



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0013686-7 B1

(22) Data do Depósito: 15/08/2000

(45) Data de Concessão: 26/07/2016



(54) Título: PROCEDIMENTO PARA SINTETIZAR UMA MISTURA DE OLIGOSSACARÍDEOS

(51) Int.Cl.: C07H 15/04; A61K 39/102

(30) Prioridade Unionista: 30/08/1999 CU 121/99

(73) Titular(es): UNIVERSIDAD DE LA HABANA. UNIVERSITY OF OTTAWA

(72) Inventor(es): VICENTE GUILLERMO VEREZ BENCOMO, RENE ROY

“PROCEDIMENTO PARA SINTETIZAR UMA MISTURA DE OLIGOSSACARÍDEOS”

Setor técnico

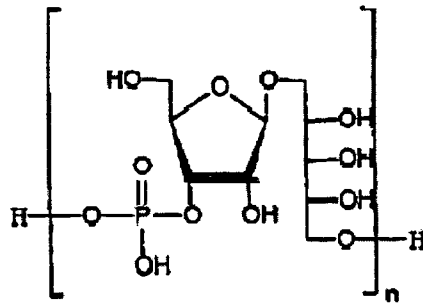
A presente invenção refere-se ao campo da medicina, em particular à síntese química de oligossacarídeos derivados de ribose-ribitol-fosfato, que são empregados como princípio ativo em vacinas para a prevenção de infecções causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), bem como às vacinas que contêm as referidas misturas de oligossacarídeos.

Estado da Técnica

O *Haemophilus influenzae* tipo b constitui um sério problema de saúde no mundo. A bactéria provoca, fundamentalmente em crianças menores de 5 anos, meningite, pneumonia, epiglote, e outras doenças do trato respiratório. As seqüelas observadas, que vão desde a surdez até o atraso mental grave, em muito países ultrapassam os 30 % dos caso que sobrevivem à doença. Estimativas recentes da Organização Mundial da Saúde indicam que morrem no mundo, hoje, em virtude de doenças provocadas pelo *Haemophilus influenzae* tipo b mais de 550.000 crianças anualmente.

O polissacarídeo purificado de *Haemophilus influenzae* é capaz de provocar imunidade protetora em adultos. No entanto, a imunidade conseguida em crianças pequenas é muito fraca e é praticamente nula em menores de 2 anos.

O polissacarídeo capsular tem a seguinte estrutura:



Demonstrou-se que principal problema é sua natureza, porque, sendo um polissacarídeo, é um antígeno T-independente que não é capaz de estimular o sistema imunológico da criança, ainda imatura. Demonstrou-se que é possível resolver o problema unindo (conjugando) covalentemente o polissacarídeo a uma proteína que se denomina "carrier" (veículo). O produto formado, conhecido como vacina conjugada, consegue induzir níveis de anticorpos protetores a partir dos 2 meses de idade.

Chu *et al.* (*Infection Immunity* 1983, 40, 245-256) prepararam o conjugado a partir do polissacarídeo nativo com toxóide tetânico, após ativá-lo com brometo e cianogênio.

Gordon (Patente US nº 4.496.538) ativaram o polissacarídeo natural com brometo de cianogênio e então o conjugaram a toxóide diftérico através da hidrazida do ácido adípico.

Hilman *et al.* (Patente US nº 4.459.286), logo após ativarem o polissacarídeo capsular, o conjugaram através do ácido 6-amino capróico à proteína da membrana externa do meningococo.

Em todos os casos anteriores, quando se realiza o processo de conjugação, a ligação covalente ocorre ao mesmo tempo entre vários grupos do polissacarídeo capsular e da proteína veículo.

A eficiência em induzir imunidade protetora na criança depende da estrutura do conjugado, ou seja, da forma com que se efetua esta ligação. Quando se conjuga o polissacarídeo natural, os grupos que participam da ligação com a proteína apresentam-se distribuídos em pontos diferentes do polissacarídeo de forma aleatória ao longo da cadeia, o que

dificulta o controle de cada lote.

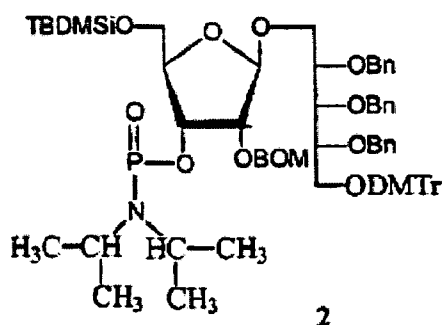
Estas vacinas são muito difíceis de analisar por meio de processos físico-químicos que, na prática comum, consistem em avaliar cada lote através de estudos de imunogenicidade em animais experimentais. No
5 entanto, algumas vezes o conjugado comporta-se de determinada maneira em animais e de maneira diferente em crianças.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, OMS, (M.R. Holliday, C. Jones, *Biologicals*, 1999, 27, 51-53), que visando-se obter uma qualidade estável, o controle das vacinas conjugadas deve basear-se em
10 métodos físico-químicos que permitam demonstrar a reproduzibilidade do produto de um lote para outro.

Para facilitar esta tarefa, as vacinas conjugadas devem ser cada vez mais definidas molecularmente. Uma alternativa de solução para este problema é a síntese de fragmentos do polissacarídeo capsular. O
15 processo de construção do antígeno por síntese consta de duas grandes etapas, a primeira é a obtenção do dissacarídeo intermediário e a segunda é sua oligomerização. Propôs-se várias vias para esta síntese.

Beuvery *et al.* (Pedido de patente Européia EP 0276 516; Patente US 5,034,519; *Tetrahedron Lett.*, 28, 1553, 1987) e Hoogerhout *et al.* (*J. Carbohydr. Chem.*, 7, 1988, 399-416) obtiveram, por síntese, um
20 fragmento do polissacarídeo capsular que reivindicam, o qual contém de 3 a 20 unidades repetitivas. Para tanto sintetizam o dissacarídeo intermediário 2 e, com o mesmo, através de síntese em solução ou em fase sólida, conseguem obter oligossacarídeos com até 6 unidades repetitivas (Elie *et al.*, *Rec. Trav.*
25 *Chim. Pays-Bas* 108, 1089, 219). Estes oligossacarídeos são conjugados a proteínas ou peptídeos através de um espaçador. O conjugado de um fragmento com 3 unidades demonstrou ser tão imunogênico em camundongos quanto as vacinas comerciais obtidas por conjugação do polissacarídeo capsular.

Em um exemplo ótimo que ilustra a via de síntese seguida, realizam-se as seguintes operações: 1. síntese do ribitol, 2. união com a ribose, 3. introdução seletiva dos substituintes da ribose, e 4. introdução da função ativa do fósforo. Esta via de síntese permite chegar ao derivado do dissacarídeo 2 que serve de intermediário central em apenas 15 etapas de reação.



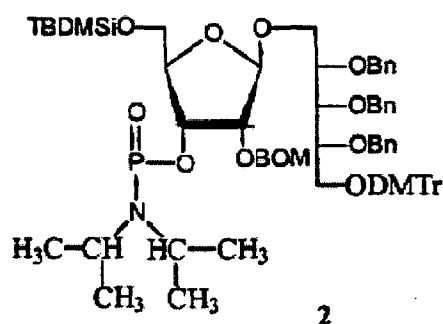
O rendimento global é de 7 % (Hermans *et al.*, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 1987, 106, 498-504). Além disso, este processo apresenta dois inconvenientes importantes: emprega-se 11 passos cromatográficos e os grupos protetores do intermediário central não são adequados para o processo de oligomerização.

Na oligomerização, ou segunda etapa de síntese, empregou-se o método em solução com ativação a partir do fosfotriéster, que permite rendimentos de 70-90 % por ciclo com base no dissacarídeo. Este procedimento apresenta o inconveniente de não permitir a síntese de fragmentos maiores que 4 unidades repetitivas porque os rendimentos diminuem rapidamente. O dissacarídeo intermediário 2 apresenta 3 tipos diferentes de grupos protetores, o que dificulta a desproteção do produto ao final da síntese e, portanto, não é o mais conveniente para seu emprego em oligomerização por fase sólida. Não obstante, reporta-se seu uso para a preparação de um hexâmero.

Nos ensaios imunológicos (Peters CCAM, *et al. Infect. Immunity* 1991, 59, 3504-10) reporta-se apenas a conjugação de um trímero a toxóide tetânico e sua imunogenicidade em camundongos e macacos.

G. Just, J. Upeslakis (Pedido de patente Européia EP 0 320 942; L. Chan; G. Just, *Tetrahedron*, 46, 1990, 151-162) sintetizaram também um fragmento do polissacarídeo capsular através de um dissacarídeo intermediário e síntese em solução. Com o fim de se obter o intermediário

5 ótimo para a síntese do antígeno recorre-se a uma via de síntese diferente: 1. síntese do ribitol, 2. síntese da ribose com os grupos protetores adequados, 3. união da ribose e do ribitol e 4. introdução da função ativa do fósforo.



Isto permite seguir um procedimento que chega a um dissacarídeo intermediário 3 como fosforamidito, que, por seus grupos

10 protetores, apresenta qualidades superiores no processo de oligomerização. Para conseguir este objetivo foi necessário um número maior de passos de síntese. Chega-se ao derivado-chave em 19 etapas de síntese e o emprego de 8 passos de purificação cromatográfica.

Com o dissacarídeo intermediário 3 procede-se à

15 oligomerização em solução, o que permite obter fragmentos do polissacarídeo capsular com 3 unidades repetitivas, com rendimentos baseados no dissacarídeo que oscilam entre 70-90 % por ciclo.

Kandil *et al.* (*Syn. Lett.*, 1992, 555-7), Chon *et al.* (Pedido de patente PCT WO 93/15205 e patente US 5,679,352) sintetizaram um

20 fragmento do polissacarídeo capsular empregando o mesmo dissacarídeo intermediário 3 e, por síntese em fase sólida usando como suporte monometoxipolietilenoglicol, conseguiram obter fragmentos com até 6 unidades repetitivas do antígeno. A incorporação reportada por ciclo foi de 95 %.

Krivan, *et al.* (Pedido de patente PCT WO 94/002149) e Nilsson, *et al.* (*J. Carbohydr. Chem.* 10, 1991, 1-22) conseguiram obter um fragmento de 10 unidades repetitivas com um dissacarídeo intermediário semelhante e química de fase sólida. Posteriormente conjugam o mesmo através de um espaçador com a adesina do Hib. O fosfonato intermediário é então preparado com 21 etapas de síntese com um rendimento global de 5 %. Além disso são necessários 7 passos cromatográficos. Posteriormente, o processo de oligomerização realiza-se por meio de química de fase sólida segundo o processo dos fosfonatos e resina de Merrifield aminada, chegando-se ao antígeno com 97-99 % de incorporação por ciclo.

Chiu Machado *et al.* (*J. Carbohydr. Chem.*, 13 1994, 465-474) e o Certificado de Autor CU 22424 reportaram um processo eficiente para a obtenção de um derivado de ribose protegido a partir de glicose e, com o uso do mesmo, chegam ao dissacarídeo intermediário em 20 etapas de reação.

Um dos aspectos que dificulta a aplicação da síntese para a obtenção de fragmentos de Hib visando seu emprego em vacinas é a síntese do dissacarídeo intermediário.

Os métodos enumerados anteriormente refletem o estado alcançado na moderna química dos carboidratos, no entanto sofrem de dois sérios problemas técnicos. O emprego de numerosas etapas cromatográficas ao longo da síntese que torna impraticável sua realização em escala industrial e o número de etapas de síntese que é elevado. O problema fundamental que impede a síntese do dissacarídeo em menos etapas é a introdução dos grupos benzila na unidade de ribose.

O processo de oligomerização do dissacarídeo intermediário pode realizar-se em solução, com o sério inconveniente de que o tamanho do antígeno que se pode alcançar está limitado a 3-4 unidades repetitivas ou, também, pode realizar-se por química de fase sólida. A química de fase sólida permite alcançar oligossacarídeos com um tamanho de 6 e 10 unidades

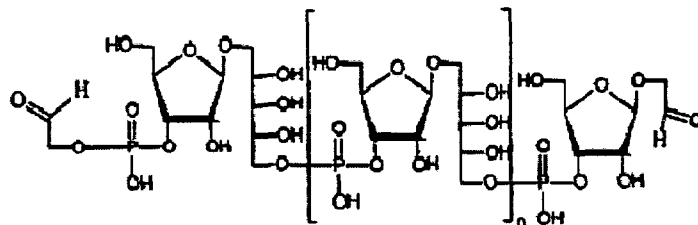
repetitivas com incorporações por ciclo muito altas. No entanto, o método apresenta dois sérios inconvenientes, o rendimento real do processo é de apenas 10-15 %, porque para se alcançar incorporações superiores a 95 % por ciclo, torna-se necessário um excesso de dissacarídeo que varia entre 3 e 10 moles equivalentes que se perdem tão logo o ciclo se efetua. Por outro lado, deve-se sintetizar dois diferentes derivados do dissacarídeo intermediário, um que se liga à fase sólida e o outro que se emprega no crescimento da cadeia.

Um aspecto comum a todos os trabalhos precedentes de síntese do antígeno, e que constituiu um de seus objetivos principais, é a obtenção de um único fragmento oligossacarídico puro, que não contenha diferenças apenas em sua estrutura, mas tampouco ao longo de sua cadeia. Tudo isto baseou-se na suposição de que um antígeno formado por uma única molécula é imprescindível para se obter vacinas conjugadas anti-Hib de qualidade mais estável, devido a seu controle mais fácil.

