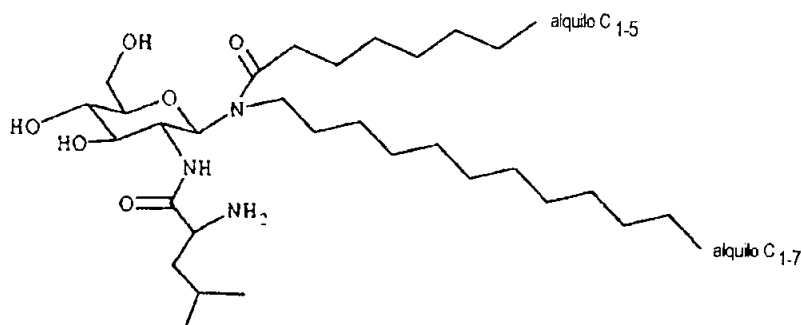
En otra realización, los glicolípidos son aquellos descritos por la fórmula II(a):



5

Fórmula II(a)

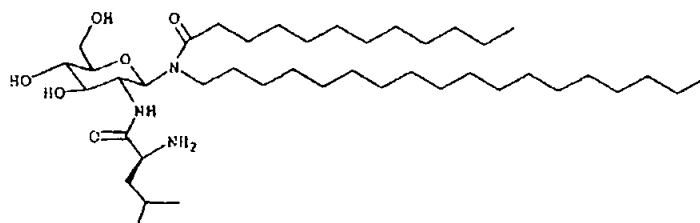
En otra realización, los glicolípidos son aquellos descritos por la fórmula II(b):



Fórmula II(b)

10

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



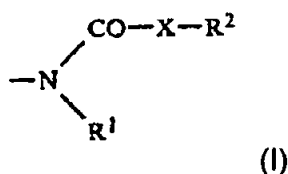
Fórmula III

Un compuesto de fórmula III puede existir en forma amida o forma

acetato. La forma amida de este compuesto tiene el nombre comercial Bay 15-1583®. La forma acetato tiene el nombre comercial Bay R1005®.

Los glicolípidos de fórmula I pueden prepararse utilizando los siguientes procedimientos, tomados de la patente de EE.UU. nº 4.855.283.

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



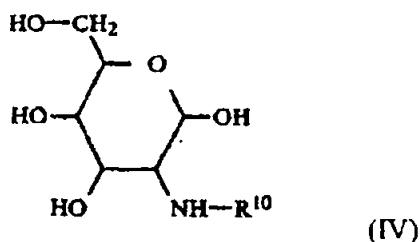
- 10 con los significados citados anteriormente para R^1 , R^2 y X.

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

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

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

amino,



en la que R^{10} representa un grupo protector para la protección de grupos amino, que es conocido por la síntesis de péptidos y puede eliminarse selectivamente, cuando sea apropiado.

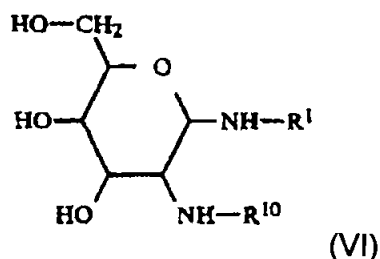
Son ejemplos de grupos protectores adecuados grupos acilo tales como trifluoroacetilo o tricloroacetilo, o-nitrofenilsulfenilo, 2,4-dinitrofenilsulfenilo o grupos alcóxicarbonilo inferior opcionalmente sustituidos tales como grupos metóxicarbonilo, *terc*-butilóxicarbonilo, bencilóxicarbonilo, p-metoxibencilóxicarbonilo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

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



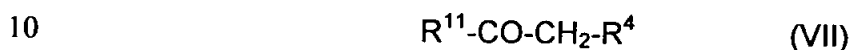
en las que R^1 tiene el significado dado anteriormente, proporcionando

glicosilaminas (fórmula VI)

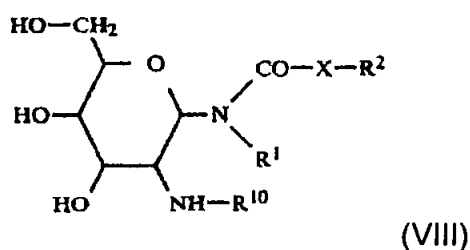


Las preparaciones de glicosilamina de este tipo son conocidas en principio (Ellis, Advances in Carbohydrate Chemistry 10, 95, (1955)) y se describen específicamente en la DE-OS (memoria descriptiva alemana publicada) nº 3.213.650.

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



teniendo R² el significado anteriormente citado y representando R¹¹ halógeno tal como, por ejemplo, cloro, o representando -O-CO-R², con el significado anteriormente citado para R², o representando -O-CO-O-alquilo inferior. De este modo, se obtienen glicosilamidas (fórmula VIII)



en las que R¹ y R² tienen los significados citados anteriormente, y R¹⁰ es igual que R⁶ y X representa -CH₂-. Las condiciones para N-acilaciones de este tipo se indican en la DE-OS (memoria descriptiva alemana publicada) nº 3.213.650.

En una realización preferida, las glicosilaminas de fórmula VI se hacen

reaccionar con uno a dos equivalentes de un cloruro de carbonilo (fórmula VII) o con uno a dos equivalentes de un anhídrido mixto que se ha obtenido a partir del ácido carboxílico relevante $R^2-CH_2-CO_2H$ y cloroformiato de etilo o cloroformiato de isobutilo, en presencia de una base orgánica auxiliar,
 5 mediante procedimientos conocidos en la bibliografía, proporcionando la glicosilamida de fórmula VIII con $X = -CH_2-$.

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

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



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

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

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

X)



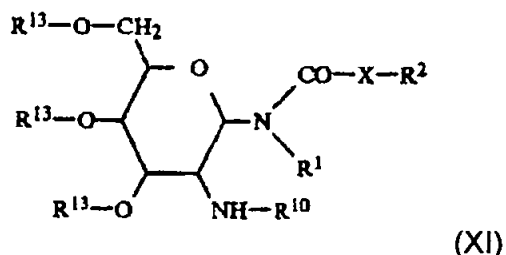
teniendo R^2 el significado anteriormente citado, se obtienen glicosilureas de fórmula VIII, y X es $-NH-$. Esta reacción de acilación, como las reacciones
5 anteriormente citadas, se lleva a cabo preferiblemente en disolventes orgánicos, estando las temperaturas de reacción entre -20 y $60^{\circ}C$,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

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

15 En muchos casos, es también ventajoso llevar a cabo, en paralelo o en lugar de las etapas de purificación anteriormente citadas, una derivatización química que conduce a un derivado de las glicosilamidas, carbamatos de glicosilo y glicosilureas de fórmula VIII que tiene buenas propiedades de cristalización. Las derivatizaciones químicas de este tipo son, en el caso de
20 las glicosilamidas, carbamatos de glicosilo y glicosilureas según la invención, por ejemplo, reacciones de esterificación en los grupos hidroxilo de los residuos de azúcar. Son ejemplos de grupos éster adecuados grupos acetilo, benzoílo o p-nitrobenzoílo.

