



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **90569** (13) **C2**  
(51) **МПК (2009)**  
**A61K 39/39**  
**C07H 15/12** (2006.01)  
**C07H 13/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

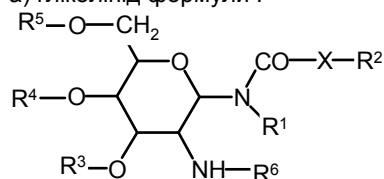
## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

### (54) КОМПОЗИЦІЯ ГЛІКОЛІПІДНОГО АД'ЮВАНТУ (ВАРІАНТИ) ТА СПОСІБ ЇЇ ОТРИМАННЯ

1

(21) a200808748  
(22) 15.01.2007  
(24) 11.05.2010  
(86) PCT/IB2007/000258, 15.01.2007  
(31) 60/762,279  
(32) 26.01.2006  
(33) US  
(31) 60/814,984  
(32) 20.06.2006  
(33) US  
(46) 11.05.2010, Бюл.№ 9, 2010 р.  
(72) ДОМІНОВСКИ ПОЛ ЖОЗЕФ, US, МАННАН  
РАМАСАМИ МАННАР, US, МЕДІРАТТА САНГІТА,  
US  
(73) ПФАЙЗЕР ПРОДАКТС ІНК., US  
(56) LOCKHOFF O: "GLYCOLIPIDS AS  
IMMUNOMODULATORS SYNTHESIS AND  
PROPERTIES" ANGEWANDTE CHEMIE  
INTERNATIONAL EDITION IN ENGLISH, vol. 30, no.  
12, 1991, pages 1611-1620  
US 6290971 B1, 18.09.2001  
a200512191, 15.02.2006  
US 4855283 A, 08.08.1989  
(57) 1. Композиція, що містить:

а) гліколіпід формули I



, Формула I

де  
R<sup>1</sup> та R<sup>2</sup>, незалежно - гідроген або насичений алкіл, що має до 20 атомів карбону;  
X - -CH<sub>2</sub>-, -O- або -NH-;  
R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> та R<sup>5</sup>, незалежно - гідроген, -SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, -PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, -COC<sub>1-10</sub>алкіл;  
R<sup>6</sup> - L-аланіл, L-альфа-амінобутил, L-аргініл, L-аспарагініл, L-аспартил, L-цистеїніл, L-глутаміл, L-гліцил, L-гістидил, L-гідроксипроліл, L-ізолейцил, L-лейцил, L-лізил, L-метіоніл, L-орнітиніл, L-фенілаланіл, L-проліл, L-серил, L-треоніл, L-тирозил, L-триптофаніл та L-валіл або їх D-ізомери;

2

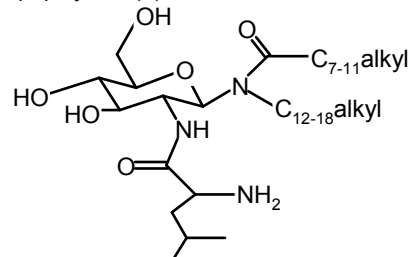
у формі солі, де сіль є похідною від слабкої кислоти,

b) спирт, де спиртом є HO-C<sub>1-3</sub>алкіл;

c) слабку кислоту, де слабка кислота 1) є у молярному надлишку відносно вмісту гліколіпиду, та 2) є будь-якою кислотою, що має значення pKa (-log Ka) між 1,0 та 9,5, застосовуючи стандартні таблиці або значення;

d) неіонну ПАВ, де неіонною ПАВ є агент, що зменшує поверхневий натяг матеріалу, він є розчинним та має компонент, що є гідрофобним, та ще один компонент, що є гідрофільним.

2. Композиція за п. 1, де гліколіпідом є сполука формули II(a)



, Формула II(a)

а слабка кислота є вибраною з одної з наступних слабких кислот або будь-якої їх комбінації: оцтова кислота, H(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) (pKa 4,76); аскорбінова кислота (1), H<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>) (pKa 4,10); ацетилсаліцилова кислота, H<sub>2</sub>(C<sub>9</sub>O<sub>4</sub>) (pKa 3,5); бутанова кислота H(C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>) (pKa 4,83); карбонатна кислота, форма 1, H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, (pKa 4,83); хромовая кислота, форма 2, HCrO<sub>4</sub><sup>-</sup>, (pKa 6,49); лимонна кислота, форма 1, H<sub>3</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>), (pKa 3,14); лимонна кислота, форма 2, H<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub><sup>-</sup>, (pKa 4,77); лимонна кислота, форма 3, (HC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)<sup>2-</sup>, (pKa 6,39); мурашина кислота, H(CHO<sub>2</sub>), (pKa 3,75); фумарова кислота, H<sub>4</sub>(C<sub>4</sub>O<sub>4</sub>), (pKa 3,03); гептанова кислота, H(C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>), (pKa 4,89); гексанова кислота, H(C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub>), (pKa 4,84); флуоридна кислота, HF, (pKa 3,20); ізолимонна кислота, H<sub>8</sub>(C<sub>6</sub>O<sub>7</sub>), (pKa 3,29); молочна кислота, H(C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>), (pKa 3,08); малеїнова кислота, H<sub>4</sub>(C<sub>4</sub>O<sub>4</sub>), (pKa 1,83); нікотинова кислота, H<sub>5</sub>(C<sub>6</sub>NO<sub>2</sub>), (pKa 3,39); щавлева кислота, форма 1, H<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), (pKa 1,23); щавлева кислота, форма 2, (HC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sup>-</sup>, (pKa 4,19); пентанова кислота, H(C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>), (pKa 4,84); фосфатна кислота, форма 1, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,

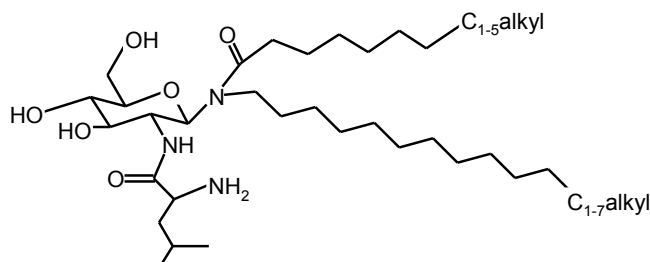
(13) **C2**

(11) **90569**

(19) **UA**

(рКа 2,16); пропанова кислота,  $H(C_3H_5O_2)$ , (рКа 4,86); піровиноградна кислота,  $H_4(C_3O_3)$ , (рКа 2,39); бурштинова кислота  $H_6(C_4O_4)$ , (рКа 4,19) та трихлороцтова кислота,  $H(C_2C_{13}O_2)$ , (рКа 0,70).

3. Композиція за п. 2, де гліколіпідом є сполука формули II(b)

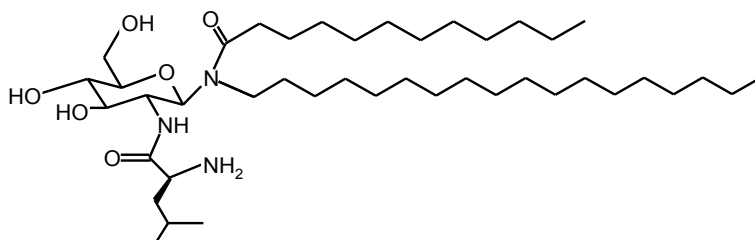


, Формула II(b)

а слабка кислота є вибраною з одної з наступних слабких кислот або будь-якої їх комбінації: оцтова кислота, ацетилсаліцилова кислота; лимонна кислота; мурашина кислота; фумарова кислота; флуоридна кислота; ізолимонна кислота; малеїнова кислота; нікотинова кислота; фосфатна кислота;

піровиноградна кислота; бурштинова кислота та трихлороцтова кислота.

4. Композиція за п. 3, де гліколіпідом є -N-(2-дезоксид-2-L-лейциламіно-β-D-глюкопіранозил)-N-октадецилдодеканамід ацетат, що має структуру формули III:



, Формула III

а слабкою кислотою є оцтова кислота.

5. Композиція за п. 2, де слабка кислота є вибраною з групи: оцтова кислота; ацетилсаліцилова кислота; лимонна кислота, форма 1; лимонна кислота, форма 2; лимонна кислота, форма 3; мурашина кислота; фумарова кислота; флуоридна кислота; ізолимонна кислота; малеїнова кислота; нікотинова кислота; фосфатна кислота, форма 1; піровиноградна кислота, бурштинова кислота та трихлороцтова кислота.

6. Композиція за будь-яким з пп. 1-5, де вказана слабка кислота є у кількості, що більше, ніж молярний еквівалент гліколіпіду, або більше у нижченаведену кількість разів, ніж молярний еквівалент гліколіпіду:

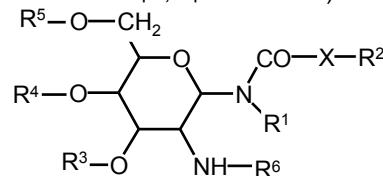
- у 1,25 разу більше,
- у 2,0 разу більше,
- у 2,5 разу більше,
- у 2,7 разу більше,
- 3,0 разу більше,
- у 5,0 разу більше, ніж молярний еквівалент кількості гліколіпіду.

7. Композиція за будь-яким з пп. 1-6, де спирт - етиловий спирт.

8. Композиція за будь-яким з пп. 1-7, де вказана неіонна ПАР є вибраною з будь-якої ПАР або їх комбінації: сорбітан монолаурат, сорбітан монопальмітат, сорбітан моностеарат, сорбітан тристеарат, сорбітан моноолеат, сорбітан триолеат, поліоксіетиленсорбітан монолаурат, поліоксіетиленсорбітан монопальмітат, поліоксіетиленсорбітан моностеарат, поліоксіетиленсорбітан моноолеат, поліоксіетиленсорбітан триолеат

та інші сорбітани та поліоксіетиленсорбітани, звичайно застосовувани у вакцинах.

9. Композиція, що містить: а) гліколіпід формули I:



, Формула I

де  $R^1$  та  $R^2$ , незалежно - гідроген або насичений алкіл, що має до 20 атомів карбону;

X -  $-CH_2-$ ,  $-O-$  або  $-NH-$ ;

$R^3$ ,  $R^4$  та  $R^5$ , незалежно - гідроген,  $-SO_4^{2-}$ ,  $-PO_4^{2-}$ ,  $-COC_{1-10}$ алкіл;

$R^6$  - L-аланін, L-альфа-амінобутил, L-аргінін, L-аспарагінін, L-аспартил, L-цистеїніл, L-глутаміл, L-гліцил, L-гістидил, L-гідроксипроліл, L-ізолейцил, L-лейцил, L-лізил, L-метіоніл, L-орнітиніл, L-фенілаланін, L-проліл, L-серил, L-треоніл, L-тирозил, L-триптофаніл та L-валіл або їх D-ізомери;

у формі солі, де сіль є похідною від слабкої кислоти,

b) спирт, де спиртом є  $HO-C_{1-3}$ алкіл;

c) слабку кислоту, де слабка кислота 1) є у молярному надлишку відносно вмісту гліколіпіду, та 2) є будь-якою кислотою, що має значення рКа ( $-\log Ka$ ) приблизно 1,0-9,5, застосовуючи стандартні таблиці або значення;

d) неіонну ПАР, де неіонна ПАР є агентом, що зменшує поверхневий натяг матеріалу, він є роз-

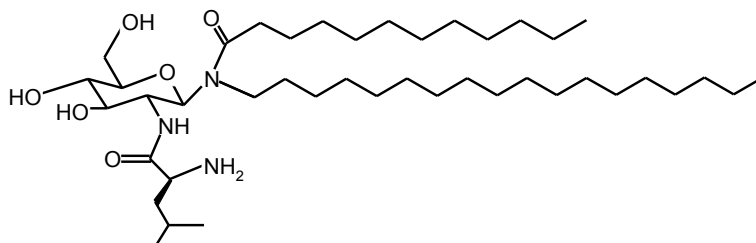
чинним та має компонент, що є гідрофобним, та ще один компонент, що є гідрофільним; та  
е) водний буфер, де підходящий буфер є придатним для застосування у вакцинах та може підтримувати рН інших інгредієнтів у межах рН приблизно 6-8, за умови, що застосовують не більше, ніж 50 mM NaCl.