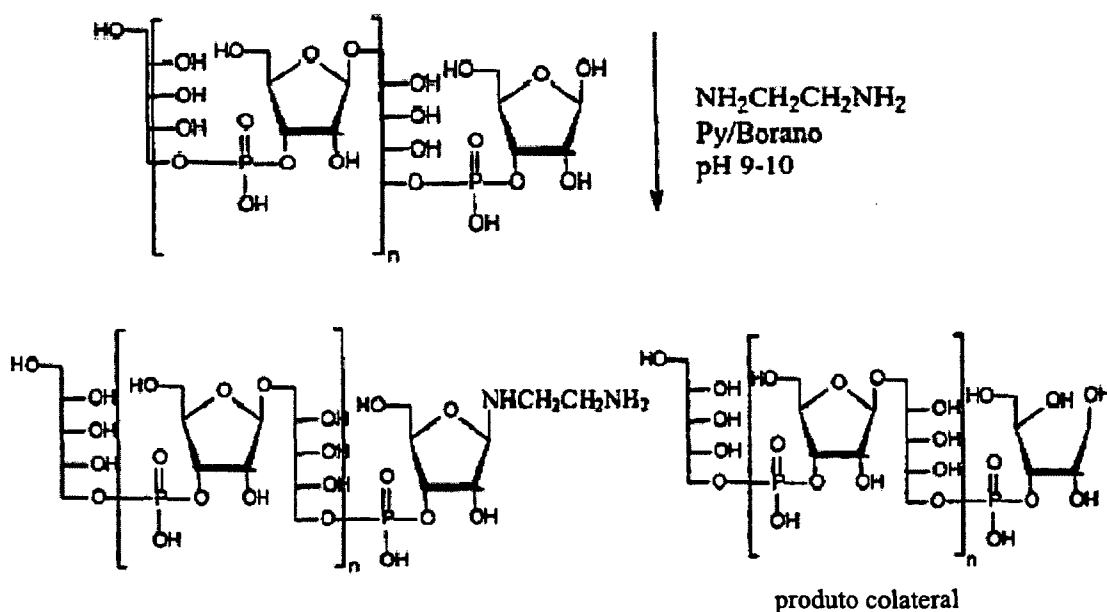
Com esta mesma finalidade de melhorar e tornar mais estável a qualidade das vacinas conjugadas, sucederam-se aos trabalhos iniciais com os polissacarídeos naturais outros de que se obteve fragmentos oligossacarídicos por fragmentação de polissacarídeos naturais e descobriu-se processos que ativam a mistura obtida por uma ou por ambas as pontas terminais.

Nas patentes norte-americanas US 4,808,700 e US 4,761,283, bem como em *Glycoconjugate J.*, 1989, 6, 489-98 (R.C. Seid, *et al.*) descreve-se a oxidação do polissacarídeo natural com periodato e a purificação dos fragmentos obtidos. As misturas de fragmentos oligossacarídicos tornam-se desta forma ativadas pelas duas extremidades como se mostra no esquema a seguir. Estes oligossacarídeos são conjugados posteriormente através de uma reação de aminação redutiva à proteína CRM 197. Como se pode observar no esquema a seguir, os dois sítios de conjugação são diferentes, o que ocasiona que, uma vez efetuada a

conjugação, existirão duas famílias diferentes de oligossacarídeos conjugados com estruturas diferentes. Tudo isto gera heterogeneidade e dificulta o controle.



- Por outro lado, na patente norte-americana US 5,153,312, bem como em *Vaccine* 1999, 17, 1251-63 (P. Constantino *et al.*) reporta-se a hidrólise do polissacarídeo natural com ácido acético e a purificação da mistura de fragmentos oligossacarídicos resultantes. O produto é ativado através de uma seqüência de reações em que se introduz o espaçador através de aminação reductiva com etilenodiamina a um pH e temperatura elevados que podem afetar a integridade da mistura de oligossacarídeos. Por outro lado, uma proporção do antígeno é reduzida em seu grupo carbonila terminal tornando-se inativado como é mostrado no esquema a seguir. Posteriormente, realiza-se uma reação seletiva do antígeno com o éster ativo do ácido adípico em apenas uma de suas extremidades. A outra extremidade ativada é empregada para a conjugação com a proteína.



As duas vacinas preparadas a partir de produtos de fragmentação do polissacarídeo capsular demonstraram, através da prática da imunização em grandes massas de crianças, que é possível empregar oligossacarídeos, não de um tamanho específico, mas com uma faixa de
5 tamanhos, na manufatura de vacinas conjugadas contra Hib, e controlar adequadamente a reproduzibilidade e a qualidade do produto. Embora os conjugados obtidos por estas duas vias sejam mais definidos do que os obtidos por ativação direta do polissacarídeo, é praticamente impossível fragmentar um polissacarídeo capsular e, depois, introduzir um grupo
10 funcional ativo no mesmo para conseguir a definição molecular e a pureza do antígeno a que se pode chegar através da síntese.

Não existem vantagens evidentes sobre o controle de vacinas conjugadas quando se emprega um oligossacarídeo com um tamanho definido ou uma mistura de oligossacarídeos considerando-se seu tamanho, porém
15 mantém-se homogêneo o resto da estrutura. Isto ficou demonstrado com o avanço dos métodos de análise do estado da técnica, que tornam possível determinar facilmente a composição de uma mistura de fragmentos de oligossacarídeos de Hib (P. Constantino, *et al.*, *Vaccine* 1999, 17 1251-1263 e D. Prieti, *et al.*, *European Carbohydrate Symposium*, Galway, julho de
20 1999, PB014).

Por outro lado, não existem diferenças entre o comportamento imunológico de uma vacina conjugada composta de uma mistura de oligossacarídeos de Hib de diferentes tamanhos, ou de oligossacarídeos de um único tamanho, sempre e quando os fragmentos forem maiores que 3
25 unidades repetitivas (S. Pillai, *et al.*, *Infection and Immunity*, 1991, 59 4371-6; A.A Kandil, *et al.*, *Glycoconjugate J.*, 1997 14, 13-17 e Peters CCAM, *et al.*, *Infect. Immunity* 1991, 59,3504-10).

Existem circunstâncias adicionais que dificultam a seleção de um único tamanho que seja ótimo por todos os pontos de vista. Por um lado,

a favor de oligossacarídeos entre 4-6 unidades repetitivas está que estes são sintetizados com maior facilidade, seu tamanho sendo suficiente para induzir uma resposta imunológica adequada. No entanto, a quantidade de proteína veículo de que se necessita na vacina é muito elevada e a estabilidade do oligossacarídeo incluído na composição da vacina é inferior, pois o processo de degradação que ocorre com a hidrólise de ligações fosfato ocasiona que, imediatamente após o início da degradação, o fragmento ligado ao veículo se apresente com menos de 4 unidades repetitivas e se converta em inativo. Em princípio, os fragmentos com um tamanho entre 8-20 unidades repetitivas são mais estáveis já que possuem a vantagem, embora se degradem à metade do tamanho, de que o fragmento ligado à proteína veículo conservará mais de 4 unidades repetitivas. Por outro lado, a quantidade de veículo de que se necessita empregar por dose de vacina é inferior.

No entanto, de acordo com o estado da técnica para os oligossacarídeos de Hib, é impossível obter-se fragmentos com um tamanho entre 10-20 com os dois processos de síntese em solução, e é muito difícil obter os mesmos com os processos em fase sólida. Efetivamente, nenhum dos relatos anteriores apresenta qualquer exemplo em que haja conseguido obter oligossacarídeos deste tamanho. Outra vantagem é que o caráter T-dependente da resposta imunológica, aspecto indispensável para se obter uma boa resposta em crianças, é inferior ao maior tamanho do oligossacarídeo (C. Fernández, E. Sverremark, *Cell Immunol* 1994, 153, 67-78).

Em resumo, qualquer via de síntese de antígenos de Hib que aspire ser competitiva deve reduzir o número de etapas de síntese do dissacarídeo-chave, reduzir o número de passos cromatográficos e, sobretudo, incrementar de maneira essencial os rendimentos do processo de oligomerização.

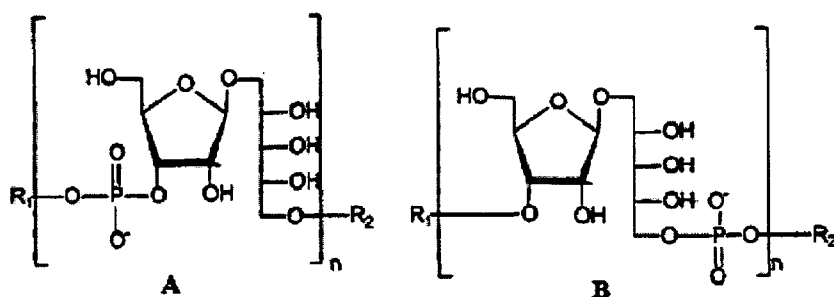
As misturas de oligossacarídeos obtidas por hidrólise do polissacarídeo natural, ao conterem frações de ambos os intervalos de

tamanhos, reúnem as vantagens de cada um e, por outro lado, abrandam o efeito de suas desvantagens. Se misturas semelhantes pudessem ser obtidas por síntese, estas teriam as vantagens de agrupar frações das duas faixas de tamanhos, além disso sua estrutura, ao ser desenhada por síntese, seria mais definida e pura ao conter o espaçador numa proporção e posição precisas.

Divulgação da invenção

A presente invenção refere-se particularmente à síntese química de misturas de oligossacarídeos derivados de ribose-ribitol-fosfato que são empregadas como princípio ativo em vacinas para a prevenção de infecções causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), bem como às vacinas que contêm as referidas misturas de oligossacarídeos.

As misturas de oligossacarídeos obtidas por síntese química da presente invenção compreendem unidades repetitivas de fórmula (fosfato-ribose-ribitol) $_n$ ou (ribose-ribitol-fosfato) $_n$ de pelo menos 5 compostos com estrutura A ou B, que representam a unidade repetitiva do polissacarídeo capsular do *Haemophilus influenzae* tipo b e diferem apenas em n , sendo que n é um valor compreendido entre 4 e 25 ($n \geq 4$ e ≤ 25), e em que R_1 ou R_2 é um espaçador para a conjugação a um veículo com a condição de que R_1 = espaçador se $R_2 = H$, ou R_2 = espaçador se $R_1 = H$:



A invenção também se refere aos imunógenos que contêm estas misturas oligossacarídicas, às vacinas que contêm estes imunógenos e aos processos para preparar estes oligossacarídeos em forma de misturas. Além disso, a invenção considera o uso das vacinas, quer sejam sozinhas ou em combinação com outras vacinas, para a prevenção das infecções causadas

pelo *Haemophilus influenzae* tipo b.

Mediante a invenção pode-se obter, por síntese química, uma mistura regular de oligossacarídeos com tamanho definido e de forma eficiente. Esta mistura apresenta uma pureza superior e é obtida mediante um
5 procedimento técnico mais simples. Verificou-se também que as vacinas conjugadas preparadas a partir da mistura são superiores em sua manufatura e mais simples de controlar.

Outro objeto da presente invenção é o método de síntese para se chegar aos oligossacarídeos previamente indicados, que se caracteriza por
10 ser um processo de uma única etapa de síntese e que consiste de uma reação de policondensação controlada em que participam um derivado intermediário do polissacarídeo-chave, um espaçador e um promotor, e que também se caracteriza porque, através das proporções de cada um dos derivados, de sua ordem de adição e do tempo de reação, é possível controlar o tamanho médio
15 do antígeno.

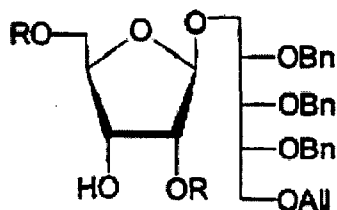
Também constitui um objeto da presente invenção o uso das misturas de oligossacarídeos previamente indicados na elaboração de imunógenos através de sua conjugação com proteínas, peptídios, lipídios, ou outra substância daquelas incluídas sob a denominação de veículo.

20 Constitui outro objeto da presente invenção o emprego dos imunógenos previamente indicados na elaboração de vacinas contra as doenças provocadas pelo *Haemophilus influenzae* tipo b, com ou sem o emprego de adjuvantes ou outros aditivos.

Outro dos objetos da presente invenção é o emprego das
25 misturas previamente indicadas na elaboração de vacinas combinadas com outras vacinas quer sejam conjugadas ou não, como por exemplo, com a vacina contra a Hepatite B, a DTP, as anti-meningocócicas A, B, C, as anti-pneumocócicas 1, 5, 6B, 6A, 14, 19F, 19A, 23F, e a vacina anti-poliomielite.

Outro dos objetos da presente invenção é a otimização do

processo de síntese do dissacarídeo-chave requerido para a síntese dos oligossacarídeos do Hib. A otimização indicada consiste no descobrimento de uma reação de benzilação seletiva que, aplicada ao dissacarídeo 4, permite transformar o mesmo no dissacarídeo 5 e introduzir os grupos protetores benzila na unidade de ribose em uma única etapa, encurtando ou simplificando significativamente o processo de síntese.



4 R = H
5 R = Bn

Também constitui um objeto da presente invenção o procedimento ótimo projetado para a síntese do intermediário 4 que permite obter o mesmo em forma pura em apenas 11 etapas de reação e sem o emprego de processos cromatográficos.