Para preparar derivados de tri-O-acilo de las glicosilamidas,
25 glicosilureas o carbamatos de glicosilo, se hacen reaccionar los correspondientes trioles (fórmula VIII) con agente acilantes en presencia de bases auxiliares inorgánicas u orgánicas. Son agentes acilantes adecuados

cloruros de ácido tales como cloruro de acetilo, cloruro de benzoilo o cloruro de p-nitrobencilo, o anhídridos tales como, por ejemplo, anhídrido acético. Esto da como resultado la formación de ésteres según la fórmula XI



- 5 teniendo R^1 , R^2 , R^{10} y X los significados dados anteriormente, y representando R^{13} acetilo, benzoilo o p-nitrobenzoilo.

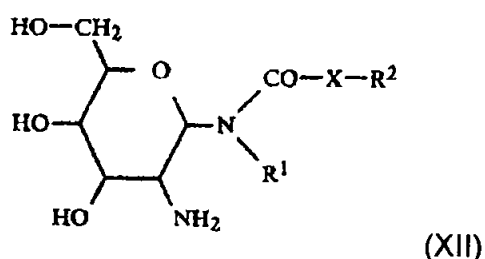
Las reacciones de O-acilación se llevan a cabo preferiblemente en disolventes orgánicos inertes. Aquellos que pueden utilizarse son hidrocarburos halogenados tales como diclorometano, triclorometano o 1,2-
10 dicloroetano, éteres tales como tetrahidrofurano o 1,4-dioxano, ésteres tales como acetato de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

Es también posible que estén indicadas como disolventes adecuados bases orgánicas solas tales como trietilamina o piridina. Las bases que pueden utilizarse son todas las bases utilizadas en la química orgánica para
15 O-acilaciones. Preferiblemente, se utilizan trietilamina, piridina o la mezcla piridina/4-dimetilaminopiridina. Los triésteres (fórmula XI) pueden cristalizarse fácilmente a partir de disolventes orgánicos. Se prefieren particularmente para la cristalización los disolventes polares tales como alcoholes de cadena corta, es decir, metanol, etanol, n-propanol o isopropanol. Otros disolventes
20 adecuados para la cristalización de los triésteres (fórmula XI) son mezclas de disolventes orgánicos con disolventes inorgánicos u orgánicos polares, por ejemplo, tetrahidrofurano-metanol, tetrahidrofurano-agua, etanol-agua e isopropanol-agua. Los triésteres (fórmula XI) que se han purificado mediante

recristalización única o, cuando sea apropiado, múltiple, se vuelven a transformar en trioles (fórmula VIII) mediante hidrólisis o transesterificación de los tres grupos O-acetilo. Son conocidos una multiplicidad de tipos de escisión de éster en la química orgánica. Para la preparación de trioles (fórmula VIII) a partir de los triésteres (fórmula XI) citados, puede hacerse la transesterificación de los grupos acilo en presencia de metanol y cantidades catalíticas de metanolato de sodio, que es conocido como hidrólisis Zemplén en química orgánica.

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

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



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

Son ejemplos de catalizadores adecuados para la hidrogenólisis

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

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



teniendo R^7 el significado citado anteriormente,

representando R^8 hidrógeno o metilo, y

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

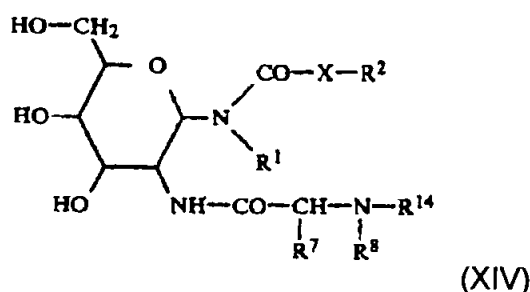
Los grupos protectores para el grupo amino en la fórmula XIII que se utilizan preferiblemente son los anteriormente citados, y se prefieren particularmente los grupos benciloxycarbonilo o *tert*-butiloxycarbonilo. El
 10 ligamiento de la 2-amino-2-desoxiglicosilamida, carbamato de 2-amino-2-desoxiglicosilo o 2-amino-2-desoxiglicosilurea de fórmula XII con un derivado de aminoácido de fórmula XIII puede llevarse a cabo mediante procedimientos convencionales de síntesis peptídica (E. Wunsch *et al.*: "Synthese von Peptiden (Synthesis of peptides)" en "Methoden der Org. Chemie (Methods of
 15 Org. Chemistry)" (Houben-Weyl) (E. Muller, editor), vol. XV/1 y XV/2, 4ª edición, publicado por Thieme, Stuttgart (1974).

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

La condensación de los compuestos de fórmula XII con los de fórmula XIII puede llevarse a cabo también cuando se activa el grupo carboxilo. Es un grupo carboxilo activado posible, por ejemplo, un anhídrido de ácido, preferiblemente un anhídrido mixto tal como un acetato de ácido o una amida
 25 de ácido tal como una imidazolidina, o un éster activado. Son ejemplos de

ésteres activados ésteres cianometílicos, ésteres pentaclorofenílicos y ésteres de *N*-hidroxiftalimida. Los ésteres activados pueden obtenerse también a partir de ácido (fórmula XIII) y *N*-hidroxisuccinimida o 1-hidroxibenzotiazol en presencia de un agente deshidratante tal como carbodiimida. Los derivados

5 de aminoácidos son conocidos y pueden prepararse de manera conocida. La condensación del compuesto amino de fórmula XII con los compuestos de carboxilo opcionalmente activados de fórmula XIII proporciona los peptidoglicolípidos de fórmula XIV



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

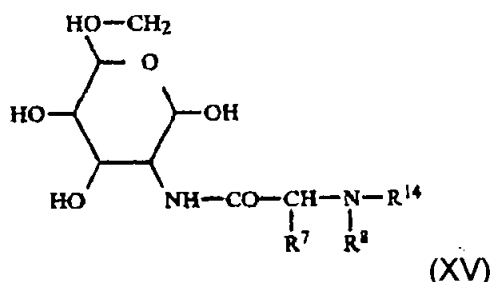
En una etapa de procedimiento final para la preparación de los compuestos según la fórmula I, se elimina el grupo protector R^{14} de los compuestos de fórmula XIV. Ha de tenerse cuidado durante esta etapa de que no se escindan los otros grupos amida, uretano o urea presentes en los

15 compuestos de fórmula XIV. Los grupos protectores R^{14} que se utilizan preferiblemente en los compuestos de fórmula XIV, el grupo *N*-carbobenzoxi y el grupo *N*-*tert*-butiloxicarbonilo, pueden eliminarse reteniendo el grupo amida, uretano o urea. El grupo carbobenzoxi puede eliminarse selectivamente mediante hidrogenólisis en presencia de un metal noble tal

20 como, por ejemplo, paladio sobre carbono en un disolvente adecuado tal como etanol, metanol, ácido acético glacial o tetrahidrofurano. Los disolventes pueden utilizarse en forma del disolvente puro o combinados entre sí o con

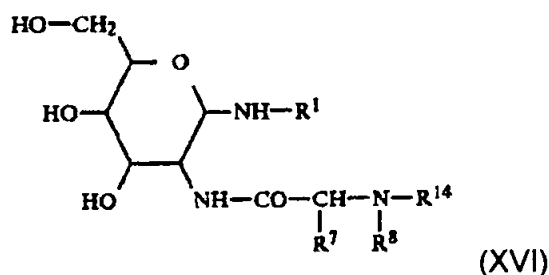
agua. La reacción puede llevarse a cabo a presión atmosférica o a presión elevada. El grupo *terc*-butiloxycarbonilo R^{14} en los compuestos de fórmula XIV puede eliminarse mediante procedimientos acidolíticos. Los ejemplos de condiciones adecuadas son el uso de cloruro de hidrógeno en disolventes adecuados tales como, por ejemplo, ácido acético glacial, dietiléter, dioxano o acetato de etilo, a temperatura ambiente. Los procedimientos de este tipo para la escisión de los carbamatos de *terc*-butilo son conocidos en principio. Las peptidoglicosilamidas, carbamatos de peptidoglicosilo y peptidoglicosilureas de fórmula I que se obtienen de esta manera se aíslan en forma de sólidos cristalinos o amorfos, mediante procedimientos conocidos *per se* y, si es necesario, se purifican mediante procedimientos estándar tales como recristalización, cromatografía, extracción, etc.