10. Композиція за п. 9, де рН розчину доводять до відносно постійного значення рН у водному розчині приблизно 6-7, а буфер є вибраним з групи: фосфатні буфери, що мають одноосновні та двоосновні солі натрійфосфату та/або калійфосфату при однакових або різних пропорціях.

11. Композиція за п. 9, де вказаний буфер є вибраним з групи:

а) 2-(N-морфоліно)етансульфонова кислота (також відома як МЕС);

б) 3-(N-морфоліно)пропансульфонова кислота (також відома як МПС);



, Формула III

б)етанол;

с) оцтову кислоту; де кількість становить молярний надлишок по відношенню до вмісту гліколіпіду;

д) неіонну ПАР, вибрану з групи: сорбітан монолаурат, сорбітан монопальмітат, сорбітан моностеарат, сорбітан тристеарат, сорбітан моноолеат, сорбітан триолеат, поліоксіетиленсорбітан монолаурат, поліоксіетиленсорбітан монопальмітат, поліоксіетиленсорбітан моностеарат, поліоксіетиленсорбітан моноолеат, поліоксіетиленсорбітан триолеат,

е) водний буфер, де рН розчину доводять до відносно постійного значення рН у водному буферованому розчині приблизно 6-7, а буфер є вибраним з групи:

а) 2-(N-морфоліно)етансульфову кислоту (також відома як МЕС),

б) 3-N-морфоліно)пропансульфову кислоту (також відома як МПС),

с) n-[трис(гідроксиметил)]-2-аміноетансульфову кислоту (також відома як ТЕС),

д) 4-(2-гідроксіетил)піперазин-1-етансульфову кислоту (також відома як ГЕПЕС), та

е) [трис(гідроксиметил)метил]гліцин (також відомий як ТРИС),

с) n-[трис(гідроксиметил)]-2-аміноетансульфонова кислота (також відома як ТЕС);

д) 4-(2-гідроксіетил)піперазин-1-етансульфонова кислота (також відома як ГЕПЕС); та

е) [трис(гідроксиметил)метил]гліцин (також відомий як ТРИС);

або будь-яка їх комбінація.

12. Композиція за будь-яким з пп. 1-11, що містить крім того антиген, вибраний з антигену або будь-якої їх комбінації з групи: модифікований живий вірус герпесу корів, модифікований живий респіраторно-синцитіальний вірус корів та модифікований живий вірус парагрипу 3.

13. Композиція, що містить:

а) N-(2-дезоксид-2-L-лейциламіно-β-D-глюкопіранозил)-N-октадецилдодеканамід ацетат, що має структуру формули III:

або будь-яку їх комбінацію,

за умови, що застосовують не більше, ніж 15 mM NaCl; а

ф) антигеном є по суті модифікований живий вірус герпесу корів, модифікований живий респіраторно-синцитіальний вірус корів, та модифікований живий вірус парагрипу 3.

14. Спосіб отримання композиції, який полягає у змішуванні разом наступного:

А) гліколіпіду формули I;

В) спирту, де спиртом є HO-C<sub>1-3</sub>алкіл;

С) слабкої кислоти, де кількість слабкої кислоти є у молярному надлишку відносно вмісту гліколіпіду; та

Д) неіонної ПАР.

15. Спосіб отримання композиції, який полягає у змішуванні разом наступного:

А) гліколіпіду формули I;

В) спирту, де спиртом є HO-C<sub>1-3</sub>алкіл;

С) слабкої кислоти, де кількість слабкої кислоти є у молярному надлишку відносно вмісту гліколіпіду;

Д) неіонної ПАР; а тоді додавання

Е) придатного буферу.

Заявлений винахід стосується нових композицій гліколіпідних ад'ювантів, способів їх застосування та їх отримання. Нові композиції заявленого винаходу є стабільними протягом довгого часу без флокуляції. Вони є особливо корисними у виробленні різних медикаментів, охоплюючи вакцини.

Вакцини звичайно застосовують для захисту людей та тварин від інфекційних хвороб, викликаних бактеріями, вірусами та паразитами. Антигени, застосовувані у вакцинах можуть бути будь-яким рядом агентів, але звичайно складаються з вбитих патогенних організмів, патогенних організмів, котрі є живими, але модифікованими чи послабленими,

білків, рекомбінантних білків або їх фрагментів. Яким би не було джерело антигену, часто необхідно додавати ад'ювант для посилення імунної реакції хазяїна на антиген.

Ад'юванти застосовують для досягнення двох цілей: вони повільно вивільняють антигени з ділянок ін'єкції та стимулюють імунну систему.

Першим ад'ювантом представленим у літературі був повний ад'ювант Фрейнда (ПАФ). ПАФ містить емульсію вода-в-олії та екстракти мікобактерій. Екстракти мікобактерій забезпечують імуностимулювальні молекули у сирій формі. Емульсія вода-в-олії діє для створення ефекту депо, де антигени повільно вивільняються. На жаль ПАФ є погано толерантним і це може викликати неконтрольоване запалення. Після знаходження ПАФ протягом 80 років зроблено спроби зменшення небажаної побічної дії ад'ювантів.

Гліколіпідні аналоги, що містять новий клас сполук, що має властивості ад'ювантів є зараз відомими. Патент США №4,855,283, (далі '283') розкриває синтез аналогів гліколіпідів, охоплюючи N-глікозиламід, N-глікозилсечовини, N-глікозилкарбамати, а особливо: N-(2-дезоксид-2-лейциламіно-β-D-глюкотранозил)-N-октадецилдодеканамід ацетат (відомий як Bay R1005, O Lockhoff, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1991) 30:1611-1620. Сполуки, описані у патенті '283' є особливо придатними для застосування як ад'юванти.

Композиції гліколіпідних ад'ювантів повинні бути легкими для виробництва та стабільними при зберіганні протягом довгого періоду часу без флокуляції ліпиду. Неацетатні форми амідів або глікозиламідів гліколіпиду є дуже нерозчинними та звичайно флокулюють з розчину при зберіганні при кімнатній або нижчій температурі.

Розчини та ад'юванти, що містять глікозиламід, запропоновані тут, показують малу флокуляцію та є цілком стабільними. Вони є легкими для виробництва та їх можна отримувати у комерційному масштабі. Рідкі композиції гліколіпідних ад'ювантів можна застосовувати як розріджувач для отримання регідратованого ліофілізованого антигену, прискореного тестування стабільності є запропонованими також.

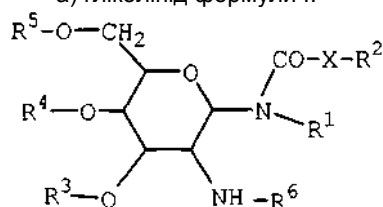
Цей винахід стосується композиції та способу створення або виробництва вихідного розчину глікозиламиду та розчин гліколіпідного ад'юванту. вихідного розчину глікозиламиду отримують розчиненням гліколіпиду формули 1 у спирті та комбінуванням цього з прийнятною кількістю слабкої кислоти плюс "неіонна" ПАР. Слабку кислоту додають до спиртового розчину гліколіпиду, у молярному надлишку слабкої кислоти відносно гліколіпиду. В одному втіленні гліколіпідом є N-(2-дезоксид-2-лейциламіно-β-D-глюкопіранозил)-N-октадецилдодеканоїламід гідроацетат. В одному втіленні спирт -етанол. В одному втіленні слабкою кислотою є оцтова кислота. В одному втіленні неіонні ПАР є різними сорбітанами (Span®) або поліоксіетиленсорбітанами (Tween®), зокрема, монолаурат сорбітанами (Span 20®) та монолаурат поліоксіетиленсорбітанами (Tween 20®). Розчин гліколіпідного ад'юванту отримують введенням прийнятною кількості вихідного розчину глікозила-

миду у "придатний буфер." pH кінцевих стабільних розчинів гліколіпідного ад'юванту, описаних тут, слід бути приблизно 6-8. Кінцевий pH приблизно 6-7 є кращим. Описано кінцевий pH приблизно 6,3-6,4. Високі концентрації солей гліколіпідного ад'юванту у надлишку 30мМ NaCl, слід усувати.

Ці два розчини представлені більш детально таким чином:

вихідний розчин глікозиламиду є композицією, що містить:

а) гліколіпід формули I:



де

R<sup>1</sup> - гідроген, або насичений алкіл, що має до 20 атомів карбону;

X- -CH<sub>2</sub>-, -O-або-NH-;

R<sup>2</sup> - гідроген, або насичений алкіл, що має до 20 атомів карбону;

R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, та R<sup>5</sup>, незалежно, - гідроген, -SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, -PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, -COC<sub>1-10</sub>алкіл;

R<sup>6</sup> - L-аланін, L-альфа-амінобутил, L-аргінін, L-аспарагінін, L-аспартил, L-цистеїніл, L-глутаміл, L-гліцил, L-гістидил, L-гідроксипропіл, L-ізолейцил, L-лейцил, L-лізил, L-метіоніл, L-орнітініл, L-фенілаланін, L-проліл, L-серил, L-треонін, L-тирозил, L-триптофаніл, та L-валіл або їх D-ізомери;

у формі солі, де сіль є похідною слабкої кислоти;

b) спирт, де спиртом є HO-C<sub>1-3</sub>алкіл;

c) слабку кислоту, де 1) слабка кислота є у молярному надлишку відносно вмісту гліколіпиду, та 2) будь-яка кислота, що має значення рКа приблизно 1,0-9,5, застосовуючи стандартні таблиці або значення; та

d) неіонну ПАР, де неіонна ПАР є агентом, що зменшує поверхневий натяг матеріалу, вона є розчинною та має один компонент, що є гідрофобним, та ще один компонент, що є гідрофільним.

Розчин гліколіпідного ад'юванту є композицією, що містить:

a) вихідний розчин глікозиламиду; та

b) придатний буфер, де буфер є прийнятним для ветеринарного або медичного застосування та може підтримувати відносно постійний pH у водному розчині приблизно 6,0-8,0.

Якщо не вказане інше, наступні терміни, застосовувані в описі та формулі винаходу, мають нижченаведені значення.

Термін "спирт" стосується сполук формули HO-C<sub>1-3</sub>алкіл. Це може бути метанол, етанол, або пропанол у будь-якій формі, як-то n-пропанол або ізо-пропанол. Етанол є кращим.

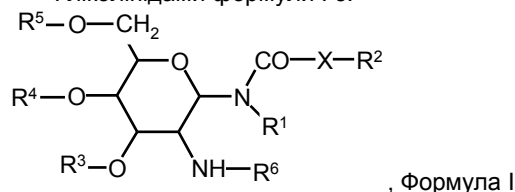
Термін "алкіл" стосується з насичених вуглеводневих груп лінійним та нелінійним ланцюгом.