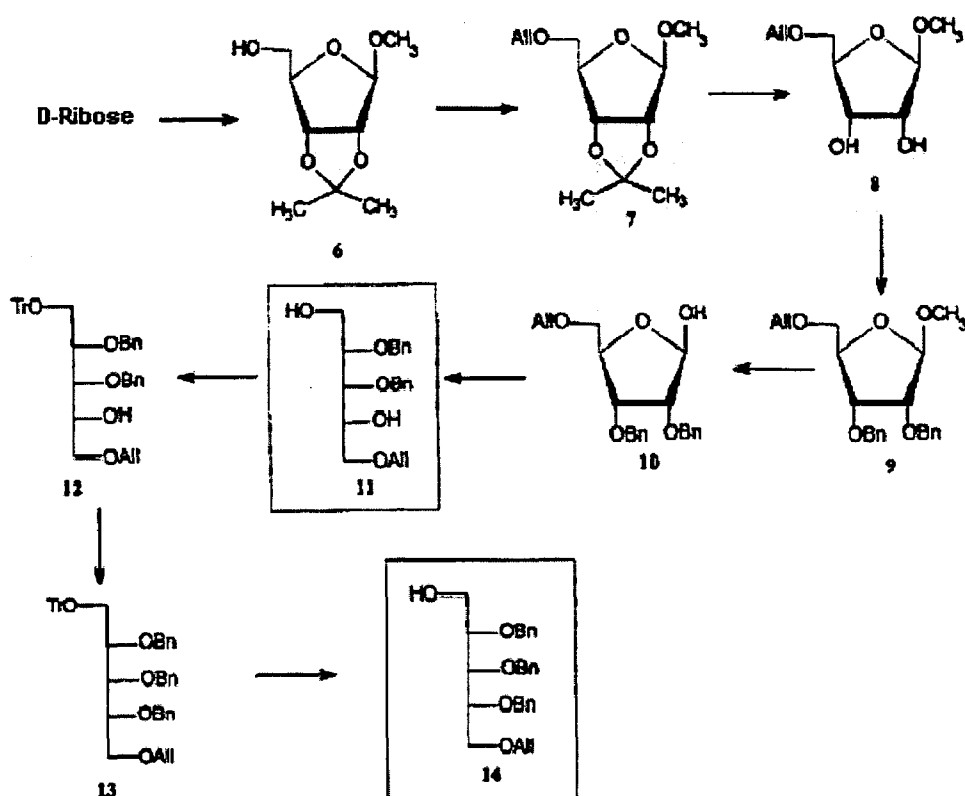
Outro dos objetos da presente invenção é o emprego dos oligossacarídeos previamente descritos na detecção de anticorpos anti-Hib através de seus conjugados com substâncias imunologicamente inertes, como a poliacrilamida, o poliestireno, o látex, etc., o que permite quantificar os anticorpos indicados.

A novidade da presente invenção consiste na própria composição da mistura de oligossacarídeos obtidos, que respondem à unidade repetitiva do polissacarídeo capsular do *Haemophilus influenzae* tipo b com um espaçador para sua conjugação em uma única de duas pontas, numa posição pré-desenhada na síntese, que respondem sempre à mesma estrutura regular e homogênea. A mistura de oligossacarídeos, em virtude de sua composição que inclui fragmentos dos dois grupos de tamanhos fundamentalmente entre 4-6 e 8-20, reúne as vantagens dos compostos individuais e diminui as desvantagens que cada um deles poderia ter em

separado.

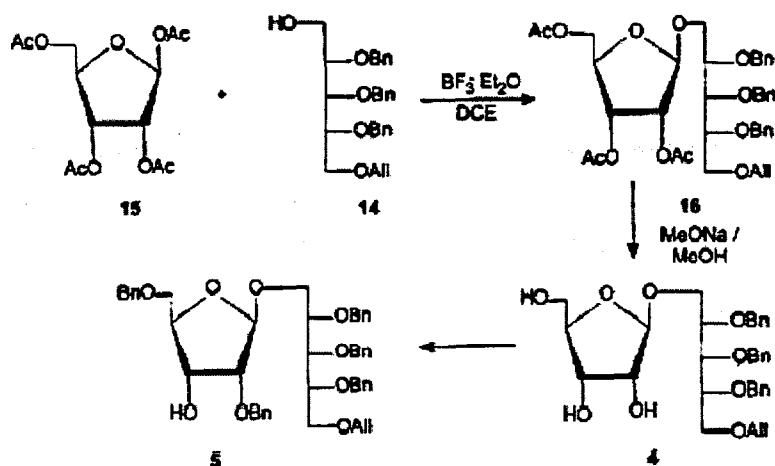
Além disso, a novidade da presente invenção está no próprio processo de elaboração destas mesclas através de síntese, o que permite obter-se o produto com alta reproduzibilidade e eficiência. Ainda assim, mediante a presente invenção, demonstra-se que uma única reação permite introduzir os grupos protetores benzila na unidade de ribose em uma única etapa, incrementando-se assim a eficácia na obtenção do dissacarídeo intermediário-chave para a síntese dos oligossacarídeos indicados.

A síntese do dissacarídeo intermediário inicia-se com a obtenção do derivado 5-O-alil-2,3,4-tri-O-benzil-D-ribitol 14 através de 9 reações químicas que estão representadas no esquema a seguir. A ribose se transforma no derivado isopropilideno 6 seguindo-se o procedimento descrito previamente na arte (Leonart *et al.*, *J. Het. Chem.*, 1966, 3, 485). Posteriormente, procede-se à alilação da posição 5 com brometo de alila em condições de transferência de fase, e hidroliza-se o grupo isopropilideno com ácido sulfúrico em metanol para se chegar ao derivado 8, que é submetido a uma representa de benzilação com cloreto de benzila e hidreto de sódio em dimetilformamida.

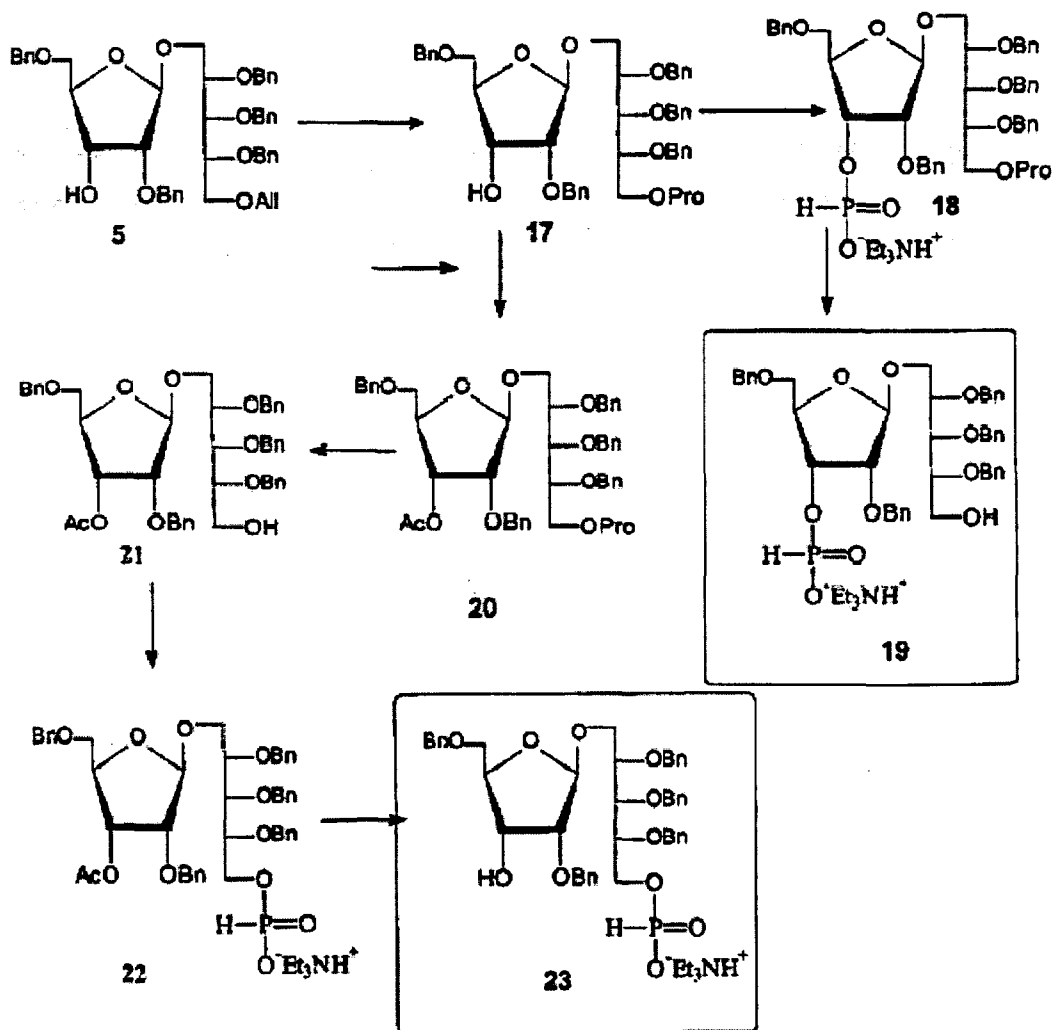


O grupo metila é hidrolizado com uma mistura de ácido acético e ácido clorídrico, seguido de uma redução com boroidreto de sódio. O derivado 5-O-alil-2,3-di-O-benzil-D-Ribitol 11 é absorvido em sílica-gel e é extraído seletivamente graças a um processo de percolação, primeiramente com cicloexano, e, depois, com clorofórmio. Este procedimento permite a purificação em grande escala, sem recorrer a técnicas cromatográficas convencionais.

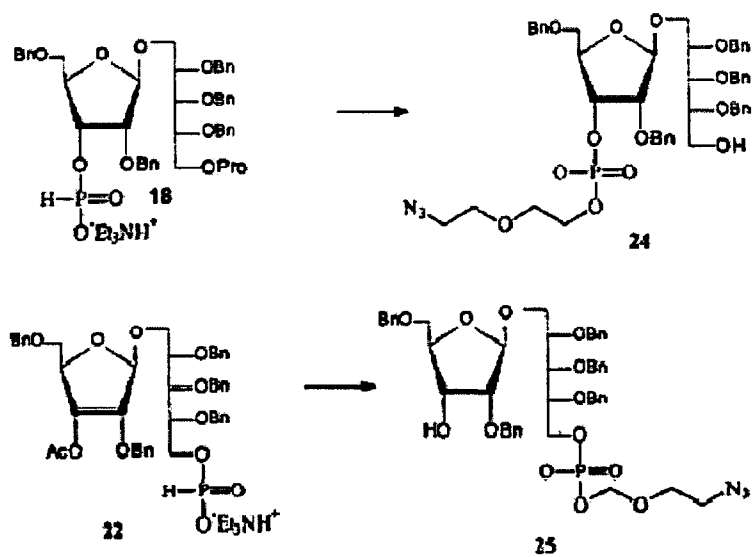
Posteriormente, o derivado de ribitol 11 é tritilado com trifenilclorometano em piridina, benzilado com cloreto de benzila e hidreto de sódio em dimetilformamida e, finalmente, hidrolizado com ácido acético para se chegar ao derivado de ribitol final que é purificado por meio de destilação. O derivado do ribitol 14 é ribosilado como se mostra no esquema a seguir com o derivado de ribose peracetilado 15. A desacetilação, seguida de uma nova aplicação da técnica de absorção-dessorção, permite chegar ao triol 4 em grande escala, sem recorrer a etapas cromatográficas.



A seguir, aplica-se sobre este triol 4 a reação de desbenzilação encontrada no âmbito da presente invenção, e que permite obter o derivado 5, imediatamente após um processo de purificação por cromatografia de coluna. O grupo alila do intermediário 5 é isomerizado a grupo propenila e, posteriormente, introduz-se o fosfonato pela posição 3 livre da unidade de ribose para dar, logo após a remoção do grupo propenila, o derivado intermediário-chave 19. De maneira semelhante, pode-se acetilar o grupo hidroxila da posição 3 ao derivado 17, hidrolizar a propenila, posteriormente introduzir o fosfonato na posição 5 e desacetilar o produto para se chegar a um dissacarídeo-chave 23 que apresenta fosfonato na posição 5 e hidroxila na posição 3.



A estrutura dos produtos formados foi confirmada em todos os casos por meio de ressonância magnética nuclear ¹H e ¹³C e por meio de experimentos de correlação H-H e H-X. A pureza foi verificada por meio de cromatografia de camada fina ou por HPLC.

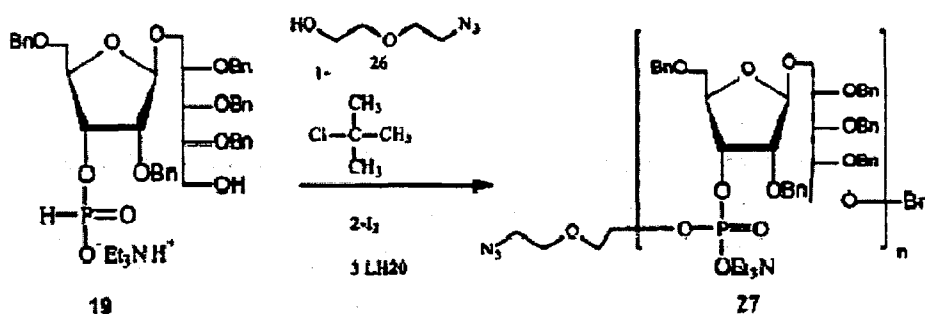


A partir dos derivados 18 ou 22, pode-se preparar os derivados 24 e 25 que também servem de receptores na reação de policondensação, como se observa a seguir.