Los compuestos según la invención de fórmula I pueden prepararse también mediante una segunda ruta sintética con resultados similarmente buenos. Esta segunda ruta sintética difiere de la primera, que se describe anteriormente, en que es diferente la secuencia de ligamiento de los sintones aminoácido de aminoazúcar, amina R^1-NH_2 y ácido carboxílico $R^2-CH_2-CO_2-H$, o derivado de ácido carbónico $R_2-O-CO-halógeno$, o R^2-NCO , con los significados anteriormente citados de R^1 y R^2 . En esta segunda ruta, se utilizan como componente de partida 2-*N*-(aminoacil)aminoazúcares adecuados de fórmula XV



con el significado anteriormente citado para R^7 y R^8 y, en la que R^{14}

representa un grupo protector de amino conocido en la química de péptidos, preferiblemente el grupo benciloxycarbonilo o *terc*-butiloxycarbonilo. Los compuestos de fórmula XV que se obtienen así se condensan después con los compuestos amino de fórmula III, proporcionando glicosilaminas de
 5 fórmula general XVI

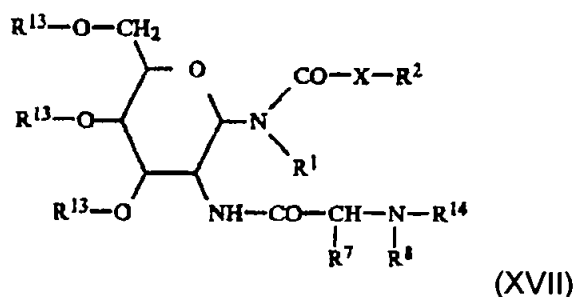


teniendo R^1 , R^7 , R^8 y R^{14} significados consistentes con la fórmula I y la definición de R^6 .

Todos los procedimientos descritos anteriormente para la preparación de los compuestos de fórmula general VI pueden utilizarse para la preparación de los compuestos de fórmula general XVI. Se hacen reaccionar después los compuestos de fórmula XVI con los derivados de ácido carboxílico anteriormente citados (fórmula VII) o con ésteres halogenofórmicos (fórmula IX) o con isocianatos orgánicos (fórmula X), proporcionando las 2-
 10 (aminoacil)aminoglicosilamidas de fórmula XIV (con $\text{X} = -\text{CH}_2-$) o los carbamatos de 2-(aminoacil)aminoglicosilo de fórmula XIV (con $\text{X} = -\text{O-}$) o las 2-(aminoacil)aminoglicosilureas de fórmula XIV (con $\text{X} = -\text{NH-}$). Estas reacciones de acilación pueden llevarse a cabo generalmente mediante los procedimientos descritos anteriormente para la reacción de glicosilaminas con
 15 derivados de ácido carboxílico o carbónico.

Los intermedios (fórmula XIV) que se obtienen de este modo pueden purificarse mediante el procedimiento de purificación física anteriormente citado. Sin embargo, es preferible convertir los compuestos de fórmula XIV,

mediante los procedimientos de O-acilación descritos anteriormente, en los tri-O-acetatos o los tri-O-benzoatos de fórmula general XVII



con significado para las variables consistente con la fórmula I.

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

- El término "ácido débil" significa cualquier ácido que tenga un valor de pKa (el $-\log$ de la Ka) de entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 9,5 utilizando tablas o valores estándar. Aunque sin pretender limitar esta invención, se describen los siguientes ejemplos de ácidos débiles con nombre,
- 20 fórmula y 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 butanoico $H(C_4H_7O_2)$ (pKa 4,83); ácido carbónico H_2CO_3 (pKa 4,83,

forma 1); ácido crómico HCrO_4^- (pKa 6,49, forma 2); ácido cítrico $\text{H}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$ (pKa 3,14, forma 1); ácido cítrico $\text{H}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^-$ (pKa 4,77, forma 2); ácido cítrico $(\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7)^=$ (pKa 6,39, forma 3); ácido fórmico $\text{H}(\text{CHO}_2)$ (pKa 3,75); ácido fumárico $\text{H}_4(\text{C}_4\text{O}_4)$ (pKa 3,03); ácido heptanoico $\text{H}(\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_2)$ (pKa 4,89); ácido hexanoico $\text{H}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2)$ (pKa 4,84), ácido fluorhídrico HF (pKa 3,20); isocitrato $\text{H}_8(\text{C}_6\text{O}_7)$ (pKa 3,29); ácido láctico $\text{H}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)$ (pKa 3,08); ácido maleico $\text{H}_4(\text{C}_4\text{O}_4)$ (pKa 1,83); ácido nicotínico $\text{H}_5(\text{C}_6\text{NO}_2)$ (pKa 3,39); ácido oxálico $\text{H}_2(\text{C}_2\text{O}_4)$ (pKa 1,23, forma 1); ácido oxálico $(\text{HC}_2\text{O}_4)^-$ (pKa 4,19, forma 2); ácido pentanoico $\text{H}(\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2)$ (pKa 4,84); ácido fosfórico H_3PO_4 (pKa 2,16, forma 1); ácido propanoico $\text{H}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2)$ (pKa 4,86); ácido pirúvico $\text{H}_4(\text{C}_3\text{O}_3)$ (pKa 2,39); ácido succínico $\text{H}_6(\text{C}_4\text{O}_4)$ (pKa 4,19) y ácido tricloroacético $\text{H}(\text{C}_2\text{Cl}_3\text{O}_2)$ (pKa 0,70). Cualquier combinación de estos ácidos está también ejemplificada.

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

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

adecuados que pueden utilizarse con esta invención, y se proporcionan numerosos ejemplos a continuación.

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

Monolaurato de sorbitán (Span 20®), monopalmitato de sorbitán (Span 40®), monoestearato de sorbitán (Span 60®), triestearato de sorbitán (Span
10 65®), monooleato de sorbitán (Span 80®), trioleato de sorbitán (Span 85®), monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween 20®), monopalmitato de polioxietilensorbitán (Tween 40®), monoestearato de polioxietilensorbitán (Tween 60®), monooleato de polioxietilensorbitán (Tween 80) y trioleato de polioxietilensorbitán (Tween 85). Estas descripciones se pretende que
15 incluyan los ingredientes del nombre comercial, o ingredientes equivalentes, como se enumeran en los catálogos de suministro para estos tensioactivos. Los tensioactivos pueden utilizarse individualmente o en cualquier combinación.