Термін "гліколіпід" стосується сполук формули I нижче. Ці сполуки є описаними у патенті США №6,290,971, та патенті США №4,855,283, issued August 8, 1989. Патент США №6,290,971, та патент США №4,855,283 уведено тут як довідку. Глі-

коліпід, описаний тут особливо, коли є у формі ацетату має торгову назву Bay R1005®, та хімічну назву "N-(2-дезоксигексозил)-N-октадецилдодеканамід

ацетат" Амідна форма цієї сполуки має торгову назву Bay 15-1583® та хімічну назву "N-(2-дезоксигексозил)-N-октадецилдодеканамід."

Гліколіпідами формули I є:



де

R<sup>1</sup> - гідроген, або насичений алкіл, що має до 20 атомів карбону;

X - -CH<sub>2</sub>-, -O- або -NH-;

R<sup>2</sup> - гідроген, або насичений алкіл, що має до 20 атомів карбону;

R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, та R<sup>5</sup>, незалежно, - гідроген, -SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, -PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, або -COC<sub>1-10</sub>алкіл;

R<sup>6</sup> - L-аланін, L-альфа-амінобутил, L-аргінін, L-аспарагін, L-аспартил, L-цистеїн, L-глутаміл, L-гліцил, L-гістидил, L-гідроксипролін, L-ізолейцил, L-лейцил, L-лізил, L-метіоніл, L-орнітиніл, L-фенілаланін, L-пролін, L-серил, L-треоніл, L-тирозил, L-триптофаніл, та L-валіл або їх D-ізомери;

R<sup>2</sup> - гідроген, або насичений алкіл, що має до 20 атомів карбону;

R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, та R<sup>5</sup>, незалежно, - гідроген, -SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, -PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, або -COC<sub>1-10</sub>алкіл;

R<sup>6</sup> - L-аланін, L-альфа-амінобутил, L-аргінін, L-аспарагін, L-аспартил, L-цистеїн, L-глутаміл, L-гліцил, L-гістидил, L-гідроксипролін, L-ізолейцил, L-лейцил, L-лізил, L-метіоніл, L-орнітиніл, L-фенілаланін, L-пролін, L-серил, L-треоніл, L-тирозил, L-триптофаніл, та L-валіл або їх D-ізомери,

або їх фармацевтично прийнятна сіль.

Ще одне конкретне втілення описує гліколіпіди формули 1 де:

R<sup>1</sup> - гідроген, або насичений C<sub>12-18</sub>алкіл;

R<sup>2</sup> - гідроген, або насичений C<sub>7-11</sub>алкіл;

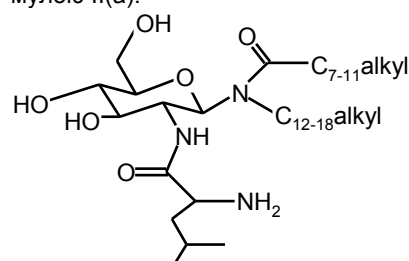
X - -CH<sub>2</sub>-

R<sup>4</sup>, та R<sup>5</sup>, незалежно, - гідроген;

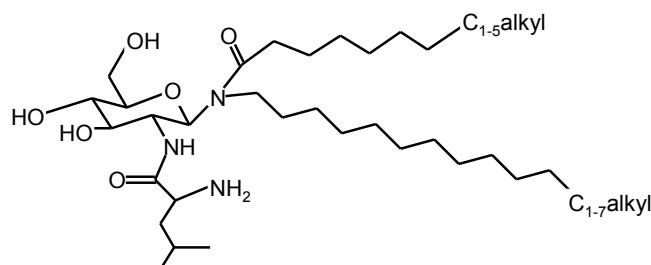
R<sup>6</sup> є вибраним з L-лейцилу;

Змінні для формули I є окремими та незалежними, а усі комбінації змінних тут описані та заявлені.

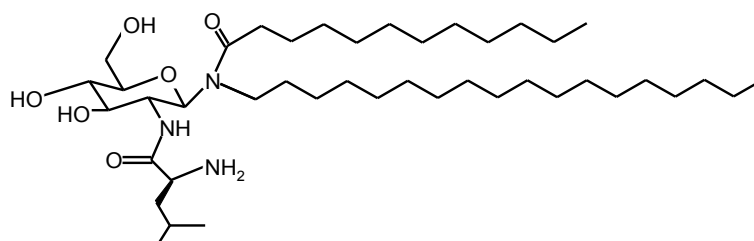
У ще одному втіленні гліколіпіди описані формулою II(a):



У ще одному втіленні гліколіпіди описані формулою II(b):



У ще одному втіленні гліколіпіди мають структуру формули III:



Сполука формули III може існувати у формі амиду або ацетату. Форма амиду цієї сполуки має торгову назву Bay 15-1583®. Форма ацетату має торгову назву Bay R1005®.

Гліколіпіди формули I можна зробити, застосовуючи наступні процедури з патенту США №4,855,283.

Як можна бачити з формули 1, сполуки згідно з винаходом є на основі заміщеної 2-аміно-2-дезоксигексози. Ці цукри є завжди N-глікозидазно зв'язаними через C-1, аномерний атом карбону з ациламідо-, карбамідо- або алкоксикарбоніламідо-групою



з вищезгаданими значеннями для  $R^1$ ,  $R^2$  та X.

2-аміногрупа аміноцукрів у сполуках згідно з винаходом, формули I, є амідно зв'язаною з α-амінокислотою або похідним α-амінокислоти.

Амінокислотами є природні L-амінокислоти, як-то гліцин, саркозин, гіпурова кислота, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, серин, треонін, цистеїн, метіонін, орнітин, цитрулін, аргінін, аспарагінова кислота, аспарагін, глютамінова кислота, глютамін, фенілаланін, тирозин, пролін, триптофан та гістидин. Також описаними є D-амінокислоти, як-то D-аланін, або амінокарбонові кислоти, як-то альфа-аміномасляна кислота, α-аміновалеріанова кислота, α-амінокапронова кислота або α-аміногептанова кислота, у D- та L-формі, що діють як замісники на аміноцукрі.

Способи отримання сполуки формули I є запропонованими також. Це стосується вихідних від 2-аміно-2-дезоксиглікопіранози похідних (формула IV), котрі є захищеними на аміногрупі,

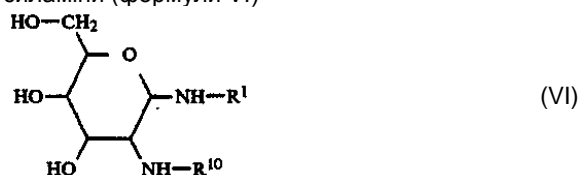


де  $R^{10}$  представляє захисну групу для захисту аміногрупи, котра є відомою з синтезу пептидів та може, де прийнятно, бути селективно усуненою.

Прикладами придатних захисних груп є ацил-групи, як-то трифлуорацетил або трихлорацетил, о-нітрофенілсульфеніл, 2,4-динітрофенілсульфеніл або необов'язково заміщені нижчі алкоксикарбонільні групи, як-то метоксикарбоніл, т-бутилоксикарбоніл, бензилоксикарбоніл, п-метоксибензилоксикарбоніл або 2,2,2-трихлоретилоксикарбоніл. Придатні N-захисні похідні аміно-гексоз є відомими. Наприклад, M. Bergmann та L. Zervas, Ber. 64, 975 (1931); D. Horton, J. Org. Chem. 29, 1776 (1964); P. H. Gross та R. W. Jeanloz, J. Org. Chem. 32, 2759 (1967); M. L. Wolfrom та H. B. Bhat, J. Org. Chem. 32, 1821 (1967); загально: J. F. W. McOmie (Editor). Prot. Prot. Groups. Org. Chem., Plenum Press (1973); Geiger in "The Peptides" Vol. 3, p 1-99, (1981) Academic Press; та література, цитована там). Кращими амінозахисними групами для отримання сполуки формули I є BOC (трет-бутилоксикарбоніл) або Z (бензилоксикарбоніл).

Блоковані похідні аміноцукру (IV) реагують, на першому етапі реакції, з амінами (формула V),  $\text{H}_2\text{N-R}^1$  (V)

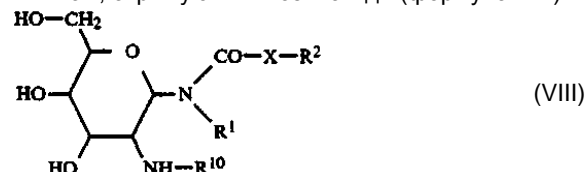
де  $R^1$  має вищезгадані значення, даючи глікозиламіни (формули VI)



Глікозиламіни цього типу є відомими (ELLIS, Advances in Carbohydrate Chemistry 10, 95 (1955)) та є конкретно описаними у DE-OS (German Published Specification) No.3,213,650.

На другому етапі реакції глікозиламіни (VI) реагують з придатними похідними карбонової кислоти (формула VII), як-то карбоксил галогеніди, або ангідриди карбонових кислот,  $\text{R}^{11}\text{-CO-CH}_2\text{-R}^4$  (VII)

$R^2$  має вищезгадані значення, а  $R^{11}$  представляє галоген як-то, наприклад, хлор, або представляє  $\text{-O-CO-R}^2$  з вищезгаданими значеннями для  $R^2$ , або представляє  $\text{-O-CO-O-}$  нижчий алкіл. Цим шляхом, отримують глікозиламід (формула VIII)



де  $R^1$  та  $R^2$  мають вищезгадані значення,  $R^{10}$  такий же, як  $R^6$ , а X представляє  $\text{-CH}_2\text{-}$

Умови для N-ацилювання цього типу є показаними у DE-OS (German Published Specification) No.3,213,650.

У кращому втіленні глікозиламіни формули VI реагують з одним - двома еквівалентами карбонільхлориду (формула VII) або з одним - двома еквівалентами змішаного ангідриду, котрий отримано з важливої карбонової кислоти  $\text{R}^2\text{-CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$  та етил хлороформіату або ізобутил хлороформіату, у присутності органічної допоміжної основи, способами, відомими з літератури, отримуючи глікозилформаміди VIII з  $\text{X}=\text{-CH}_2\text{-}$ .

Це проводять в органічних або водно-органічних розчинниках між  $0^\circ\text{C}$  та  $50^\circ\text{C}$ , де прийнятно, у присутності неорганічної або органічної основи. Придатними розріджувачами є спирти, як-то метанол, етанол, 1-пропанол або 2-пропанол, або етери, як-то діетил-етер, тетрагідрофуран або 1,4-діоксан, або галогеновані вуглеводні, як-то дихлорметан, трихлорметан або 1,2-дихлоретан, або N,N-диметилформамід.

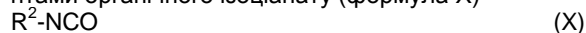
Коли глікозиламіни (VI), котрі отримують на першому етапі, реагують із галогеномурашинами естерами (IX)



$R^{12}$ - галоген як-то, наприклад, хлор або бром, а  $R^2$  має вищезгадані значення, тоді отримують глікозилкарбамати (VIII), X у формулі VIII представляє оксиген.

В одному втіленні глікозиламіни формули VIII реагують з одним - двома еквівалентами хлоркарбонового естеру IX, даючи глікозилкарбамат. Це переважно проводять в органічних або водно-органічних розчинниках при температурі між  $0^\circ\text{C}$  та  $50^\circ\text{C}$ , але особливо переважно при кімнатній температурі. Придатними розчинниками є спирти, етери, галогеновані вуглеводні або диметилформамід, як-то вищезгадані.