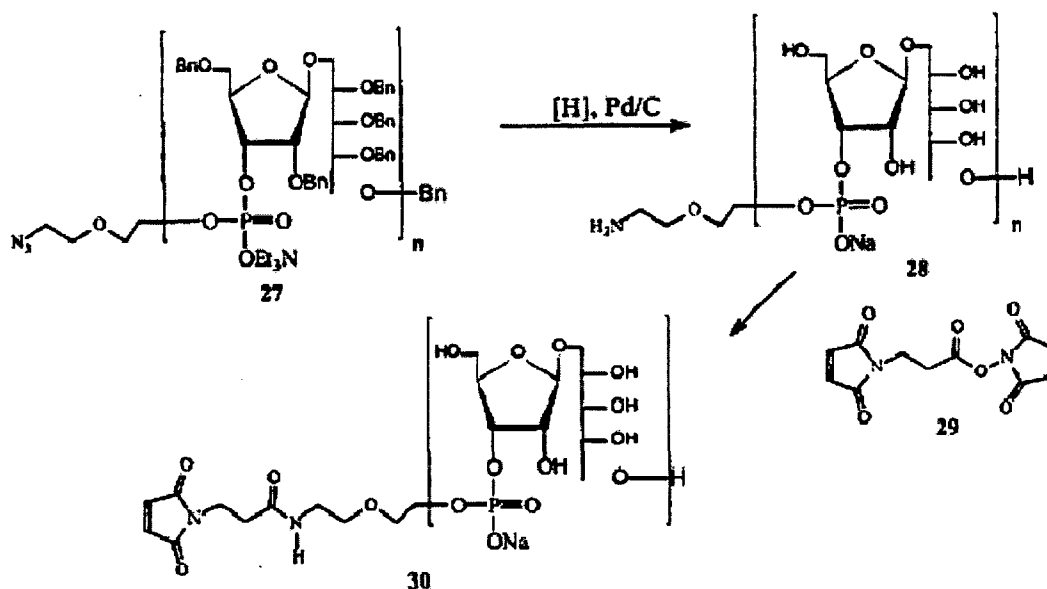
5 A reação de oligomerização foi estudada sob diversas condições, sempre com base no uso de apenas três componentes, um dissacarídeo-chave (19 ou seu análogo 23), um promotor de reação, que pode ser cloreto de pivaloíla, cloreto de adamantano-1-carbonila ou outro cloreto de ácido obstruído estericamente, e um terceiro componente que é encarregado de interromper a reação no momento de se introduzir o
10 espaçador com seu grupo funcional ativo ou seu precursor em uma das extremidades, que pode ser um composto do tipo 24, 25 ou 26.

Como espaçador para as substâncias 24, 25 ou 26 considera-se o 5-azido-3-oxapentanol, podendo-se empregar, adicionalmente, qualquer dos compostos de fórmula global R_1-Y-OH , em que Y é uma cadeia espaçadora
15 que pode ser formada por uma cadeia carbonada alifática que pode apresentar, de forma intercalada, uma cadeia aromática ou por um número de heteroátomos que podem oscilar entre 0-5. O grupo funcional R_1 na extremidade do espaçador pode ser um grupo NH_2 , $COOR$, CHO , SH ou outro grupo precursor dos mesmos.

20 As condições ótimas do processo foram desenvolvidas para vários casos, por exemplo, com o dissacarídeo 19, o espaçador 5-azido-3-oxa-pentanol 26 e cloreto de pivaloíla, em diclorometano-piridina obtém-se uma mistura que, depois de ser oxidada e cromatografada por sephadex LH-
25 20 em metanol, permite obter-se uma fração de oligômeros 27 com um rendimento de 70-85 % sobre a base do dissacarídeo.



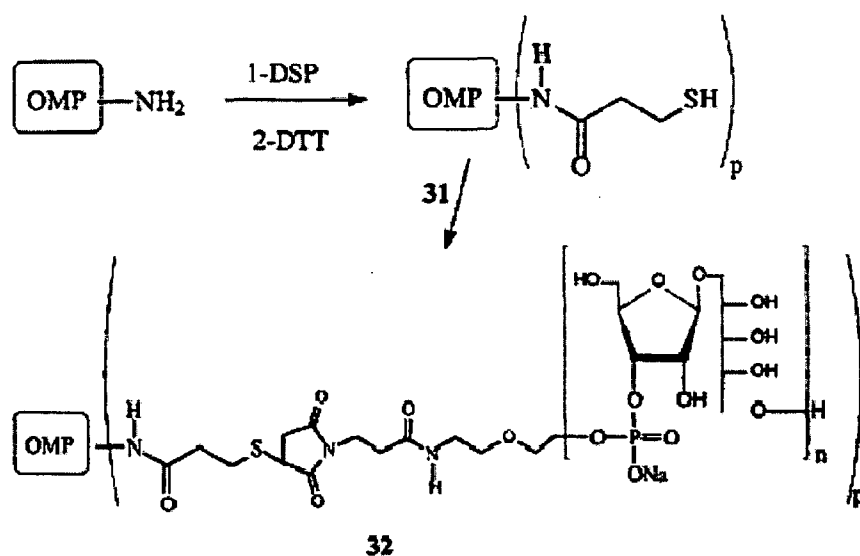
A mistura de oligossacarídeos 27 é hidrogenada em metanol-acetato de etila-ácido acético-água na presença de paládio sobre carbono para da a mistura bruta de oligossacarídeos 28. Se o grupo do espaçador deve ser ativado, o processo realiza-se na etapa seguinte. Por exemplo, à mistura de oligômeros 28 adiciona-se o derivado N-hidroxissuccinimidila do ácido β -maleimidopropiônico em dimetilformamida. Uma vez concluída a reação, o produto é diluído com água destilada e é ultra-filtrado sob pressão de nitrogênio gasoso através de uma membrana com tamanho de corte 1000. O produto 30 assim obtido constitui a mistura de oligossacarídeos ativa, pronta para ser empregada no processo de conjugação.



A estrutura dos produtos formados foi confirmada em todos os casos por ressonância magnética nuclear ^1H , ^{13}C e ^{31}P e por meio de experimentos de correlação H-H e H-X.

As proteínas, por sua vez, são funcionalizadas com ácido tiopropiônico, para o qual se introduz o tiol mascarado em forma de ligação

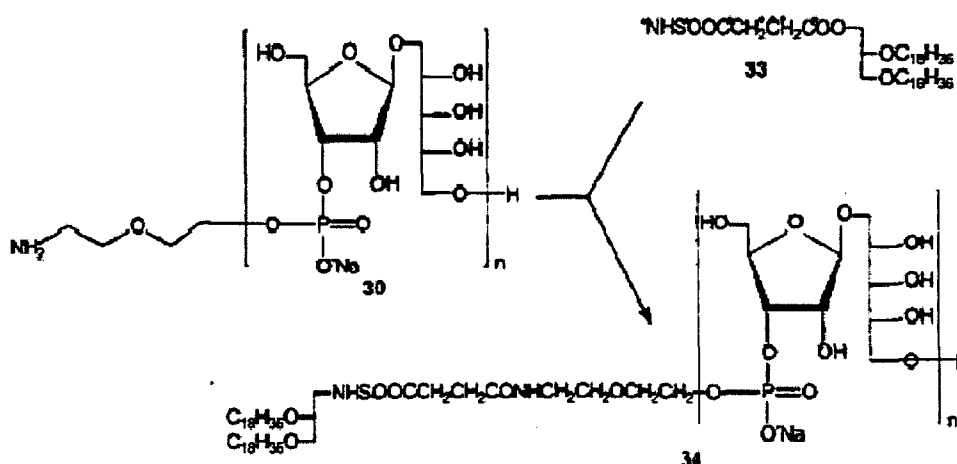
dissulfeto através de reagentes, como o SPDP ou o DSP, seguido de uma reação com ditioneitol em atmosfera inerte. A separação do excesso de reagente pode ser realizada, tanto para a OMP do meningococo (*Neisseria meningitidis*) como para o toxóide tetânico, mediante precipitações com concentrações de etanol em uma faixa de 20-95 % seguidas de centrifugação. No caso da OMP *Neisseria meningitidis* o processo que ocorre exemplifica-se com o esquema a seguir.



A proteína tiolada é misturada em atmosfera inerte com o oligossacarídeo funcionalizado, previamente filtrado através de 0,2 microns e liofilizado. A reação é interrompida por meio de precipitação etanólica seguida de centrifugação ou por ultrafiltração.

Alternativamente, o excesso dos reagentes ativadores pode ser removido do conjugado por meio de ultrafiltração. Ambos os processos de separação eliminam praticamente todo o oligossacarídeo que não se conjuga com a proteína, o que incrementa e estabiliza a qualidade do conjugado.

A mistura de oligossacarídeos 30 pode ser conjugada com outros tipos de veículo, por exemplo lipídeos. Assim, por exemplo, a reação com o 2,3-dioctadeciloxipropil succinimidil butanodioato 33 na presença de carbodiimida permite obter o conjugado 34



O conjugado da mistura de oligossacarídeos sintéticos e as proteínas pode ser diluído em um tampão fisiológico adequado e, adicionalmente, pode ser misturado com aditivos, como adjuvantes, conservantes ou outros, com a finalidade de se obter a formulação definitiva da vacina.

Ainda assim, a vacina pode ser misturada antes ou durante o processo de formulação com outras vacinas dentre aquelas empregadas nos esquemas de imunização da criança menor de um ano. Por exemplo, pode-se misturar com as proteínas a membrana externa de *Neisseria meningitidis* tipo B (OMP) e conformar uma vacina combinada anti-Hib e anti-meningococo B. Pode-se mesclar com a vacina DEP e formar uma vacina combinada tetravalente anti-Hib e anti-difteria, *pertussis* e tétano.

A imunogenicidade da vacina conjugada entre a mistura de oligossacarídeos 30 e as proteínas da membrana externa do meningococo foi demonstrada em diferentes modelos animais. A presença de anticorpos contra o polissacarídeo capsular de Hib induzidos pela preparação vacinal foi detectada mediante o método de ELISA (D.C. Phipps *et al.*, *J. Immunolog. Methods*, 1990. 135. 121-8). Os resultados obtidos são mostrados nas figuras 2-5.

Em coelhos, a vacina formulada sem alumina induz uma resposta superior na primeira dose. No entanto, ambas as preparações se equiparam quando da segunda dose e provocam uma alta concentração de

anticorpos.

No exemplo de ratas Sprague-Dawley, a vacina preparada a partir dos conjugados que diferem na relação oligossacarídeo-proteína mostraram também altas concentrações de anticorpos anti-Hib.

5 Em camundongos Balb C, a vacina preparada a partir de um conjugado semelhante induziu altas concentrações de anticorpos anti-polissacarídeo capsular.

10 A mistura de oligossacarídeos 30 pode ser acoplada a matrizes, como por exemplo, poliacrilamida, e pode ser empregada na detecção de anticorpos anti-Hib em humanos imunizados ou em animais de laboratório. Também é possível acoplar a mistura a um látex e empregá-la na detecção de anticorpos em doentes e vacinados. A poliacrilamida ativada segundo N. Bovin (*Glycoconjugate J.*, 1998, 15, 431-446) é reagida com a mistura de oligossacarídeos 30. Estudou-se de forma comparativa a
15 capacidade de HbO-HSA, que é a substância recomendada para a detecção de anticorpos anti-Hib, com o conjugado de 30 e a poliacrilamida, observando-se na figura 6 uma melhor relação resposta-ruído do produto com o antígeno sintético.

Exemplos de realização:

20 Exemplo 1: Síntese do 5-O-alil-2,3-di-O-benzil-D-ribitol 11.

Alilação - 100 g de metil 2,3-O-isopropilideno-D-ribofuranosida são dissolvidos em 70 ml de brometo de alila e agita-se isto na presença de 75 ml de hidróxido de sódio aquoso a 50 % e 2,6 g de iodeto de tetrabutil amônio durante 12 horas. Transcorrido este tempo, interrompe-se a
25 agitação e as fases são separadas. A capa aquosa é extraída com 70 ml de diclorometano e as fases orgânicas reunidas são evaporadas e secadas em vácuo.

Hidrólise - O xarope resultante é dissolvido em 1,5 l de metanol. Adiciona-se à solução 3,6 ml de ácido sulfúrico aquoso 0,4 N e a

mistura é refluxada durante 3 horas. Uma vez concluída a reação, neutraliza-se o ácido com bicarbonato de sódio, filtram-se os sais resultantes e a solução é evaporada em vácuo. O resíduo é extraído com acetato de etila, secado e evaporado. O xarope resultante é secado em vácuo durante pelo menos 2 horas.

Benzilação - Posteriormente, o produto obtido é dissolvido em 450 ml de dimetilformamida. A solução resultante é resfriada a 0°C e adiciona-se lentamente à mesma 50 g de hidreto de sódio. A mistura é agitada durante 30 minutos e, posteriormente, goteja-se sobre a mesma 150 ml de cloreto de benzila. Após 2 horas de agitação adiciona-se por gotejamento sobre a reação 20 ml de metanol. A suspensão resultante é evaporada em vácuo, redissolvida em diclorometano e lavada com água. A fase orgânica é secada com sulfato de sódio e evaporada.

Hidrólise - O xarope resultante da reação anterior é dissolvido em 1,5 l de dioxano. Adiciona-se HCl (2N, 1,5 l) e aquece-se o sistema até uma temperatura de 75-80°C. Após 2 horas de reação interrompe-se a agitação e as fases são separadas. A fase aquosa é extraída duas vezes com 200 ml de diclorometano e as fases orgânicas unidas são rotoevaporadas. O produto concentrado é dissolvido em 1 litro de diclorometano e lavado sucessivamente com 400 ml de água, 300 ml de solução saturada com bicarbonato de sódio e 400 ml de água, e, finalmente, isto é secado com sulfato de sódio e rotoevaporado.

Redução - O xarope resultante é dissolvido em etanol (800 ml) e resfria-se o sistema até 20°C e adiciona-se 24 g de NaBH₄. A mistura reacional é agitada à temperatura ambiente durante 1,5 horas e, uma vez finalizada a reação, destrói-se o excesso de boroidreto com ácido acético até que alcance um pH 7-8. A solução resultante é filtrada e rotoevaporada. O resíduo é dissolvido em 500 ml de diclorometano e a solução orgânica é lavada com água, secada com sulfato de sódio e empregada no exemplo

seguinte.

Exemplo 2: Purificação do 5-O-alil-2,3-di-O-benzil-D-ribitol

11.

À solução diclorometanólica do 5-O-alil-2,3-di-O-benzil-D-ribitol 11 bruto proveniente do exemplo anterior adiciona-se 300 g de sílica-gel. Agita-se manualmente o sistema até que o produto seja absorvido na fase sólida e evapora-se em vácuo para eliminar o dinitrilo. O produto absorvido em sílica-gel é colocado em um equipamento de percolação. As impurezas presentes são extraídas com cicloexano durante 48 horas. Posteriormente, troca-se o solvente por diclorometano e o produto é extraído em forma de xarope amarelo claro cromatograficamente puro. Rendimento de 75-95 %. RMN ^{13}C δ 60,7 (C-1), 70,2 (C-4), 71,0, 71,7, 72,0, 73,6 (PhCH₂C-5, OCH₂CH=), 79,2, 79,3 (C-2,3), 117,1 (CH₂=), 127,5-128,2 (Ph), 134,3 (CH=), 138,0, 138,1 (Cipso).

Exemplo 3: Síntese do 5-O-alil-2,3,4-di-O-benzil-D-ribitol 14.

Tritilação - 100 g de 5-O-alil-2,3-di-O-benzil-D-ribitol 11 proveniente do exemplo anterior são secados em vácuo e dissolvidos em 600 ml de piridina. Adiciona-se mais 75 ml de trifenilclorometano e 0,5 g de dimetilaminopiridina e a mistura é agitada a 50°C durante 6 horas. Uma vez concluída a reação a mesma é evaporada e o resíduo é dissolvido em 500 ml de diclorometano, lavado com 1 l de água, secado com sulfato de sódio e evaporado. O resíduo é secado em vácuo durante 3 horas.

Benzilação - O xarope da etapa anterior é dissolvido em 300 ml de dimetilformamida e a solução é resfriada a 5°C. Adiciona-se lentamente 25 g de hidreto de sódio e, uma vez terminada a adição, mantém-se a agitação durante 30 minutos. Goteja-se então 40 ml de cloreto de benzila e a reação é deixada agitando durante 1 hora. Uma vez concluída a reação, resfria-se e goteja-se 10 ml de metanol para destruir o excesso de reagente, os solventes são evaporados e o resíduo resultante é dissolvido em 500 ml de

diclorometano, lavando-se com 1 l de água. A fase orgânica é secada com sulfato de sódio e evaporada.

Hidrólise - O resíduo é dissolvido em 1 l de ácido acético, adiciona-se 110 ml de água destilada à reação, agita-se a 80°C. Após 1,5 hora, a reação termina. O solvente é evaporado e o resíduo é dissolvido em 500 ml de cicloexano, a fase orgânica é resfriada a 0-5°C durante 4 horas e filtrada. A fase orgânica é lavada com água, secada sobre sulfato de sódio e evaporada. O produto é obtido puro por destilação entre 200-220°C a 0,1 mm. Rendimento de 80-90 g a partir de 100 g de ribose. RMN ^{13}C δ 61,2 (C-1), 69,6, 71,8, 72,1, 72,3, 73,9 (PhCH₂C-5, OCH₂CH=), 78,0, 78,8, 78,9 (C-2,3,4), 116,8 (CH₂=), 127,5-128,2 (Ph), 134,7 (CH=), 138,0, 138,1, 138,2 (Cipso).

Exemplo 4: Síntese do 5-O-alil-2,3,4-tri-O-benzil-1-O-(β -D-ribofuranosil)-D-ribitol 4

Glicosilação - Adiciona-se em um reator o derivado do exemplo anterior (370 g) dissolvido em 2,7 l de dicloroetano seco. Resfria-se o sistema de reação a 0-25°C, adiciona-se peneiras moleculares de 4 Å em pó (207 g) e, após 15 minutos, adiciona-se uma solução de trifluoroeterato de boro (407 ml) a um fluxo próximo de 15 ml/min. Por último, adiciona-se o peracetato de ribofuranosila 15 (370 g) dissolvido em diclorometano seco (1 l) durante um período aproximado de 20 minutos e mantém-se o sistema reagindo durante 3 horas. Verifica-se o consumo do produto de saída com CCD empregando-se o sistema de solventes hexano/acetato de etila (2/1) e se revela com H₂SO_{4(c)} a 5 % e etanol. Ao fim da reação neutraliza-se com trietilamina (222 ml) até pH 7 e, posteriormente, adiciona-se solução saturada de bicarbonato de sódio (800 ml) e se deixa agitando durante meia hora. A reação deve manter-se a um pH neutro. Descarrega-se o conteúdo do reator e filtra-se em vácuo. O sólido obtido é lavado 2 vezes com dicloroetano (200 ml) para arrastar o produto retido na torta sólida. A fase sólida é

desmanchada e a fase orgânica é extraída duas vezes com 600 ml de água, seca-se com sulfato de sódio e evapora-se em vácuo.

Desacetilação - Ao xarope resultante da reação anterior dissolvido em metanol (2 l) adiciona-se uma solução de metóxido de sódio em metanol (1 %) até que o pH do meio reacional alcance 9. Mantém-se o sistema reagindo durante quase 2 horas. Ao terminar a reação neutraliza-se com resina ácida até pH 6-7. A resina é separada por filtração em vácuo. O xarope obtido (427 g) contém, além do produto desejado, 5-*O*-alil-2,3,4-trio-*O*-benzil-D-ribitol sem reagir, D-ribose e outras impurezas não determinadas.

Exemplo 5: Purificação do 5-*O*-alil-2,3,4-trio-*O*-benzil-1-*O*-(β-D-ribofuranosil)-D-ribitol 4.

O xarope proveniente do exemplo anterior é dissolvido em diclorometano (1 l) e adiciona-se sílica-gel (1 kg). Agita-se o sistema manualmente até o produto seja absorvido na fase sólida e evapora-se em vácuo para eliminar o diclorometano. O sólido resultante é mantido em vácuo durante 2 horas para eliminar qualquer traço de diclorometano.

O produto absorvido em sílica-gel é colocado em um equipamento de percolação. As impurezas presentes são extraídas com cicloexano durante 48 horas. Posteriormente troca-se o solvente com clorofórmio e o produto é extraído em forma de xarope amarelo claro cromatograficamente puro. Rendimento de 238 g. RMN ¹H δ 5,85 (m, 1H, CH=), 5,20 (m, 2H, CH₂=), 4,85 (s, 1H, H-1'), ¹³C δ 62,8 (C-5'), 77,7, 77,9, 78,2 (C-2,3,4), 84,0 (C-4'), 107,2 (C-1').

Exemplo 6: Síntese do 5-*O*-alil-2,3,4-tri-*O*-benzil-1-*O*-(β-D-2',5'-di-*O*-benzil-ribofuranosil)-D-ribitol 5.

Benzilação - Dissolve-se o derivado resultante do exemplo anterior (200 g) em tolueno (2 l), adiciona-se Bu₂SnO (80 g) e refluxa-se durante 4 horas. Resfria-se à temperatura ambiente e adiciona-se pouco a pouco NaH a 50 % (56 g). Agita-se a 80°C durante aproximadamente meia

hora e adiciona-se iodeto de tetrabutyl amônio (62 g). Agita-se a 80°C durante aproximadamente 1 hora e adiciona-se então o cloreto de benzila (148 ml). Continua-se a agitação a 80°C e as adições de porções semelhantes de cloreto de benzila com aproximadamente meia hora de intervalo até que o CCD (hexano/acetado de etila – 2/1) mostre que o produto majoritário na reação seja o dissacarídeo dibenzilado. Resfria-se então a reação, neutraliza-se com uma solução metanólica a 1 % de HCl e filtra-se sob pressão reduzida utilizando celite como auxiliar de filtração. Evapora-se o tolueno a pressão reduzida. O produto obtido com sais da evaporação é dissolvido em acetato de etila, filtrado sob pressão reduzida e concentrado. O xarope bruto é purificado por meio de cromatografia de coluna utilizando-se um sistema de solventes tolueno/acetona - 60/1. O produto puro 5 é obtido como xarope (100 g). RMN-¹H δ 5,96 (m, 1H, -CH=), 5,18 (m, 2H, CH₂=), 5,02 (s, 1H, H-1)

Exemplo 7: Síntese do 2,3,4-tri-*O*-benzil-1-*O*-(β-D-2',5'-di-*O*-benzil-3'-*O*-trietilamônio fosfonato-ribofuranosil)-D-ribitol (19).

Isomerização do grupo alila - 20 g do xarope resultante do exemplo anterior são secados em alto vácuo durante 2 horas. Adiciona-se ao mesmo dimetilsulfóxido seco (100 ml) e t-butóxido de potássio (6,4 g). A reação é colocada a 100°C durante uma hora, e logo verte-se sobre 250 ml de água gelada. Adiciona-se ácido clorídrico concentrado por gotejamento até que o pH da reação alcance 7. Extrai-se com 3 vezes 80 ml de éter etílico. As fases orgânicas unificadas são secadas com sulfato de sódio e são evaporadas.

Fosfonilação - Prepara-se uma solução de imidazol (1,5 g) em acetonitrila seca (34 ml), resfria-se a 0°C e adiciona-se à mesma tricloreto de fósforo (0,56 ml) e trietilamina 3,1 ml. A solução é agitada durante 15 minutos e adiciona-se à mesma por gotejamento o dissacarídeo resultante da etapa anterior dissolvido em acetonitrila (3 ml). A mistura é agitada durante 15 minutos à temperatura ambiente e interrompe-se a reação adicionando-se à

mesma solução 1M de brometo de trietilamônio. Agita-se durante 10 minutos e adiciona-se à mesma diclorometano, as fases são separadas e a fase orgânica é lavada com solução fria de brometo de trietilamônio. A fase orgânica é lavada, secada com sulfato de sódio e evaporada.

5 *Hidrólise da propenila* - O produto é dissolvido em ácido acético a 60 % e agitado a 70 % durante 30 minutos, o solvente é evaporado e a mistura redissolvida em diclorometano, e lavada com solução de brometo de trietilamônio, secada e evaporada. A cromatografia de coluna do xarope resultante permite obter-se o produto puro com um rendimento que oscila
10 entre 70-85 %.

 RMN ^1H δ 6,85 (d, H-P), 4,95 (s, H-1), 4,60 (m, H-3), 2,93 (q, NCH_2CH_3) 1,20 (t, NCH_2CH_3). ^{13}C δ 105,9 (C-1).

Exemplo 8: Reação de policondensação entre 19 e 26 (relação 10-1)

15 A uma solução do composto 19 (1 g) em piridina-trietilamina (10-1,1 ml) adiciona-se cloreto de trimetilacetila (0,14 ml) e a reação é agitada durante 20 minutos. Adiciona-se então o espaçador 26 (14,6 mg) e uma nova quantidade de cloreto de trimetilacetila (0,9 ml) e a reação é novamente agitada durante 1 hora. Adiciona-se uma solução de I_2 (1,1 g) em
20 piridina-água (7,3 ml; 20-1) e agita-se durante 30 minutos. A reação é diluída com diclorometano e lavada com solução 1 M de tiosulfato de sódio e com uma solução fria de brometo de trietilamônio (0,5 M), secada com sulfato de sódio e evaporada. O produto é ressuspenso em metanol e cromatografado através de uma coluna de Sephadex LH-20 previamente estabilizada em
25 metanol. As frações correspondentes são reunidas e evaporadas. Rendimento de 80 %.

Exemplo 9: Reação de policondensação entre 19 e 26 (relação 10-1)

 A uma solução do composto 19 (1 g) e do espaçador 26 (14,6

mg) em piridina-trietilamina (10-1,1 ml) adiciona-se cloreto de trimetilacetila (0,23 ml) e a reação é agitada durante 2 horas. Adiciona-se uma solução de I₂ (1,1 g) em piridina-água (7,3 ml; 20-1) e o produto é tratado de maneira semelhante ao exemplo 8.

5 Exemplo 10: Reação de policondensação entre 19 e 26
 (relação 5-1)

 A uma solução do composto 19 (1 g) e o espaçador 24 (29,2 mg) em piridina-trielamina (10-1, 1 ml) adiciona-se cloreto de trimetilacetila (0,23 ml) e a reação é agitada durante 2 horas. Adiciona-se uma solução de I₂ (1,1 g) em piridina-água (7,3 ml; 20-1) e o produto é tratado de maneira semelhante ao exemplo 8.

Exemplo 11: Reação de policondensação entre 23 e 26
 (relação 5-1, solvente piridina)

15 A uma solução do composto 23 (1 g) e do espaçador 26 (29,2 mg) em piridina (1 ml) adiciona-se cloreto de trimetilacetila (0,23 ml) e a reação é agitada durante 2 horas. Adiciona-se uma solução de I₂ (1,1g) em piridina-água (7,3 ml; 20-1) e o produto é tratado de maneira semelhante ao exemplo 8.

20 Exemplo 12: Reação de policondensação entre 19 e 24
 (relação 5-1, solvente piridina)

 A uma solução do composto 19 (1 g) e do espaçador 24 (29,2 mg) em piridina (1 ml) adiciona-se cloreto de trimetilacetila (0,23 ml) e a reação é agitada durante um intervalo de 2 horas. Adiciona-se uma solução de I₂ (1,1 g) em piridina-água (7,3 ml; 20-1) e o produto é tratado de maneira semelhante ao exemplo 8.

Exemplo 13: Reação de hidrogenação dos produtos dos
 Exemplos 8-12

 O produto bruto dos exemplos 8-12 é hidrogenado numa mistura de acetato de etila-água-ácido acético (1-2-2-0,1) com paládio a 10 %

sobre carvão e, finalmente, purifica-se com troca iônica através de Sephadex C-25 Na. O liofilizado caracterizado por RMN mostra que o produto contém a unidade repetitiva Rib-Rib-fosfato e o espaçador. As frações ativas são obtidas com duas ultrafiltrações, primeiro através de uma membrana com intervalo de corte 1000 e o retido é ultrafiltrado por 10.000. O que passa pela membrana é liofilizado dando o produto final 28 com um rendimento global que oscila dependendo das condições selecionadas entre 20-80 % com respeito ao dissacarídeo de saída. RMN ^1H δ 5,12 (H-1), 4,60 (H-3), 3,29 (CH_2NH_2). ^{31}P δ 2,14 (espaçador-P-Rib) 0,74 (Ribitol-P-Rib).

10 Exemplo 14: Síntese do derivado 5-(3-maleimidopropionamido)-3-oxapentil oligo ribosil ribitol fosfato 30.

A uma solução do produto do exemplo anterior (3,34 mg, 1,73 μmol) em água bidestilada (0,1 ml) adicionou-se 0,7 mg (2,62 μmol) de N-hidroxisuccinimidil β -maleimidopropionato 27 dissolvido em N,N-dimetilformamida (0,4 ml). Após 4 horas de reação (0,5 ml) centrifugou-se (10 minutos, 3500 rpm) e o sobrenadante foi diluído com água bidestilada, procedendo-se à ultrafiltração com um equipamento Amicon através de uma membrana com valor de corte 1000. O retido na membrana foi liofilizado. O rendimento oscila entre 85 e 95 %. RMN: ^1H , δ 6,95 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 5,01 (s, H-1) 3,41 (t, 2H, CH_2NH), 2,56 (t, 2H, CH_{2a}).

20 Exemplo 15: Análise dos produtos obtidos no Exemplo 13 por meio de cromatografia de troca iônica

Os produtos dos exemplos 8-12 hidrogenados e em forma de sal de sódio são analisados por meio de cromatografia de troca iônica em uma coluna HR 5/5 de Mono Q, com um gradiente linear de cloreto de sódio (P. Constantino, *et al.*, *Vaccine* 1999, 17, 1251-1263). O perfil cromatográfico de eluição representado na figura 1B mostra que a mistura de oligossacarídeos do exemplo 8 contém fragmentos de diferente tamanhos. Comparando-se com o reportado na literatura e no cromatograma A de um pentâmero pode-se

concluir que estão representadas, na mistura, 4-5 unidades repetitivas, até mais de 20.

Exemplo 16: Conjugação com as proteínas da membrana externa de *Neisseria meningitidis*

5 Dissolve-se a massa de proteína da membrana externa de *Neisseria meningitidis* ou meningococo (OMPC) de um frasco que contém aproximadamente 400 mg de proteína em 80 ml de PBS de pH 8 com N₂ (g) durante 5 minutos, mantendo-se a agitação e em banho de água com gelo. Adiciona-se 1,6 ml da solução de DSP em DMP e agita-se lentamente a 4°C
10 durante 2 horas. Adiciona-se 1,6 ml de solução de DTT em PBS e agita-se lentamente a 4°C o frasco bem tampado durante 1 hora. Transvasa-se a solução para um frasco com 20-400 ml de etanol frio e centrifuga-se a 1800 rpm e 4°C durante 30 minutos. Decanta-se o sobrenadante e o sólido é ressuspenso em uma pequena porção de etanol, e logo adiciona-se entre 200-
15 400 ml de etanol. Centrifuga-se novamente. Ressuspende-se a torta obtida em 80 ml de PBS pH = 7-9. Adiciona-se uma solução do oligossacarídeo sintético funcionalizado 30 e agita-se durante 1-48 horas. Uma vez concluído o processo repete-se as operações de precipitação etanólica-centrifugação, seguido de uma ultrafiltração por uma membrana de 30.000 e, finalmente,
20 reconstitui-se no tampão de PBS a uma concentração antígeno sintético de 40-80 µg por ml.

Exemplo 17: Conjugação com toxóide tetânico

A solução de toxóide tetânico a uma concentração de 5 mg/ml em PBS de pH 8 é borbulhada com N_{2(g)} durante 5 minutos, mantendo-se a
25 agitação e em banho de água com gelo. Adiciona-se 1,6 ml da solução de DSP em DMP e agita-se lentamente a 4°C durante 2 horas. Adiciona-se 1,6 ml de solução de DTT em PBS e agita-se lentamente a 4°C o frasco bem tampado durante 1 hora. Transvasa-se a solução para um equipamento de ultrafiltração com membrana de 10.000, procede-se à ultrafiltração

adicionando-se tampão fresco previamente borbulhado com $N_{2(g)}$ ao retido pela membrana, até que a solução daquilo que passa pela membrana seja negativa no teste de Ellman para tiois. Adiciona-se uma solução do oligossacarídeos sintético funcionalizado 30 e agita-se durante 1-48 horas.

- 5 Uma vez concluído o processo, repetem-se as operações de ultrafiltração por membrana de 10.000 até que a solução daquilo que passa pela membrana seja negativa no teste de fenol-sulfúrico para açúcares. Finalmente reconstitui-se no tampão de PBS a uma concentração de antígeno sintético de 40-80 μg por ml.

10 Exemplo 18: Conjugação com dioctadecil glicerina hemissuccinato

- O produto do exemplo 8 (10 mg) é dissolvido em 1 ml de dimetilformamida, mistura-se com uma solução do hemissuccinato dioctadecil glicerina ativado em forma de N-hidroxisuccinimida 31.
- 15 Adiciona-se etil diaminopropilcarbodiimida (5 mg) e a reação é agitada durante 6 horas. Adiciona-se uma nova porção de carbodiimida e a reação é continuada com agitação durante 6 horas. O solvente é evaporado e a mistura é aplicada a uma coluna de C18-sílica-gel (1 g). Elui-se com água para remover o oligossacarídeo e, finalmente, com uma concentração crescente de
- 20 metanol-água para eluir o produto da reação. Rendimento de 85 %. RMN ^1H δ 5,12 (H-1), 4,60 (H-3), 3,40 (CH_2NH), 1,30 (CH_2), 0,90 (CH_3).

Exemplo 19: Preparação da vacina sem adjuvante

- O imunógeno obtido no exemplo 16 que se encontra dissolvido em tampão de PBS a uma concentração de 40 μg por ml é diluído
- 25 em condições assépticas e a 4-8°C com uma solução de água bidestilada. Agita-se durante 10 minutos. Determina-se a concentração do antígeno de Hib e das proteínas por meio de ensaios colorimétricos e ajusta-se adicionando mais tampão de PBS a uma concentração final do antígeno de Hib de 20 mg/ml. Adiciona-se tiomersal até uma concentração final de 0,1-

0,001 %. A suspensão resultante constitui o granel de uma vacina conjugada contra Hib sem adjuvante.

Exemplo 20: Preparação da vacina anti-Hib com alumina como adjuvante

5 O imunógeno obtido no exemplo 16 que se encontra dissolvido em tampão de PBS a uma concentração de 40 µg é misturado em condições assépticas e a 4-8°C com uma solução de alumina 1-0,001 mg por ml em água bidestilada. Agita-se durante 20 min. Determina-se a concentração do antígeno de Hib e das proteínas por meio de ensaios
10 colorimétricos e ajusta-se adicionando-se mais tampão de PBS a uma concentração final do antígeno de Hib de 20 mg/ml. Adiciona-se timerosal até uma concentração final de 0,1-0,001 %. A suspensão resultante constitui o granel de uma vacina conjugada contra Hib com adjuvante de alumina.

Exemplo 21: Preparação de uma vacina combinada anti-Hib e
15 anti-meningocócica B.

O imunógeno obtido no exemplo 16 que se encontra dissolvido em tampão de PBS a uma concentração de 80 µg por ml que tem uma proporção oligossacarídeo-proteína entre 1-3 e 1-5, é misturado em condições assépticas e a 4-6°C com uma solução do complexo de proteínas
20 da membrana externa (OMPC) de *Neisseria meningitidis* tipo b, dentre as empregadas na produção da vacina VA MENGOC BC, a uma concentração em PBS de 100-200 mg por ml. Após 20 minutos de homogeneização por agitação magnética suave, o conteúdo da reação é misturado com igual volume de solução de alumina 1-0,01 mg por ml em água bidestilada. Agita-
25 se durante 20 minutos a 4-6°C. Determina-se a concentração do antígeno de Hib por estimativa de ribose e das proteínas mediante o método de Lowry e ajusta-se adicionando mais tampão de PBS a uma concentração final de 0,1-0,001 %. A suspensão resultante constitui o granel de uma vacina combinada anti-Hib e anti-meningocócica B adjuvada com alumina.

Exemplo 22: Preparação de uma vacina combinada anti-Hib e anti-DTP

O imunógeno obtido no exemplo 16 que se encontra dissolvido em tampão de PBS a uma concentração de 80 µg por ml, é
5 misturado em condições assépticas e a 4-6°C com uma solução de granel final da vacina tripla bacteriana que se encontra a uma concentração quatro vezes superior àquela usualmente empregada na formulação final. Após 20 minutos de homogeneização por agitação magnética suave, o conteúdo da
10 reação é misturado com igual volume de solução de alumina 1-0,01 mg por ml de água bidestilada. Agita-se durante 20 minutos a 4-6°C. Determina-se a concentração do antígeno de Hib por estimativa de ribose e das proteínas totais mediante Lowry e ajusta-se adicionando mais tampão de PBS a uma concentração final do antígeno de Hib de 20 mg/ml. Adiciona-se tiomersal até uma concentração final de 0,1-0,001 %. A suspensão resultante constitui
15 o granel de uma vacina combinada anti-Hib e anti-DTP adjuvada com alumina.

Exemplo 23: Ensaio imunológicos da vacina obtida a partir do oligômero e a OMP

A vacina dos exemplos 19 e 20 foi utilizada para imunizar a
20 uma dose de 1 µg ou 2 µg de antígeno. Os animais usados para este ensaio foram coelhos, ratos e camundongos. Realizaram-se 2 imunizações com 4 semanas de intervalo e 3 extrações de sangue para todos os experimentos a 0,28 e 42 dias. Após coletadas, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3500 r.p.m. durante 20 minutos. Os soros assim obtidos foram diluídos 10
25 vezes e armazenados a -40°C até o momento de sua análise.

A avaliação da resposta de anticorpos dos soros de todos os animais imunizados foi realizada mediante um ensaio imunoenzimático tipo ELISA indireto. Os resultados alcançados são mostrados nas figuras 2-5.

Exemplo 24: Conjugado da mistura de oligossacarídeos

sintéticos e p-nitrofenilacrilato

A mistura de oligossacarídeos do exemplo 13 (10 mg) é dissolvida em dimetilformamida e adicionada sobre uma solução de p-nitrofenilacrilato (10-30 mg) em dimetilformamida (1 ml). Adiciona-se 0,1-0,5 ml de trietilamina e a reação é mantida com agitação durante 16 horas. Adiciona-se à mesma 0,1-0,5 ml de amoníaco e a agitação é continuada durante 24 horas. A solução é aplicada numa coluna de Sephadex LH-20 em acetonitrila. Elui-se com uma mistura de acetonitrila-água. As frações positivas de ribose segundo o ensaio de orcinol são reunidas e liofilizadas. O rendimento é superior a 80 %.

Exemplo 25: Capacidade do conjugado do oligossacarídeo sintético de detectar anticorpos anti-Hib

Uma solução do produto do exemplo anterior em tampão de carbonato-bicarbonato é aplicada a uma concentração de 1-100 µg por ml sobre a metade de uma placa de 96 poços. Na outra metade aplica-se o antígeno HbO-HSA à concentração recomendada. Procede-se realizando um ensaio de tipo ELISA empregando um soro anti-Hib, o soro de camundongos imunizados com um conjugado do polissacarídeo natural conjugado com toxóide tetânico. Os resultados obtidos neste ensaio são mostrados na Figura 6.

Breve descrição das figuras

Figura 1. Cromatograma típico das frações de oligômeros obtidas no Exemplo 15 por meio de cromatografia de troca iônica em Mono Q HR 5/5 com um gradiente linear de NaCl de 0-500 mM, em que A: pentâmero; B: oligômero do Exemplo 10.

Figura 2. Respostas dos anticorpos de coelhos imunizados com a vacina do Exemplo 16.

Figura 3. Respostas dos anticorpos de coelhos imunizados com a vacina do Exemplo 15.

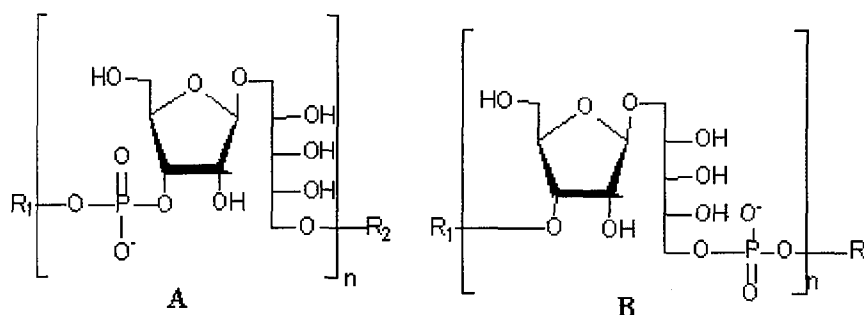
Figura 4. Respostas dos anticorpos de ratos imunizados com a vacina do Exemplo 15.

Figura 5. Respostas dos anticorpos de camundongos Balb C imunizados com a vacina do Exemplo 15.

5 Figura 6. Capacidade do conjugado de 26-PPA para detectar anticorpos anti-Hib.

REIVINDICAÇÕES

1. Procedimento para sintetizar uma mistura de oligossacarídeos compreendendo unidades repetitivas de fórmula (fosfato-ribose-ribitol)_n ou (ribose-ribitol-fosfato)_n



5 em que

n = é um número inteiro entre 4 e 25

R_1 = espaçador e R_2 = H; ou R_2 = espaçador e R_1 = H

caracterizado pelo fato de que a reação para formar o oligossacarídeo acima compreende as seguintes etapas: 2,3,4-tri-*O*-benzil-1-
 10 *O*-(β-D-2',5'-di-*O*-benzil-3'-*O*-triethylamônio fosfonato-ribofuranosil)-D-ribitol ou 2,3,4-tri-*O*-benzil-5-*O*-triethylamônio fosfonato-1-*O*-(β-D-2',5'-di-*O*-benzil-ribofuranosil)-D-ribitol sendo submetidos a uma reação de policondensação adicional na presença de um promotor, com um espaçador em um solvente básico, em que o promotor é cloreto de pivaloíla ou cloreto
 15 de adamantano-1-carbonila e dito espaçador como um receptor pode interromper o crescimento das cadeias de oligômero, em que dito espaçador tem a fórmula geral R_3 -Y-OH, em que Y é uma cadeia alifática que pode incluir anel(éis) aromático(s) ou pode incluir heteroátomos em um número de 0 a 5, em que R_3 é grupo funcional na extremidade terminal do espaçador que
 20 pode ser selecionado de NH_2 , COOR, CHO, SH, ou azida; e o produto da policondensação sendo ainda submetido à oxidação do fosfonato a fosfato, seguido de hidrogenação para remover os grupos protetores benzila,

desproteção ou ativação do espaçador e eliminação das frações maiores que 25 unidades repetitivas, por meio de um ou vários processos de peneiração molecular.

2. Procedimento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que 2,3,4-tri-*O*-benzil-1-*O*-(β -D-2',5'-di-*O*-benzil-3'-*O*-trietilamônio fosfonato-ribofuranosil)-D-ribitol ou 2,3,4-tri-*O*-benzil-5-*O*-trietilamônio fosfonato-1-*O*-(β -D-2',5'-di-*O*-benzil-ribofuranosil)-D-ribitol e o promotor encontram-se em uma proporção molar de 1/1-3.

3. Procedimento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o espaçador é 5-azido-3-oxapentanol.

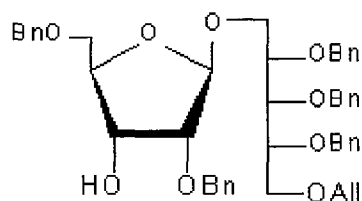
4. Procedimento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que 2,3,4-tri-*O*-benzil-1-*O*-(β -D-2',5'-di-*O*-benzil-3'-*O*-trietilamônio fosfonato-ribofuranosil)-D-ribitol ou 2,3,4-tri-*O*-benzil-5-*O*-trietilamônio fosfonato-1-*O*-(β -D-2',5'-di-*O*-benzil-ribofuranosil)-D-ribitol e o espaçador encontram-se numa proporção molar entre 5-10/1.

5. Procedimento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dissacarídeo é 2,3,4-tri-*O*-benzil-1-*O*-(β -D-2',5'-di-*O*-benzil-3'-*O*-trietilamônio fosfonato-ribofuranosil)-D-ribitol, o espaçador é 5-azido-3-oxapentanol, o promotor é cloreto de pivaloíla e o solvente básico é piridina.

6. Procedimento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que 2,3,4-tri-*O*-benzil-1-*O*-(β -D-2',5'-di-*O*-benzil-3'-*O*-trietilamônio fosfonato-ribofuranosil)-D-ribitol ou 2,3,4-tri-*O*-benzil-5-*O*-trietilamônio fosfonato-1-*O*-(β -D-2',5'-di-*O*-benzil-ribofuranosil)-D-ribitol em forma pura são obtidos empregando o 2,3,4-tri-*O*-benzil-5-*O*-alil-(β -D-ribofuranosil)-D-ribitol, que é sintetizado por meio de ribosilação do 2,3,4-tri-*O*-benzil-5-*O*-alil-D-ribitol com peracetato de ribofuranosa seguido de desacetilação dando o composto 2,3,4-tri-*O*-benzyl-5-*O*-alil-(β -D-ribofuranosil)-D-ribitol, que é submetido a purificação por adsorção-

dessorção em sílica-gel.

7. Procedimento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o 2,3,4-tri-*O*-benzil-1-*O*-(β -D-2',5'-di-*O*-benzil-3'-*O*-triethylamônio fosfonato-ribofuranosil)-D-ribitol ou 2,3,4-tri-*O*-benzil-5-*O*-triethylamônio fosfonato-1-*O*-(β -D-2',5'-di-*O*-benzil-ribofuranosil)-D-ribitol são obtidos empregando o 5-*O*-propenil-2,3,4-tri-*O*-benzil-1-*O*-(2',5'-di-*O*-benzil- β -D-ribofuranosil)-D-ribitol que é sintetizado por um processo de dibenzilação do 2,3,4-tri-*O*-benzil-5-*O*-alil-(β -D-ribofuranosil)-D-ribitol com óxido de dibutilestanho, iodeto de tetrabutylamônio, hidreto de sódio e cloreto de benzila em uma relação 1: 0,5-2: 0,001-1, 0,5-10: 1-5, em um solvente selecionado do grupo consistindo de tolueno, benzeno, tetraidrofurano e xileno, dando o composto de fórmula



em que Bn é benzila e AlI é alila, seguido de isomerização de alila a propenila.

8. Procedimento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que 2,3,4-tri-*O*-benzil-1-*O*-(β -D-2',5'-di-*O*-benzil-3'-*O*-triethylamônio fosfonato-ribofuranosil)-D-ribitol ou 2,3,4-tri-*O*-benzil-5-*O*-triethylamônio fosfonato-1-*O*-(β -D-2',5'-di-*O*-benzil-ribofuranosil)-D-ribitol são obtidos começando a partir de 5-*O*-propenil-2,3,4-tri-*O*-benzil-1-*O*-(2',5'-di-*O*-benzil- β -D-ribofuranosil)-D-ribitol, por um método que compreende um processo de fosfonilação com tricloreto de fósforo-imidazol seguido de hidrólise do grupo propenila, ou acetilação, hidrólise do grupo propenila, e fosfonilação com tricloreto de fósforo-imidazol, seguido de desacetilação.

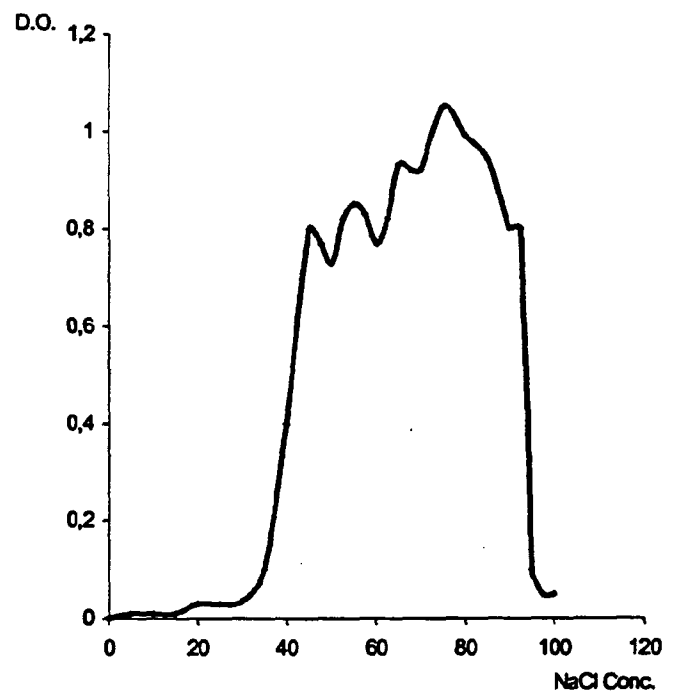
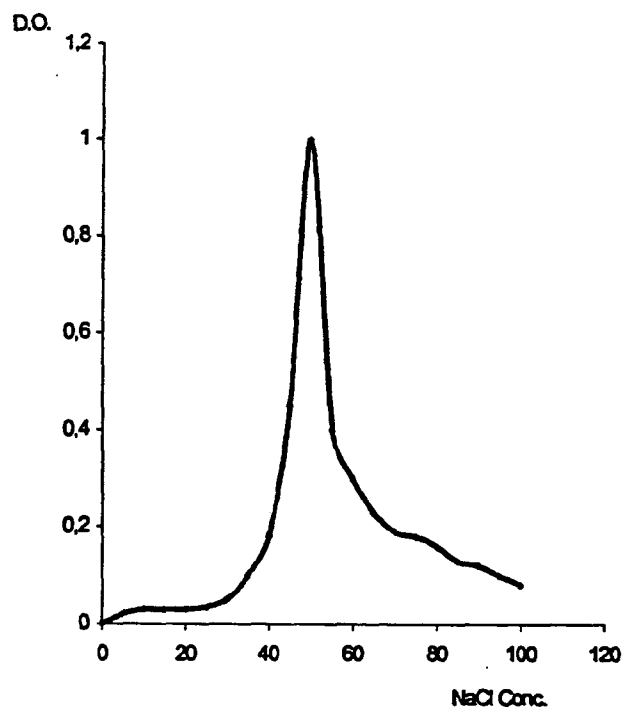
FIGURA 1

FIGURA 2

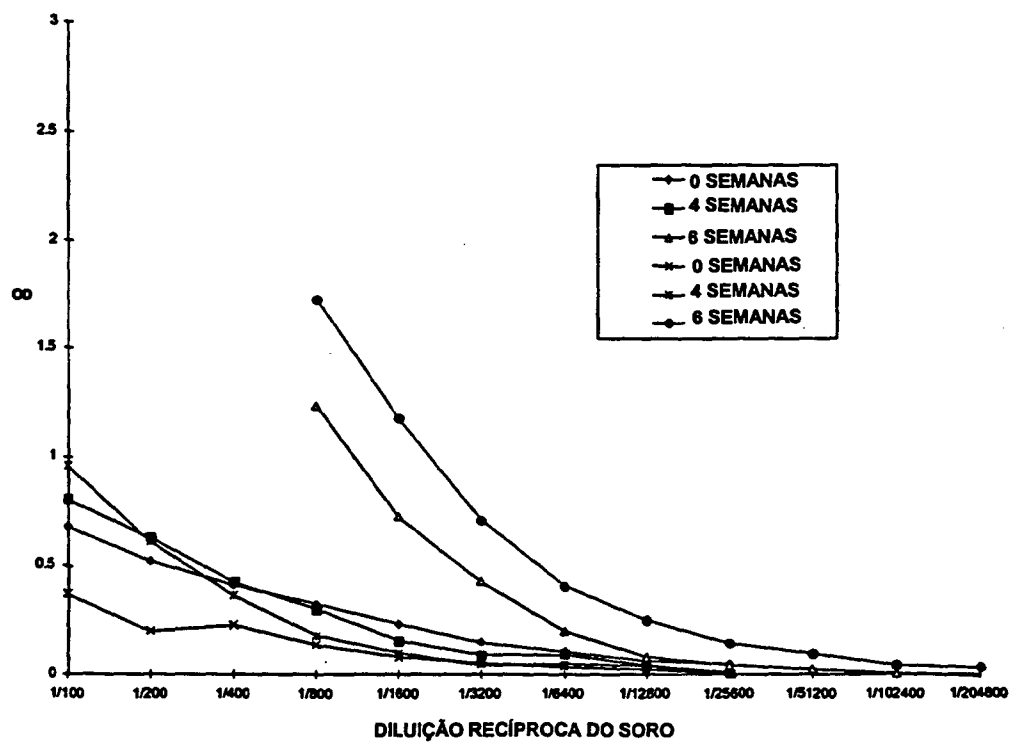


FIGURA 3

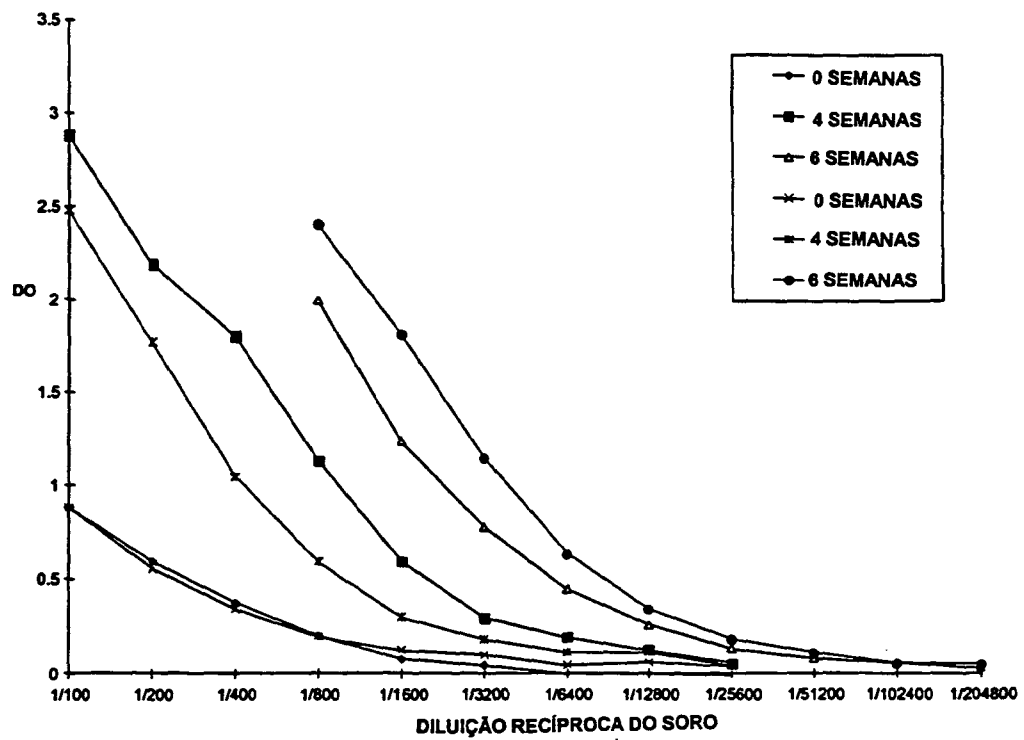


FIGURA 4

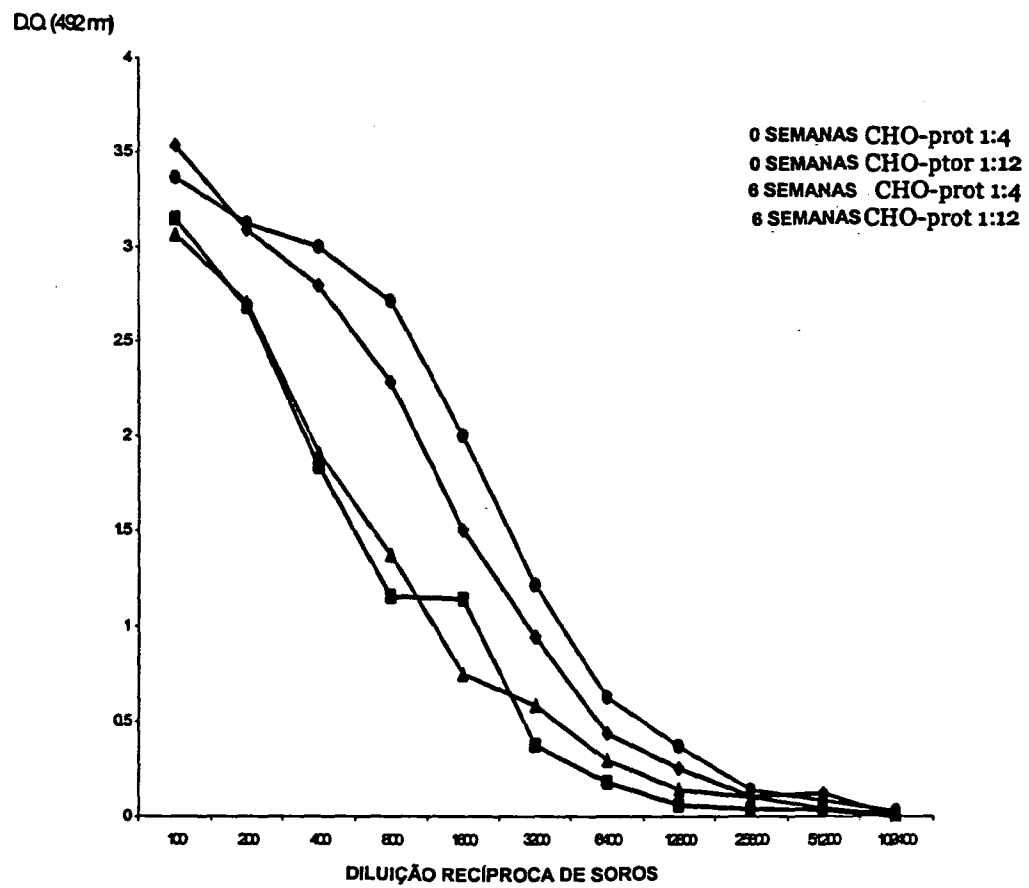


FIGURA 5

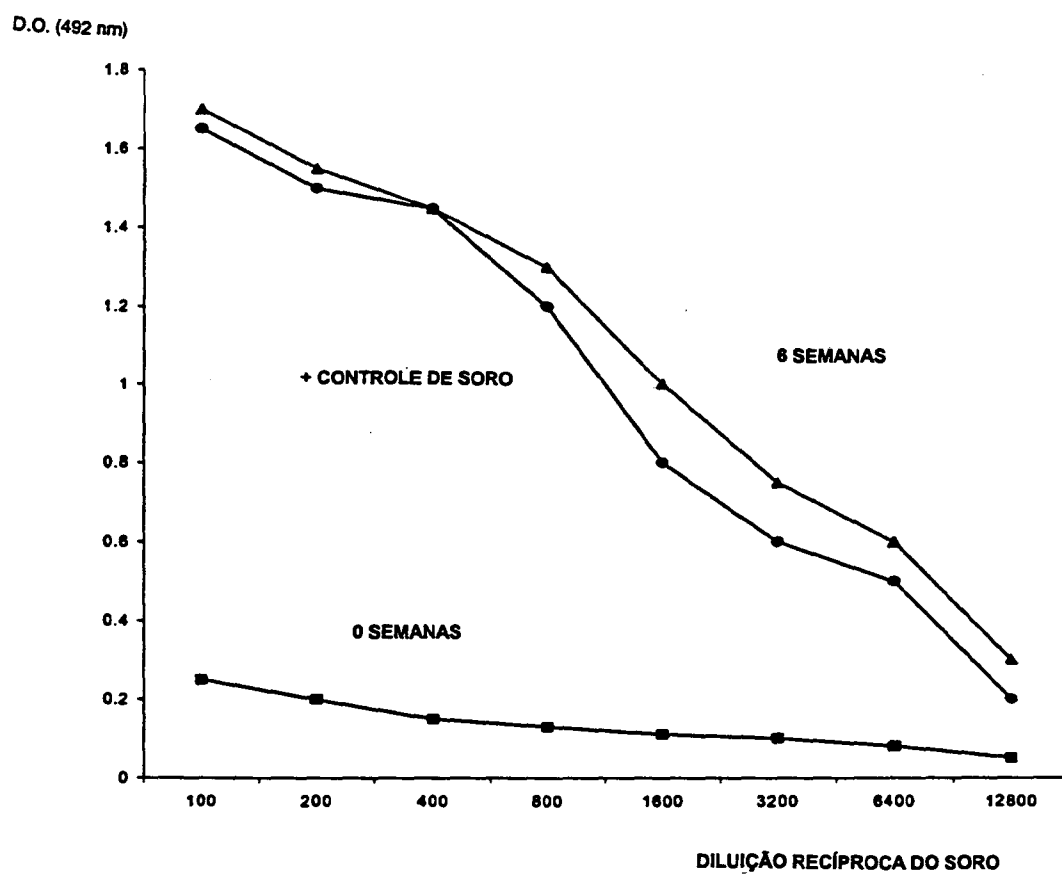
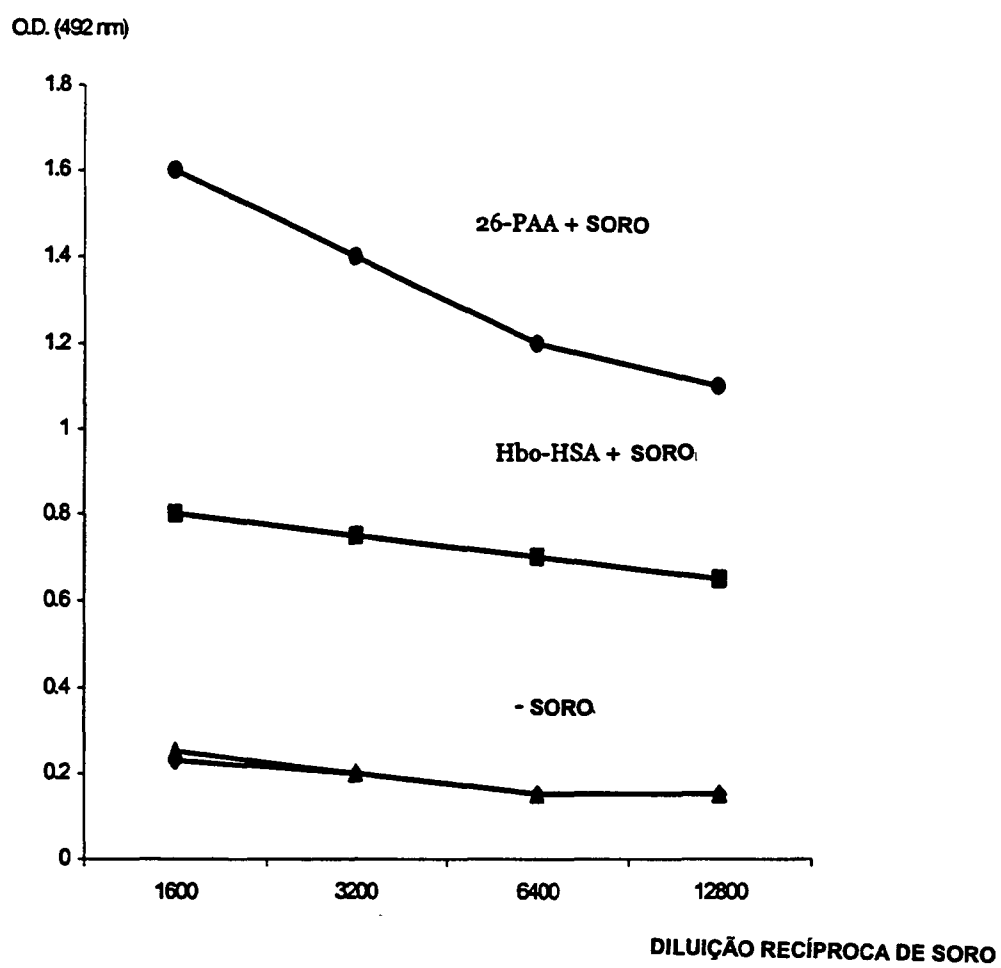


FIGURA 6



RESUMO

“PROCEDIMENTO PARA SINTETIZAR UMA MISTURA DE OLIGOSSACARÍDEOS”

A presente invenção refere-se ao campo da medicina, em particular à síntese química de misturas de oligossacarídeos derivados de ribose-ribitol-fosfato, que são empregadas como princípio ativo em vacinas para a prevenção de infecções causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), bem como às vacinas que compreendem a referida mistura de oligossacarídeos. As misturas de oligossacarídeos obtidas por síntese química da presente invenção compreendem unidades repetitivas de fórmula (fosfato-ribose-ribitol) $_n$ ou (ribose-ribitol-fosfato) $_n$ de pelo menos 5 compostos com estrutura A ou B, que representam a unidade repetitiva do polissacarídeo capsular do *Haemophilus influenzae* tipo b e que diferem apenas em n , sendo que $n \geq 4$ e ≤ 25), e em que R_1 ou R_2 é um espaçador para a conjugação a um veículo, com a condição de que $R_1 = \text{espaçador}$ se $R_2 = H$, ou $R_2 = \text{espaçador}$ se $R_1 = H$. A invenção também se refere aos imunógenos que contêm estas misturas oligossacarídicas, às vacinas que contêm estes imunógenos e aos processos para preparar estes oligossacarídeos em forma de misturas. Além disso, a invenção refere-se ao uso das vacinas, quer sejam sozinhas ou em combinação com outras vacinas, para a prevenção das infecções causadas pelo *Haemophilus influenzae* tipo b.