Se describen particularmente monolaurato de sorbitán (Span 20®),
20 monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween 20®), monooleato de sorbitán (Span 80®), trioleato de sorbitán (Span 85®), monooleato de polioxietilensorbitán (Tween 80), trioleato de polioxietilensorbitán (Tween 85).

El término "tampón adecuado" significa un tampón que es adecuado para uso veterinario o médico y puede mantener un pH relativamente
25 constante en una solución acuosa de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8. Los tampones fosfato son una realización descrita aquí. Los tampones fosfato pueden prepararse a un pH específico en un amplio

intervalo mediante el mezclado de sales monobásicas y dibásicas de fosfato de sodio y/o fosfato de potasio en diferentes proporciones. La preparación y uso de diversos tampones de sodio y potasio son bien conocidos por un experto en la técnica.

5 Son otros ejemplos de tampones los siguientes:

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

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

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

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

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

Parte I. Preparación de las soluciones

15 Las nuevas formulaciones dadas a conocer aquí son: 1) soluciones madre de glicosilamida y 2) soluciones coadyuvantes glicolípídicas.

1) Se prepara una solución madre de glicosilamida disolviendo un glicolípido en un alcohol y combinando cantidades apropiadas de un ácido débil. Se añade el ácido débil a la solución de glicolípido-alcohol en exceso molar del ácido débil con respecto al glicolípido. Se añade un tensioactivo no iónico a la mezcla de glicolípido-alcohol-ácido, creando una solución madre de glicosilamida. El glicolípido ejemplificado es acetato de *N*-(2-desoxi-2-*L*-leucilamino- β -D-glucopiranosil)-*N*-octadecildodecanoilamida. El alcohol ejemplificado es etanol. El ácido débil ejemplificado es ácido acético. Los
20
25 tensioactivos no iónicos son como se describen anteriormente.

Preparación de soluciones madre de glicosilamida. Se añade ácido débil a una solución alcohólica que contiene un glicolípido. Se añade el ácido

débil en exceso molar con respecto al contenido de glicolípido. El componente ácido débil debería añadirse de 1,25 a 5 veces la cantidad de glicolípido, en equivalentes molares del glicolípido. En ciertas realizaciones, se recomiendan las siguientes cantidades relativas de ácido. El ácido débil debería ser 2,0
5 veces, 2,5 veces, 2,7 veces, 3,0 veces y 5,0 veces, y lo más preferiblemente es 2,7 veces tantos moles de ácido como moles de glicolípido.

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

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

El ácido débil convierte el glicolípido en una sal farmacéuticamente
25 aceptable. Las sales preferidas son sales no tóxicas, que se utilizan habitualmente en preparaciones farmacéuticas y biológicas. Por ejemplo, se obtienen cloruros, acetatos, lactatos y sales inertes de los compuestos de

fórmula I con los ácidos débiles descritos en la presente memoria.

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

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

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

pH 7,8 da como resultado una solución coadyuvante glicolípida final con un pH de aproximadamente 6,4. Pueden hacerse ajustes finales al pH, pero típicamente no son necesarios.

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

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

Parte II. Caracterización de la solución coadyuvante glicolípida

Puede controlarse la estabilidad de la solución coadyuvante glicolípida durante almacenamiento mediante simple observación visual o utilizando instrumentos analíticos apropiados. Las moléculas glicolípicas forman micelas cuando están en solución acuosa, y es posible determinar precisamente el tamaño de las micelas con un difractómetro láser. Dicha

medida puede utilizarse para determinar si hay floculación de las moléculas glicolípídicas.

Un enfoque alternativo para medida de la estabilidad a tiempo real es realizar ensayos de estabilidad acelerada. Con ensayos de estabilidad
5 acelerada, se somete la solución coadyuvante a una temperatura de aproximadamente 37°C durante aproximadamente 7 días, seguido de incubación aproximadamente a 4°C durante aproximadamente 2 días con agitación constante. La incubación aproximadamente a 37°C durante aproximadamente 7 días representa el almacenamiento aproximadamente a
10 4°C durante un periodo de aproximadamente 1 año. La incubación aproximadamente a 4°C durante aproximadamente 2 días con agitación constante representa la condición de estrés a la que la solución coadyuvante glicolípídica podría enfrentarse durante el transporte.

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

Pueden utilizarse coadyuvantes no glicolípidos adicionales en la

solución coadyuvante glicolípida en combinación con los descritos anteriormente. En otra realización de la invención, se añaden moléculas inmunoestimulantes adicionales a la solución de coadyuvante glicolípido. Las moléculas inmunoestimulantes son bien conocidas en la técnica, e incluyen saponinas, Quil A, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) y Carbopol.

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

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

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

Parte III. Uso de la solución coadyuvante glicolípida

La solución coadyuvante glicolípida, en una forma de sal farmacéuticamente aceptable, puede mezclarse con un antígeno. Los antígenos convenientes incluyen: proteínas patógenas microbianas,

glicoproteínas, lipoproteínas, péptidos, glicopéptidos, lipopéptidos, toxoides, carbohidratos y antígenos específicos de tumor. Los antígenos pueden derivar de una variedad de fuentes. Los antígenos de patógenos microbianos incluyen bacterias, virus y organismos parásitos que causan enfermedades. Pueden
5 emplearse mezclas de dos o más antígenos. El antígeno puede estar muerto, naturalmente atenuado, vivo modificado o ser un extracto de proteína, proteína producida recombinantemente, un péptido sintetizado químicamente o cualquier otra cosa que estimule una respuesta inmune. El antígeno peptídico puede existir en forma de un péptido libre o conjugado con el
10 glicolípido o conjugado con otros epitopes de células B o células T conocidos.

La solución coadyuvante glicolipídica estable puede combinarse con coadyuvantes o componentes que son conocidos por tener propiedades coadyuvantes adicionales. Los coadyuvantes adicionales que pueden combinarse con la solución coadyuvante glicolipídica incluyen polímeros,
15 compuestos terpenoides de origen natural en su forma bruta o parcialmente purificada, amina cuaternaria anfífila, derivados de materiales de pared celular bacteriana y análogos sintéticos de pared celular bacteriana o componentes de ADN. La solución coadyuvante glicolipídica puede utilizarse con o combinarse con uno o más agentes tales como antibióticos o antígenos
20 diferentes. Los antígenos bacterianos o virales pueden estar muertos o vivos modificados. Los antígenos virales muertos se preparan haciendo crecer virus en cultivo de tejido e inactivando los virus mediante tratamientos químicos. Algunos virus pueden hacerse crecer en huevos con embrión. El antígeno viral muerto puede añadirse a una solución que contiene solución coadyuvante
25 glicolipídica, y la solución resultante puede utilizarse para vacunar a los animales para conseguir protección contra infecciones virales.