Коли глікозиламіни (VI), котрі отримують на першому етапі, реагують з одним - двома еквівалентами органічного ізоціанату (формула X)



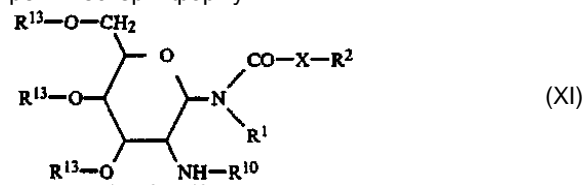
із  $R^2$ , що має вищезгадані значення, отримують глікозилсечовини формули VIII, а X -  $\text{-NH-}$ . Цю

реакцію ацилювання типу вищезгаданих реакцій переважно проводять в органічних розчинниках, з температурою реакції, що є -20-60°C, переважно 0-25°C. Придатними розчинниками є вищезгадані спирти, етери, галогеновані вуглеводні або диметилформамід.

Глікозиламід (формула VIII, X=-CH<sub>2</sub>-), глікозилкарбамати (формула VIII, X=-O-) або глікозилсечовини (формула VIII, X=-NH-), отримані цим шляхом виділяють у формі кристалічних або аморфних твердих продуктів відомими способами та, якщо необхідно, очищують стандартними процедурами, як-то перекристалізація, хроматографія, екстракція, тощо.

У багатьох випадках, також краще проводити паралельно або замість вищезгаданих етапів очистки хімічну дериватизацію, котра дає похідні глікозиламідів, карбаматів та сечовин формули VIII, котрі мають гарні властивості стосовно кристалізації. Хімічні дериватизації цього типу є, у випадку глікозиламідів, глікозилкарбаматів та глікозилсечовин згідно з винаходом, наприклад, реакціями естерифікації на гідроксильних групах залишків цукру. Приклади придатних естерних груп є ацетил, бензоїл або п-нітробензоїл.

Для отримання три-О-ацил-похідних глікозиламідів, глікозилсечовин або глікозилкарбаматів, відповідні триолі (Формул VIII) реагують із ацилювальними агентами у присутності неорганічних або органічних допоміжних основ. Придатними ацилювальними агентами є хлоридангідриди кислот, як-то ацетилхлорид, бензоїлхлорид або п-нітробензилхлорид, або ангідриди, як-то, наприклад, оцтовий ангідрид. Це призводить до утворення естерів формули XI



де R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>10</sup> та X мають вищезгадані значення, а

R<sup>13</sup> представляє ацетил, бензоїл або п-нітробензоїл.

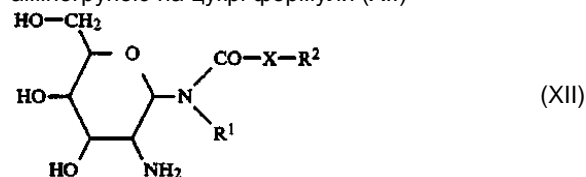
Реакції О-ацилювання переважно проводять в інертних органічних розчинниках, якими є галогеновані вуглеводні, як-то дихлорметан, трихлорметан або 1,2-дихлоретан, етери, як-то тетрагідрофуран, або 1,4-діоксан, естери, як-то етилацетат, та аміді, як-то диметилформамід.

Також можливо для органічних основ поодиноці, як-то триетиламін або піридин, бути придатними розчинниками. Основи, котрі можна застосовувати, є усі основами, застосовуваними в органічній хімії для О-ацилювання. Переважно, застосовують триетиламін, піридин або суміш піридин/4-диметиламінопіридин. Триестери (формула XI) можна легко кристалізувати з органічних розчинників. Особливо кращими для кристалізації є полярні розчинники, як-то коротко-ланцюгові спирти, як-то метанол, етанол, н-пропанол або ізопропанол. Іншими розчинниками, придатними для кристалізації триестерів (формула XI) є суміші органічних розчинників з полярними неорганічними або

органічними розчинниками, як-то тетрагідрофуран-метанол, тетрагідрофуран-вода, етанол-вода та ізопропанол-вода. Триестери (формула XI), котрі очищеними одиничною або, де прийнятно, багаторазовою перекристалізацією, повертають до триолів (формула VIII) гідролізом або трансестерифікацією трьох О-ацетил-груп. Різноманітність типів розщеплень естерів є відомими в органічній хімії. Для отримання триолів (формула VIII) з триестерів (формула XI) це можна зробити трансестерифікацією ацил-групи у присутності метанолу та каталітичної кількості натрій метаноляту, що є відомим як гідроліз ZEMPLÉN в органічній хімії.

Третій етап реакції при отриманні сполук формули I згідно з винаходом полягає у селективному відщепленні захисної групи 2-аміногрупи на цукрі у сполуках формули VIII. У цій реакції треба бути обережним, щоб не було одночасного усунення 1-амідо- або 1-карбамідо- або 1-(алкоксикарбоніламідо)-груп на цукрі у сполуках формули VIII.

Бензилоксикарбоніл-групу, котра є переважно застосовуваною, на С-2 аміногексанів можна кількісно та селективно відщеплювати, із збереженням 1-амідо-, 1-карбамідо- або 1-алкоксикарбоніламідогруп, в умовах гідрогенолізу. Цей гідрогеноліз забезпечує глікозиламіді, глікозилсечовини або глікозилкарбамати з вільною 2-аміногрупою на цукрі формули (XII)



з вищезгаданими значеннями для R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> та X.

Приклади придатних каталізаторів для гідрогенолізу є благородні метали, як-то платина або паладій на активованому вугіллі. Паладій/активоване вугілля (5% або 10%) є застосовуваним переважно. Гідрогеноліз можна проводити під атмосферним тиском або підвищеним тиском у придатній герметичній посудині. Інертні розчинники є придатними для гідрювання, як-то, наприклад, спирти, як-то метанол, етанол, або пропанол, етери, як-то тетрагідрофуран або 1,4-діоксан, або карбонові кислоти, як-то оцтова кислота, або їх суміші. Де прийнятно, розчинником є змішуванням з водою або розбавленими кислотами, як-то хлоридна кислота або сульфатна кислота. Безумовно, коли так кислоти додають, 2-аміно-2-дезоксиглікозиламіді, -карбамати та -сечовини формули XII отримують як солі амонію цих кислот. Т-бутилоксикарбонільну захисну групу, котра є подібно переважно застосовуваною у сполуках формули VIII, можна відщеплювати способами, відомими з літератури, застосовуючи мінеральні кислоти, як-то хлоридна кислота або сульфатна кислота. У цьому випадку також, 2-аміно-2-дезоксиглікозиламіді, -карбамати та -сечовини формули XII селективно отримують як солі амонію кислот, застосовуваних для розщеплення.

Четвертий етап реакції для синтез сполук формули I, згідно з винаходом, полягає у зв'язуванні аміноглікозил-амідів, амідів, -карбаматів або сечовин формули XII, або їх солей, з придатним

амінокислотним похідним. Придатні амінокислотні похідні є N-блокованими амінокислотами (формула XIII)

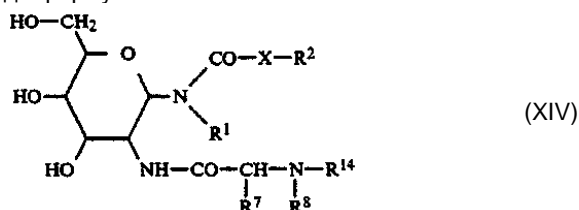


з  $\text{R}^7$ , що має вищезгадане значення,  $\text{R}^8$  представляє гідроген або метил, а  $\text{R}^{14}$  представляє захисну групу, котру звичайно застосовують у синтезі пептидів та котру можна селективно усувати знов, залишаючи пептидний зв'язок.

Захисні групи для аміногруп у формулі XIII, котрі є переважно застосовуваними є вищезгаданими, а бензилоксикарбоніл- або т-бутилоксикарбоніл-групи є особливо кращими. Зв'язування 2-аміно-2-дезоксиглікозиламіду, -карбамату або -сечовини формули XII з амінокислотним похідним формули XIII можна проводити звичайними способами синтезу пептидів (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/1 and XV/2, 4th Edition, published by Thieme, Stuttgart (1974).

Прикладами звичайних способів є конденсація аміногрупи у сполуці формули XII із амінокислотним похідним формули XIII у присутності водовіднімальних агентів, наприклад, дициклогексилкарбодііміду або діізопропілкарбодііміду.

Конденсацію сполук формули XII із сполуками формули XIII можна також проводити, коли карбоксильна група є активованою. Можливою активованою карбоксильною групою є, наприклад, ангідрид кислоти, переважно змішаний ангідрид, як-то ацетангідрид кислоти, або амід кислоти, як-то імідазолід, або активований естер. Прикладами активованих естерів є ціанометиллові естери, пентахлорфеніл-естери, та N-гідроксифталімідні естери. Активовані естери можна також отримувати з кислот (формула XIII) та N-гідроксисукциніміду або 1-гідроксibenзотіазолу у присутності водовіднімального агента, як-то карбодіімід. Похідні амінокислот є відомими та їх можна отримувати відомим чином. Конденсація аміносполуки формули XII із необов'язково активованими карбоксильними сполуками формули XIII забезпечує пептидогліколіпіди формули XIV.

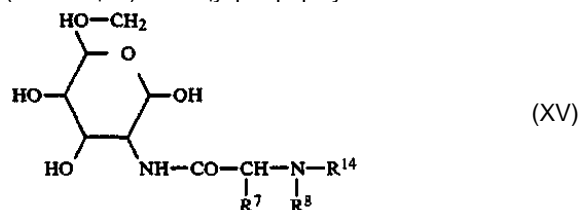


з вищезгаданими значеннями для  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^7$ ,  $\text{R}^8$ ,  $\text{R}^{14}$  та X.

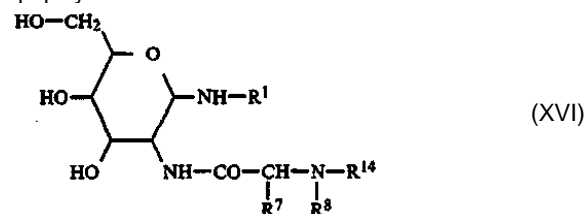
На кінцевому етапі способу отримання сполуки формули I, усувають захисну групу  $\text{R}^{14}$  у сполуках формули XIV. Треба бути обережним на цьому етапі, щоб інші амідні, уретанові або сечовинні групи у сполуках формули XIV не були відщепленими. Захисні групи  $\text{R}^{14}$ , котрі є переважно застосовуваними у сполуках формули XIV, N-карбобензоксигрупа та N-трет-бутилоксикарбоніл-група, можна усувати, утримуючи амідні, уретанові

або сечовинні групи. Карбобензоксигрупу можна селективно усувати гідрогенолізом у присутності благородного металу як-то, наприклад, паладій на активованому вугіллі, у придатному розчиннику, як-то етанол, метанол, льодяна оцтова кислота або тетрагідрофуран. Розчинники можна застосовувати як чисті розчинники або комбіновані один з одним або з водою. Реакцію можна проводити під атмосферним тиском або під підвищеним тиском. Трет-бутилоксикарбоніл  $\text{R}^{14}$  у сполуках формули XIV можна усувати ацидолітичними способами. Прикладами придатних умов застосування гідрогенхлориду у придатних розчинниках як-то, наприклад, льодяна оцтова кислота, діетил-етер, діоксан або етилацетат, при кімнатній температурі. Способи цього типу для відщеплення т-бутил карбаматів є відомими. Пептидоглікозиламіди, -карбамати та -сечовини формули I, котрі отримують таким чином, виділяють у формі кристалічних або аморфних твердих продуктів, відомими способами, та якщо необхідно, очищають стандартними способами, як-то перекристалізація, хроматографія, екстракція тощо.