En una realización de esta invención, la solución coadyuvante

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

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

Los antígenos virales vivos modificados pueden liofilizarse y proporcionarse en forma de tortas liofilizadas en una preparación de vacuna comercial. En general, estas tortas liofilizadas de antígenos virales vivos modificados se rehidratan con una solución diluyente y se utilizan para

vacunación parenteral. Los ejemplos de diluyentes incluyen una solución de agua que contiene solución salina tamponada con fosfato. Si la solución diluyente contiene una molécula inmunoestimulante conocida, puede mejorarse la eficacia de la vacunación con los antígenos virales vivos modificados. En una realización de la presente invención, se utiliza la solución coadyuvante glicolípida como solución diluyente.

EJEMPLOS

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

Tabla 1. Una composición no adecuada para uso comercial

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

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

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

Tabla 2. Composición de una solución madre de glicosilamida

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

Aquí se utilizó etanol al 60% (v/v), y la relación molar de ácido acético a glicolípido es de 2,0. Se reemplazó el etanol anhidro del ejemplo 1 por etanol al 60% en agua. La solución madre de glicosilamida resultante era ópticamente transparente y no había sedimentación en el fondo del recipiente. Se añade
 5 esta solución madre de glicosilamida a diversos tampones, preparando la solución coadyuvante glicolipídica del ejemplo 3 siguiente.

Ejemplo 3. Preparación de soluciones coadyuvantes glicolipídicas. Se prepararon soluciones de tampón fosfato a diferentes pH. Se preparó una solución madre 2 M de fosfato de sodio monobásico disolviendo 138 g de sal
 10 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 250 ml de agua DI en un vaso de precipitados y completando un volumen final de 500 ml. De forma similar, se preparó una solución madre 2 M de fosfato de sodio dibásico disolviendo 142 g de NaH_2PO_4 en 300 ml de agua DI en un vaso de precipitados y completando un volumen final de 500 ml. Ambas soluciones madre se esterilizaron por
 15 filtración utilizando un filtro de 0,2 μm .

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

pH calculado	Solución de Na_2HPO_4 (ml)	Solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (ml)	Volumen total de solución madre 2 M	Agua estéril DI añadida (ml)	Volumen total de solución madre 1 M
--------------	--	---	-------------------------------------	------------------------------	-------------------------------------

			(ml)		(ml)
6,0	87,7	12,3	100	100	200
6,5	68,5	31,5	100	100	200
7,0	39,0	61,0	100	100	200
7,5	16,0	84,0	100	100	200
7,8	8,5	91,5	100	100	200

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

Se prepararon soluciones coadyuvantes glicolípídicas utilizando estos tampones madre y las soluciones madre de glicosilamida del ejemplo 2.

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

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

En otro conjunto de experimentos, se ensayó la significación del pH final de diversas soluciones para evaluar cómo afecta el pH a la floculación. Se preparó un tampón fosfato 20 mM a un pH inicial de 7,8. La Tabla 4 muestra el coadyuvante glicolípido preparado utilizando la glicosilamida preparada como en el ejemplo 1, en el que glicolípido y ácido acético se utilizaron a iguales concentraciones molares. Nota: el pH final no cayó mucho (Tabla 4), indicando la efectividad del tampón. Las concentraciones de NaCl variaron. Se compararon las lecturas de densidad óptica (D.O.) a 600 nm en la

Tabla 4 con lecturas similares en la Tabla 5, en la que las soluciones coadyuvantes glicolípicas se prepararon con soluciones madre de glicosilamida que contenían dos veces la relación molar de ácido acético a glicolípido, preparadas como en el ejemplo 2. Utilizar la concentración o

5 cantidad de ácido acético mayor da como resultado una floculación mínima. La floculación era mayor en la muestra no filtrada que en las muestras filtradas. Además, al aumentar la concentración de NaCl, hay un aumento de la floculación e incluso precipitación. Se preparó la solución coadyuvante glicolípica descrita en la Tabla 5 con un tampón fosfato que tiene un pH

10 inicial de 8,0; el pH final de la solución coadyuvante glicolípica era entre 6,8 y 7,0. Una reducción adicional del pH final de la solución coadyuvante glicolípica puede dar como resultado una solución coadyuvante glicolípica con menos turbidez y sin floculación.

Tabla 4. Preparación de composiciones de glicosilamida que contienen una

15 cantidad equimolar de ácido acético y glicolípidos (véase el ejemplo 1).

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

Tabla 5. Preparación de solución coadyuvante glicolípica utilizando solución madre de glicosilamida que contiene dos veces la cantidad molar de ácido acético que de glicolípido (véase el ejemplo 2)

Concentración de NaCl (mM)	Volumen de tampón (ml)	Volumen de solución madre de glicosilamida (ml)	pH final	D.O. a 600 nm
----------------------------	------------------------	---	----------	---------------

0	480	25	6,93	0,146
15	480	25	6,88	0,487
100	480	25	6,84	2,826

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

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

Tabla 7. Titulación de coadyuvante glicolipídico con ácido acético

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

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

Tabla 8. Composición de una solución madre de glicosilamida

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 8. Cuantificación del componente glicolípido utilizando HPLC

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

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

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

Tabla 12. Patrones de Bay 15-5831®

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

Se prepararon patrones en el intervalo de 0,10 a 1,03 mM y se

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

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

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

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

Nº de muestra	Descripción	Concentración medida (mM)	D.O. a 600 nm	pH
Muestra 1 de 30 l	NaCl 15 mM, NaOH 0 mM	6,21	0,218	6,42

Muestra 2 de 30 l	NaCl 15 mM, NaOH 1 mM	6,3	0,137	6,52
Muestra 3 de 30 l	NaCl 15 mM, NaOH 2 mM	6,24	0,137	6,59
Muestra 4 de 30 l	NaCl 15 mM, NaOH 4 mM	6,17	0,15	6,80
Muestra 5 de 30 l	NaCl 15 mM, NaOH 8 mM	6,26	0,129	7,06
Muestra 6 de 30 l	NaCl 15 mM, NaOH 12 mM	6,15	0,062	7,54

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

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

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

durante el transporte.

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

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

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

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

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

Número de lote de la solución coadyuvante	Concentración medida
---	----------------------

glicolípida y tratamiento	(mM)
Lote 1- 4°C	6,23
Lote 1- Agitación a 37°C	6,29
Lote 2- 4°C	6,32
Lote 2- Agitación a 37°C	6,30
Lote 3- 4°C	6,28
Lote 3- Agitación a 37°C	6,29

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

5 **Ejemplo 11.** Ensayo viricida de la solución coadyuvante glicolípida

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

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

Se rehidrataron los bloques virales utilizando la solución coadyuvante glicolípida. Después de incubación a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora, se sembraron las muestras sobre una monocapa de una línea celular
20 permisiva con una dilución en serie. Contando el número de bloques virales

que aparecen sobre la monocapa, se obtuvo el valor del 50% de la dosis infecciosa en cultivo de tejido por ml (TCID50/ml) para cada antígeno viral rehidratado con agua estéril o solución coadyuvante glicolípida. En este ensayo, se trató como viricida una reducción del título de 0,7 después de rehidratar con la solución coadyuvante glicolípida de ensayo.

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

Tabla 16. Ensayo viricida para la solución coadyuvante glicolípida

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

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

Se presentan ejemplos para ilustrar la invención. No debería considerarse que limitan el alcance de la invención. Resultarán evidentes para los expertos en la técnica muchos cambios, variaciones, modificaciones y

otros usos y aplicaciones de esta invención.

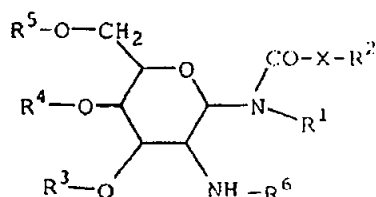
Habiéndose descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

5 1. Una composición que comprende:

 a) un glicolípido de fórmula I;

 en el que la fórmula I es



 en la que

10 R¹ y R² son independientemente hidrógeno o radical alquilo saturado que tiene hasta 20 átomos de carbono;

 X es -CH₂-, -O- o -NH-;

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

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

 R⁶ es L-alanilo, L-alfa-aminobutilo, L-arginilo, L-asparginilo, L-aspartilo, L-cisteinilo, L-glutamilo, L-glicilo, L-histidilo, L-hidroxipropilo, L-isoleucilo, L-leucilo, L-lisilo, L-metionilo, L-ornitinilo, L-fenilalanilo, L-prolilo, L-serilo, L-treonilo, L-tirosilo, L-triptofanilo y L-valilo o sus isómeros D;

 en una forma de sal, en la que la forma de sal deriva de un ácido débil;

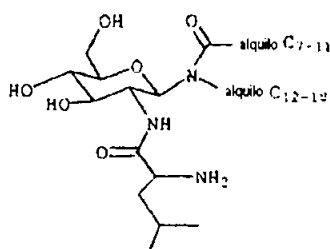
 b) un alcohol, en el que el alcohol es HO-alquilo C₁₋₃;

 c) un ácido débil, en el que el ácido débil 1) está en exceso molar con respecto al contenido de glicolípido, y 2) es cualquier ácido que tenga un

valor de pKa (el $-\log$ de Ka) entre 1,0 y 9,5 utilizando las tablas o valores estándar;

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

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



10

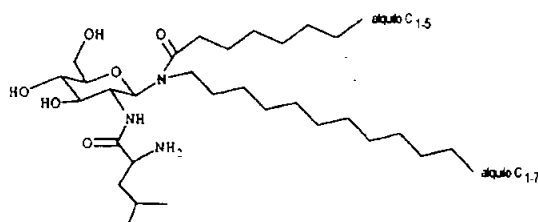
Fórmula II(a)

y el ácido débil se selecciona de uno o cualquier combinación de los siguientes ácidos débiles: ácido acético, $\text{H}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)$ (pKa 4,76); ácido ascórbico (1), $\text{H}_2(\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6)$ (pKa 4,10); ácido acetilsalicílico, $\text{H}_8(\text{C}_9\text{O}_4)$ (pKa 3,5); ácido butanoico $\text{H}(\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2)$ (pKa 4,83); ácido carbónico H_2CO_3 (pKa 4,83, forma 1); ácido crómico HCrO_4^- (pKa 6,49, forma 2); ácido cítrico $\text{H}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$ (pKa 3,14, forma 1); ácido cítrico $(\text{H}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)^-$ (pKa 4,77, forma 2); ácido cítrico $(\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7)^{=}$ (pKa 6,39, forma 3); ácido fórmico $\text{H}(\text{CHO}_2)$ (pKa 3,75); ácido fumárico $\text{H}_4(\text{C}_4\text{O}_4)$ (pKa 3,03); ácido heptanoico $\text{H}(\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_2)$ (pKa 4,89); ácido hexanoico $\text{H}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2)$ (pKa 4,84); ácido fluorhídrico HF (pKa 3,20); isocitrato $\text{H}_8(\text{C}_6\text{O}_7)$ (pKa 3,29); ácido láctico $\text{H}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)$ (pKa 3,08); ácido maleico $\text{H}_4(\text{C}_4\text{O}_4)$ (pKa 1,83); ácido nicotínico $\text{H}_5(\text{C}_6\text{NO}_2)$ (pKa 3,39); ácido oxálico $\text{H}_2(\text{C}_2\text{O}_4)$ (pKa 1,23, forma 1); ácido oxálico $(\text{HC}_2\text{O}_4)^-$ (pKa 4,19, forma 2); ácido pentanoico $\text{H}(\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2)$ (pKa 4,84); ácido fosfórico H_3PO_4 (pKa 2,16,

20

forma 1); ácido propanoico $\text{H}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2)$ (pKa 4,86); ácido pirúvico $\text{H}_4(\text{C}_3\text{O}_3)$ (pKa 2,39); ácido succínico $\text{H}_6(\text{C}_4\text{O}_4)$ (pKa 4,19) y ácido tricloroacético $\text{H}(\text{C}_2\text{Cl}_3\text{O}_2)$ (pKa 0,70).

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



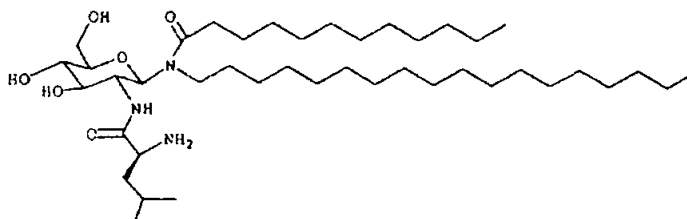
Fórmula II(b)

y

- 10 el ácido débil se selecciona de uno o cualquier combinación de los siguientes ácidos débiles: ácido acético, ácido acetilsalicílico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido fluorhídrico, isocitrato, ácido maleico, ácido nicotínico, ácido fosfórico, ácido pirúvico, ácido succínico y ácido tricloroacético.

15

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



Fórmula III

y el ácido débil es ácido acético.

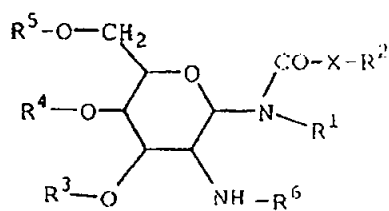
5. Una composición de la reivindicación 2, en la que el ácido débil se selecciona del grupo constituido por: ácido acético, ácido acetilsalicílico, ácido cítrico de forma 1, ácido cítrico de forma 2, ácido cítrico de forma 3, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido fluorhídrico, isocitrato, ácido maleico, ácido nicotínico, ácido fosfórico de forma 1, ácido pirúvico, ácido succínico y ácido tricloroacético.
6. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que dicho ácido débil está en una cantidad que es mayor que el equivalente molar del glicolípido, o está en una cantidad que es las siguientes veces mayor que el equivalente molar del glicolípido:
- a) 1,25 veces mayor,
 - b) 2,0 veces mayor,
 - c) 2,5 veces mayor,
 - d) 2,7 veces mayor,
 - e) 3,0 veces mayor,
 - f) 5,0 veces mayor,
- que la cantidad equivalente molar del glicolípido.
7. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el alcohol es alcohol etílico.
8. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que dicho tensioactivo no iónico se selecciona de uno cualquiera o una combinación del grupo constituido por: monolaurato de sorbitán,

monopalmitato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, triestearato de sorbitán, monooleato de sorbitán, trioleato de sorbitán, monolaurato de polioxietilensorbitán, monopalmitato de polioxietilensorbitán, monoestearato de polioxietilensorbitán, monooleato de polioxietilensorbitán, trioleato de polioxietilensorbitán y otros sorbitanos y polioxietilensorbitanos utilizados habitualmente en vacunas.