Сполуки згідно з винаходом, формули I, можна також отримувати другим шляхом синтезу з подібними гарними результатами. Цей другий шлях синтезу відрізняється від першого, що є описаним вище, тим, що послідовність зв'язування синтонів амінокислоти аміноцукру, аміну  $\text{R}^1-\text{NH}_2$  та карбонової кислоти  $\text{R}^2-\text{CH}_2-\text{CO}_2-\text{H}$ , або похідного карбонової кислоти  $\text{R}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{anoreH}$ , чи  $\text{R}^2-\text{NCO}$ , з вищезгаданими значеннями  $\text{R}^1$  та  $\text{R}^2$ , є різними. У цьому другому шляху придатні 2-N-(аміноацил)аміноцукри формули XV



з вищезгаданими значеннями для  $\text{R}^7$  та  $\text{R}^8$ , та, де  $\text{R}^{14}$  представляє амінозахисну групу, відому у хімії пептидів, переважно бензилоксикарбоніл або т-бутилоксикарбоніл, застосовують як вихідний компонент. Сполуки формули XV, котрі таким чином отримують, тоді конденсують із аміносполуками формули III, отримуючи глікозиламіни загальної формули XVI



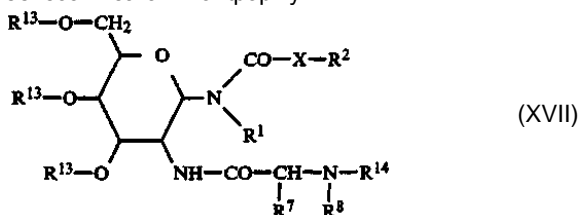
з  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^7$ ,  $\text{R}^8$  та  $\text{R}^{14}$ , що мають значення, відповідні формулі I та визначенню  $\text{R}^6$ .

Усі описані вище способи отримання сполук загальної формули VI можна застосовувати для отримання сполук загальної формули XVI. Сполуки формули XVI тоді реагують з вищезгаданими похідними карбонових кислот (формула VII) або з галогеномурашиними естерами (формула IX) або



з органічними ізоціанатами (формула X), даючи 2-(аміноацил)-аміноглікозиламід формули XIV (з  $X=-CH_2-$ ), або -карбамати формули XIV (з  $X=-O-$ ), або -сечовини формули XIV (з  $X=-NH-$ ). Ці реакції ацилювання можна загалом проводити описаними вище способами для реакції глікозиламідів з похідними карбонових або карбонатної кислот.

Інтермедіати (формула XIV), котрі отримують цим шляхом, можна очищати вищезгаданим фізичним способом очистки. Однак, краще перетворювати сполуки формули XIV, описаними вище способами О-ацилювання у три-О-ацетати або три-О-бензоати загальної формули XVII



зі значеннями змінних відповідними формулі 1.

Ці сполуки можна легко кристалізувати, переважно з полярних розчинників, як-то метанол або етанол, та таким чином очищати. Очищені кристалічні похідні формули XVII тоді перетворюють у триоли формули XIV вищезгаданими способами гідролізу естерів, котрі є широко застосовуваними, особливо у хімії цукрів. Кінцеве усунення захисних груп у амінокислот у сполуках формули XIV вже описано вище для отримання сполук формули I. Винахід також стосується солей сполук формули I. Ними є перед усім нетоксичні солі, котрі можна звичайно застосовувати у фармацевтиці, наприклад, хлориди, ацетати та лактати, або інертні солі сполук формули I.

Термін "слабка кислота" означає будь-яку кислоту, що має значення  $pK_a$  ( $-\log K_a$ ) приблизно 1,0 - 9,5, застосовуючи стандартні таблиці або значення. Без обмеження рамок винаходу, наступні приклади слабких кислот, є описаними з назвою, формулою, та приблизним  $pK_a$ . Оцтова кислота,  $H(C_2H_3O_2)$  ( $pK_a$  4,76); аскорбінова кислота(1),  $H_2(C_6H_6O_6)$  ( $pK_a$  4,10); ацетилсаліцилова кислота,  $H_8(C_9O_4)$ , ( $pK_a$  3,5,); бутанова кислота  $H(C_4H_7O_2)$  ( $pK_a$  4,83); карбонатна кислота,  $H_2CO_3$ , ( $pK_a$  4,83 форма 1); хромовая кислота,  $HCrO_4^-$ , ( $pK_a$  6,49 форма 2); лимонна кислота,  $H_3(C_6H_5O_7)$ , ( $pK_a$  3,14 форма 1); лимонна кислота,  $H_2C_6H_5O_7^-$ , ( $pK_a$  4,77 форма 2); лимонна кислота,  $(HC_6H_5O_7)^-$ , ( $pK_a$  6,39 форма 3); мурашина кислота,  $H(CHO_2)$ , ( $pK_a$  3,75); фумарова кислота,  $H_4(C_4O_4)$  ( $pK_a$  3,03); гептанова кислота,  $H(C_7H_{13}O_2)$ , ( $pK_a$  4,89); гексанова кислота,  $H(C_6H_{11}O_2)$ , ( $pK_a$  4,84); флуоридна кислота,  $HF$ , ( $pK_a$  3,20); ізолимонна кислота,  $H_8(C_6O_7)$  ( $pK_a$  3,29); молочна кислота,  $H(C_3H_5O_3)$ , ( $pK_a$  3,08); малеїнова кислота,  $H_4(C_4O_4)$  ( $pK_a$  1,83); ніотинова кислота,  $H_5(C_6NO_2)$ , ( $pK_a$  3,39); щавлева кислота,  $H_2(C_2O_4)$ , ( $pK_a$  1,23 форма 1); щавлева кислота,  $(HC_2O_4)^-$ , ( $pK_a$  4,19 форма 2); пентанова кислота,  $H(C_5H_9O_2)$ , ( $pK_a$  4,84); фосфатна кислота,  $H_3PO_4$ , ( $pK_a$  2,16 форма 1); пропанова кислота,  $H(C_3H_5O_2)$ , ( $pK_a$  4,86); піровиноградна кислота,  $H_4(C_3O_3)$  ( $pK_a$  2,39); бурштинова кислота  $H_6(C_4O_4)$  ( $pK_a$  4,19) та трихлороцтова кислота,  $H(C_2Cl_3O_2)$  ( $pK_a$  0,70). Будь-які комбінації цих кислот є прикладами також.

Оцтова кислота є кращою. Ацетилсаліцилова кислота, лимонна кислота, мурашина кислота, фумарова кислота, флуоридна кислота, ізолимонна кислота, малеїнова кислота, ніотинова кислота, фосфатна кислота, піровиноградна кислота, бурштинова кислота та трихлороцтова кислота є більш загальними слабкими кислотами, що застосовують індивідуально, у комбінації та як сукупність.

Термін "неіонна ПАР" означає ПАР, котра є речовиною, що зменшує поверхневий натяг матеріалу, вона є розчинною, а неіонна означає, що вона має полярну групу, що не є електрично зарядженою. Термін амфіфільна ПАР означає ПАР, де частина молекули ПАР є гідрофобною, а частина є гідрофільною. Придатні ПАР повинні бути неіонними та амфіфільними та прийнятними для ветеринарного або медичного застосування. Будь-які або не певні неіонні ПАР, що є прийнятними для ветеринарного або медичного застосування, можна легко визначати фахівцями. Є багато придатних неіонних ПАР, що можна застосовувати згідно з цим винаходом та запропонованими нижче прикладами.

Два добре відомих типи неіонних ПАР застосовані тут. Вони є відомими як сорбітани, звичайно під торговою маркою Span®, та поліоксіетиленсорбітани, звичайно під торговою маркою Tween®. Особливо застосованими тут є:

Сорбітан монолаурат (Span 20®), сорбітан монопальмітат (Span 40®), сорбітан моностеарат (Span 60®), сорбітан тристеарат (Span 65®), сорбітан моноолеат (Span 80®), сорбітан триолеат (Span 85®), поліоксіетиленсорбітан монолаурат (Tween 20®), поліоксіетиленсорбітан монопальмітат (Tween 40®), поліоксіетиленсорбітан моностеарат (Tween 60®), поліоксіетиленсорбітан моноолеат (Tween 80), та поліоксіетиленсорбітан триолеат (Tween 85). Ці описи охоплюють торгові марки інгредієнтів, або еквівалентних інгредієнтів. ПАР можна застосовувати індивідуально або у будь-якій комбінації.

Сорбітан монолаурат (Span 20®), поліоксіетиленсорбітан монолаурат (Tween 20®), сорбітан моноолеат (Span 80®), сорбітан триолеат (Span 85®), поліоксіетиленсорбітан моноолеат (Tween 80), поліоксіетиленсорбітан триолеат (Tween 85) є описаними особливо.

Термін "придатний буфер" означає буфер, що є придатним для ветеринарного або медичного застосування та може підтримувати відносно постійний рН у водному розчин приблизно 6-8. Фосфатні буфери є одним втіленням, описаним тут. Фосфатні буфери можна зробити з рН у широких межах змішуванням одноосновного та двоосновного натрій фосфатів та/або калій фосфатів у різних пропорціях. Створення та застосування різних буферів є добре відоме фахівцю.

Інші приклади буферів:

2-(N-морфоліно) етансульфонова кислота (також відома як МЕС);

3-(N-морфоліно) пропансульфонова кислота (також відома як МПС);

n-[трис(гідроксиметил)]-2-аміноетансульфонова кислота (також відома як ТЕС);

4-(2-гідроксietил)піперазин-1-етансульфонова кислота (також відома як ГЕПЕС);

[трис(гідроксиметил)метил]гліцин (також відомий як ТРИС).

Частина I. Отримання розчинів.

Новими композиціями, розкритими тут є 1) вихідні розчини глікозиламідів та 2) розчини гліколіпідного ад'юванту.

1) Вихідний розчин глікозиламиду отримують розчиненням гліколіпиду у спиртї та комбінуванням прийнятної кількості слабкої кислоти. Слабку кислоту додають до спиртового розчину гліколіпиду у молярному надлишку слабкої кислоти відносно гліколіпиду. Неіонну ПАР додають до суміші гліколіпід-спирт-кислота для створення вихідного розчину глікозиламиду. Гліколіпідом є N-(2-дезоксиглюкопіранозил)-N-октадецилдодеканоїламід ацетат. Спирт - етанол. Слабкою кислотою є оцтова кислота. Неіонні ПАР описані вище.

Отримання вихідних розчинів глікозиламідів.

Слабку кислоту додають до спиртового розчину з вмістом гліколіпиду. Слабку кислоту додають у молярному надлишку відносно вмісту гліколіпиду. Слабку кислоту слід додавати у кількості від 1,25 до 5 молярних еквівалентів відносно гліколіпиду. У деяких втіленнях рекомендовані наступні відносні кількості кислоти. Слабкій кислоті слід бути у 2,0 рази, 2,5 рази, 2,7 рази, 3,0 рази та 5,0 разів, а найкраще у 2,7 рази більше за молями кислоти, ніж молей гліколіпиду.

Неіонну ПАР додають до суміші спирт-гліколіпід, перед або після добавки слабкої кислоти для створення кінцевого вихідного розчину глікозиламиду.

У присутності слабкої кислоти, глікозиламід перетворюється в ацетатну форму гліколіпиду. Гліколіпід формули I не є повністю розчинними при введенні безпосередньо у буферовані водні розчини. Розчин, звичайно отриманий від розчинення гліколіпиду формули I у буферованому водному розчині є молочною сумішшю. Попередні дослідники намагалися отримати такі розчини гомогенних сумішей обробкою ультразвуком молочного розчину. Однак, обробка ультразвуком не гарантує, що розчин залишається гомогенним при зберіганні. Хімічний підхід до суспендування цих сполук призводить до повністю розчинного майже оптично прозорого розчину водного буферованого гліколіпиду при прийнятному рН. Коли слабку кислоту додають у надлишку у порівнянні з гліколіпідом, це гарантує, що усі гліколіпідні молекули перетворюються у розчинну форму, та їх повернення назад до нерозчинної форми є попередженням.

Слабка кислота перетворює гліколіпід у фармацевтично прийнятну сіль. Кращими солями є нетоксичні солі, котрі звичайно застосовують у фармацевтичних та біологічних препаратах. Наприклад, хлориди, ацетати, лактати та інертні солі сполук формули I, отримують зі слабких кислот, описаних тут.

Спиртами, застосовуваними для розчинення гліколіпиду, можуть бути метанол, етанол, будь-які ізомери пропанолу, або будь-яка їх комбінація. Утворений спиртовий розчин гліколіпиду повинен бути оптично прозорим. Будь-яка хімічна реакція,

що може перетворювати ацетат гліколіпиду назад до неацетатної форми, може викликати флокуляцію гліколіпідів у водному розчині. Коли відбувається флокуляція гліколіпиду, молекули гліколіпиду виходять з розчину як тонкі пластівці, осідаючи на дно ємності.

Початкова концентрація слабкої кислоти у вихідному розчині глікозиламиду гліколіпиду та спирт визначають, чи буде флокуляція гліколіпиду. Слабка кислота повинна бути у молярному надлишку відносно гліколіпиду для запобігання флокуляції.

2) розчини гліколіпідного ад'юванту отримують введенням прийнятної кількості вихідного розчину глікозиламиду у "придатний буфер." рН описаних тут кінцевих стабільних розчинів гліколіпідного ад'юванту повинен бути приблизно 6-8. Кінцевий рН приблизно 6 - 7 є кращим. Кінцевий рН є приблизно 6,3-6,4.

Вихідний розчин глікозиламиду містить надлишок кислоти та повинен бути буферованим для застосування як ад'юванту. Наприклад, фосфатний буфер можна зробити при певних рН у широких межах змішуванням одноосновних та двоосновних солей натрій фосфат або калій фосфат у різних пропорціях. Якщо застосовують фосфатний буфер, його можна зробити приблизно при 20мМ, та він має рН приблизно 7,8. Коли вихідний розчин глікозиламиду додають до буферу, рН буферу знижується. Буферований фосфатом розчин при рН7,8 призводить до кінцевого розчину гліколіпідного ад'юванту з рН приблизно 6,4. Кінцеве доведення рН можна зробити, але звичайно не необхідне.

Вихідний розчин глікозиламиду з вмістом слабкої кислоти та гліколіпиду має дуже низький рН. Може бути необхідним доведення рН до прийнятного рівня. Сильна основа не підходить для цього, оскільки добавка сильної основи може перетворювати сольову форму гліколіпиду назад до несольової форми, призводячи до осадження (флокуляції) несольової форми у водному середовищі. Однак, якщо є бажаною сильна основа, слід застосовувати тільки невеликі кількості. Наприклад, рекомендують застосовувати не більше, ніж 100мМ NaOH, тоді як 4,0мМ або менше є оптимальними.

Буферувальний розчин може необов'язково містити трохи NaCl, але це не є потрібним. Концентрації NaCl може бути приблизно 1 - 50мМ. Нижчі концентрації NaCl є кращими. Приклади тут не мають NaCl або мають 15мМ NaCl. 100мМ NaCl не є придатним, оскільки відбувається флокуляція. Жодної флокуляції не очікують з концентраціями NaCl 15мМ або менше. Жодної флокуляції не очікують з концентраціями NaCl 30мМ або менше. Жодної флокуляції не очікують з концентраціями NaCl 50мМ або менше.

Частина II. Характеристика розчину гліколіпідного ад'юванту.

Стабільність розчину гліколіпідного ад'юванту при зберіганні можна відстежувати простим візуальним спостереженням або застосуванням прийнятих аналітичних приладів. Молекули гліколіпиду утворюють міцели у водному розчині та можливо точно визначати розмір міцел лазерним дифрактометром. Такий вимір можна застосовувати для

визначення будь-якої флокуляції молекул гліколіпиду.

Альтернативний підхід до виміру стабільності у реальному часі полягає у прискореному тестуванні стабільності. У прискореному тестуванні стабільності ад'ювантний розчин піддають дії до температури приблизно 37°C протягом приблизно 7 діб, а потім інкубують приблизно при 4°C протягом приблизно двох діб при постійному струшуванні. Інкубування приблизно при 37°C протягом приблизно 7 діб представляє зберігання приблизно при 4°C протягом приблизно одного року. Інкубування приблизно при 4°C протягом приблизно двох діб з постійним струшуванням представляє напружений стан розчину гліколіпідного ад'юванту при транспортуванні.

Для визначення, чи є розчин гліколіпідного ад'юванту ізотонічним з цитоплазмою, можна визначати осмолярність. Різні концентрації натрій хлориду можна додавати та осмолярність утвореного розчину визначати, застосовуючи осмометр. Збільшення концентрації натрій хлориду, окрім збільшення осмолярності також стимулює помутніння. Мутність, як вважають, є викликаного агрегуванням міцел у більші частинки. Розчини, що важко або неможливо фільтрувати, застосовуючи фільтр 0,2 мкм є загалом не прийнятними для комерційного застосування, оскільки кінцеве фільтрування є часто застосовуваним для гарантування стерильності ад'ювантних розчинів, отриманих у комерційному масштабі. Електронний мікроскопічний аналіз можна застосовувати для визначення, чиє агрегування міцел результатом кількості солі.

Додаткові негліколіпідні ад'юванти можна застосовувати у розчині гліколіпідного ад'юванту у комбінації з описаними вище. У ще одному втіленні винаходу додаткові імуностимулявальні молекули додають до розчину гліколіпідного ад'юванту. Імуностимулявальні молекули є добре відомими у рівні техніки та охоплюють сапоніни, Quil A, диметилдіоктадециламоній бромід (DDA) та Карбопол.

Quil A є очищеним екстрактом кори південно-американського дерева *Quillaja saponaria*. Quil A індукує гуморальні та опосередковані клітинами реакції. Quil A є часто застосовуваним з холестерин, оскільки холестерин усуває менш бажану побічну дію, коли є доданням у прийнятних пропорціях. Холестерин утворює нерозчинні комплекси із Quil A, що утворюють спірального типу структури, оскільки холестерин зв'язується з Quil A, таким чином оголюючи елементи молекул цукру, що допомагають стимулювати імунну реакцію.

Диметилдіоктадециламоній бромід, DDA, є катіонною ПАВ з алкіл-ланцюгами з 18 атомів карбону. Він є амфифільним четвертинним аміном. Безпосередня взаємодія DDA та антигену є необхідною для отримання оптимальної імунної реакції, оскільки функції DDA як носія антигену безпосереднім зв'язуванням антигену на поверхні розділу олія/вода. Це стимулює гуморальні та опосередковані клітинами імунні реакції.

Карбопол є ще одним корисним імуностимулявальним засобом, що можна застосовувати згідно з цим винаходом. Він є гомополімером ак-

рилової кислоти, що є перехресно зв'язаним із поліалкеніл-етером.

Частина III. Застосування розчину гліколіпідного ад'юванту.

Розчин гліколіпідного ад'юванту у фармацевтично прийнятній сольовій формі, можна змішувати з антигеном. Зручні антигени охоплюють: білки, глікопротеїни, ліпопротеїни, пептиди, глікопептиди, ліпопептиди, токсосоїди, вуглеводи мікробних патогенів, та специфічні антигени пухлин. Антіантиген може бути похідним з багатьох джерел. Антіантигени від мікробних патогенів стосується хвороб, що спричиняють бактерії, віруси, та паразити. Суміші двох або більш антигени можна застосовувати. Антиген може бути вбитим, природним послабленим, модифікованим живим, або білковим екстрактом, рекомбінантно продукованим білком, хімічно синтезованим пептидом або будь-чим, що стимулює імунну реакцію. Пептидний антиген може бути вільним пептидом або кон'югованим з гліколіпідом або кон'югованим з іншими відомими епітопами В-клітин або Т-клітин.

Стабільний розчин гліколіпідного ад'юванту можна комбінувати із додатковими ад'ювантами або компонентами, котрі є відомими як такі, що мають властивості ад'юванту. Додаткові ад'юванти, що можна комбінувати з розчином гліколіпідного ад'юванту, охоплюють полімери, природно існуючі терпеноїдні сполуки у їх сирій або частково очищених формі, амфифільні четвертинні аміни, похідні стінок бактеріальних клітин та синтетичні аналоги стінок бактеріальних клітин або компоненти ДНК. Розчин гліколіпідного ад'юванту можна застосовувати разом або комбінованим з одним або більше агентами, як-то антибіотики або різні антигени. Бактеріальні або вірусні антигени можуть бути вбитими, чи модифікованими живими. Вбиті вірусні антигени отримують вирощуванням вірусів у культурі тканин та інактивуванням вірусів хімічною обробкою. Деякі віруси можна вирощувати в ембріонах яєць. Вбитий вірусний антиген можна додавати до розчину з вмістом розчину гліколіпідного ад'юванту, а утворений розчин можна застосовувати для вакцинації тварини для досягнення захисту проти вірусної інфекції.

В одному втіленні цього винаходу, розчин гліколіпідного ад'юванту можна застосовувати як розріджувач для модифікованих живих вірусних антигенів. Вірусні патогени можуть бути послабленими у вірулентності їх пасажуванням у культурі тканин протягом кількох генерацій або певними маніпуляціями з вірусним геномом. Такі послаблені штами вірусів можна вирощувати до дуже високих титрів у культурі тканин та можна застосовувати як вакцинні антигени. Послаблені вірусні штами позначені як модифіковані живі вірусні антигени. Тоді як ці штами є менш вірулентними, вони є ще високо імуногенними при застосуванні як антигенів у вакцині та дають захист проти інфекції вірулентними штамами. Слід застосовувати розчин гліколіпідного ад'юванту як розріджувач для антигенів модифікованого живого вірусу, розчин гліколіпідного ад'юванту слід тестувати для гарантії, що це не матиме будь-якого віруліцидного впливу на конкретний розглянутий вірус.

Віруліцидну властивість розчину гліколіпідного ад'юванту стосовно антигенів модифікованого живого вірусу можна визначати у дослідженні *in vitro*. Ліофілізовані вірусні антигени регідратують розчином гліколіпідного ад'юванту або водою. Утворені розчини вірусу поміщають на моношар пермісивних клітин. Титр вірусного антигену визначають підрахунком числа утворених на моношарі бляшок. Відмінність отриманих вірусних титрів між зразками, регідратованими водою та розчином гліколіпідного ад'юванту, можна застосовувати для визначення, чи є будь-який віруліцидний вплив розчину гліколіпідного ад'юванту на будь-який живий вірус.

Антигени модифікованого живого вірусу можуть бути ліофілізованими та запропонованими як ліофілізовані брикети при отриманні комерційних вакцин. Загалом ці ліофілізовані брикети антигенів модифікованого живого вірусу регідратують розчином розріджувачу та застосовують для парентеральної вакцинації. Приклади розріджувачів охоплюють водний розчин з вмістом буферованого фосфатом фізіологічного розчину. Якщо розріджувальний розчин містить відомі імуностимулявальні молекули, ефективність вакцинації антигенами модифікованого живого вірусу може бути поліпшеною. В одному втіленні заявленого винаходу розчин гліколіпідного ад'юванту застосовують як розріджувальний розчин.

Приклади

Приклад 1. Отримання нерозчинної композиції глікозиламідів з однаковою концентрацією Bay 15-5831® та оцтової кислоти.

Таблиця 1

Композиція, не придатна  
для комерційного застосування

Реагент	Кількість (200мл)
Етанол (100%)	176,1мл
Tween 20	4,0мл
Льодяна оцтова кислота	1,5мл
Bay 15-5831®	18,4г

Bay 15-5831® є зареєстрованим Bayer Company, під торговою назвою N-(2-дезоксид-2-Л-

лейциламіно-β-D-глюкопіранозил)-N-октадецилдодеканоїламід. Коли цю сполуку застосовують для отримання ад'ювантного розчину, застосовуючи композиції, описані у таблиці 1 вище, де оцтову кислоту застосовують в однаковій молярній концентрації з гліколіпідом, а гліколіпід є у формі вільної основи, гліколіпід є нерозчинним та флокулює.

Приклад 2. Розчинний вихідний розчин глікозиламідів, застосовуючи ті ж компоненти як у прикладі 1, але зі збільшенням концентрації оцтової кислоти відносно концентрації гліколіпідів, призводить до розчинного вихідного розчину глікозиламідів.

Таблиця 2

Композиція вихідного розчину глікозиламідів

Реагент	Кількість (50мл)
Етанол (60об.%)	44,64мл
Tween 20	1,12мл
Льодяна оцтова кислота	0,68мл
Bay 15-5831®	3,49г

Тут застосовували 60об.% етанол, а молярне співвідношення оцтової кислоти з гліколіпідом є 2,0. 200-нормативний етанол прикладу 1 заміняли сумішшю 60% етанол-вода. Утворений вихідний розчин глікозиламідів був оптично прозорим та не осаджувався на дні ємності. Це вихідний розчин глікозиламідів додають до різних буферів для отримання розчину гліколіпідного ад'юванту у прикладі 3, нижче.

Приклад 3. Отримання розчинів гліколіпідного ад'юванту. Були отримані розчини фосфатного буферу при різних рН. 2М вихідний розчин одноосновного натрій фосфату було отримано розчиненням 138 грамів  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  у 250мл ДІ води при кінцевому об'ємі 500мл. Подібно 2М вихідний розчин двоосновного натрій фосфату було отримано розчиненням 142 грам  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  у 300мл ДІ води при кінцевому об'ємі 500мл. Обидва вихідні розчини стерильно фільтрували, застосовуючи фільтр 0,2 мікрон.

Таблиця 3

Композиції 1М вихідного розчину натрій фосфатного буферу при різних рН

Розраховано рН	Розчин $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (мл)	Розчин $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (мл)	Загальний об'єм 2М вихідного розчину (мл)	Стерильна ДІ вода (мл)	Загальний об'єм 1М вихідного розчину (мл)
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

Різні об'єми 2М вихідних розчинів одноосновного натрій фосфату та двоосновного натрій фосфату, як показано у таблиці 3 отримували, тоді 1М вихідні розчини натрій фосфатного буферу отримували при різних рН. 1М розчини фосфатного

буферу тоді розбавляли 50X для отримання 20мМ фосфатних буферів.

Розчини гліколіпідного ад'юванту отримували, застосовуючи ці вихідні буфери та вихідні розчини глікозиламідів з прикладу 2.

До 96мл кожного з цих 20мМ розчинів фосфату додавали 5мл вихідного розчину глікозиламідів, отриманого у прикладі 2. Утворений розчин гліколіпідних ад'ювантів містив 12,5мМ оцтової кислоти та 6,33мМ гліколіпідів. Гліколіпід є зараз у формі ацетату.

Приклад 4. Значність кінцевого рН розчину гліколіпідного ад'юванту.

У ще одному з експериментів, значність кінцевого рН різних розчинів тестували для оцінювання, як рН впливає на флокуляцію. 20мМ фосфатний буфер отримували при початковому рН7,8. Таблиця 4 показує отриманий гліколіпідний ад'ювант, застосовуючи глікозиламід, отриманий як у прикладі 1, де гліколіпід та оцтову кислоту застосовували в однаковій молярній концентрації. Зауваження, кінцевий рН не знижувався дуже сильно (Таблиця 4), показуючи ефективність буферу. Концентрації NaCl варіювали. Зчитування оптичної

густини (О.Г.) при 600нм, у таблиці 4 порівнювали з подібними зчитуваннями у таблиці 5, де розчини гліколіпідного ад'юванту отримували із вихідними розчинами глікозиламідів з вмістом удвічі більшого молярного співвідношення оцтової кислоти з гліколіпідом, ніж отриманого у прикладі 2. Застосування більшої концентрації або кількості оцтової кислоти призводить до мінімальної флокуляції. Флокуляція була вищою у нефільтрованому зразку, ніж у фільтрованих зразках. Більш того, зі збільшенням концентрації NaCl, є збільшення флокуляції та навіть осадження. Розчин гліколіпідного ад'юванту, описаний у таблиці 5, отримували з фосфатним буфером, що має початковий рН8,0; кінцевий рН розчину гліколіпідного ад'юванту був між 6,8 та 7,0. Подальше зниження кінцевого рН розчину гліколіпідного ад'юванту може призводити до розчину гліколіпідного ад'юванту з меншою мутністю та без флокуляції.

Таблиця 4

Отримання композицій глікозиламідів з вмістом еквімолярної кількості оцтової кислоти та гліколіпідів. (Дивись Приклад 1.)

Концентрація NaCl (мМ)	Об'єм буферу (мл)	Об'єм вихідної композиції гліколіпідів (мл)	Кінцевий рН	О.Г. при 600нм
0	480	25	7,42	1,693
15	480	25	7,39	1,873
100	480	25	7,33	2,742

Таблиця 5

Отримання розчину гліколіпідного ад'юванту, застосовуючи вихідний розчин глікозиламідів з вмістом удвічі більшої молярної кількості оцтової кислоти та гліколіпідів. (Дивись Приклад 2.)

Концентрація NaCl (мМ)	Об'єм буферу (мл)	Об'єм вихідного розчину глікозиламідів (мл)	Кінцевий рН	О.Г. при 600нм
0	480	25	6,93	0,146
15	480	25	6,88	0,487
100	480	25	6,84	2,826

Оптична густина (О.Г.) менше, ніж 0,1, представляє напівпрозорий розчин. Оптична густина 0,1-0,5 показує гомогенність із слабкою мутністю, оптична густина 0,5-1,0 показує деяку мутність, оптична густина 1,0-1,5 показує суттєву мутність. Оптична густина 1,5 показує мутність та ймовірно не може бути фільтрованою, застосовуючи фільтр 0,2 мікрон. Останню загалом не вважають комерційно придатною.

Приклад 5. Титрування гліколіпідного ад'юванту оцтовою кислотою, щоб показати флокуляцію може бути оберненим. Для визначення, чи обертає флокуляцію додавання збільшеної кількості оцтової кислоти до гліколіпідного ад'юванту, що показує флокуляцію, отримували гліколіпідний ад'ювант як описано у прикладі 1. Цей гліколіпідний ад'ювант показував флокуляцію навіть у відсутності NaCl. Збільшували концентрацію оцтової кислоти додавали до цієї флокульованої суміші гліколіпідного ад'юванту. Оцтову кислоту розбавляли у 16,6 разів водою для отримання робочих концентрацій розчину 1моль. Тоді 15 мкл цього 1М розчину додавали до 15мл суміші гліколіпідного ад'юванту для збільшення концентрації оцтової

кислоти на 1мМ. Із збільшенням концентрації оцтової кислоти, рН гліколіпідного ад'юванту знижується та флокулянти розчиняються. Однак, гліколіпідний ад'ювант залишався іноді мутним. Це спостереженням підтверджує, що збільшення концентрації оцтової кислоти перетворює вільну основу Bay 15-5381 у ацетатну форму, котра є більш розчинною у водному розчині.

Таблиця 7

Титрування гліколіпідного ад'юванту оцтовою кислотою

Об'єм гліколіпідного ад'юванту	Доданий об'єм 1Н оцтової кислоти	рН розчину
15мл	0	7,25
15мл	15мкл (1мМ)	7,21
15мл	30мкл (2мМ)	7,10
15мл	60мкл (4мМ)	6,97
15мл	150мкл (10мМ)	6,44
15мл	750мкл (50мМ)	4,57

Приклад 6. Отримання другого стабільного розчину гліколіпідного ад'юванту з NaCl та без нього. Після встановлення важливості збільшення кількості оцтової кислоти у підтримуванні стабільності розчинів гліколіпідів, було вирішено застосовувати композицію, показану у таблиці 8 для отримання спершу вихідного розчину глікозиламиду та тоді для отримання ще одного розчину гліколіпідного ад'юванту з NaCl та без нього. Цей вихідний розчин глікозиламиду є подібним розчину у прикладі 2, з у 4 рази більшим загальним об'ємом та відносно більшою кількістю оцтової кислоти та Tween 20.

Таблиця 8

Композиція вихідного розчину глікозиламиду

Реагент	Кількість (200мл)
60% Етанол (v/v)	179мл
Tween 20	4,0мл
Оцтова кислота	3,0мл
Bay 15-5381	13,96 грам

Три різні розчини гліколіпідного ад'юванту з різними концентраціями NaCl отримували, застосовуючи фосфатний буфер з прикладу 3 та вихідний розчин глікозиламиду, отриманий як у таблиці 8.

Аналогічно композиції у прикладі 4, Таблиця 5, отримували розчини гліколіпідного ад'юванту, що містили 0мМ, 15мМ, та 100мМ NaCl. Розчини з вмістом 0мМ та 15мМ NaCl фільтрували через фільтр 0,2-мікрон. Розчин гліколіпідного ад'юванту з вмістом 100мМ NaCl не фільтрували через фільтр 0,2-мікрон.

Таблиця 9

Отримання стабільних розчинів гліколіпідного ад'юванту з NaCl та без нього

Концентрація натрій хлориду (мМ)	Об'єм буферу (мл)	Об'єм вихідного розчину глікозиламиду (мл)	Кінцевий РН	О.Г. при 600нм
0	465	35	6,39	0,039
15	465	35	6,37	0,073
100	465	35	6,29	0,439

20мл кожного з розчинів гліколіпідного ад'юванту поміщали у склянки 30мл та інкубували при кімнатній температурі та при 4°C. Візуальні спостереження отримували з регулярними інтервалами. Спочатку розчин гліколіпідного ад'юванту з 0мМ NaCl був оптично прозорим. Розчин гліколіпідного ад'юванту з вмістом 15мМ NaCl був слабо мутним та мав О.Г. 0,073 при 600 нм. Розчин гліколіпідного ад'юванту з вмістом 100мМ NaCl був мутним та мав О.Г. 0,439 при 600нм. Таблиця 9. Жодний з цих розчинів гліколіпідного ад'юванту не показував будь-яких ознак флокуляції при кімнатній температурі та при 4°C. Ці розчини гліколіпідного ад'юванту спостерігали протягом одного року без змін вигляду.

Приклад 7. Титрування стабільного розчину гліколіпідного ад'юванту із NaOH.

Спочатку оптично прозорий та стабільний розчин гліколіпідного ад'юванту отримували без NaOH. Для встановлення, що усунення або застосування мінімальної кількості NaOH було суттєвим для попередження флокуляції, необхідно показати, що поступова добавка NaOH може індукувати флокуляцію в інакше стабільній гліколіпідній суміші. Прийнятні об'єми 1N NaOH додавали до 15мл розчину гліколіпідного ад'юванту без будь-якого NaCl, як отримано у таблиці 10, нижче. NaOH збільшували поступово від 1мМ до 12мМ. (Таблиця

10) Розчин гліколіпідного ад'юванту, застосовуваний у цьому дослідженні, отримували, застосовуючи вихідний розчин глікозиламиду, описаний у прикладі 6. Зі збільшенням концентрації NaOH у розчині гліколіпідного ад'юванту, рН композиції поступово збільшувався разом з флокуляцією.

Таблиця 10

Титрування стабільного розчину гліколіпідного ад'юванту з NaOH

Об'єм гліколіпідного ад'юванту	Доданий об'єм 1N NaOH (мМ)	рН розчину
15мл	0	6,21
15мл	15мкл (1мМ)	6,38
15мл	30мкл (2мМ)	6,48
15мл	60мкл (4мМ)	6,68
15мл	150мкл (10мМ)	7,11
15мл	750мкл (50мМ)	12,17

Приклад 8. Кількісний аналіз гліколіпиду, застосовуючи ВЕРХ.

Нижченаведені способи застосовували в аналізі ВЕРХ Bay 15-5831®. Застосовували ВЕРХ-параметри, описані у таблиці 11.

Таблиця 11

Параметри, застосовувані у способі кількісного аналізу за допомогою ВЕРХ Вай 15-5381

Параметр	Деталі
Колонка	Hamilton PRP-1, 7 мікрон, 250×4,6мм
Потік	1,5мл/хвилин
Об'єм ін'єкції	10мкл
Довжина хвилі детектора	210нм
Мобільна фаза А	0,4об.% перхлоратна кислота
Мобільна фаза В	Ацетонітрил
Гradient	0 хвилин 40% А/60% В
	15 хвилин 30% А/70% В
	20 хвилин 30% А/70% В
	35 хвилин 10% А/90% В
	50 хвилин 10% А/90% В
	51 хвилин 40% А
Час перебігу	65 хвилин
Час утримання Вай 15-5381	Приблизно 25 хвилин

Таблиця 12

Стандарти Вай 15-5831®

Стандарт	Концентрація
1	0,103мМ
2	0,206мМ
3	0,412мМ
4	0,618мМ
5	0,824мМ
6	1,03мМ

Стандарти у межах 0,10-1,03мМ отримували та ін'єктували у ВЕРХ. Стандарти показано у таблиці 12. Зразки нагрівали до кімнатної температури та інвертували 5 разів перед застосуванням. Один мл зразку додавали до 6мл метанолу у 10мл мірній колбі. Зразки тоді обробляли ультразвуком протягом 10 хвилин та тоді розбавляли до об'єму та змішували. Нелінійну регресію проводили на стандартах з площами піків проти концентрації. Зразки були тоді розраховані за кривими.

Приклад 9. Масштаб отримання 30л. Отримували 30л розчину гліколіпідного ад'юванту зі складом, описаним у прикладі 6. Ця партія містила 15мМ NaCl.

Застосовуючи ці 30л, отримували 5 різних розчинів зі збільшенням концентрації NaOH. Концентрація NaOH збільшували від 0мМ до 1мМ, 2мМ, 4мМ, 8мМ та 12мМ. Зразок для кожної концентрації NaOH аліквотували для виміру рН та візуального спостереження. Зі збільшенням кількості NaOH, рН гліколіпідного ад'юванту збільшувався разом зі збільшенням флокуляції. Флокуляція при концентрації NaOH 2мМ при кімнатній температурі, а при 4 °С, флокуляція починалася при 4мМ NaOH.

Таблиця 13

Характеристики партії 30л гліколіпідного ад'юванту зі збільшенням концентрації NaOH

Зразок №	Опис	Виміряна концентрація (мМ)	О.Г. при 600нМ	РН
30л зразку 1	15мМ NaCl, 0мМ NaOH	6,21	0,218	6,42
30л зразку 2	15мМ NaCl, 1мМ NaOH	6,3	0,137	6,52
30л зразку 3	15мМ NaCl, 2мМ NaOH	6,24	0,137	6,59
30л зразку 4	15мМ NaCl, 4мМ NaOH	6,17	0,15	6,80
30л зразку 5	15мМ NaCl, 8мМ NaOH	6,26	0,129	7,06
30л зразку 6	15мМ NaCl, 12мМ NaOH	6,15	0,062	7,54

Кількість Вай 15-5381 в усіх 6 зразках показана у таблиці 13 аналізували, застосовуючи спосіб ВЕРХ, описаний у прикладі 8. Зразки з різними рН показували ті ж концентрації Вай 15-5381, вказуючи, що ад'ювант не розкладається при збільшенні рН при добавці NaOH та флокуляції.

Приклад 10. Оцінки стабільності, застосовуючи прискорене тестування в обваженому режимі.

Цей приклад описує способи та результати прискореного тестування в обваженому режимі розчину гліколіпідного ад'юванту. Три партії розчинів гліколіпідного ад'юванту отримували, як описано у прикладі 6, у масштабі 500л. Усі три партії мали 15мМ NaCl та не містили NaOH. Розчини гліколіпідного ад'юванту з цих трьох партій по 500л

застосовували для дослідження стабільності гліколіпиду, застосовуючи прискорене тестування стабільності.

Для прискореного тестування в обваженому режимі розчин гліколіпідного ад'юванту піддавали дії струшування протягом 7 діб при 37°С, а потім струшування при 4°С протягом двох діб. 7 діб струшування при 37°С представляє старіння при 4°С протягом року. Струшування при 4°С протягом двох діб представляє обваження при транспортуванні.

Один розчин гліколіпідного ад'юванту тримали статичним при 37°С протягом 7 діб, тоді струшували при 100об./хвил. при 4 °С протягом ще 2 діб. При чотирьох моментах часу, тобто Т=0, 3, 7, та 9

добі, спостереженням та фотозображення реєстрували. При 2 моменти часу, тобто T=0 та 9 доби, Індекс рефракції та розмір частинок аналіз тоді проводили.

Другий розчин гліколіпідного ад'юванту струшували при 100об./хвил. при 37°C протягом 7 діб; тоді струшували при 100 об/хвил при 4°C протягом ще 2 діб. При чотирьох моментах часу, тобто T=0, 3, 7, та 9 діб, спостереження та фотозображення реєстрували. При 2 моментах часу, тобто T=0 та 9 діб, тоді проводили аналіз індексу рефракції та розміру частинок.

Третій розчин гліколіпідного ад'юванту тримали статичним при 4 °C протягом 9 діб як контроль. У чотири моменти часу, тобто T=0, 3, 7, та 9 діб, реєстрували спостереження та фотозображення. У 2 моменти часу, тобто T=0 та 9 діб проводили аналіз індексу рефракції та розміру частинок.

Не було змін розміру частинок як результату тестування в об'явленому режимі. Усі зразки підтримували субмікронний розмір частинок, як спостерігали у зразках негайно після їх отримання. Більш того, вимір компоненту Bay 15-5831® за допомогою ВЕРХ у зразках, що тримали при 4°C або піддавали об'явленню при 37°C протягом 7 діб, не показував будь-як змін кількості Bay 15-5831®.

Таблиця 15

Кількісний аналіз Bay 15-5831®  
після тестування в об'явленому режимі

Номер партії розчину гліколіпідного ад'юванту та обробка	Виміряна концентрація (мМ)
Партія 1-4°C	6,23
Партія 1-37°C Струшування	6,29
Партія 2-4°C	6,32
Партія 2-37°C Струшування	6,30
Партія 3-4°C	6,28
Партія 3-37°C Струшування	6,29

У таблиці 15, контрольні зразки тримали при 4°C протягом 7 діб, тоді як тест-зразки струшували при 37°C протягом 7 діб. Зразки, що струшували при 37°C протягом 7 діб мають концентрації подібну концентрації, що зберігали при 4°C.

Приклад 11. Віруліцидне тестування розчину гліколіпідного ад'юванту.

Віруліцидне тестування проводили на розчині гліколіпідного ад'юванту, отриманому у масштабі 30 л, як описано вище у прикладі 9. Цей розчин гліколіпідного ад'юванту містив 15мМ NaCl та не містив NaOH.

Гліколіпідний ад'ювант тестували на його придатність для застосування як розріджувачу з модифікованими живими вірусами. Антигени модифікованого живого вірусу отримують як висушені сублімацією пробки. При регідратації цих пробок з придатним розчином гліколіпідного ад'юванту, було підтверджено, що застосовуваний розчин гліколіпідного ад'юванту не знищує модифікованих живих вірусів. Розчин гліколіпідного ад'юванту тестували проти трьох вірусних антигенів корів: респираторно-синцитіальний вірус корів (BRSV), вірус парагрипу 3 (PI3), та вірус інфекційного ринотрахеїту корів (IBR).

Вірусні пробки регідратували, застосовуючи розчин гліколіпідного ад'юванту. Після інкубування при кімнатній температурі (RT) протягом 1 годин, зразки поміщали на моношар лінії пермісивних клітин з серійними розбавленнями. Підрахунком числа вірусних пробок, що виявляються на моношарі отримували 50% значення інфекційної дози на мл культур тканин (TCID<sub>50</sub>/мл) для кожного вірусного антигену, ре гідратованого стерильною водою або розчином гліколіпідного ад'юванту. У цьому аналізі зниження титру 0,7 після регідратації тест-розчином гліколіпідного ад'юванту вважали віруліцидним.

Результати представлені у таблиці 16. Розчин гліколіпідного ад'юванту не показував будь-якого віруліцидного впливу на ці три віруси корів.

Таблиця 16

Віруліцидний аналіз розчину гліколіпідного ад'юванту

Вірус	Вихідний титр	Кінцевий титр з гліколіпідним ад'ювантом	Кінцевий титр зі стерильною водою	Втрата титру
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

Цей приклад показує, що розчин гліколіпідного ад'юванту можна застосовувати у комерційній композиції вакцини для тварин. Risproval® є обмеженим трьома різними вірусними хворобами корів, застосовуючи три модифіковані живі вірусні антигени. Цими вірусними антигенами корів є модифікований живий вірус герпесу корів, модифікований живий респираторно-синцитіальний вірус корів, та

модифікований живий вірус парагрипу 3. Ці вірусні антигени продукують як ліофілізовані брикети та розчин гліколіпідного ад'юванту, продукований згідно з цим винаходом, можна застосовувати як розріджувальний розчин для цих антигенів. Застосовуваним гліколіпідом був N-(2-дезоксид-2-L-лейциламіно-β-D-глюкопіранозил)-N-октадецилдодеканамід ацетат.



Приклади представлені для ілюстрації винаходу. Вони не обмежують рамок винаходу. Багато змін, варіацій, модифікацій, та інших застосувань

цього винаходу повинні бути зрозумілими фахівцям.