9. Una composición que comprende:

a) un glicolípido de fórmula I:

10 en el que la fórmula I es



en la que

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

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

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

R^6 es L-alanilo, L-alfa-aminobutilo, L-arginilo, L-asparginilo, L-aspartilo, L-cisteinilo, L-glutamilo, L-glicilo, L-histidilo, L-hidroxipropilo, L-
20 leucilo, L-lisilo, L-metionilo, L-ornitinilo, L-fenilalanilo, L-prolilo, L-serilo, L-treonilo, L-tirosilo, L-triptofanilo y L-valilo o sus isómeros D;

en una forma de sal, en la que la forma de sal deriva de un ácido débil;

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

c) un ácido débil, en el que el ácido débil 1) está en exceso molar

con respecto al contenido de glicolípido, y 2) es cualquier ácido que tenga un valor de pKa (el $-\log$ de Ka) entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 9,5 utilizando las tablas o valores estándar;

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

e) un tampón acuoso, en la que el tampón adecuado es adecuado para uso en vacuna y puede mantener el pH de los demás ingredientes dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8,

con la condición de que no se utilice NaCl más de 50 mM.

10. Una composición de la reivindicación 9, en la que el pH de la solución se ajusta a un pH relativamente constante en una solución acuosa de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 7, y el tampón se selecciona del grupo constituido por tampones fosfato que tienen cualquiera o ambas de las sales monobásica y dibásica de fosfato de sodio y/o fosfato de potasio en la misma o diferentes proporciones.

11. Una composición de la reivindicación 9, en la que dicho tampón se selecciona del grupo de:

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

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

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

d) ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico (también

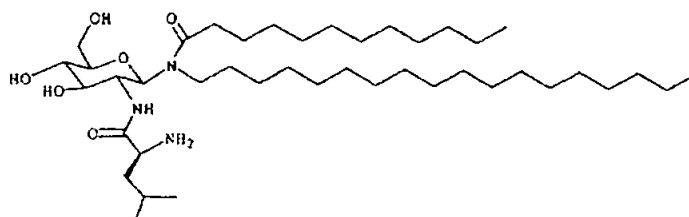
conocido como HEPES);

- e) [tris(hidroximetil)metil]glicina (también conocida como TRIS);
o cualquier combinación de los mismos.

- 5 12 Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende adicionalmente un antígeno seleccionado del grupo, o cualquier combinación de los mismos, constituido por herpesvirus bovino vivo modificado, virus sincitial respiratorio bovino vivo modificado y virus de la parainfluenza 3 vivo modificado.

10

13. Una composición que comprende:
a) acetato de *N*-(2-desoxi-2-L-leucilamino- β -D-glucopiranosil)-*N*-octadecildodecanamida, que tiene una estructura de fórmula III:



15

Fórmula III

- b) etanol;
c) ácido acético;
d) tensioactivo no iónico seleccionado de: monolaurato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, triestearato de sorbitán, monooleato de sorbitán, trioleato de sorbitán, monolaurato de polioxietilensorbitán, monopalmitato de polioxietilensorbitán, monoestearato de polioxietilensorbitán, monooleato de polioxietilensorbitán, trioleato de polioxietilensorbitán;
- 20

e) un tampón acuoso en el que el pH de la solución se ajusta a un pH relativamente constante en una solución tamponada acuosa de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 7, y el tampón se selecciona del grupo de:

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

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

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

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

e) [tris(hidroximetil)metil]glicina (también conocida como TRIS);
o cualquier combinación de los mismos;

15 con la condición de que no se utilice NaCl más de 15 mM, y:

f) un antígeno constituido esencialmente por herpesvirus bovino vivo modificado, virus sincitial respiratorio bovino vivo modificado y virus de la parainfluenza 3 vivo modificado.

20 14. Un procedimiento para la preparación de una composición, que comprende mezclar conjuntamente lo siguiente:

a) un glicolípido de fórmula I;

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

c) un ácido débil, en el que la cantidad de ácido débil está en
25 exceso molar con respecto al contenido de glicolípido; y

d) un tensioactivo no iónico.

15. Un procedimiento para la preparación de una composición, que comprende mezclar conjuntamente lo siguiente:

- a) un glicolípido de fórmula I;
- b) un alcohol, en el que el alcohol es HO-alquilo C_{1-3} ;
- 5 c) un ácido débil, en el que la cantidad de ácido débil está en exceso molar con respecto al contenido de glicolípido;
- d) un tensioactivo no iónico; y añadir después
- e) un tampón adecuado.

RESUMEN

Esta invención se refiere a composiciones y procedimientos de preparación de soluciones madre de diluyente coadyuvante estable y
5 soluciones coadyuvantes finales que comprenden glicolípidos, ácidos débiles, alcoholes, tensioactivos no iónicos y tampones.

PATENT COOPERATION TREATY

588

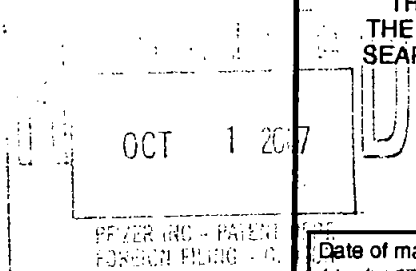
From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

PFIZER INC.
Attn. Fuller, Grover F., Jr.
MS8260-1615
Eastern Point Road
Groton, CT 06340
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION



(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference PC33250A International application No. PCT/IB2007/000258 Applicant PFIZER PRODUCTS INC.	Date of mailing (day/month/year) 26/09/2007 FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below International filing date (day/month/year) 15/01/2007
---	---

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90b/s.1 and 90b/s.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Catriona Cleere
--	--

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the international Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the international Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the international Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the international Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the international Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the international Bureau and not with the receiving Office or the international Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PC33250A	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2007/000258	International filing date (day/month/year) 15/01/2007	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 26/01/2006
Applicant PFIZER PRODUCTS INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
 b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/39 C07H15/12 C07H13/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 855 283 A (LOCKHOFF OSWALD [DE] ET AL) 8 August 1989 (1989-08-08) the whole document	13
A		1-12, 14, 15
X	LOCKHOFF O: "GLYCOLIPIDS AS IMMUNOMODULATORS SYNTHESIS AND PROPERTIES" ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION IN ENGLISH, vol. 30, no. 12, 1991, pages 1611-1620, XP002449518 ISSN: 0570-0833 the whole document	13
A		1-12, 14, 15
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 September 2007	26/09/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Irion, Andrea

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 290 971 B1 (KANDIL ALI [CA] ET AL) 18 September 2001 (2001-09-18) the whole document	13
A		1-12, 14, 15
A	----- STUENKEL K G ET AL: "Synthetic glycolipids with immunopotentiating activity on humoral immunity: evaluation in vivo" PROGRESS IN LEUKOCYTE BIOLOGY, LISS, NEW YORK, NY, US, vol. 9, 1988, pages 575-579, XP009061925 ISSN: 0884-6790 the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2007/000258

93

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4855283	A	08-08-1989	AU 564222 B2	06-08-1987
			AU 5897986 A	24-12-1986
			CA 1289952 C	01-10-1991
			CN 86104185 A	08-04-1987
			CS 8604513 A2	13-10-1989
			DE 3521994 A1	02-01-1987
			DK 287886 A	21-12-1986
			EP 0206037 A2	30-12-1986
			ES 8801769 A1	01-05-1988
			ES 8900231 A1	16-06-1989
			FI 862619 A	21-12-1986
			GR 861574 A1	17-10-1986
			HU 41049 A2	30-03-1987
			IE 58918 B1	01-12-1993
			IL 79126 A	16-09-1991
			JP 2077990 C	09-08-1996
			JP 7116207 B	13-12-1995
			JP 61293991 A	24-12-1986
			NO 862199 A	22-12-1986
			PH 26775 A	13-10-1992
			PT 82796 A	01-07-1986
			ZA 8604571 A	25-02-1987
US 6290971	B1	18-09-2001	NONE	

PATENT COOPERATION TREATY

94

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/IB2007/000258

International filing date (day/month/year)
15.01.2007

Priority date (day/month/year)
26.01.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K39/39 C07H15/12 C07H13/12

Applicant
PFIZER PRODUCTS INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Irion, Andrea

Telephone No. +49 89 2399-8174



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**International application No.
PCT/IB2007/000258

Box No. 1 Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/IB2007/000258

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-15</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-12, 14, 15</u>
	No: Claims	<u>13</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-15</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Item V

V.1 Reference is made to following documents

- D1: US4855283 (LOCKHOFF ET AL.) 08 August 1989 (1989-08-08)
D2: O. LOCKHOFF ET AL.: 'Glycolipids as immunomodulators: syntheses and properties', Angewandte Chemie - International Edition in English, 1991, vol. 30, no. 12, pages 1611-1620
D3: US6290971 (KANDIL ET AL.) 18 September 2001 (2001-09-18)

V.2 Novelty (Article 33(2) PCT)

V.2.1 With respect to claims 1-15

None of the available prior art documents describe the composition as defined in present claims 1, 9, and 13 is considered novel in the sense of Article 33(2) PCT. Furthermore, the process as defined in claims 14 and 15 is considered novel in the sense of Article 33(2) PCT.

V.3 Inventive step (Article 33(3) PCT)

V.3.1 With respect to claim 13

The subject-matter of claim 13 differs from each of the closest prior art documents D1-D3 in that ethanol, a non-ionic surfactant and a aqueous buffer are present. The technical problem to be solved is formulated by the Applicants as providing a glycolipid composition having an improved stability. None of these compounds appear to have any surprising effect on the stability of the adjuvant composition. Therefore, the subject-matter of claim 13 is not considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT.

V.3.2 With respect to claims 1-12, 14 and 15

The subject-matter of claims 1-12, 14 and 15 differs from each of the closest prior art documents D1-D3 in that the composition comprises a weak acid in molar excess with reference to the glycolipid content. The technical problem to be solved may be regarded as providing an adjuvant composition comprising a glycolipid having an improved stability. None of the available prior art documents suggests that adding a weak acid to a composition comprising glycolipids as defined in present claim 1 would improve the stability of said glycolipids as it is shown in the application as originally

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2007/000258

filed. Therefore, the subject-matter of claims 1-12, 14, and 15 is considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT.

V.4 Industrial applicability (Article 33(4) PCT)

V.4.1 With respect to claims 15

The subject-matter of claims 1-15 appears to be susceptible of industrial application.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
2 August 2007 (02.08.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/085962 A2

(51) International Patent Classification: **Not classified**

(21) International Application Number:

PCT/IB2007/000258

(22) International Filing Date: 15 January 2007 (15.01.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/762,279 26 January 2006 (26.01.2006) US
60/814,984 20 June 2006 (20.06.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **PFIZER PRODUCTS INC.** [US/US]; Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **DOMINOWSKI, Paul, Joseph** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US). **MANNAN, Ramasamy, Mannar** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US). **MEDIRATTA, Sangita** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US).

(74) Agent: **FULLER, Grover, F., Jr.**; c/o LAWRENCE, Jackie, Pfizer Inc. MS8260-1615, Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: NOVEL GLYCOLIPID ADJUVANT COMPOSITIONS

(57) Abstract: This invention relates to compositions and methods of preparing stable adjuvant diluent stock solutions and final adjuvant solutions comprising glycolipids, weak acids, alcohols, nonionic surfactants and buffers.

WO 2007/085962 A2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2007/000258

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/39 C07H15/12 C07H13/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 855 283 A (LOCKHOFF OSWALD [DE] ET AL) 8 August 1989 (1989-08-08) the whole document	13
A		1-12, 14, 15
X	LOCKHOFF O: "GLYCOLIPIDS AS IMMUNOMODULATORS SYNTHESIS AND PROPERTIES" ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION IN ENGLISH, vol. 30, no. 12, 1991, pages 1611-1620, XP002449518 ISSN: 0570-0833 the whole document	13
A		1-12, 14, 15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 September 2007

Date of mailing of the international search report

26/09/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Irion, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2007/000258

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 290 971 B1 (KANDIL ALI [CA] ET AL) 18 September 2001 (2001-09-18) the whole document	13
A		1-12,14, 15
A	----- STUENKEL K G ET AL: "Synthetic glycolipids with immunopotentiating activity on humoral immunity: evaluation in vivo" PROGRESS IN LEUKOCYTE BIOLOGY, LISS, NEW YORK, NY, US, vol. 9, 1988, pages 575-579, XP009061925 ISSN: 0884-6790 the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2007/000258

102

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4855283	A	08-08-1989	AU 564222 B2	06-08-1987
			AU 5897986 A	24-12-1986
			CA 1289952 C	01-10-1991
			CN 86104185 A	08-04-1987
			CS 8604513 A2	13-10-1989
			DE 3521994 A1	02-01-1987
			DK 287886 A	21-12-1986
			EP 0206037 A2	30-12-1986
			ES 8801769 A1	01-05-1988
			ES 8900231 A1	16-06-1989
			FI 862619 A	21-12-1986
			GR 861574 A1	17-10-1986
			HU 41049 A2	30-03-1987
			IE 58918 B1	01-12-1993
			IL 79126 A	16-09-1991
			JP 2077990 C	09-08-1996
			JP 7116207 B	13-12-1995
			JP 61293991 A	24-12-1986
			NO 862199 A	22-12-1986
			PH 26775 A	13-10-1992
			PT 82796 A	01-07-1986
			ZA 8604571 A	25-02-1987

US 6290971	B1	18-09-2001	NONE	

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No 08 075683 00000 0000

Fecha 2008 07 22 16 10 28 Dep 2020 NUECREACIONE
Tra 11 PATENTE IYII Eve 378 FASE NACIONAL I
Act 411 PRESENTACION Folios 102



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ◆ Descripción de la invención
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas

[]
[]
[]
[]
[]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas

[]
[]
[]
[]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas

[]
[]
[]
[]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha 22 Jul 08

Carrera 13 No 27-00 Piso 6, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E mail info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D C , Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 104

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER PRODUCTS INC.

REFERENCIA	Radicación No.	8 75683
	Solicitud internacional	PCT/IB2007/000258
	Fecha inicio fase nacional	26/08/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	6564
	Folios	1

¶ Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

06 AGO 2008

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpall