

(11) Número de Publicação: **PT 1490409 E**

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(51) Classificação Internacional:

C08B 37/00 (2006.01) **C07H 13/00** (2006.01)
A61K 39/095 (2006.01) **A61K 39/385** (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) **A61P 25/00** (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) **A61P 31/04** (2006.01)
C07H 13/06 (2006.01) **C07H 13/12** (2006.01)
C07H 15/00 (2006.01) **C07H 15/02** (2006.01)
C07H 15/207 (2006.01)

(22) Data de pedido: **2003.03.26**

(30) Prioridade(s): **2002.03.26 GB 0207117**
2002.08.30 GB 0220195
2002.12.18 GB 0229494
2002.12.24 GB 0230163

(43) Data de publicação do pedido: **2004.12.29**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.12.31**
066/2009

(73) Titular(es):

NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS
S.R.L.

VIA FIORENTINA 1 53100 SIENA SI IT

(72) Inventor(es):

PAOLO COSTANTINO IT
FRANCESCO BERTI IT
FRANCESCO NORELLI IT
ANTONELLA BARTOLONI IT

(74) Mandatário:

FRANCISCO NOVAES CUNHA BRITO SOTO MAIOR DE
ATAYDE
AV. DUQUE D'AVILA, N.º 32, 1º ANDAR 1000-141 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **SACÁRIDOS MODIFICADOS POSSUINDO UMA ESTABILIDADE MELHORADA EM ÁGUA**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

EPÍGRAFE:	<u>"SACÁRIDOS MODIFICADOS POSSUINDO UMA ESTABILIDADE MELHORADA EM ÁGUA"</u>
-----------	--

Campo técnico

Este invento situa-se no campo da química de polissacáridos e relaciona-se com sacáridos modificados, processos para a sua preparação e derivados conjugados. Em particular, o invento relaciona-se com sacáridos modificados possuindo uma estabilidade melhorada em água.

Antecedentes do invento

Os polissacáridos são moléculas biológicas importantes e têm sido largamente usados na indústria farmacêutica para a prevenção e tratamento de doenças. Por exemplo, os polissacáridos capsulares têm sido usados desde há muitos anos em vacinas contra bactérias capsuladas, como o meningococo (*Neisseria meningitidis*), pneumococo (*Streptococcus pneumoniae*) e Hib (*Haemophilus influenzae* tipo B).

Para intensificar a imunogenicidade destes polissacáridos, particularmente em crianças, foram desenvolvidas vacinas conjugadas. Estas compreendem um polissacárido capsular conjugado com uma proteína transportadora [p.ex., referências 1,2,3]. A conjugação poderá transformar os antígenos T-independentes em antígenos T-dependentes.

Um problema verificado com muitos tipos de polissacárido é a sua baixa estabilidade em água. A estabilidade dos polissacáridos em água depende da natureza das ligações O-

glicosídicas que ligam as unidades de sacárido entre si. A baixa estabilidade em água resulta de as ligações O-glicosídicas serem facilmente hidrolisadas na presença de ácidos ou glicosidases. O polissacárido capsular do meningococo do serogrupo A constitui um exemplo de um polissacárido com baixa estabilidade em água.

A estabilidade dos polissacáridos constitui um problema particular no fabrico de vacinas conjugadas. Para preparar uma vacina conjugada de polissacárido-proteína, é necessário manipular grupos quimicamente funcionais do polissacárido de modo a que o polissacárido possa ser ligado a uma proteína. O polissacárido poderá ser ligado directamente à proteína [2, 4], ou ligado por meio de um grupo linker. Têm sido propostos muitos tipos diferentes de grupos linker para a ligação entre polissacáridos e proteínas [p.ex., 3, 5].

A exposição de um polissacárido a reagentes químicos, particularmente a ácidos, poderá resultar num corte indesejado das ligações glicosídicas e na consequente fragmentação do polissacárido. Tal fragmentação é altamente indesejável, causando perdas de rendimento na síntese de conjugados de polissacárido-proteína.

Os polissacáridos que são instáveis desta forma requerem geralmente uma escolha cuidadosa de reagentes e condições para que se possam contornar os problemas acima descritos. No entanto, tal limita a escolha dos reagentes disponíveis para a manipulação do polissacárido, desta forma se limitando a gama de ligações que podem ser efectuadas entre o polissacárido e a proteína transportadora. Adicionalmente, a instabilidade destes polissacáridos significa que é difícil desenvolver procedimentos robustos que possam ser usados para preparar vacinas em escala industrial.

Constitui um dos objectivos do invento o fornecimento de meios para a modificação de sacáridos capsulares de modo a que estes não sofram problemas de instabilidade e mantenham a imunogenicidade.

Em GB733459 são apresentados polissacáridos pirogénicos derivados de bactérias gram negativas que são acilados, p.ex., com um anidrido de ácido orgânico. Refere-se ainda que os produtos são úteis como agentes estimuladores do sistema hipófise-suprarrenal, manifestando-se reduzidos efeitos adversos.

Em WO 98/42718 expõe-se um método para a despolimerização de polissacáridos até fragmentos sacarídicos usando a ozonólise.

A WO 93/07178 apresenta um oligossacárido derivado de um polissacárido antigénico obtido a partir de um agente patogénico, um método para a sua preparação e o seu uso, particularmente como vacina. O oligossacárido é preparado através de uma reacção de despolimerização por oxidação-redução.

Exposição do invento

O invento baseia-se na descoberta de que a modificação dos grupos hidroxilo presentes nas unidades monossacarídicas dos sacáridos capsulares oferece uma estabilidade melhorada. Os sacáridos modificados obtidos pelo processo do invento são mais estáveis à hidrólise do que os seus sacáridos nativos correspondentes.

Sacáridos modificados segundo o invento

O invento fornece um sacárido capsular modificado compreendendo um grupo bloqueante numa posição de grupo hidroxilo em pelo menos uma das unidades monossacarídicas do

sacárido capsular nativo correspondente, sendo que o sacárido capsular compreende ligações fosfodiéster.

O termo "sacárido capsular modificado" indica um sacárido que pode ser obtido a partir de um sacárido capsular nativo através de uma modificação adequada. Assim, a sequência básica de unidades monossacarídicas repetidas do sacárido capsular nativo é mantida nos sacáridos capsulares modificados de acordo com o presente invento.

O termo "sacárido" abrange tanto os oligossacáridos (p.ex., contendo desde 2 até 39 unidades monossacarídicas) como os polissacáridos (p.ex., contendo 40 ou mais unidades monossacarídicas). Tal como ocorrem naturalmente em bactérias, os sacáridos capsulares nativos tomam geralmente a forma de polissacáridos. Os polissacáridos poderão ser manipulados para dar origem a oligossacáridos mais curtos. Os oligossacáridos podem ser obtidos por purificação e/ou dimensionamento do polissacárido nativo (p.ex. por hidrólise em ácido fraco, por aquecimento, por cromatografia de exclusão por dimensões, etc.).

Tipicamente, os sacáridos modificados do presente invento são oligossacáridos. Os oligossacáridos poderão ser obtidos a partir dos polissacáridos usando qualquer dos métodos de dimensionamento acima descritos.

Os sacáridos capsulares modificados segundo o presente invento podem ser obtidos a partir dos sacáridos capsulares nativos. No entanto, o presente invento não se restringe a sacáridos modificados que se obtêm a partir de sacáridos capsulares nativos. Poderão obter-se os sacáridos capsulares modificados do presente invento recorrendo a outros métodos, como a síntese total ou parcial.

O número de unidades monossacarídicas possuindo grupos bloqueantes poderá variar, segundo o presente invento. Por

exemplo, todas ou substancialmente todas as unidades monossacarídicas do sacárido capsular correspondente poderão possuir grupos bloqueantes. Alternativamente, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das unidades monossacarídicas do sacárido capsular correspondente poderão possuir grupos bloqueantes. Pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 unidades monossacarídicas do sacárido capsular correspondente poderão possuir grupos bloqueantes.

Do mesmo modo, o número de grupos bloqueantes numa unidade monossacarídica poderá variar. Por exemplo, o número de grupos bloqueantes numa unidade monossacarídica poderá ser de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, preferencialmente 1-4, mais preferencialmente 1-2.

Em uma das formas de realização do invento, a pelo menos uma unidade monossacarídica que possui um grupo bloqueante é uma unidade monossacarídica não terminal. O termo "unidade monossacarídica não terminal" indica uma unidade monossacarídica que não corresponde a uma das unidades monossacarídicas terminais da cadeia oligossacarídica/polissacarídica.

O invento abrange sacáridos capsulares modificados em que todas as posições de grupos hidroxilo das unidades monossacarídicas terminais e não terminais possuem um grupo bloqueante. No entanto, prefere-se que exista pelo menos um grupo hidroxilo ou um grupo amino livre no sacárido capsular modificado do presente invento. Um grupo carboxilo ou amino livre é vantajoso por proporcionar uma "pega" para reacções subsequentes do sacárido capsular modificado, p.ex., para conjugação com uma molécula transportadora. Quando o sacárido modificado contém um grupo hidroxilo livre, este é preferencialmente um grupo hidroxilo anomérico,

preferencialmente um grupo hidroxilo anomérico terminal. Quando o sacárido modificado contém um grupo amino, este deriva preferencialmente de um grupo hidroxilo anomérico. Os grupos amino são facilmente acessíveis a partir de grupos hidroxilo anoméricos através de redução aminativa (usando, por exemplo, $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{Cl}$).

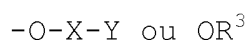
O termo "grupo amino" inclui grupos com a fórmula $-\text{NH}_2$ ou NH-E , em que E é um grupo protector de azoto. São abaixo apresentados exemplos típicos de grupos protectores de azoto.

O termo "grupo bloqueante" indica qualquer grupo que bloqueie a reactividade de um grupo hidroxilo. Os peritos na técnica conhecem muitos tipos diferentes de grupos bloqueantes. Os grupos bloqueantes preferidos para os grupos hidroxilo correspondem a grupos que são directamente acessíveis através de uma reacção de derivatização do grupo hidroxilo, i.e., por substituição do átomo de hidrogénio do grupo hidroxilo por outro grupo. Os derivados adequados de grupos hidroxilo que actuam como grupos bloqueantes são, por exemplo, carbamatos, sulfonatos, carbonatos, ésteres, éteres (p.ex., silil-éteres ou alquil-éteres) e acetais. Como exemplos específicos de tais grupos bloqueantes contam-se o alilo, Aloc, benzilo, BOM, t-butilo, tritilo, TBS, TBDPS, TES, TMS, TIPS, PMB, MEM, MOM, MTM e THP.

No entanto, o grupo bloqueante não estará necessariamente acessível através de uma reacção de derivatização do grupo hidroxilo. O grupo bloqueante poderá substituir por completo o grupo hidroxilo. Por exemplo, o grupo bloqueante poderá corresponder a alquilo C_{1-12} , alquilo C_{3-12} , arilo C_{5-12} , arilo C_{5-12} -alquilo C_{1-6} , NR^1R^2 (em que R^1 e R^2 são tal como abaixo definido), H, F, Cl, Br, CO_2H , CO_2 (alquilo C_{1-6}), CN, CF_3 , CCl_3 , etc.

Preferencialmente, o grupo bloqueante é um grupo retirador de electrões. Sem nos pretendermos cingir a qualquer teoria, acredita-se que as ligações glicosídicas sejam instáveis à hidrólise devido à ocorrência de um ataque nucleofílico intramolecular de um grupo hidroxilo sacarídico na ligação glicosídica (i.e., por formação de um intermediário cíclico). Quanto maior for a nucleofilicidade do grupo hidroxilo, maior será a tendência para o ataque nucleofílico intramolecular. Um grupo bloqueante retirador de electrões possui o efeito de deslocalizar o par de electrões desemparelhado do oxigénio, deste modo diminuindo a nucleofilicidade do oxigénio e reduzindo a tendência para o ataque nucleofílico intramolecular.

Preferencialmente, o grupo bloqueante possui a fórmula:



em que

X é C(O), S(O) ou SO₂;

Y é alquilo C₁₋₁₂, alcoxi C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂ ou arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, cada um dos quais poderá opcionalmente ser substituído com 1, 2 ou 3 grupos seleccionados de modo independente a partir de F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ ou CCl₃; ou Y é NR¹R²;

R¹ e R² são seleccionados de modo independente a partir de H, alquilo C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂, arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆; ou R¹ e R² podem ser reunidos para formar um grupo heterocíclico saturado C₃₋₁₂;

R³ é alquilo C₁₋₁₂ ou cicloalquilo C₃₋₁₂, cada um dos quais poderá opcionalmente ser substituído com 1, 2 ou 3 grupos seleccionados de modo independente a partir de F, Cl, Br, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ ou CCl₃; ou R³ é arilo C₅₋₁₂ ou arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, cada um dos quais poderá opcionalmente ser

substituído com 1, 2, 3, 4 ou 5 grupos seleccionados a partir de F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ ou CCl₃.

Preferencialmente, quando R³ é alquilo C₁₋₁₂ ou cicloalquilo C₃₋₁₂, este é substituído com 1, 2 ou 3 grupos tal como acima definido.

Os grupos bloqueantes com a fórmula -O-X-Y- ou -OR³ poderão ser preparados a partir de grupos hidroxilo através de procedimentos de derivatização convencionais, tal como reacção do grupo hidroxilo com um haleto de acilo, haleto de alquilo, haleto de sulfonilo, etc. Assim, o átomo de oxigénio em -O-X-Y- é preferencialmente o átomo de oxigénio do grupo hidroxilo, enquanto que o grupo -X-Y- em -O-X-Y- substitui de preferência o átomo de hidrogénio do grupo hidroxilo.

Alternativamente, os grupos bloqueantes poderão tornar-se acessíveis através de uma reacção de substituição, tal como a substituição de tipo Mitsunobu. Este e outros métodos de preparação de grupos bloqueantes a partir de grupos hidroxilo são bem conhecidos.

Mais preferencialmente, o grupo bloqueante é -OC(O)CF₃[6] ou -OC(O)NR¹R².

Mais preferencialmente, o grupo bloqueante é um grupo carbamato com a fórmula -OC(O)NR¹R², em que R¹ e R² são seleccionados de modo independente a partir de um alquilo C₁₋₆. Mais preferencialmente, R¹ e R² são ambos metilo, i.e., o grupo bloqueante é -OC(O)NMe₂.

Os grupos bloqueantes de carbamato possuem um efeito estabilizante sobre a ligação glicosídica e podem ser preparados sob condições suaves. É abaixo descrito um exemplo de um processo para a manipulação de um sacárido de modo a fornecer um grupo bloqueante de carbamato. No entanto, o invento não se restringe a sacáridos modificados preparados através dos processos aqui exemplificados, sendo que outros

processos de preparação de sacáridos modificados segundo o invento ocorrerão prontamente a um perito na técnica.

O termo "alquilo" é aqui usado para designar grupos alquilo sob as formas linear e ramificada. O grupo alquilo poderá ser interrompido com 1, 2 ou 3 heteroátomos seleccionados a partir de -O-, -NH- ou -S-. O grupo alquilo poderá igualmente ser interrompido com 1, 2 ou 3 ligações duplas e/ou triplas. No entanto, o termo "alquilo" refere-se geralmente a grupos alquilo que não possuem interrupções de heteroátomos ou interrupções de ligações duplas ou triplas. Quando se faz referência a um alquilo C₁₋₁₂, pretende-se significar que o grupo alquilo poderá conter um número de átomos de carbono entre 1 e 12 (p.ex., C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). Do mesmo modo, quando se faz referência a um alquilo C₁₋₆, pretende-se significar que o grupo alquilo poderá conter um número de átomos de carbono entre 1 e 6 (p.ex., C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆).

O termo "cicloalquilo" inclui grupos cicloalquilo, policicloalquilo e cicloalquenilo, assim como combinações destes com grupos alquilo, tal como os grupos cicloalquilalquilo. O grupo cicloalquilo poderá ser interrompido com 1, 2 ou 3 heteroátomos seleccionados a partir de -O-, -NH- ou -S-. No entanto, o termo "cicloalquilo" refere-se usualmente a grupos cicloalquilo que não possuem interrupções de heteroátomos. Os exemplos de grupos cicloalquilo incluem os grupos ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexilmetilo e adamantilo. Quando se faz referência a um cicloalquilo C₃₋₁₂, pretende-se significar que o grupo cicloalquilo poderá conter um número de átomos de carbono entre 3 e 12 (p.ex., C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

O termo "arilo" é aqui usado para referir um grupo aromático, tal como fenilo ou naftilo. Quando se faz referência a um arilo C₅₋₁₂, pretende-se significar que o grupo arilo poderá conter um número de átomos de carbono entre 5 e 12 (p.ex., C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂).

O termo "arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆" refere-se a grupos como benzilo, feniletilo e naftilmetilo.

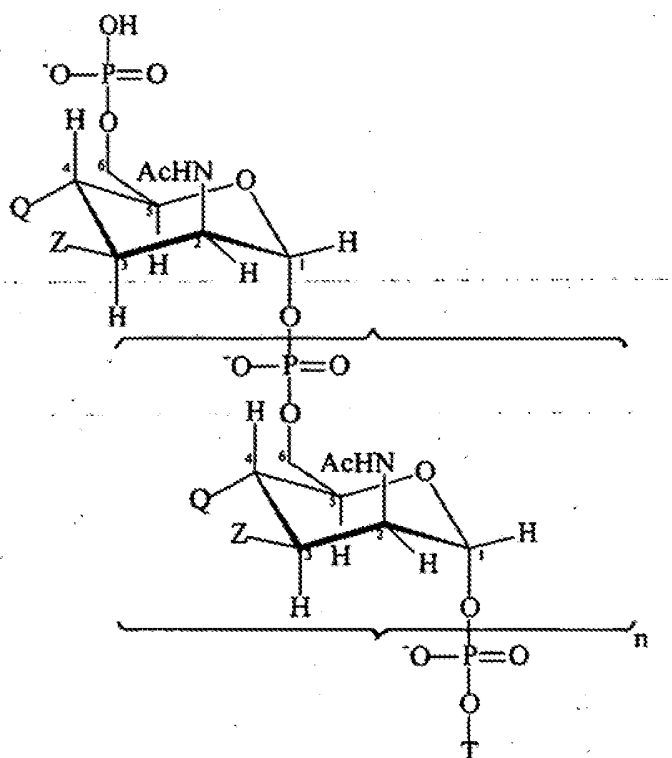
Quando R¹ e R² são reunidos para formar um grupo C₃₋₁₂ heterocíclico saturado, pretende-se que R¹ e R² formem, juntamente com o átomo de azoto, um grupo heterocíclico saturado contendo um número de átomos de carbono entre 3 e 12 (p.ex., C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂). O grupo heterocíclico poderá conter 1 ou 2 heteroátomos (tais como N, O ou S) para além do átomo de azoto. Como exemplos de grupos heterocíclicos saturados encontram-se o pirrolidinilo, piperidinilo, morfolinilo, piperazinilo, imidazolidinilo, azetidínilo e aziridinilo.

Em todas as formas de realização aqui descritas, o sacárido capsular modificado é um sacárido capsular modificado possuindo ligações fosfodiéster. Mais preferencialmente, o sacárido capsular modificado é um sacárido modificado do serogrupo A de *Neisseria meningitidis*. Os sacáridos do serogrupo A de *Neisseria meningitidis* são particularmente instáveis à hidrólise.

Quando o sacárido capsular modificado é um sacárido modificado do serogrupo A de *Neisseria meningitidis*, o grupo bloqueante encontra-se preferencialmente nas posições 4 e/ou 3, mais preferencialmente na posição 4, do sacárido do serogrupo A de *Neisseria meningitidis* correspondente. Os grupos bloqueantes localizados nas posições 4 e/ou 3 do sacárido do serogrupo A de *Neisseria meningitidis* têm-se

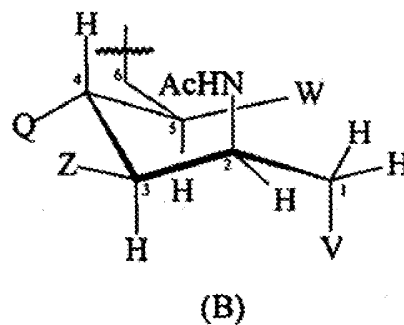
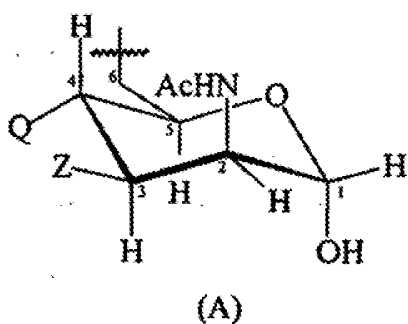
mostrado particularmente eficazes na melhoria da estabilidade face à hidrólise.

Este invento fornece também um sacárido com a fórmula:



em que

T tem a fórmula (A) ou (B):



n é um número inteiro de 1 a 100;

cada grupo Z é seleccionado de modo independente entre -OH ou um grupo bloqueante tal como acima definido; e

cada grupo Q é seleccionado de modo independente entre -OH ou um grupo bloqueante tal como acima definido;

W é seleccionado entre -OH ou um grupo bloqueante tal como acima definido;

V é seleccionado a partir de -NH₂, -NHE, -NE¹E², -OH ou -O-D, em que: E, E¹ e E² são grupos protectores de azoto, podendo ser idênticos ou diferentes, e D é um grupo protector de oxigénio, e em que mais do que cerca de 7% (p.ex., 8%, 9%, 10% ou mais) dos grupos Q são grupos bloqueantes.

De preferência, n é um número inteiro de 15 a 25.

Os grupos Z n + 2 podem ser idênticos ou diferentes entre si. Do mesmo modo, os grupos Q n + 2 podem ser idênticos ou diferentes entre si.

V é preferencialmente -NH₂ ou -NHE.

Como grupos protectores de azoto adequados encontram-se os grupos sililo (como TMS, TES, TBS, TIPS), derivados de acilo (como trifluoroacetamidas, metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, t-butoxycarbonilo (Boc), benziloxycarbonilo (Z ou Cbz), 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), 2-(trimetilsilil)etoxycarbonilo, aliloxycarbonilo (Alloc), 2,2,2-tricloroetoxycarbonilo (Troc)), derivados de sulfonilo (como 2-trimetilsililetanosulfonilo (SES)), derivados de sulfenilo, alquilo C1-12, benzilo, benzidrilo, tritilo, alilo, 9-fenilfluorenilo, etc. Um grupo protector de azoto preferido é o Fmoc.

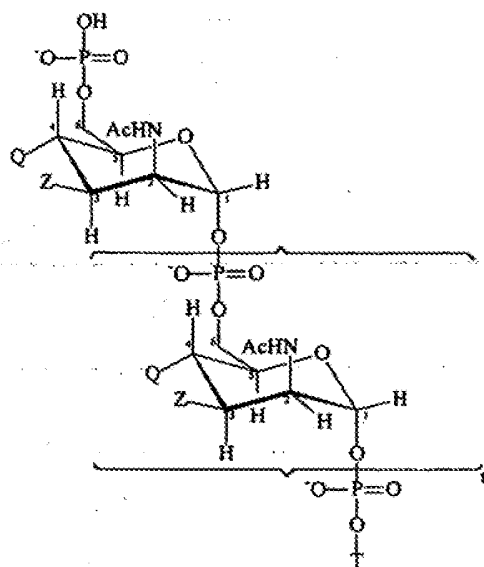
Os grupos protectores de azoto divalentes, que podem ser usados como E¹E², incluem derivados cíclicos de imidas (como N-ftalimidas, N-ditiosuccinimidas, N-2,3-difenilmaleimidas), derivados de imina (como N-1,1-dimetiltiometilenoaminas, N-benzilidenoaminas, N-p-metoxibenzilidenoaminas, N-difenilmetilenoaminas), derivados de enamina (como N-(5,5-dimetil-3-oxo-1-ciclohexenil)aminas), etc. Um grupo protector de azoto divalente preferido é o N-ftalimidilo.

Os grupos protectores de oxigénio adequados incluem ésteres, éteres (p.ex., silil-éteres ou alquil-éteres) e acetais. Os exemplos específicos incluem alilo, acetilo, Aloc, benzilo, benziloximetilo (BOM), t-butilo, tritilo, ter-butildimetilsililo (TBS), ter-butildifenilsililo (TBDPS), trietilsililo (TES), trimetilsililo (TMS), tri-isopropilsililo (TIPS), parametoxibenzilo (PMB), MEM, metoximetilo (MOM), MTM e tetrahidropiraniolo (THP).

Todos os grupos Z poderão corresponder a OH. Alternativamente, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50% ou 60% dos grupos Z podem corresponder a OAc. De preferência, cerca de 70% dos grupos Z correspondem a OAc, correspondendo o resto dos grupos Z a OH ou a grupos bloqueantes como os acima definidos.

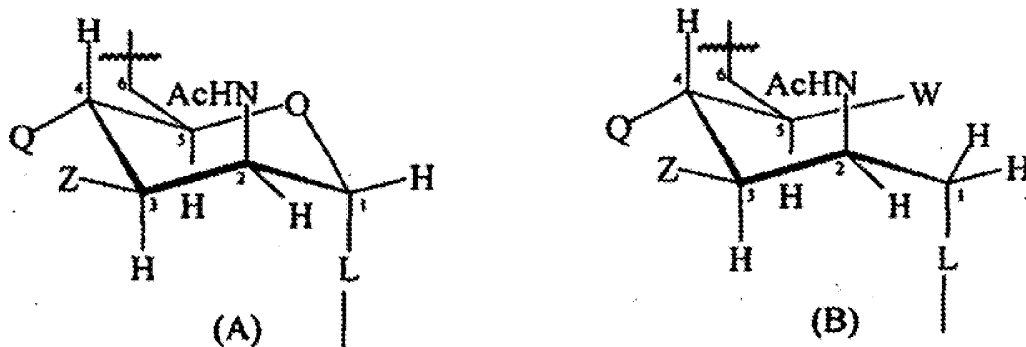
Pelo menos cerca de 7% dos grupos Q são grupos bloqueantes. Preferencialmente, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% dos grupos Q são grupos bloqueantes. Alternativamente, todos os grupos Q poderão ser grupos bloqueantes.

O invento fornece igualmente uma molécula compreendendo uma porção molecular sacarídica com a fórmula:



em que

T tem a fórmula (A) ou (B):



n, Z e Q e W são tais como acima definido, e: L é O, NH, NE, S ou Se.

A ligação covalente livre de L pode ser unida a qualquer porção molecular apropriada, p.ex. a -H, -E, um linker, uma proteína transportadora, etc. L é preferencialmente N ou O. É igualmente possível que L corresponda a N, ligado a um linker divalente, a um grupo protector divalente ou a uma proteína transportadora divalente.

Processo para a produção de um sacárido modificado

O invento fornece um processo para a modificação de um sacárido capsular, compreendendo os passos de:

- (a) fornecimento de um sacárido capsular possuindo pelo menos um grupo hidroxilo numa unidade monossacarídica; e
- (b) conversão do dito pelo menos um grupo hidroxilo num grupo bloqueante; sendo que o sacárido capsular compreende ligações fosfodiéster.

O grupo bloqueante poderá corresponder a qualquer dos grupos bloqueantes acima descritos.

O sacárido capsular poderá ser um sacárido capsular nativo (oligossacárido ou polissacárido). Como alternativa, o sacárido capsular poderá ser, por exemplo, um sacárido capsular des-O-acetilado e/ou um sacárido capsular possuindo um grupo amino terminal (p.ex., obtido por aminação redutiva).

Um processo preferido para a modificação de um sacárido em que o grupo bloqueante é $-OC(Q)NR^1R^2$ será aquele em que o passo (b) compreende os passos de:

(b1) fazer reagir o sacárido capsular com um reagente bifuncional num solvente orgânico; e

(b2) fazer reagir o produto do passo (b1) com um composto amino com a fórmula (I):



em que R^1 e R^2 são tais como acima definido e o sacárido capsular compreende ligações fosfodiéster.

O termo "reagente bifuncional" indica qualquer reagente que tem a capacidade de desempenhar a dupla função de (i) fornecer no passo (b1) um primeiro átomo de carbono electrofílico para acoplamento com o(s) grupo(s) hidroxilo no sacárido; e (ii) fornecer um segundo átomo de carbono electrofílico para acoplamento com o grupo amino usado no passo (b2). De modo geral, o segundo átomo de carbono electrofílico é regenerado a partir do primeiro átomo de carbono electrofílico durante o passo (b). O reagente bifuncional proporciona uma ligação $-C(O)-$ entre o polissacárido e o composto amino.

Os reagentes bifuncionais para uso no âmbito do presente invento incluem, de modo não limitativo, 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), carbonil-di-1,2,4-triazol (CDT), carbonil-di-1,2,3-benzotriazol (CDB), difenilcarbonato, brometo de cianogénio, fosgénio ou trifosgénio. Um perito na

técnica conhecerá outros reagentes bifuncionais que poderão desempenhar a mesma função.

Um reagente bifuncional preferido é o CDI. O CDI tem a vantagem de ser um reagente mais suave do que, por exemplo, o fosgénio ou o brometo de cianogénio. Em particular, as reacções de acoplamento que utilizam CDI não originam gases de ácido halídrico, tais como HCl ou HBr. A geração de gás de HCl ou HBr é indesejável, uma vez que se torna necessário a limpeza da saída da câmara de reacção para evitar que estes gases escapem para a atmosfera. Ainda, a geração de gás de HCl ou HBr poderá afectar grupos funcionais sensíveis do sacárido, resultando na perda de rendimento devido à decomposição ou fragmentação do sacárido.

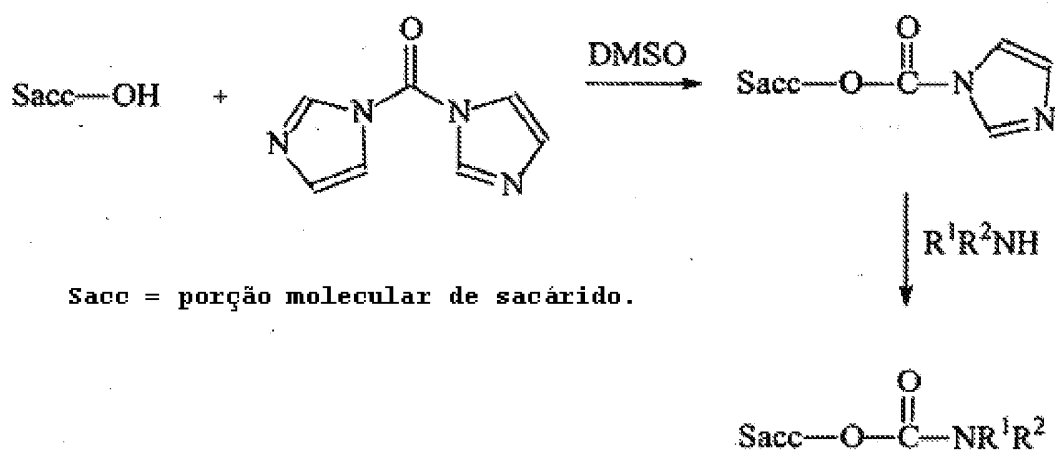
O solvente orgânico usado no passo (b1) é preferencialmente um solvente aprótico. Os solventes apróticos são bem conhecidos dos peritos na técnica e não contêm quaisquer átomos de hidrogénio ionizáveis. Estes solventes são vantajosos porque facilitam a reacção do(s) grupo(s) hidroxilo do sacárido com o reagente bifuncional, através da intensificação da nucleofilicidade do(s) grupo(s) hidroxilo. Os solventes apróticos adequados incluem, de modo não limitativo, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), formamida, hexametilfósforo-triamida (HMPT), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU), dimetilacetamida (DMAC), ou hexametilfosforamida (HMPA). É preferido o DMSO.

No passo (b2) do processo segundo o invento, o produto do passo (b1) é posto em reacção com um composto amino para formar o polissacárido modificado. O composto amino usado no processo do presente invento tem a fórmula (I), tal como acima definido. Na fórmula (I), preferencialmente, R^1 e R^2 são seleccionados de modo independente a partir de um alquilo C_{1-6} . Mais preferencialmente, R^1 e R^2 são ambos metilo.

Como compostos amino adequados para uso no âmbito deste invento encontram-se a metilamina, dimetilamina, etilamina, N-etilmetilamina, dietilamina, N-metilpropilamina, N-etilpropilamina, isopropilamina, butilamina, N-metilbutilamina, N-etilbutilamina, N-propilbutilamina, N-metilciclopentilamina, N-etilciclopentilamina, ciclohexilamina, N-metilciclohexilamina, N-etilciclohexilamina, benzilamina, N-etilbenzilamina, N-metilbenzilamina, isobutilamina, ter-butilamina, ciclopentilamina, dibenzilamina, pirrolidina, piperidina, morfolina, piperazina, imidazolidina, azetidina, aziridina, anilina, N-metilanilina e N-etilanilina. Estes podem ser usados na forma de sal (p.ex., sal de cloridrato).

De preferência, o composto amino usado no presente invento é uma amina secundária. Mais preferencialmente, a amina é a dimetilamina.

Um processo preferido segundo o invento é exemplificado pelo Esquema 1, abaixo:



Esquema 1

Neste esquema, o sacárido (p.ex. polissacárido ou oligossacárido de MenA) é inicialmente activado através de pelo menos um dos seus grupos hidroxilo numa unidade de monossacárido usando CDI em solvente de DMSO. O produto intermediário de carbamato de imidazol resultante reage com a amina R^1R^2NH (p.ex., dimetilamina) para fornecer o sacárido modificado.

Os sacáridos modificados poderão alternativamente ser preparados num processo de um só passo fazendo reagir um ou mais grupos hidroxilo num sacárido capsular com um reagente com a fórmula $XC(O)NR^1R^2$, sendo que X é um grupo de partida e R^1 e R^2 são tais como acima definido. Os grupos de partida adequados incluem, de modo não limitativo, $-Cl$, $-Br$, $-CF_3$, $-OC_6F_5$ ou $-CCl_3$.

Alternativamente, os sacáridos capsulares modificados de acordo com o presente invento poderão ser preparados por meios sintéticos, por exemplo, a partir de unidades monossacarídicas adequadas. Tipicamente, a síntese total de um sacárido capsular modificado compreende a formação de ligações glicosídicas (p.ex., ligações fosfodiéster) entre unidades monossacarídicas adequadas e, posteriormente, a modificação do sacárido resultante por qualquer dos modos aqui descritos. Alternativamente, as unidades monossacarídicas poderão ser modificadas antes da formação das ligações glicosídicas para fornecer o mesmo sacárido capsular modificado.

Os sacáridos capsulares modificados segundo este invento são preferencialmente oligossacáridos. Partindo dos polissacáridos capsulares nativos, poderão obter-se oligossacáridos capsulares modificados seguindo um de dois métodos: (1) modificação do polissacárido capsular, seguindo-se o dimensionamento do polissacárido modificado para formar um oligossacárido modificado; ou (2) dimensionamento do

polissacárido capsular, seguindo-se a modificação do oligossacárido resultante para formar um oligossacárido modificado. Ambos os métodos são abrangidos pelo presente invento. No entanto, o primeiro método é preferido, uma vez que este método assegura que um grupo hidroxilo terminal estará disponível para subsequente conjugação do oligossacárido modificado com uma molécula transportadora, tal como uma proteína.

O presente invento proporciona igualmente um processo para a modificação de um polissacárido do serogrupo A de *Neisseria meningitidis*, compreendendo os passos de:

(a) fornecimento de um polissacárido do serogrupo A de *Neisseria meningitidis*;

(b) dimensionamento do dito polissacárido para fornecer um oligossacárido; e

(c) conversão de pelo menos um grupo hidroxilo do oligossacárido num grupo bloqueante, tal como acima descrito.

O passo (b) deste processo poderá opcionalmente ser seguido por passo(s) de derivatização conhecido(s). Os passos de derivatização conhecidos incluem, por exemplo, aminação redutiva seguida de protecção do grupo $-NH_2$ resultante e/ou des-O-acetilação.

Este invento proporciona igualmente um processo para a modificação de um polissacárido do serogrupo A de *Neisseria meningitidis*, compreendendo os passos de:

(a) fornecimento de um polissacárido do serogrupo A de *Neisseria meningitidis*;

(b) conversão de pelo menos um grupo hidroxilo do polissacárido num grupo bloqueante, tal como acima descrito; e

(c) dimensionamento do polissacárido resultante para fornecer um oligossacárido.

O passo (c) deste processo poderá opcionalmente ser seguido por passo(s) de derivatização conhecido(s) antes do passo (c). Os passos de derivatização conhecidos incluem, por exemplo, aaminação redutiva seguida de protecção do grupo $-NH_2$ resultante e/ou des-O-acetilação.

Qualquer dos processos acima descritos poderá ser seguido por um passo durante o qual são removidos os contaminantes (p.ex., contaminantes de baixo peso molecular).

Materiais de partida para o sacárido capsular

Os sacáridos capsulares modificados segundo o invento poderão ser obtidos a partir de sacáridos capsulares nativos. O termo "sacárido capsular nativo" refere-se a polímeros contendo açúcar (p.ex. polímeros de açúcares, ácidos de açúcar, açúcares amino, álcoois polihídricos, álcoois de açúcar e fosfatos de açúcar, etc.) que podem ser encontrados na cápsula de bactérias (tanto Gram-positivas como Gram-negativas) tais como *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*. Ainda, o termo "sacárido capsular nativo" abrange tanto polissacáridos como oligossacáridos. Os oligossacáridos capsulares nativos poderão ser obtidos dimensionando polissacáridos nativos.

A "posição de grupo hidroxilo" de um sacárido capsular nativo é uma posição no sacárido capsular nativo que possui um grupo hidroxilo. No entanto, o termo não inclui posições em ligações glicosídicas, ou dos resíduos nestas, que possuam grupos hidroxilo (p.ex., um grupo hidroxilo que faça parte de uma ligação glicosídica não ocupa uma posição de grupo hidroxilo). Não são também contempladas posições ocupadas por um grupo hidroxilo anomérico numa unidade monossacarídica terminal. As posições em que existe um grupo acetoxi (AcO) no

sacárido capsular nativo não são também posições de grupo hidroxilo.

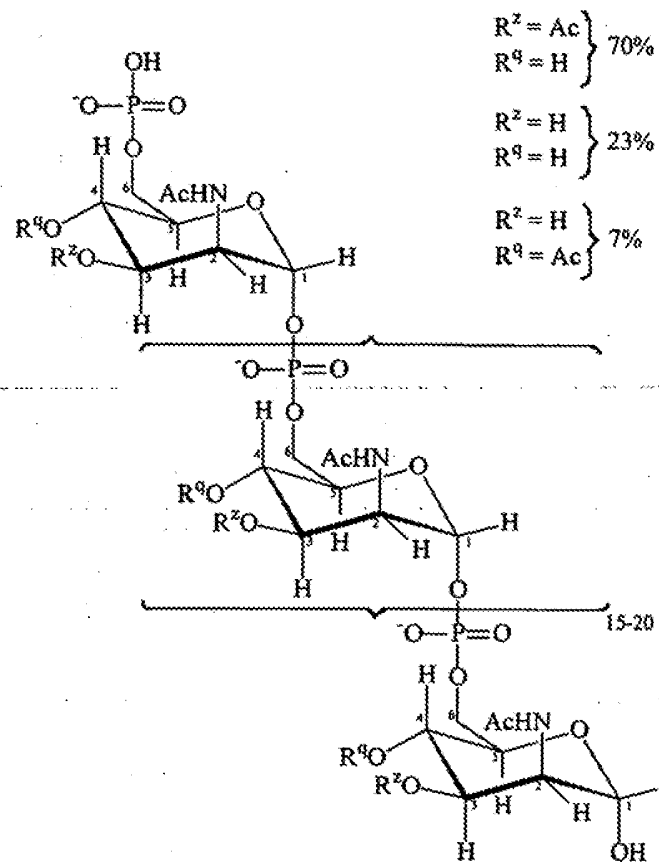
O sacárido capsular nativo compreende unidades sacarídicas ligadas por ligações fosfodiéster. Os sacáridos compreendendo ligações fosfodiéster são instáveis à hidrólise.

O sacárido capsular nativo e o sacárido capsular modificado segundo o invento são preferencialmente imunogénicos em mamíferos (p.ex., humanos). O mamífero poderá ser um adulto humano ou uma criança.

O sacárido capsular nativo é preferencialmente um polissacárido (ou um seu fragmento oligossacarídico) de *N. meningitidis* (incluindo os serogrupos A, B, C, W135 e Y), *S. pneumoniae* (incluindo os serotipos 1, 4, 5, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F), *H. influenzae* tipo B, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus mutans*, *Cryptococcus neoformans*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e/ou *Pseudomonas aeruginosa*.

Se bem que o invento se possa aplicar a qualquer serogrupo de *N. meningitidis*, é preferido o uso de um sacárido capsular do serogrupo A ("MenA"). O sacárido capsular MenA é particularmente instável em solução aquosa, o que significa que é necessário recorrer a procedimentos especiais para efectuar manipulações químicas (p.ex. conjugação com proteínas transportadoras) nesta molécula. No entanto, verifica-se que os sacáridos de MenA modificados de acordo com este invento apresentam uma estabilidade vantajosa em solução aquosa.

O polissacárido capsular MenA $\{\rightarrow 6\}$ -D-MarpNAc(3/4OAc)- α -(1 \rightarrow OP03 \rightarrow) é composto por resíduos de N-acetilmanosamina ligados entre si por ligações α 1-6-fosfodiéster possuindo as unidades repetitivas que abaixo se apresentam.



De acordo com as definições acima, 93% das posições 4 são posições de grupo hidroxilo, e 30% das posições 3 são posições de grupo hidroxilo. O grupo 1-hidroxi terminal ocupa também uma posição de grupo hidroxilo. O grupo 1-hidroxi terminal é um grupo hidroxílico anomérico terminal. O grupo hidroxilo que faz parte do grupo $-OP(O)(OH)O^-$ não constitui uma posição de grupo hidroxilo.

Conjugados de sacárido-proteína

Os sacáridos modificados do invento poderão ser submetidos a qualquer dos procedimentos de pós-processamento usualmente aplicados a sacáridos (p.ex., derivatização, conjugação, fragmentação, etc.). De modo a acentuar a imunogenicidade, os sacáridos modificados do invento são preferencialmente conjugados com uma proteína transportadora. A conjugação com

proteínas transportadoras é particularmente útil para vacinas pediátricas [7] e constitui uma técnica bem conhecida [encontrada, p.ex., nas refs. 8 a 16, etc.].

O invento proporciona assim um conjugado de uma proteína e de um sacárido modificado do invento. A proteína poderá ser conjugada directamente com o sacárido, ou poderá ser usado um linker. Poderá utilizar-se qualquer processo de química de linkers adequado. A estabilidade melhorada do polissacárido modificado permite vantajosamente a utilização de uma larga gama de associações a linkers.

Tal como se descreve acima, é preferido que o sacárido capsular modificado possua pelo menos um grupo hidroxilo ou grupo amino livre que poderá ser usado como "pega" para ligação subsequente a uma proteína transportadora.

Poderá obter-se um sacárido capsular modificado possuindo um grupo hidroxilo livre através do bloqueio selectivo dos grupos hidroxilo num sacárido capsular, ou do desbloqueamento selectivo de um sacárido capsular modificado no qual todos os grupos hidroxilo se encontram bloqueados. Alternativamente, poderá revelar-se um grupo hidroxilo livre através do dimensionamento de um sacárido capsular modificado. Preferencialmente, o pelo menos um grupo hidroxilo livre é um grupo hidroxilo terminal anomérico. O grupo hidroxilo terminal anomérico é preferido como grupo hidroxilo livre porque um grupo hidroxilo terminal anomérico pode ser revelado através do dimensionamento de um sacárido capsular modificado.

Poderá obter-se um sacárido capsular modificado possuindo um grupo amino livre através de redução aminativa de um grupo hidroxilo terminal anomérico, opcionalmente seguida pela protecção do grupo $-NH_2$ resultante. A reacção de aminação redutiva poderá ser efectuada antes ou depois do passo de modificação segundo o presente invento. Preferencialmente, a

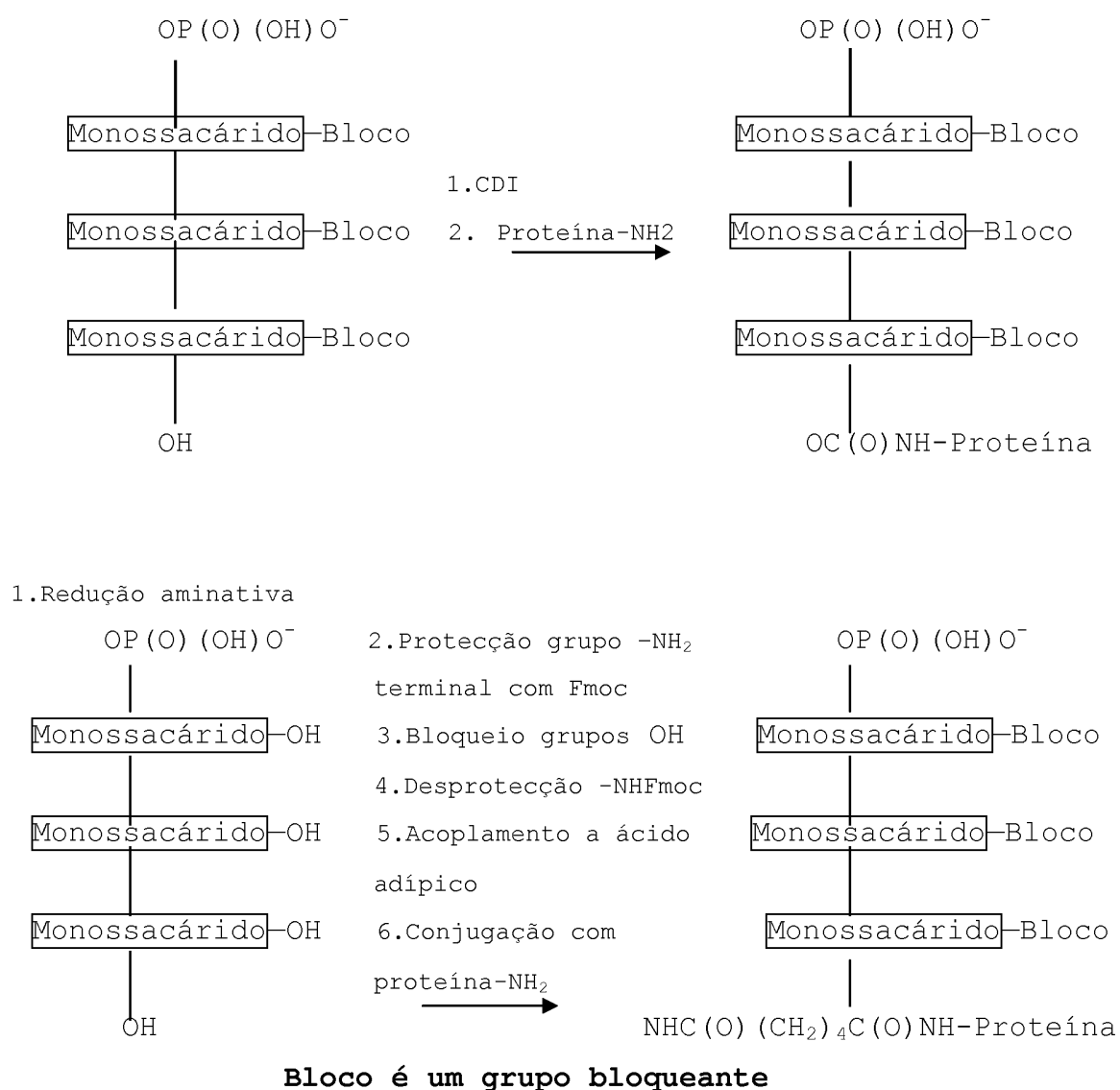
redução aminativa é efectuada antes do passo de modificação do presente invento, uma vez que o grupo -NH_2 resultante pode ser selectivamente protegido/desprotegido na presença de grupos hidroxilo/grupos bloqueantes.

As ligações directas à proteína poderão compreender a oxidação do polissacárido seguida por redução aminativa com a proteína, tal como descrito em, por exemplo, as referências 2 e 4.

As ligações através de um grupo linker poderão ser efectuadas usando qualquer procedimento conhecido, por exemplo, os procedimentos descritos nas referências 3 e 5. Um tipo de ligação preferida é a de um linker de carbonilo, que poderá ser formada por reacção de um grupo hidroxilo livre do sacárido modificado com CDI [17, 18] seguida da reacção com uma proteína para formar uma ligação carbamato. Outro tipo de ligação preferida é a de um linker de ácido adípico, que poderá ser formada através do acoplamento de um grupo -NH_2 livre no sacárido modificado com ácido adípico (usando, por exemplo, activação por diimida), seguido do acoplamento de uma proteína ao produto intermediário de sacárido-ácido adípico resultante [12, 19, 20]. Outros linkers incluem B-propionamido [21], nitrofenil-etilamina [22], haletos de haloacilo [23], ligações glicosídicas [24], ácido 6-aminocapróico [25], ADH [26], porções moleculares C_4 a C_{12} [27], etc.

A conjugação poderá envolver: redução do terminal anomérico para obter um grupo hidroxilo primário, opcionalmente protecção/desprotecção do grupo hidroxilo primário; reacção do grupo hidroxilo primário com CDI para formar um produto intermediário de CDI-carbamato; e acoplamento do produto intermediário de CDI-carbamato com um grupo amino de uma proteína.

O Esquema 2 apresenta dois exemplos diferentes do modo como um sacárido capsular pode ser conjugado com uma proteína transportadora, de acordo com o presente invento. No primeiro exemplo, a proteína é conjugada através de um grupo hidroxilo terminal. No segundo exemplo, a proteína é ligada através de um grupo amino terminal.



Esquema 2

As proteínas transportadoras preferidas são as toxinas ou toxóides bacterianos, como os toxóides da difteria ou tétano. Estes são vulgarmente usados em vacinas conjugadas. O toxóide da difteria CRM₁₉₇ é particularmente preferido [28]. Outras proteínas transportadoras apropriadas incluem a proteína da membrana externa de *N. meningitidis* [29], péptidos sintéticos [30, 31], as proteínas de choque térmico [32, 33], as proteínas do bacilo pertússico [34, 35], a proteína D de *H. influenzae* [36], citocinas [37], linfocinas [37], hormonas [37], factores de crescimento [37], toxina A ou B de *C. difficile* [38], proteínas de captação do ferro [39], etc. É possível utilizar misturas de proteínas transportadoras.

Após a conjugação, poderão separar-se os sacáridos livres e os conjugados. Existem muitos métodos apropriados para tal, incluindo a cromatografia hidrofóbica, ultrafiltração tangencial, diafiltração, etc. [ver igualmente as refs. 40, 41, etc.].

Uma só proteína transportadora poderá transportar múltiplos sacáridos diferentes [42].

Composições farmacêuticas e métodos

O invento fornece uma composição farmacêutica compreendendo (a) um sacárido modificado segundo o invento e/ou um conjugado do invento, e (b) um transportador farmacêuticamente aceitável.

Quando um conjugado está presente, a composição poderá compreender também proteína transportadora livre [43].

O termo "transportadores farmacêuticamente aceitáveis" inclui qualquer transportador que não induza por si só a produção de anticorpos prejudiciais ao indivíduo que recebe a composição. Os transportadores adequados correspondem tipicamente a macromoléculas grandes e lentamente

metabolizadas, tais como proteínas, polissacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, trealose [44], agregados lipídicos (como gotículas de óleo ou lipossomas) e partículas virais inactivas. Tais transportadores são bem conhecidos dos técnicos de perícia média. As vacinas poderão também conter diluentes, tais como água, soro fisiológico, glicerol, etc. Adicionalmente, poderão estar presentes substâncias auxiliares, tais como agentes molhantes ou agentes emulsionantes, substâncias tamponantes de pH e semelhantes. Pode encontrar-se uma exposição exaustiva dos excipientes farmacêuticamente aceitáveis em Remington's Pharmaceutical Sciences.

Tipicamente, as composições são preparadas sob a forma de injectáveis, como soluções líquidas ou suspensões; poderão igualmente preparar-se formas sólidas adequadas para solução, ou suspensão, em veículos líquidos antes da injeção. A preparação poderá também ser emulsificada ou encapsulada em lipossomas para que se obtenha um efeito adjuvante intensificado. A administração directa das composições será geralmente parentérica (p.ex. por injeção subcutânea, intraperitoneal, intravenosa ou intramuscular, ou por administração ao espaço intersticial de um tecido). As composições poderão igualmente ser administradas a uma lesão. Outros modos de administração incluem a administração oral e pulmonar, rectal (supositórios) e aplicações transdérmicas ou transcutâneas [p.ex., ref. 45], agulhas e hiposprays. As dosagens de tratamento poderão ser administradas num regime de dose única ou de doses múltiplas (p.ex. incluindo doses de reforço).

A composição do invento é preferencialmente estéril, tamponada e/ou isenta de pirogénios.

A composição corresponde preferencialmente uma composição imunogénica (p.ex. uma vacina). As vacinas baseadas em sacáridos ou conjugados de sacárido-proteína são bem conhecidas da técnica.

As composições imunogénicas compreendem uma quantidade imunologicamente eficaz de antigénio sacarídico, assim como qualquer um de outros componentes especificados, segundo necessário. Por "quantidade imunologicamente eficaz" pretende-se significar que a administração dessa quantidade a um indivíduo, em dose única ou como parte de uma série de doses, é eficaz para fins de tratamento ou prevenção. Esta quantidade varia dependendo do estado de saúde e condição física do indivíduo a tratar, da idade, do grupo taxonómico do indivíduo a tratar (p.ex., primata não humano, primata, etc.), da capacidade do sistema imunológico do indivíduo para sintetizar anticorpos, do grau de protecção desejada, da formulação da vacina, da avaliação da situação clínica feita pelo médico, e de outros factores relevantes. É esperado que esta quantidade se inclua num intervalo relativamente alargado que pode ser determinado através de ensaios de rotina. As dosagens de tratamento poderão ser administradas num regime de dose única ou de doses múltiplas (p.ex. incluindo doses de reforço). A vacina poderá ser administrada em conjunção com outros agentes imunoreguladores.

A composição imunogénica poderá incluir um adjuvante. Os adjuvantes preferidos para a intensificação da eficácia da composição incluem, de forma não limitativa: (A) compostos de alumínio, p.ex. hidróxidos de alumínio (p.ex., oxihidróxidos), fosfatos de alumínio (p.ex., hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos de alumínio, etc. [p.ex., ver os capítulos 8 e 9 da ref. 46], ou misturas de diferentes compostos de alumínio, estando estes compostos presentes em qualquer forma adequada

(p.ex., de gel, cristalina, amorfa, etc.) e sendo preferida a adsorção; (B) MF59 (5% de esqualeno, 0,5% de Tween 80 e 0,5% de Span 85, formulado em partículas submicrónicas por meio de um microfluidificador [ver o Capítulo 10 da ref. 46; ver também a ref. 47]; (C) lipossomas [ver os Capítulos 13 e 14 da ref. 46]; (D) ISCOMS [ver o Capítulo 23 da ref. 46], que poderão estar isentos de detergente adicional [48]; (E) SAF, contendo 10% de esqualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero L121 bloqueado por plurónico, e thr-MDP, microfluidizado até uma emulsão submicrónica ou vortexado para gerar uma emulsão com partículas de maior tamanho [ver o Capítulo 12 da ref. 46]; (F) sistema adjuvante RIBI® (RAS) (Ribi Immunochem) contendo 2% de esqualeno, 0,2% de Tween 80 e um ou mais componentes da parede celular bacteriana pertencentes ao grupo que consiste em monofosforil-lípido A (MPL), dimicolato de trealose (TDM) e esqueleto da parede celular (CWS), preferencialmente MPL+CWS (Detox®); (G) adjuvantes de saponinas, tal como o QuilA ou o QS21 [ver o Capítulo 22 da ref. 46], também conhecido por Stimulon®; (H) quitosano [p.ex., 49]; (I) Adjuvante Completo de Freund (CFA) e Adjuvante Incompleto de Freund (IFA); (J) citocinas, tais como interleucinas (p.ex., IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.); interferões (p.ex., interferão gama), factor estimulador de colónias de macrófagos, factor de necrose de tumor, etc. [ver os capítulos 27 e 28 da ref. 46]; (K) micropartículas (i.e., uma partícula de ~100 nm a ~150 µm de diâmetro, mais preferencialmente ~200 nm a ~30 µm de diâmetro, e ainda mais preferencialmente ~50 nm a ~10 µm de diâmetro) formadas a partir de materiais biodegradáveis e não tóxicos (p.ex. um poli(α-hidroxiácido), um ácido polihidroxibutírico, um poliortoéster, um polianidrido, uma policaprolactona, etc.); (L) monofosforil-lípido A (MPL) ou MPL 3-O-

desacetilado (3dMPL) [p.ex., capítulo 21 da ref. 46]; (M) combinações de 3dMPL com, por exemplo, QS21 e/ou emulsões óleo-em-água [50]; (N) oligonucleótidos compreendendo motivos CpG [51], i.e., contendo pelo menos um dinucleótido CG, sendo opcionalmente usada 5-metilcitosina em lugar de citosina, e/ou motivo CI; (O) um éter de polioxietileno ou um éster de polioxietileno [52]; (P) um surfactante de éster de polioxietileno-sorbitano em combinação com um octoxinol [53] ou um surfactante de éter ou éster de polioxietileno-alquilo em combinação com pelo menos um surfactante não iónico adicional, tal como um octoxinol [54]; (Q) um oligonucleótido imunoestimulante (p.ex., um oligonucleótido CpG) e uma saponina [55]; (R) um imunoestimulante e uma partícula de sal metálico [56]; (S) uma saponina e uma emulsão óleo-em-água [57]; (T) uma saponina (p.ex. QS21) + 3dMPL + IL12 (opcionalmente + um esteroide) [58]; (U) enterotoxina termolábil de *E. coli* ("LT"), ou seus mutantes destoxificados, tais como os mutantes K63 ou R72 [p.ex., capítulo 5 da ref. 59]; (V) toxina da cólera ("CT"), ou seus mutantes destoxificados [p.ex., capítulo 5 da ref. 59]; e (W) emuladores do monofosforil-lípido A, como os derivados de fosfato de aminoalquilglucosaminida, p.ex., RC-529 [60]; (X) polifosfazeno (PCPP); (Y) um bioadesivo [61], como microesferas de ácido hialurónico esterificado [62] ou um mucoadesivo selecionado a partir do grupo que consiste em derivados de crosslinking do ácido poliacrílico, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona, polissacáridos e carboximetilcelulose; ou (Z) outras substâncias que actuam como agentes imunoestimuladores para intensificar a eficácia da composição [p.ex., ver o capítulo 7 da ref. 46]. O alum (especialmente fosfatos e/ou hidróxidos de alumínio) constitui um adjuvante preferido.

Os muramilpéptidos incluem a N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glycero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

Uma vez formuladas, as composições do invento poderão ser administradas directamente ao indivíduo. Os indivíduos a tratar poderão ser animais; em particular, poderão tratar-se indivíduos humanos. As vacinas são particularmente úteis para vacinar crianças e adolescentes.

As vacinas de acordo com o invento poderão ser profilácticas (i.e., para prevenção de uma infecção) ou terapêuticas (i.e., para tratar a doença após a infecção), mas serão tipicamente profilácticas.

Além dos sacáridos modificados, a composição poderá conter outros componentes antigénicos. Por exemplo, a composição poderá incluir um ou mais sacáridos (estejam ou não modificados de acordo com o invento). Por exemplo, a composição poderá compreender sacáridos dos serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis* (p.ex., para além de um sacárido de MenA modificado). Estes estarão tipicamente conjugados com proteínas transportadoras, e os sacáridos de diferentes serogrupos de *N. meningitidis* poderão estar conjugados com a mesma proteína transportadora ou com proteínas transportadoras diferentes. Quando a mistura compreende sacáridos capsulares de ambos os serogrupos A e C, é preferido que a razão (p/p) de sacárido MenA:sacárido MenC seja superior a 1 (p.ex., 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 ou superior). Tem-se observado uma imunogenicidade melhorada do componente de MenA quando este está presente em excesso (massa/dose) em relação ao componente de MenC. [63]

A composição poderá conter ainda antigénios proteicos.

Os antígenos que poderão ser incluídos na composição do invento incluem:

- antígenos de *Helicobacter pylori* tais como CagA [64 a 67], VacA [68, 69], NAP [70, 71, 72], HopX [p.ex., 73], HopY [p.ex., 73] e/ou urease.

- um antígeno proteico do serogrupo B de *N. meningitidis*, tal como os encontrados nas refs. 74 a 80, sendo particularmente preferidos a proteína '287' (ver abaixo) e derivados (p.ex., 'ÄG287').

- uma preparação de vesículas da membrana externa (OMV) do serogrupo B de *N. meningitidis*, tal como as apresentadas nas refs. 81, 82, 83, 84, etc.

- um antígeno sacarídico do serogrupo C de *N. meningitidis*, tal como o oligossacárido do serogrupo C apresentado na ref. 85 [ver também a ref. 86].

- um antígeno sacarídico de *Streptococcus pneumoniae* [p.ex., 87, 88, 89].

- um antígeno do vírus da hepatite A, tal como o vírus inativado [p.ex., 90, 91].

- um antígeno do vírus da hepatite B, tal como os antígenos de superfície e/ou do core [p.ex., 91, 92].

- um antígeno do vírus da hepatite C [p.ex., 93].

- um antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como a holotoxina pertússica (PT) e a hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente também em combinação com pertactina e/ou os aglutinogénios 2 e 3 [p.ex., refs. 94 e 95].

- um antígeno de difteria, tal como um toxóide de difteria [p.ex., capítulo 3 da ref. 96], p.ex., o mutante CRM₁₉₇ [p.ex., 97].

- um antígeno de tétano, tal como um toxóide de tétano [p.ex., capítulo 4 da ref. 96].

- um antígeno sacarídico de *Haemophilus influenzae* B [p.ex., 86].
- um antígeno de *N. gonorrhoeae* [p.ex., 74, 75, 76].
- um antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [p.ex., 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104].
- um antígeno de *Chlamydia trachomatis* [p.ex., 105].
- um antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [p.ex., 106].
- antígeno(s) de poliomielite [p.ex., 107, 108], tal como IPV ou OPV.
- antígeno(s) da raiva [p.ex., 109], tal como o vírus inativado liofilizado [p.ex. 110, RabAvert®].
- antígenos do sarampo, papeira e/ou rubéola [p.ex., capítulos 9, 10 e 11 da ref. 96].
- antígeno(s) da gripe [p.ex., capítulo 19 da ref. 96], tal como as proteínas de superfície hemaglutinina e/ou neuraminidase.
- um antígeno de *Moraxella catarrhalis* [p.ex., 111].
- um antígeno de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo do grupo B) [p.ex., 112, 113].
- um antígeno sacarídico de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo do grupo B).
- um antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo do grupo A) [p.ex., 113, 114, 115].
- um antígeno de *Staphylococcus aureus* [p.ex., 116].
- um antígeno de *Bacillus anthracis* [p.ex., 117, 118, 119].
- um antígeno de um vírus da família Flaviviridae (género flavivírus), tal como o vírus da febre amarela, vírus da encefalite japonesa, quatro serotipos de vírus do dengue, vírus da encefalite transmitida pela carraça, vírus West Nile.

- um antígeno de pestivírus, tal como o vírus da febre porcina clássica, vírus da diarreia viral bovina e/ou vírus da border disease.

- um antígeno de parvovírus, p.ex., do parvovírus B19.

- uma proteína de prião (p.ex., a proteína do prião CJD).

- uma proteína amilóide, tal como um péptido beta [120].

- um antígeno tumoral, tal como os listados na Tabela 1 da ref. 121 ou nas Tabelas 3 e 4 da ref. 122.

A composição poderá compreender um ou mais destes antígenos adicionais.

Os antígenos proteicos tóxicos poderão ser destoxificados quando necessário (p.ex., destoxificação da toxina pertússica por meios químicos e/ou genéticos [95]).

Quando um antígeno de difteria é incluído na composição, é preferida a inclusão adicional do antígeno de tétano e dos antígenos pertússicos. Similarmente, quando é incluído um antígeno de tétano, prefere-se igualmente a inclusão de antígenos de difteria e pertússicos. Do mesmo modo, quando é incluído um antígeno pertússico, é preferida a inclusão adicional dos antígenos de difteria e de tétano.

Os antígenos encontram-se preferencialmente adsorvidos a um sal de alumínio.

Os antígenos na composição estarão tipicamente presentes numa concentração de pelo menos 1 µg/ml cada. Em geral, a concentração de um dado antígeno será suficiente para estimular uma resposta imune contra esse antígeno.

Como alternativa ao uso de antígenos proteicos na composição do invento, poderá utilizar-se ácido nucleico codificando para o antígeno [p.ex., refs. 123 a 131]. Os componentes de proteína das composições do invento poderão deste modo ser substituídos por um ácido nucleico

(preferencialmente DNA, p.ex. sob a forma de um plasmídeo) que codifica para a proteína.

O invento fornece igualmente um método para a estimulação de uma resposta de anticorpos num mamífero, compreendendo a administração de uma composição farmacêutica do invento ao mamífero. O mamífero é preferencialmente um humano. O humano poderá ser um adulto ou, preferencialmente, uma criança. A resposta de anticorpos é preferencialmente protectora contra a infecção pelo serogrupo A de *N. meningitidis*.

O invento fornece ainda um método para a imunização de um mamífero, compreendendo a administração de uma composição farmacêutica do invento ao mamífero.

Este invento fornece também um sacárido modificado segundo o invento, ou um conjugado segundo o invento, para uso como medicamento.

O invento proporciona ainda o uso de um sacárido modificado segundo o invento, ou um conjugado segundo o invento, no fabrico de um medicamento para a prevenção ou tratamento de uma doença causada por bactérias capsuladas. As doenças causadas por *Neisseria* incluem meningite, septicémia e gonorreia. As doenças causadas por *H. influenzae* incluem otite média, bronquite, pneumonia, celulite, pericardite e meningite. As doenças causadas pelo pneumococo incluem meningite, sépsis e pneumonia. É preferida a prevenção e/ou tratamento da meningite bacteriana.

Definições

O termo "compreendendo" significa "incluindo" assim como "consistindo em"; p.ex., uma composição "compreendendo" X poderá consistir exclusivamente em X ou poderá incluir algo adicional, p.ex., X + Y.

O termo "cerca de" em relação a um valor numérico x significa, por exemplo, $x \pm 10\%$.

Deverá ter-se em conta que poderão existir anéis de açúcar sob as formas aberta e fechada e que, se bem que as fórmulas estruturais aqui apresentadas mostrem formas fechadas, as formas abertas são igualmente abrangidas pelo invento.

Breve descrição dos esquemas

A Figura 1 mostra o *avDP* de amostras de MenA após incubação a 37°, 49° e 57°C apresentado num gráfico em função do tempo (h).

A Figura 2 apresenta o *avDP* de amostras de MenA-CDI-DMA após incubação a 37°, 49° e 57°C apresentado num gráfico em função do tempo (h).

A Figura 3 mostra um gráfico com os espectros sobrepostos de RMN ^{31}P a 242,9 MHz de amostras de MenA-CDI-DMA incubadas a 57°C durante 0, 24, 48, 72 e 96 horas. São indicados alguns marcadores de sinal.

A Figura 4 mostra o diagrama de *avDP* vs. tempo para a comparação dos métodos analíticos colorimétricos e de RMN ^{31}P .

A Figura 5 mostra o *avDP* de sacáridos nativos e modificados de MenA a 2-8°C ao longo do tempo.

A Figura 6 apresenta o espectro de RMN ^1H a 600 MHz de MenA-CDI-DMA a 298 K. São indicadas algumas atribuições.

A Figura 7 mostra os resultados de um ensaio competitivo de ELISA realizado usando oligossacáridos de MenA, MenA-CDI e MenA-CDI-DMA como agentes de revestimento. A concentração de competidores variou entre 10^0 e 10^{-7} mg/ml.

A Figura 8 ilustra o esquema de reacção para a conjugação de oligossacáridos de MenA.

A Figura 9 apresenta o espectro de RMN ^1H a 600 MHz e 25°C de MenA modificado activado. São indicados alguns marcadores de sinal.

As Figuras 10A e 10B mostram espectros hetero-correlacionados de RMN ^1H , ^{13}C a 25°C de MenA modificado activado. Em ambas as Figuras, 10A e 10B, o eixo dos X estende-se aproximadamente desde 5,7 ppm, à esquerda, até 1,8 ppm, à direita. Na Figura 10A, o eixo dos Y estende-se aproximadamente desde 145 ppm, no topo, até 185 ppm, na base; na Figura 10B este eixo estende-se aproximadamente desde 5 ppm, no topo, até 105 ppm, na base.

A Figura 11 apresenta os gráficos sobrepostos de RMN ^1H de MenA DP4 modificado activado e de MenA DP4 nativo (sem a modificação química por CDI e DMA) activado.

A Figura 12 apresenta o espectro de RMN ^{31}P a 243 MHz e 25°C de MenA modificado activado.

As Figuras 13 e 14 expõem o aparecimento de sacárido livre devido à hidrólise de conjugados armazenados a 37°C durante um período de quatro semanas. Os sacáridos modificados são apresentados como quadrados e os sacáridos naturais como triângulos abertos.

A Figura 15 expõe o aparecimento de sacárido livre devido à hidrólise de conjugados armazenados a 37°C durante um período de quatro semanas a diversos pH. A coluna à esquerda de cada par indica o oligossacárido nativo.

A Figura 16 apresenta os títulos de IgG anti-pS-MenA induzidos por (da esquerda para a direita) os conjugados do lote 3, do lote 5 e do lote 002011. As barras indicam os limites de confiança de 95%.

A Figura 17 apresenta a análise das subclasses de IgG em pools de soros resultantes de imunização com conjugados de

MenA modificados e não modificados (lotes 3, 5 e 002011). Os valores correspondem à DO_{405nm} multiplicada por 1000.

A Figura 18 mostra os resultados de um ensaio competitivo de ELISA usando o pS de MenA como competidor. O eixo dos Y apresenta os valores de DO_{405nm} multiplicados por 1000. O eixo dos X mostra as recíprocas das diluições de soro. O oligossacárido MenA não modificado é representado pelos círculos; os sacáridos modificados são representados por quadrados (lote 3) e por triângulos (lote 5). Os símbolos abertos mostram os dados relativos à ausência de polissacárido competidor; os símbolos a cheio mostram os dados relativos à presença de polissacárido competidor.

Modos de realização do invento

Modificação do oligossacárido MenA

Purificou-se o polissacárido capsular a partir de MenA, o qual foi hidrolisado para fornecer o oligossacárido MenA. O polissacárido (2 g) foi hidrolisado a 50°C em tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 4,75, a uma concentração de polissacárido de 10 mg/ml, durante cerca de 4 horas [86]. Após a hidrólise, a solução foi seca por evaporação em rotor.

O oligossacárido foi activado usando o esquema de reacção que é apresentado acima no Esquema 1. O oligossacárido foi dissolvido em DMSO até se obter uma concentração de sacárido de 10 mg/ml. Para se obter uma razão molar de oligossacárido:CDI de 1:20, adicionaram-se então 21,262 g de CDI (Sigma®) e a mistura de reacção foi agitada durante 16 horas à temperatura ambiente. O composto MenA-CDI resultante foi purificado por precipitação selectiva numa mistura de 80:20 (v/v) de acetona:DMSO, seguida de centrifugação. A eficiência da reacção de activação foi calculada, através da

determinação da razão entre o imidazol livre e o imidazol ligado, como sendo de cerca de 67,9%.

No segundo passo de reacção, o oligossacárido MenA-CDI foi solubilizado em DMSO até uma concentração de sacárido de cerca de 10 mg/ml. Para se obter uma razão molar de unidade de MenA-CDI:DMA de 1:100, adicionaram-se 36,288 g de cloridrato de dimetilamina a 99% (Sigma®) e a mistura de reacção foi agitada durante 16 horas à temperatura ambiente. O produto de reacção foi liofilizado e ressolubilizado até se obter uma solução a 10 mg/ml em água.

Para remover os reagentes de baixo peso molecular (em particular a dimetilamina (DMA)) da preparação de oligossacárido, foi efectuado um passo de diálise através de uma membrana MWCO de 3,5 kDa (Spectra/Por®). Foram realizados quatro passos de diálise: (i) 16 horas contra 2 L de cloreto de sódio 1M (factor de diálise 1:20), (ii) 16 horas contra 2 L de cloreto de sódio 0,5M (factor de diálise 1:20), (iii) e (iv) 16 horas contra 2 L de WFI (factor de diálise 1:20). Para melhorar a purificação, foi ainda realizado um passo de diafiltração através de uma membrana MWCO de 1 kDa (Centricon®).

O produto purificado de MenA-CDI-DMA foi tamponado a pH 6,5 em L-histidina 25 mM (Fluka®).

A estabilidade dos produtos de MenA e de MenA-CDI-DMA foi avaliada usando métodos colorimétricos e de RMN para determinar o seu grau médio de polimerização (*avDP*). As amostras foram incubadas em frascos de vidro em tampão de His 25 mM, pH 6,5, durante 96 horas a uma de três temperaturas (37°, 49° ou 57°C) e, no final do período de incubação, as amostras foram armazenadas a 4°C.

Estudo colorimétrico da estabilidade

O *avDP* químico é expresso através da razão $[Pt]/[Pme]$, em que $[Pt]$ é a concentração total de fósforo e $[Pme]$ é a concentração de fosfato de monoéster terminal. $[Pt]$ foi determinado colorimetricamente tal como descrito na ref. 132. $[Pme]$ foi determinado através da medição do fosfato inorgânico, P_i , libertado por reacção enzimática com fosfatase ácida de batata [133].

As Figuras 1 e 2 mostram os *avDPs* de MenA e de MenA-CDI-DMA em função do tempo (t).

As constantes cinéticas (k) da hidrólise de sacárido (indicada nas Figuras 1 e 2 pela descida de *avDP*) foram analisadas tal como se descreve na referência 134. Foram analisados dois aspectos distintos de k :

- k como função de *avDP* e t na equação cinética padrão; e
- k como função do factor de frequência (A), energia de activação (ΔG_a) e temperatura (T) na equação de Arrhenius.

Assumiu-se que a hidrólise prosseguiu até ao final com uma cinética de primeira ordem satisfatória:

$$\frac{d\text{avDP}}{dt} = -k\text{avDP} \qquad \text{avDP} = \text{avDP}_0 \exp(-kt)$$

em que $\text{avDP}_0 = \text{avDP}$ a $t=0$.

A forma logarítmica é:

$$\ln \text{avDP} = \ln \text{avDP}_0 - kt$$

k é definida pelo declive do gráfico de $\ln \text{avDP} = f(t)$.

A equação de Arrhenius indica a correlação entre as constantes cinéticas a diversos valores de temperatura e a energia de activação para a reacção de hidrólise:

$$k = A \exp(-\Delta G_a / RT)$$

$$\ln k = \ln A - \Delta G_a / RT$$

em que $R = 8,314 \times 10^{-3}$ KJ/mol K.

ΔG_a é calculado a partir do declive da linha recta obtida pelo traçado de um gráfico de $\ln k$ em função da recíproca da temperatura ($1/T$). Neste estudo foi analisada apenas a energia de activação total da reacção de hidrólise, sem a separação das contribuições isoladas da entalpia de activação e da entropia de activação ($\Delta G_a = \Delta H_a + T\Delta S_a$).

A Tabela 1 resume os dados do ensaio colorimétrico de *avDP* e as constantes cinéticas da reacção de hidrólise a várias temperaturas:

	T (K)	<i>avDP</i>					k (s ⁻¹)
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	
MenA	310	21,453	17,452	14,197	11,550	9,396	$2,4 \times 10^{-6}$
	322	21,453	14,028	9,173	5,998	3,922	$4,9 \times 10^{-6}$
	330	21,453	10,956	5,595	2,857	1,459	$7,8 \times 10^{-6}$
MenA- CDI-DMA	310	21,453	21,192	20,994	19,524	18,640	$1,9 \times 10^{-7}$
	322	21,453	22,410	19,127	17,472	15,491	$9,2 \times 10^{-7}$
	330	21,453	20,227	16,555	13,864	11,600	$1,8 \times 10^{-6}$

Os gráficos de Arrhenius das constantes de taxa obtidas a 37°, 49° e 57°C indicam que a energia de activação da reacção de hidrólise em tampão His 25 mM, pH 6,5, é de 50,1 KJ/mol (12,0 Kcal/mol) para MenA e de 94,9 KJ/mol (22,7 Kcal/mol) para MenA-CDI-DMA. Os erros-padrão, estimados por regressão

linear dos menores quadrados dos gráficos de Arrhenius, são de $\pm 5,0$ KJ/mol ($\pm 1,2$ Kcal/mol) para os valores de ΔG_a . Assim, o polissacárido modificado segundo o invento é quase duas vezes mais estável do que o seu correspondente não modificado.

Estudo da estabilidade por RMN

De modo a verificar o *avDP* obtido pelo método colorimétrico, efectuaram-se experiências analíticas de RMN ^{31}P . Os dados de *avDP* foram calculados através da razão de integração entre os sinais de P_{me} e de $P_{em\ cadeia}$ (ver Figura 3).

Foram preparadas amostras de RMN ^1H e ^{31}P dissolvendo oligossacáridos liofilizados em 0,75 ml de D_2O a 99,9% (Aldrich®) para fornecer soluções com concentrações de 10-15 mM. Em todas as experiências, foram usados tubos de RMN de 5 mm Wilmad®. Os espectros de RMN foram registados a 298 K num espectrómetro de RMN Avance DRX da Bruker®, a 600 MHz, com uma unidade BGU. Foi usada uma sonda de tripla ressonância TBI 5 nun com gradientes z auto-blindados. Para o processamento dos dados foi usado o software XWINNMR 3.0 da Bruker. As condições de aquisição espectral padronizadas para ^1H foram as de recolha de pontos de dados a 32 k ao longo de uma janela espectral de 6000 Hz com 4 varrimentos. Foi aplicada uma transformação de Fourier aos espectros de RMN ^1H após aplicação de uma função de alargamento de linha de 0,1 Hz e os espectros foram referenciados à ressonância do ião acetato a 1,91 ppm ou à da água monodeuterada a 4,72 ppm. As condições de aquisição espectral padronizadas para ^{31}P foram as de recolha de pontos de dados a 32 k ao longo de uma janela espectral de 3000 Hz com 128 varrimentos. Foi usada uma função de alargamento de linha de 2,0 Hz.

Tal como mostra a Figura 4, os métodos colorimétricos e de RMN ^{31}P são concordantes para todos os valores de temperatura,

sendo apenas evidente um ligeiro deslocamento para baixo (sem efeitos sobre $\ln avDP = f(t)$).

Os resultados dos métodos de análise colorimétrica e de RMN ^{31}P são resumidos na Tabela 2:

Método analítico	T (K)	avDP					k (s ⁻¹)
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	
Determinação colorimétrica	310	21,453	21,192	20,994	19,524	18,640	1,9 x 10 ⁻⁷
	322	21,453	22,410	19,127	17,472	15,491	9,2 x 10 ⁻⁷
	330	21,453	20,227	16,555	13,864	11,600	1,8 x 10 ⁻⁶
Determinação por RMN ^{31}P	310	20,407	19,573	19,170	18,450	18,253	3,3 x 10 ⁻⁷
	322	20,407	16,986	14,836	12,556	10,051	2,0 x 10 ⁻⁶
	330	20,407	15,984	12,123	9,860	8,079	2,7 x 10 ⁻⁶

Através da melhoria da análise por meio da forma espectral de P_{me} , verifica-se o surgimento de duas espécies moleculares diferentes (ver Figura 3). É evidente uma constante cinética inferior para o sinal de campo superior.

Por extrapolação dos dados adquiridos a temperatura inferior (p.ex., a temperatura de armazenamento típica de 2 a 8°C), é possível extrapolar estes dados para uma escala de tempo de 2 anos (ver Figura 5).

Comparando os resultados obtidos por meio destas investigações relativamente à estabilidade de MenA e de MenA-CDI-DMA, observa-se um aumento significativo de estabilidade do produto modificado. A extrapolação para uma escala de tempo mais alargada indica que a degradação de MenA-CDI-DMA é reduzida o suficiente para permitir a distribuição do produto durante 2 anos.

Caracterização estrutural

A Figura 6 mostra um espectro por RMN ^1H de uma amostra de MenA-CDI-DMA a 298 K com atribuições de sinal indicativas. O perfil por RMN sugere uma elevada similiariedade entre o

oligossacárido MenA e o oligossacárido MenA-CDI-DMA. Os sinais de ^1H -metil-DMA surgem na região espectral de 2,6-3 ppm. O pico a 2,73 ppm corresponde ao ^1H -metilo do DMA livre, como reagente residual na solução. O pico a 2,91 ppm foi atribuído, como hipótese, à ligação de ^1H -metil-DMA à cadeia de oligossacárido.

Os perfis de RMN ^{31}P são similares aos do oligossacárido MenA. Observa-se apenas um curto deslocamento para campo inferior do sinal de P_{me} (ver Figura 3).

Os sacáridos modificados segundo o invento são deste modo estruturalmente semelhantes aos seus correspondentes nativos, o que deverá significar que a antigenicidade e a imunogenicidade não são afectadas.

Ensaio competitivo de ELISA

Foi usado um ensaio competitivo de ELISA para correlacionar os oligossacáridos MenA, MenA-CDI e MenA-CDI-DMA com a sua capacidade para deslocar anticorpos específicos. O gráfico de % de inibição em função da concentração do competidor (mg/ml) é apresentado na Figura 7. Todas as amostras exibiram um comportamento semelhante, atingindo cerca de 100% de inibição a uma concentração de competidor de 10^{-1} mg/ml.

Tal confirma que a modificação dos sacáridos de acordo com o invento não resulta em perda de antigenicidade.

Conjugação

O sacárido MenA modificado (MenA-CDI-DMA) foi conjugado com proteína CRM₁₉₇ através do processo resumido na Figura 8. Os passos básicos do processo de conjugação são:

- hidrólise do polissacárido MenA para fornecer fragmentos de oligossacárido
- dimensionamento dos fragmentos de oligossacárido

- aminação redutiva dos grupos aldeído terminais dos oligossacáridos dimensionados
- protecção dos grupos -NH_2 terminais por grupos Fmoc antes da reacção com CDI
- desprotecção intrínseca dos grupos -NH_2 durante a reacção com DMA
- activação dos grupos -NH_2 terminais por SIDEA (N-hidroxisuccinimidodiéster de ácido adípico)
- ligação covalente à proteína CRM₁₉₇

a) Hidrólise

O polissacárido MenA foi hidrolisado em tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 4,75, durante aproximadamente 3 horas a 73°C. A hidrólise foi controlada de modo a se obterem oligossacáridos com um grau de polimerização (GP) médio de aproximadamente 15, tal como determinado através da razão (p/p) entre o fósforo orgânico total e o fosfato de monoéster.

b) Dimensionamento

Este passo selecciona uma população definida de oligossacáridos gerados durante o processo de hidrólise. O hidrolisado acima obtido foi ultrafiltrado através de uma membrana com cutoff de 30 kDa (12 volumes de diafiltração de tampão de acetato 5 mM, pH 6,5) para remover as cadeias de grande extensão da porção molecular retida.

c) Introdução de um grupo amino primário na extremidade redutora

Adicionou-se acetato de amónio à solução de oligossacárido dimensionado para se obter uma concentração final de 300 g/l, adicionando-se então ciano-borohidreto de sódio até uma

concentração final de 73 g/l. Após ajuste do pH até $6,5 \pm 0,2$, a mistura foi incubada a 37°C durante 5 dias.

Os amino-oligossacáridos foram então purificados por ultrafiltração através de uma membrana de cutoff de 3 kDa usando 13 volumes de NaCl 0,5 M. Este passo remove as cadeias sacarídicas de curta extensão ($GP < 6-7$), obtendo-se um grau final de polimerização média de ~15.

A porção molecular retida foi diafiltrada com 4 volumes de TAB (brometo de tetrabutílamónio) 10 mM e de seguida com 7 volumes de H₂O para se proceder à troca de Na⁺ por TAB⁺. O ião orgânico positivo melhora a solubilidade do sacárido em DMSO (requerida para os passos de derivatização seguintes) até cerca de 10 g/l.

Os oligossacáridos purificados foram secos com um evaporador de rotor para remover a água e foram então solubilizados em solvente de DMSO até uma concentração de cerca de 10 g/l.

A solução purificada de amino-oligossacáridos foi analisada quanto ao seu conteúdo em fósforo pelo procedimento de Chen [132] e quanto à quantidade de grupos amino introduzidos pelo procedimento de Habbeb [135].

Como alternativa à ultrafiltração para a remoção de sacáridos de cadeia curta, foi usada uma coluna Q-Sepharose Fast Flow, mas torna-se então necessário um passo adicional de troca para uma coluna SP-Sepharose (Pharmacia®) para efectuar a conversão Na⁺/TAB⁺.

d) Protecção dos grupos amino terminais com reagente Fmoc

Fizeram-se reagir os amino-oligossacáridos com Fmoc-OSu (N-9-fluorenilmetoxycarboniloxi) (Sigma) de acordo com a razão molar $-NH_2:Fmoc-OSu = 1:20$. A mistura foi incubada durante 12 horas, com agitação, à temperatura ambiente e foi precipitada

com acetona (concentração final de 80% v/v). O precipitado foi recolhido por centrifugação e lavado por diversas vezes com acetona para remover o reagente Fmoc-OSu que não reagiu.

e) Reacção de estabilização com os reagentes CDI e DMA

Os amino-oligossacáridos protegidos foram solubilizados em DMSO a 10 g/l e adicionados a CDI numa razão molar de CDI:fósforo total = 20:1. A mistura foi incubada durante 12 horas, com agitação, à temperatura ambiente e foi precipitada com acetona (concentração final de 80% v/v). O precipitado foi recolhido por centrifugação e lavado por diversas vezes com acetona para remover o reagente CDI que não reagiu.

O produto acima obtido foi solubilizado em DMSO a 10 g/l e adicionado a uma solução de DMA em etanol (cerca de 5,6 M) de acordo com a razão molar de DMA:fósforo total = 20:1. A mistura foi incubada durante 12 horas, com agitação, à temperatura ambiente e foi precipitada com acetona (concentração final de 80% v/v). O precipitado foi recolhido por centrifugação e lavado por diversas vezes com acetona para remover o reagente DMA que não reagiu.

Os oligossacáridos purificados foram então secos em vácuo para remover os vestígios de solventes orgânicos.

f) Cromatografia de troca iónica

O oligossacárido seco foi solubilizado em água a 10 g/l e carregado sobre uma coluna SP-Sepharose Fast Flow (Pharmacia®) equilibrada com NaCl 1 M, de modo a efectuar a troca de Tab^+/Na^+ . A coluna foi então lavada com 5 volumes de coluna (VC) de água para recuperar os vestígios de produto adsorvido à resina. O oligossacárido foi então seco por evaporação em rotor para remover a água.

g) Derivatização para éster activo

O produto seco foi solubilizado em água a uma concentração de grupo amino de 40 mM, adicionando-se então 9 volumes de DMSO seguidos de TEA (triethylamina) até uma concentração final de 200 mM. À solução resultante adicionou-se N-hidroxisuccinimidodiéster de ácido adípico (SIDEA) até uma concentração final de 480 mM.

A reacção foi mantida à temperatura ambiente durante 2 horas, com agitação, e o oligossacárido activado foi então precipitado com acetona (concentração final de 80% v/v). O precipitado foi recolhido por centrifugação e lavado por diversas vezes com acetona para remover o SIDEA que não reagiu.

Os oligossacáridos purificados foram então secos sob vácuo para remover o solvente.

A quantidade de grupos éster activos que foi introduzida na estrutura do oligossacárido foi determinada por um método colorimétrico tal como o descrito na referência 136.

O oligossacárido activado foi analisado por RMN ^1H , tal como acima descrito, para confirmar as modificações químicas. Foram usados os perfis protónicos por RMN que haviam sido estabelecidos em experiências anteriores para avaliar diversos lotes de produto. Os sinais de sacáridos foram atribuídos por inspecção dos espectros RMN de 1D (Figura 9) e dos espectros RMN hetero-correlacionados de 2D (^1H , ^{13}C ; Figuras 10A e 10B), verificando-se serem característicos do MenA modificado.

Dissolveram-se cerca de 5 mg de cada amostra em 750 μl de D_2O e os espectros foram registados num espectrómetro Bruker Advance a 600 MHz.

A inspecção da razão entre grupos CH_3^{DMA} e $\text{H}_1^{\text{anel sacarídico}}$ indicou um rendimento da reacção de estabilização de entre 70% a 75%.

O perfil protónico do sacárido modificado é mantido, e a análise por RMN não evidencia modificações substanciais no que diz respeito ao estado de O-acetilação e à conformação estrutural. No entanto, os grupos carbamato modificam o campo magnético local e, deste modo, a atribuição do espectro de RMN ^1H é complicada.

Na Figura 11 são apresentados os gráficos sobrepostos de oligossacáridos MenA modificados e de oligossacáridos MenA nativos. É evidente um deslocamento para campo inferior dos sinais H_3 , H_4 e H_2 , já que os grupos carbamato nas posições de anel C_3 e C_4 estão mais próximos do que outros núcleos, como por exemplo H_1 . Os espectros sugerem outras transições mas a sua atribuição não é completamente segura.

A Figura 12 mostra que a derivatização química não provoca qualquer modificação do espectro de RMN ^{31}P .

h) Conjugação com CRM₁₉₇

O oligossacárido activado seco foi adicionado a uma solução a 45 mg/ml de CRM₁₉₇ em tampão de fosfato 10 mM, pH 7,2, de acordo com uma razão molar de grupos éster:proteína = 12:1. A reacção foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 12 horas e o conjugado obtido foi purificado por ultrafiltração tangencial através de uma membrana com cutoff de 30 kDa usando 50 volumes de tampão fosfato 10 mM, pH 7,2. O produto foi filtrado em condições de esterilidade e armazenado a -20°C até à formulação da vacina.

O conjugado purificado foi analisado quanto ao conteúdo em proteína (Ensaio de Proteínas microBCA), conteúdo em sacárido (análise cromatográfica), perfil de HPLC (em TSKgel G4000SWXL, 7,5 mm D.I. x 30 cm), perfil de RMN e SDS-PAGE.

Estabilidade dependente do tempo do conjugado

A estabilidade do conjugado com CRM₁₉₇ do oligossacárido MenA-CDI-DMA foi avaliada através da monitorização do surgimento, devido à hidrólise, do sacárido livre em solução ao longo de quatro semanas de armazenagem a 37°C, em comparação com um conjugado com CRM₁₉₇ do oligossacárido MenA não modificado.

A quantidade de sacárido livre (i.e., não conjugado) foi determinada por cromatografia de fase reversa numa coluna C4 de cartucho ISOLUTE® (IST®) para isolar as cadeias não conjugadas, e em seguida pelo sacárido permeado através de cromatografia HPAE-PAD.

O sacárido total (i.e., tanto o conjugado como o não conjugado) foi determinado através de um método de análise quantitativa de fosfato de N-acetilmanosamina, o qual utiliza uma cromatografia de troca aniónica de alto rendimento em associação a detecção amperométrica pulsada (HPAE-PAD) [137].

A razão entre sacárido não conjugado e sacárido total foi expressa em percentagem (% FS).

Numa primeira experiência, a % FS desenvolveu-se tal como se segue (Figura 13):

Tempo (dias)	0	7	14	21	28
Modificado	16,8	14,7	23,8	21,7	23,3
Natural	11,0	-	27,0	36,6	39,5

Numa segunda experiência, os resultados foram os que se seguem (Figura 14):

Tempo (dias)	0	7	14	21	28
Modificado	1,8	1,5	4,2	4,9	8,2
Natural	4,8	5,5	19,3	22,7	28,3

O conjugado de oligossacárido MenA modificado é claramente muito mais resistente à hidrólise do que o seu correspondente natural a temperaturas elevadas. Após 28 dias a 37°C, por exemplo, a percentagem de sacárido libertado é de 6,4% para o oligossacárido modificado vs. 23,5% para o açúcar natural.

Num trabalho adicional destinado a testar a consistência lote-a-lote usando o sacárido MenA modificado, foi monitorizado o surgimento de sacárido livre a partir dos conjugados durante 8 semanas a 37°C. Os resultados para os três lotes foram:

Tempo (dias)	0	7	14	28	56
Lote A	1,7	2,9	3,2	5,8	8,7
Lote B	1,0	4,2	4,5	6,5	10,9
Lote C	2,2	4,5	5,4	8,2	11,4

Deste modo, verifica-se que o conjugado modificado é estável por um período alargado de tempo. Uma percentagem de sacárido livre de menos de 12% encontra-se bem dentro dos limites de aceitabilidade, mesmo para temperaturas acima do normal.

Estabilidade pH-dependente do conjugado

A estabilidade dos conjugados de oligossacáridos MenA modificados e não modificados foi testada através da monitorização do surgimento de sacárido livre a diferentes pH, numa gama de entre 6,0 e 8,0, após armazenagem a 37°C durante 28 dias. Os oligossacáridos modificados (Lote 5) e não modificados (Lote RS040101) foram comparados e os incrementos em sacárido livre ($\Delta\%$ FS) entre os dias 0 e 28 foram tal como se segue (Figura 15):

pH*	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Modificado	10,3	5,4	8,9	8,3	26,1
Nativo	43,5	30,1	36,1	20,3	30,5
*pH \pm 0,1					

O conjugado de MenA modificado evidencia assim uma taxa de hidrólise muito mais baixa quando comparado com o conjugado do oligossacárido MenA nativo no intervalo de pH de 6,5-7,5. A pH 8,0, quando os grupos estabilizantes de carbamato são removidos, o efeito é menos marcado.

Imunogenicidade dos conjugados modificados

Os conjugados purificados de CRM₁₉₇ com oligossacárido MenA modificado foram usados para imunizar ratinhos de modo a verificar se a modificação não remove a imunogenicidade do sacárido.

A vacina foi formulada de modo a proporcionar uma dose humana única (SHD) de 10 µg de sacárido num volume de 0,5 ml. Foram preparadas duas formulações: uma formulação líquida e uma formulação liofilizada. Ambas contêm um adjuvante de fosfato de alumínio a 0,6 mg de Al³⁺/ml na forma de dosagem final, sendo usada uma suspensão aquosa do adjuvante para reconstituir a formulação liofilizada.

A formulação líquida do conjugado de oligossacárido modificado foi comparada com a formulação liofilizada do conjugado de oligossacárido nativo (i.e., não modificado).

Os ratinhos foram imunizados com 1/5 da SHD, sendo as vacinas diluídas com soro fisiológico antes de cada imunização. Dez ratinhos Balb/c (fêmeas, com 6-8 semanas) por grupo de imunização foram injectados subcutaneamente com 0,5 ml da vacina ao tempo zero e quatro semanas depois. As colheitas de sangue foram efectuadas antes da primeira

imunização e à semana 6 (soros pré- e pós-II), sendo os soros armazenados a -70°C.

Títulos de anti-polissacárido

Os anticorpos IgG totais específicos anti-polissacárido MenA foram doseados no soro dos animais imunizados de acordo com o procedimento do CDC para a análise de MenA em soros humanos [138], adaptado à análise de soros de animais, com algumas pequenas alterações.

O soro de cada ratinho foi analisado em duplicado usando uma curva de titulação. Foi calculada a GMT (média geométrica dos títulos) para os grupos de imunização. O título de anti-polissacárido MenA foi expresso em Unidades ELISA de Ratinho (MEU), usando-se para o cálculo de MEU um software baseado no Método de Ensaio da Linha de Referência.

A análise das subclasses de IgG foi efectuada num pool dos soros pós-II obtidos a partir dos grupos de imunização, usando os conjugados de fosfatase alcalina-anti IgG1 de ratinho, ou IgG2a, ou IgG2 ou IgG3 (Zymed) como conjugado secundário no procedimento de ELISA. Os títulos foram expressos como correspondendo à DO_{405nm} obtida com uma diluição de 1:3200 do pool de soros pós-II após 30 minutos de revelação do substrato.

A Figura 16 mostra os títulos de IgG anti-pS MenA induzidos pelos dois lotes de conjugado de MenA modificado (lotes 3 e 5) em comparação com o conjugado de MenA liofilizado não modificado (lote 002011) usando fosfato de alumínio como adjuvante. Ambos os conjugados modificados induziram um título muito semelhante ao induzido pelo conjugado de MenA não modificado.

A Figura 17 apresenta a análise das subclasses de IgG dos pools de soros (diluídos a 1:3200) resultantes da imunização

com conjugados de MenA modificados e não modificados. A subclasse mais representada em todos os soros é a IgG1, sendo esta a subclasse predominantemente induzida em ratinhos por antígenos T-dependentes quando apresentados como proteínas. Uma vez que o sacárido capsular MenA é naturalmente um antígeno T-independente que não tem a capacidade de induzir uma memória imunológica, este achado indica que a conjugação atingiu o seu objectivo.

A especificidade do título de anti-pS MenA foi determinada através de um ensaio competitivo de ELISA usando pS MenA como competidor numa concentração final de 25 µg/ml. Tal como mostra a Figura 18, verifica-se uma muito boa inibição do título induzido pelos conjugados modificados e não modificados, indicando que todos os conjugados exibiram a capacidade de induzir títulos específicos de anti-pS MenA.

Ensaio bactericida em soro (SBA) contra o serogrupo A de *N. meningitidis*

Foi analisada a funcionalidade dos anticorpos induzidos por imunização com os conjugados usando um ensaio bactericida *in vitro* para medir a lise bacteriana mediada por complemento.

Usaram-se os pools dos soros pós-II de cada grupo de imunização. Estes foram inactivados durante 30 minutos a 56°C antes de serem utilizados no ensaio. Foi usado complemento de coelho bebé a 25% como fonte de complemento (Pel Freeze). O título bactericida foi expresso como correspondendo à recíproca da diluição de soro que provoca a morte de 50% das bactérias. Foi testada a actividade contra duas estirpes do serogrupo A: F8238 e F6124.

Os títulos foram os seguintes:

Estirpe alvo	Lote 3	Lote 5	Lote 002011
F8238	2048-4096	2048	4096-8192
F6124	4096	2048	4096

Assim, todos os conjugados induziram bons títulos bactericidas contra ambas as estirpes, e os títulos induzidos pelos oligossacáridos modificados não são significativamente inferiores aos obtidos usando as estruturas de açúcar nativas. No entanto, verifica-se a vantagem de os oligossacáridos modificados serem significativamente mais estáveis do que os oligossacáridos nativos. O invento fornece, deste modo, antigénios que retêm o potencial imunogénico do sacárido capsular de MenA nativo, mas que exibem uma resistência melhorada à hidrólise durante o armazenamento.

Deve ter-se em conta que o invento foi descrito apenas com fins exemplificativos e que poderão introduzir-se modificações sem que se abandone o âmbito das reivindicações anexas.

Lisboa, 26 de Março de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Um sacárido capsular modificado compreendendo um grupo bloqueante numa posição de grupo hidroxilo em pelo menos uma das unidades monossacarídicas do sacárido capsular nativo correspondente, sendo o sacárido capsular **caracterizado por facto de** compreender ligações fosfodiéster.

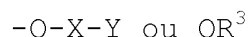
2. O sacárido capsular modificado de acordo com a Reivindicação N.º.1, **caracterizado por** pelo menos uma unidade monossacarídica ser uma unidade monossacarídica não terminal.

3. O sacárido capsular modificado de acordo com as Reivindicações N.º.1 ou N.º.2, **caracterizado por** compreender pelo menos um grupo hidroxilo ou um grupo amino livres.

4. O sacárido capsular modificado de acordo com a Reivindicação N.º.3, **caracterizado por** pelo menos um grupo hidroxilo livre ser um grupo hidroxilo anomérico terminal.

5. O sacárido capsular modificado de acordo com a Reivindicação N.º.1, **caracterizado por** o grupo bloqueante ser um grupo retirador de electrões.

6. O sacárido capsular modificado de acordo com as Reivindicações N.º.1 ou N.º.2, **caracterizado por** o grupo bloqueante possuir a fórmula:



em que

X é C(O), S(O) ou SO₂;

Y é alquilo C₁₋₁₂, alcoxi C₁₋₁₂, cicloalquilo C₃₋₁₂, arilo C₅₋₁₂ ou arilo C₅₋₁₂-alquilo C₁₋₆, cada um dos quais poderá opcionalmente ser substituído com 1, 2 ou 3 grupos seleccionados de modo independente a partir de F, Cl, Br, CO₂H, CO₂(alquilo C₁₋₆), CN, CF₃ ou CCl₃; ou Y é NR¹R²;

R^1 e R^2 são seleccionados de modo independente a partir de H, alquilo C_{1-12} , cicloalquilo C_{3-12} , arilo C_{5-12} , arilo C_{5-12} -alquilo C_{1-6} ; ou R^1 e R^2 podem ser reunidos para formar um grupo heterocíclico saturado C_{3-12} ;

R^3 é alquilo C_{1-12} ou cicloalquilo C_{3-12} , cada um dos quais poderá opcionalmente ser substituído com 1, 2 ou 3 grupos seleccionados de modo independente a partir de F, Cl, Br, CO_2 (alquilo C_{1-6}), CN, CF_3 ou CCl_3 ; ou R^3 é arilo C_{5-12} ou arilo C_{5-12} -alquilo C_{1-6} , cada um dos quais poderá opcionalmente ser substituído com 1, 2, 3, 4 ou 5 grupos seleccionados a partir de F, Cl, Br, CO_2H , CO_2 (alquilo C_{1-6}), CN, CF_3 ou CCl_3 .

7. O sacárido capsular modificado de acordo com a Reivindicação N°.6, **caracterizado por** o grupo bloqueante ser $-OC(O)NR^1R^2$ ou $-OC(O)CF_3$.

8. O sacárido capsular modificado de acordo com a Reivindicação N°.7, **caracterizado por** o grupo bloqueante ser $-OC(O)NR^1R^2$ e R^1 e R^2 serem seleccionados de modo independente a partir de alquilo C_{1-6} .

9. O sacárido capsular modificado de acordo com a Reivindicação N°.8, **caracterizado por** R^1 e R^2 serem ambos metilo.

10. O sacárido capsular modificado de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, **caracterizado por** pelo menos 10% das unidades monossacarídicas compreenderem um grupo bloqueante.

11. O sacárido capsular modificado de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, **caracterizado por** o sacárido capsular correspondente compreender unidades monossacarídicas ligadas por ligações fosfodiéster.

12. O sacárido capsular modificado de acordo com a Reivindicação N°.11, **caracterizado por** o sacárido capsular

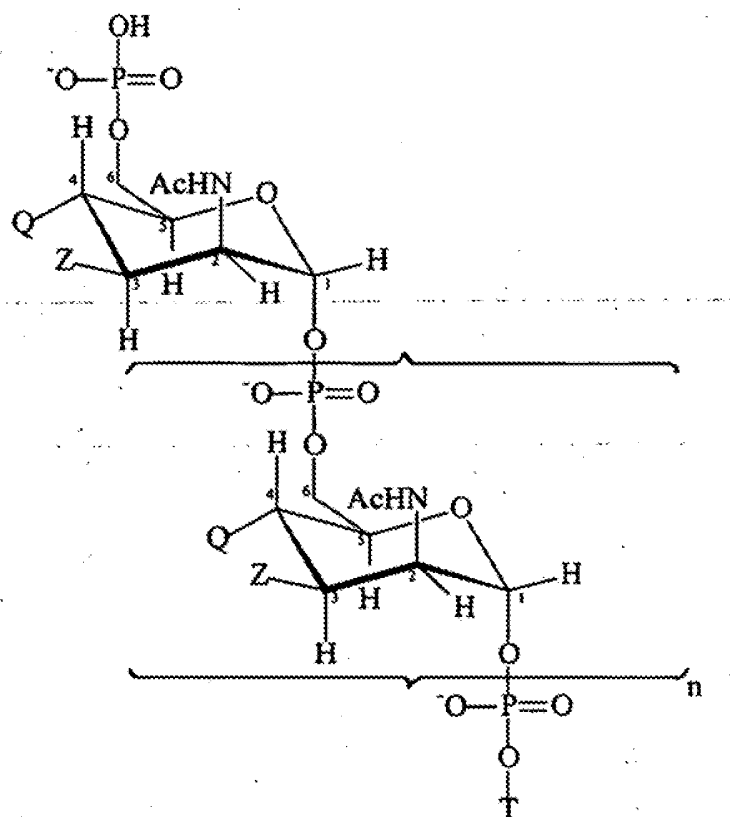
correspondente ser um sacárido do serogrupo A de *Neisseria meningitidis*.

13. O sacárido capsular modificado de acordo com a Reivindicação N°.12, **caracterizado por** o grupo bloqueante se encontrar em qualquer das posições 4- e/ou 3- do sacárido correspondente do serogrupo A de *Neisseria meningitidis*.

14. O sacárido capsular modificado de acordo com a Reivindicação N°.12, **caracterizado por** o grupo bloqueante se encontrar em qualquer das posições 4- do sacárido correspondente do serogrupo A de *Neisseria meningitidis*.

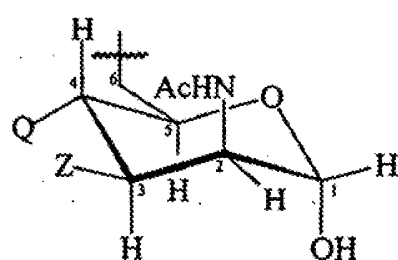
15. O sacárido capsular modificado de acordo com qualquer uma das Reivindicações N°.1 a N°.14, **caracterizado por** este ser um oligossacárido.

16. Um sacárido com a fórmula:

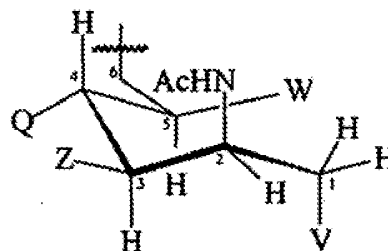


Caracterizado por

T ter a fórmula (A) ou (B):



(A)



(B)

n ser um número inteiro de 1 a 100;

cada grupo Z ser seleccionado de modo independente entre -OH ou um grupo bloqueante tal como definido nas Reivindicações N°.5 a N°.9; e

cada grupo Q ser seleccionado de modo independente entre -OH ou um grupo bloqueante tal como definido nas Reivindicações N°.5 a N°.9;

W ser seleccionado entre -OH ou um grupo bloqueante tal como definido nas Reivindicações 5 a 9;

V ser seleccionado a partir de -NH₂ ou -NHE, em que E é um grupo protector de azoto;

e em que mais do que cerca de 7% dos grupos Q são grupos bloqueantes.

17. O sacárido de acordo com a Reivindicação N°.16, **caracterizado por** pelo menos 50% dos grupos Z serem OAc.

18. O sacárido de acordo com as Reivindicações N°.16 ou N°.17, **caracterizado por** n ser um número inteiro de entre 15 a 25.

19. O sacárido de acordo com qualquer uma das Reivindicações N°.16 a N°.18, **caracterizado por** pelo menos 10% dos grupos Q serem grupos bloqueantes.

20. Um processo para a modificação de um sacárido capsular, compreendendo os passos de:

(a) fornecimento de um sacárido capsular possuindo pelo menos um grupo hidroxilo numa unidade monossacarídica; e

(b) conversão do dito pelo menos um grupo hidroxilo num grupo bloqueante;

caracterizado por o sacárido capsular compreender ligações fosfodiéster.

21. Um processo para a modificação de um sacárido capsular, compreendendo os passos de:

(a) fornecimento de um sacárido capsular que possui pelo menos um grupo hidroxilo numa unidade monossacarídica;

(b) conversão do dito pelo menos um grupo hidroxilo num grupo bloqueante $-OC(O)NR^1R^2$, (b1) fazendo reagir o sacárido capsular com um reagente bifuncional num solvente orgânico; e (b2) fazendo reagir o produto do passo (b1) com um composto amino com a fórmula (I):



caracterizado por R^1 e R^2 serem tal como definido em qualquer uma das Reivindicações N°.3, N°.5 e N°.6;

caracterizado por o sacárido capsular compreender ligações fosfodiéster.

22. O processo de acordo com a Reivindicação N°.20 ou Reivindicação N°.21, **caracterizado por** o grupo bloqueante ser tal como definido por qualquer uma das Reivindicações N°.5 a N°.9.

23. O processo de acordo com a Reivindicação N°.22, **caracterizado por** o solvente orgânico ser um solvente aprótico.

24. O processo de acordo com a Reivindicação N°.23, **caracterizado por** o solvente aprótico ser seleccionado a partir de dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF),

formamida, hexametilfosforamida (HMPA), hexametilfósforo-triamida (HMPT), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU) ou dimetilacetamida (DMAC).

25. O processo de acordo com as Reivindicações N°.23 ou 24, **caracterizado por** o solvente aprótico ser o DMSO.

26. O processo de acordo com as Reivindicações N°.22 a N°.25, **caracterizado por** o agente bifuncional ser seleccionado a partir de 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), carbonil-di-1,2,4-triazol (CDT), carbonil-di-1,2,3-benzotriazol (CDB), difenilcarbonato, brometo de cianogénio, fosgénio ou trifosgénio.

27. O processo de acordo com a Reivindicação N°.26, **caracterizado por** o agente bifuncional ser o CDI.

28. O processo de acordo com as Reivindicações N°.20 a N°.27, **caracterizado por** o sacárido capsular modificado ser um oligossacárido capsular modificado.

29. O processo de acordo com a Reivindicação N°.28, **caracterizado por** o sacárido capsular do passo (a) ser um oligossacárido capsular que é obtido por meio do dimensionamento do polissacárido capsular nativo correspondente.

30. O processo de acordo com a Reivindicação N°.28, **caracterizado por** o sacárido capsular do passo (a) ser um polissacárido capsular nativo e o processo é ainda caracterizado pelo facto de compreender um passo (c) no decurso do qual o produto do passo (b) é dimensionado, deste modo fornecendo um oligossacárido capsular modificado.

31. Um processo para a modificação de um polissacárido do serogrupo A de *Neisseria meningitidis*, **caracterizado por** compreender os passos de:

(a) fornecimento de um polissacárido nativo do serogrupo A de *Neisseria meningitidis*;

(b) dimensionamento do dito polissacárido de modo a fornecer um oligossacárido; e

(c) conversão de pelo menos um grupo hidroxilo do oligossacárido em um grupo bloqueante, de acordo com qualquer uma das Reivindicações N°.21 a N°.27.

32. Um processo para a modificação de um polissacárido do serogrupo A de *Neisseria meningitidis*, **caracterizado por** compreender os passos de:

(a) fornecimento de um polissacárido nativo do serogrupo A de *Neisseria meningitidis*;

(b) conversão de pelo menos um grupo hidroxilo do polissacárido em um grupo bloqueante, de acordo com qualquer uma das Reivindicações N°.21 a N°.27; e

(c) dimensionamento do polissacárido resultante.

33. Um processo para a preparação do sacárido capsular modificado de acordo com as Reivindicações N°.1 a N°.19, consistindo num processo de síntese total **caracterizado por** compreender a formação de ligações glicosídicas entre duas ou mais unidades de monossacárido.

34. Um sacárido capsular modificado, **caracterizado por** poder ser obtido através do processo de acordo com qualquer uma das Reivindicações N°.20 a N°.33.

35. Um sacárido capsular modificado, **caracterizado por** ser obtido através do processo de acordo com qualquer uma das Reivindicações N°.20 a N°.33.

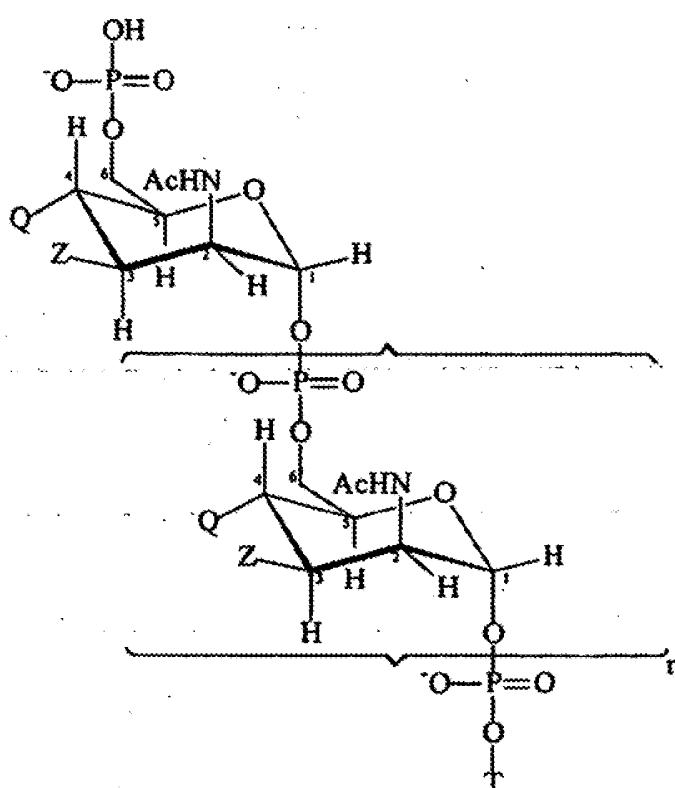
36. Um conjugado de sacárido-proteína de um sacárido modificado, de acordo com qualquer uma das Reivindicações N°.1 a N°.19, N°.34 ou N°.35.

37. O conjugado de acordo com a Reivindicação N°.36, **caracterizado por** a proteína ser uma toxina ou toxóide bacteriano.

38. O conjugado de acordo com a Reivindicação N°.37, **caracterizado por** a toxina ou toxóide bacteriano ser a toxina ou toxóide da difteria.

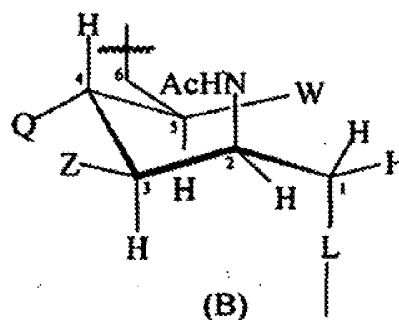
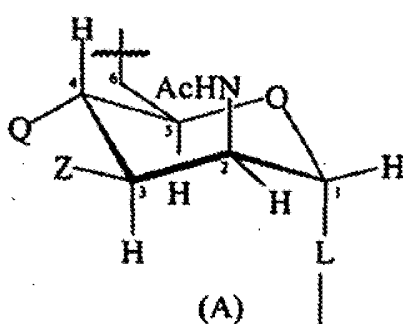
39. O conjugado de acordo com a Reivindicação N°.37, **caracterizado por** a toxina ou toxóide bacteriano ser o CRM₁₉₇.

40. Uma molécula compreendendo uma porção molecular de sacárido com a fórmula:



caracterizada por

T ter a fórmula (A) ou (B):



n ser um número inteiro de 1 a 100;

cada grupo Z ser seleccionado de modo independente a partir de OH ou um grupo bloqueante tal como definido nas Reivindicações N°.5 a N°.9; e

cada grupo Q ser seleccionado de modo independente a partir de OH ou um grupo bloqueante tal como definido nas Reivindicações N°.5 a N°.9;

W ser seleccionado a partir de OH ou um grupo bloqueante tal como definido nas Reivindicações N°.5 a N°.9;

L ser O, NH, NE, S ou Se, sendo E um grupo protector de azoto; e caracterizado por mais do que cerca de 7% dos grupos Q corresponder a grupos bloqueantes.

41. Uma composição farmacêutica **caracterizada por** compreender (a) um sacárido modificado de acordo com qualquer uma das Reivindicações N°.1 a N°.19, N°.34 ou N°.35 e/ou um conjugado de sacárido-proteína de acordo com qualquer uma das Reivindicações N°.36 a N°.39 e/ou uma molécula de acordo com a Reivindicação N°.40, e (b) um transportador farmaceuticamente aceitável.

42. A composição de acordo com a Reivindicação N°.41, **caracterizada por** compreender um antigénio sacarídico proveniente de um ou mais dos serogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis*, correspondendo opcionalmente o sacárido a um oligossacárido e estando o mesmo opcionalmente conjugado com uma proteína transportadora.

43. A composição de acordo com a Reivindicação N°.41 ou com a Reivindicação N°.42, **caracterizada por** compreender um adjuvante de vacina.

44. A composição de acordo com a Reivindicação N°.43, **caracterizada por** o adjuvante ser um fosfato de alumínio.

45. A composição de acordo com qualquer uma das Reivindicações N°.41 a N°.44, **caracterizada por**

correspondender a uma vacina contra uma doença causada por *Neisseria meningitidis*.

46. O sacárido modificado de acordo com qualquer uma das Reivindicações N°.1 a N°.18, **caracterizado por** ser usado como medicamento.

47. O conjugado de acordo com qualquer uma das Reivindicações N°.36 a N°.39, **caracterizado por** ser usado como medicamento.

48. A molécula de acordo com a Reivindicação N°.40, **caracterizada por** ser usada como medicamento.

49. O uso do polissacárido modificado de acordo com qualquer uma das Reivindicações N°.1 a N°.19, N°.34 ou N°.35, ou o conjugado de acordo com qualquer uma das Reivindicações N°.36 a N°.39, ou a molécula de acordo com a Reivindicação N°.40, **caracterizado por** fabricar um medicamento para a prevenção ou tratamento de uma doença causada por uma ou mais bactérias capsuladas.

50. O uso de acordo com a Reivindicação N°.49, **caracterizado por** a doença ser a meningite bacteriana.

51. O sacárido capsular modificado de acordo com a Reivindicação N°.6, **caracterizado por** X ser C(O).

52. O sacárido capsular modificado de acordo com a Reivindicação N°.6, **caracterizado por** Y ser alquilo C₁₋₁₂.

Lisboa, 26 de Março de 2009

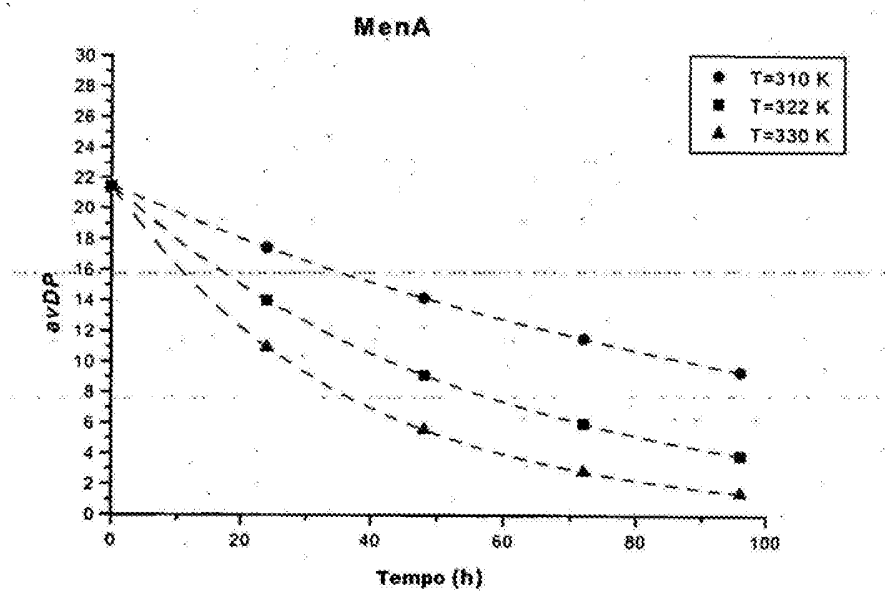
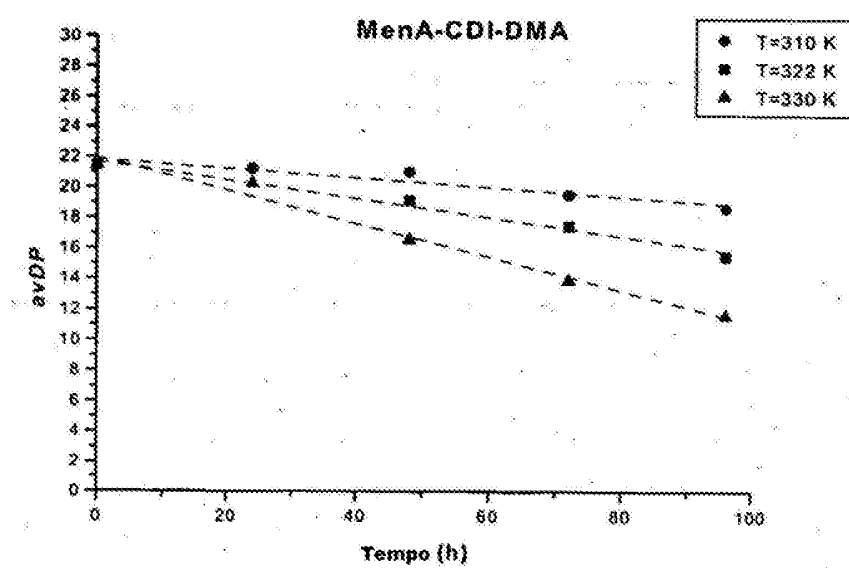
Figura 1*Figura 2*

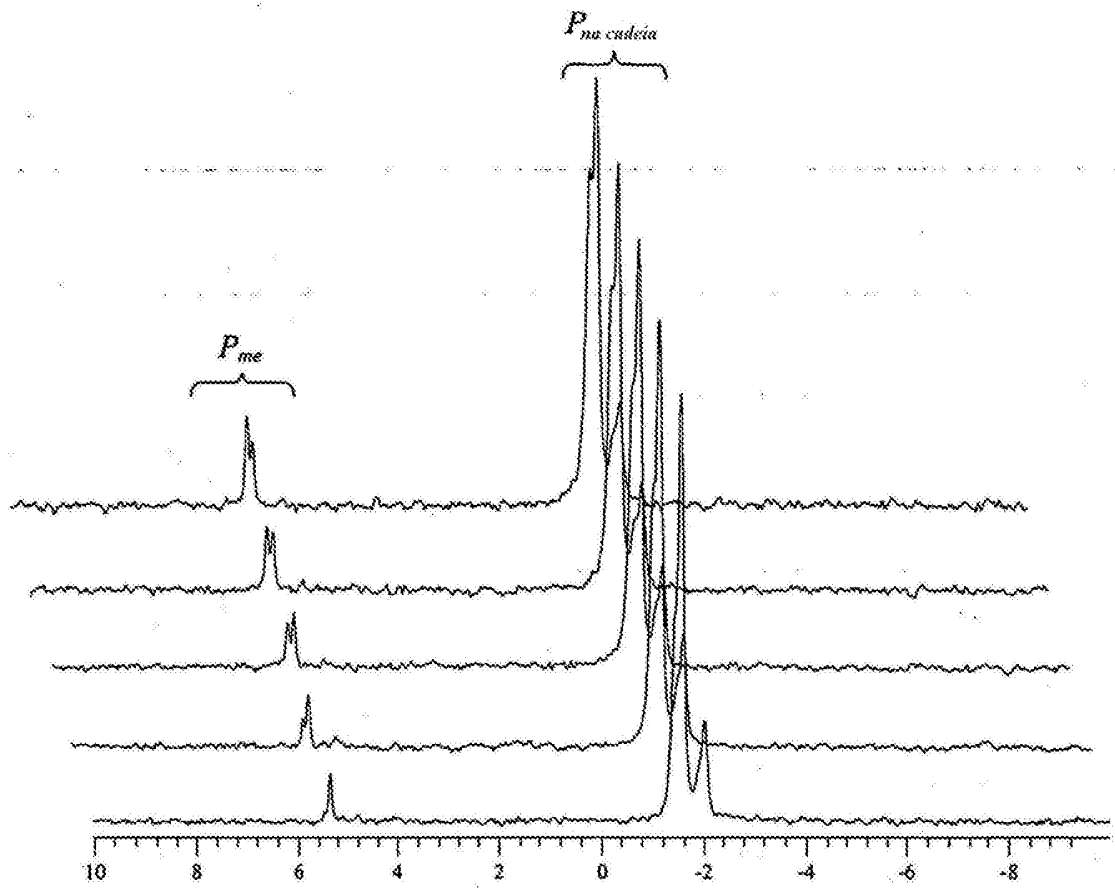
Figura 3

Figura 4

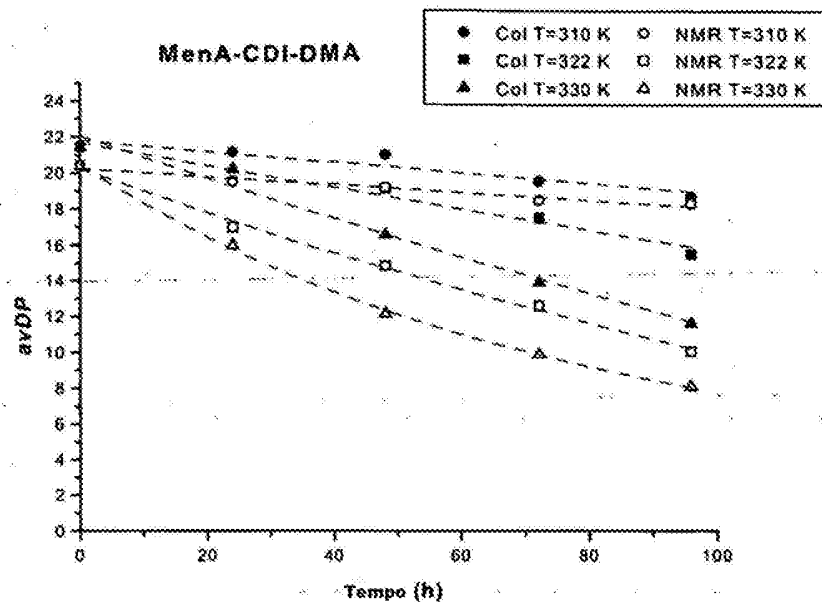


Figura 5

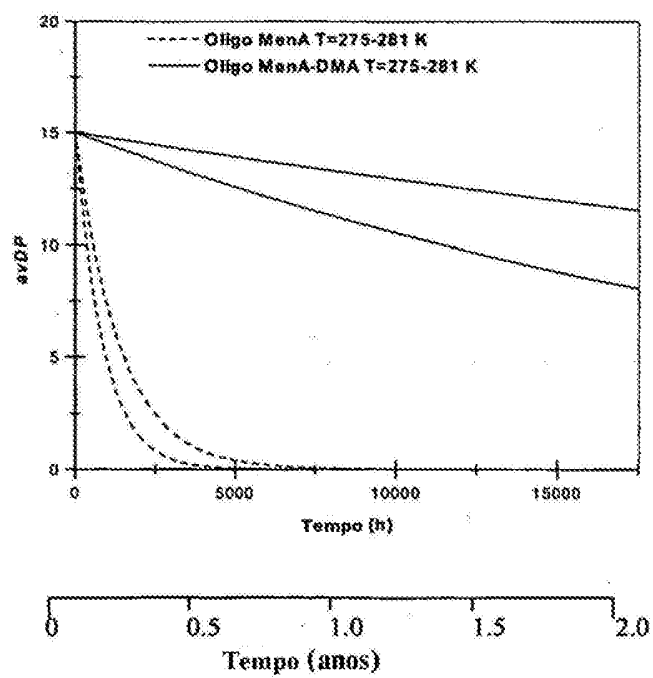


Figura 6

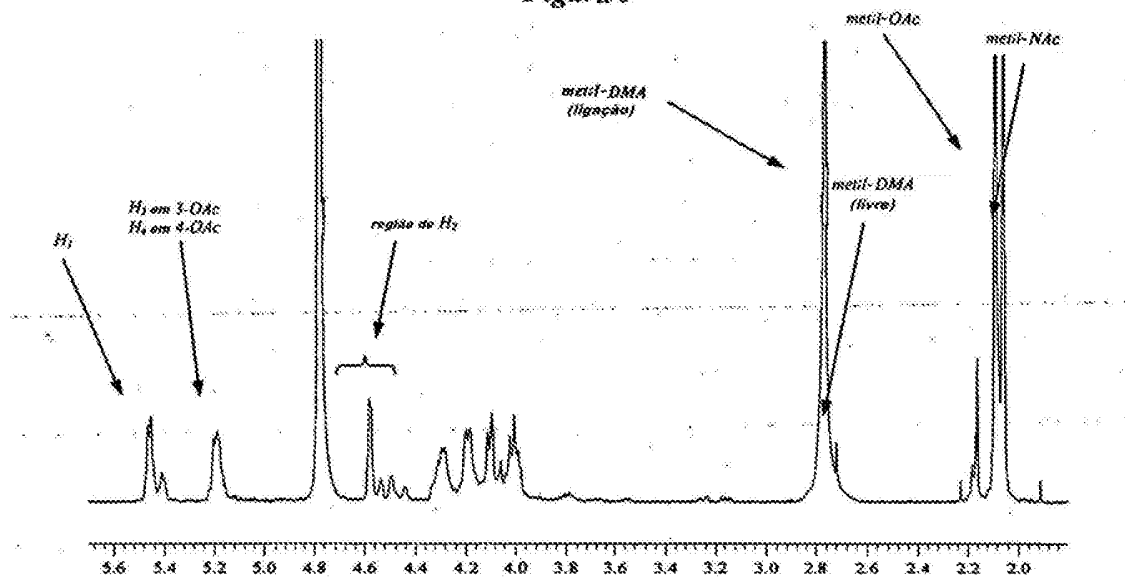


Figura 7

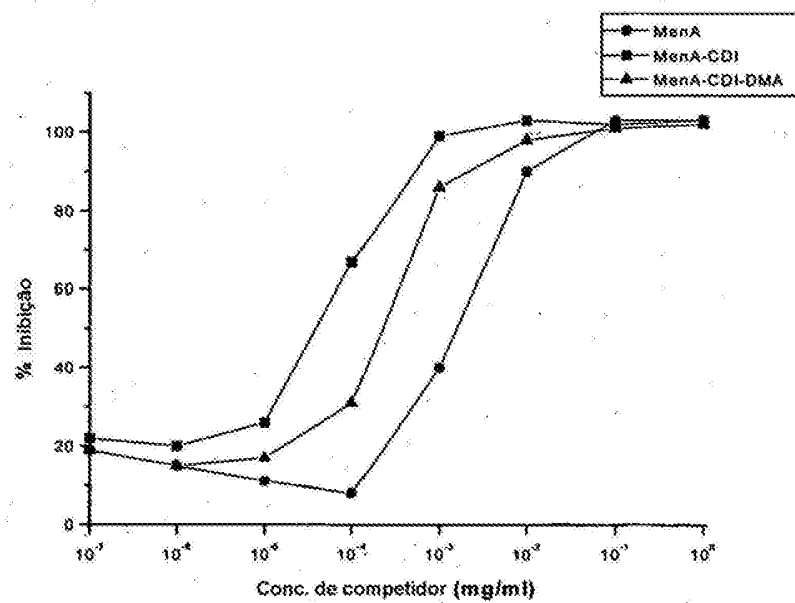


Figura 8

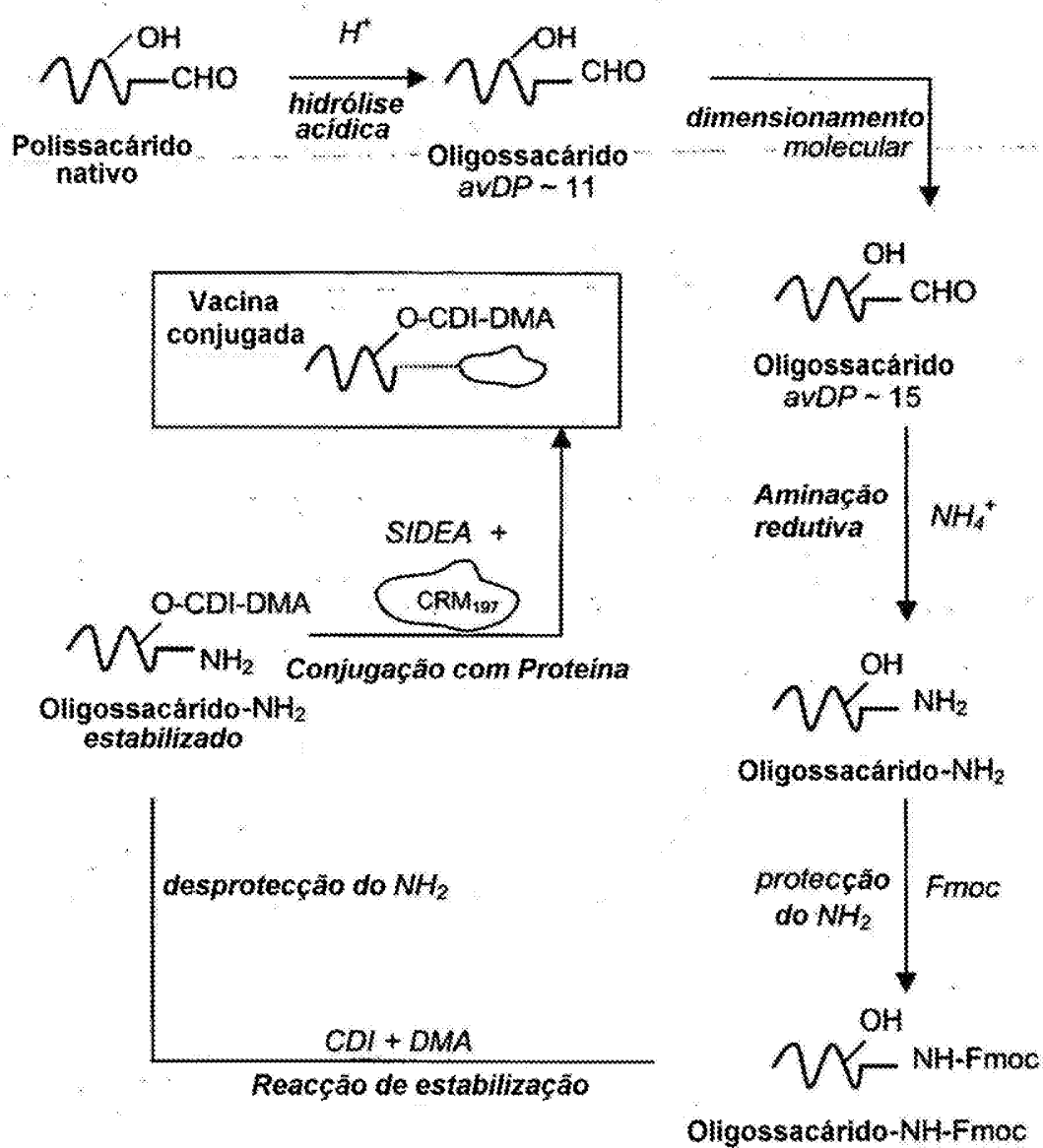


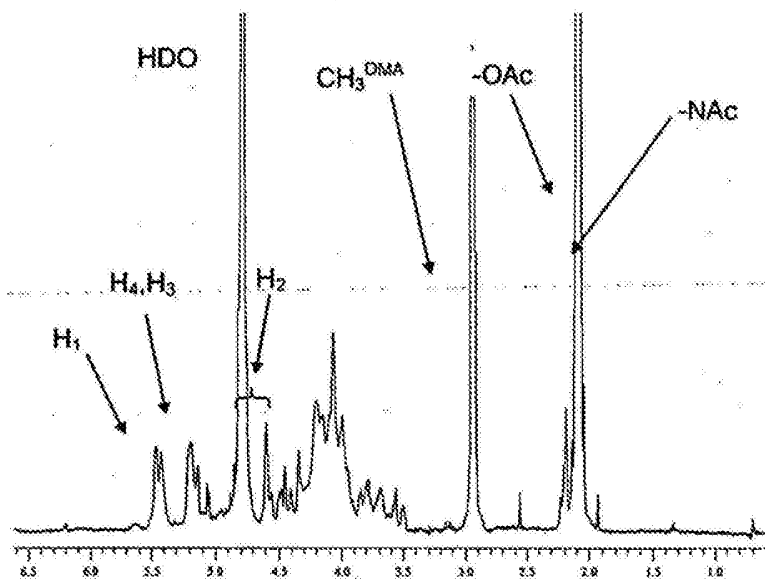
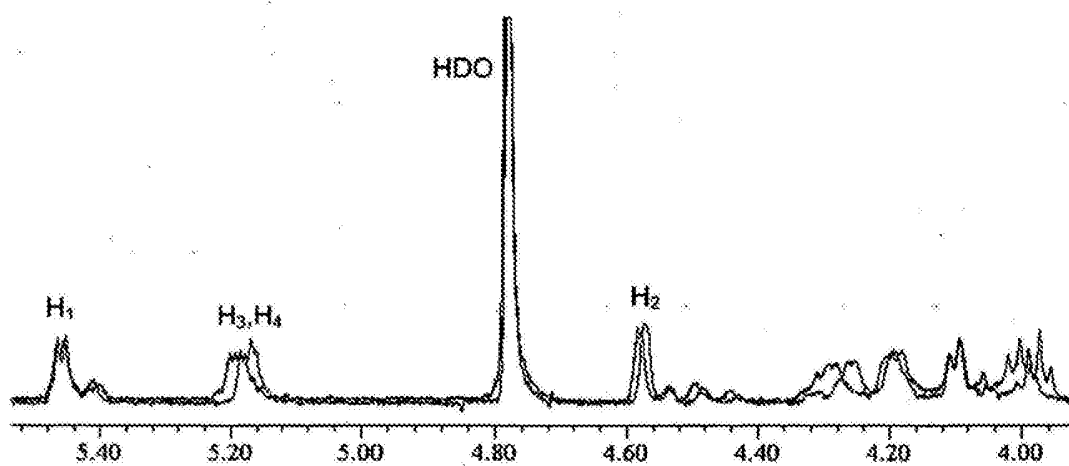
Figura 9*Figura 11*

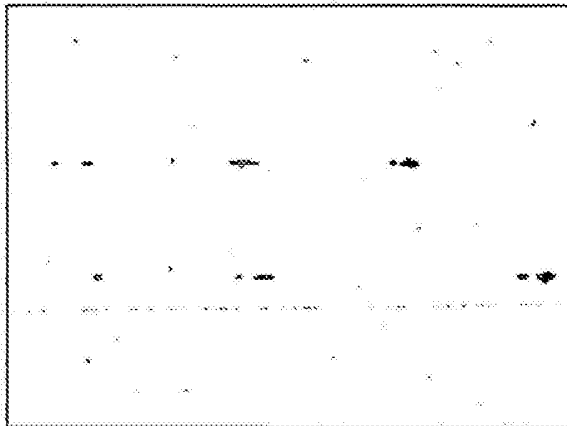
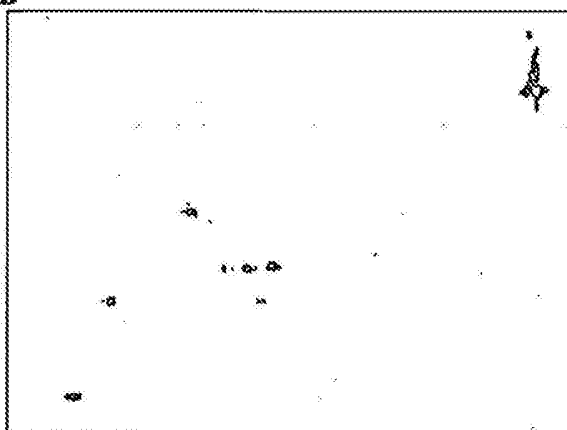
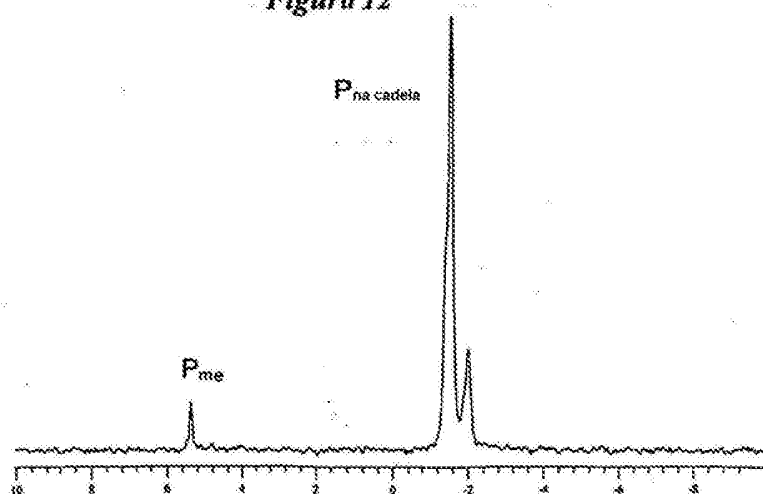
Figura 10A*Figura 10B**Figura 12*

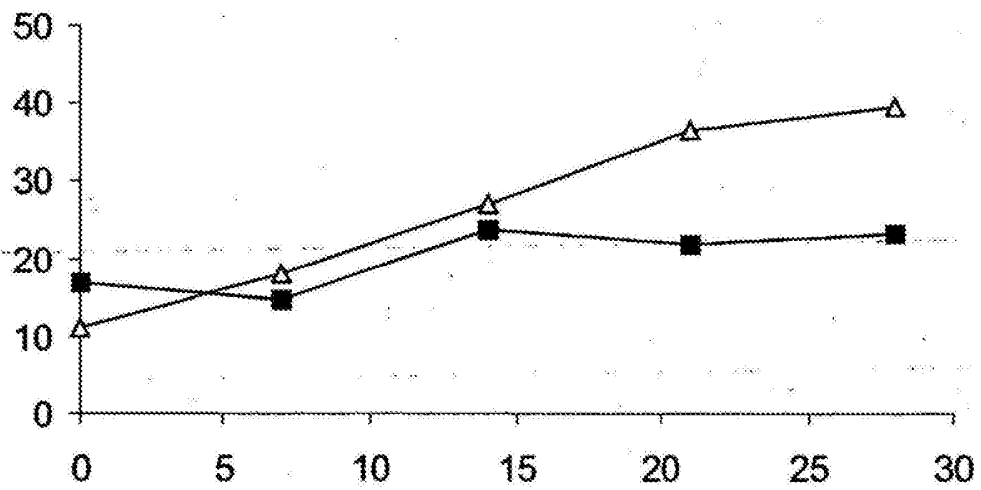
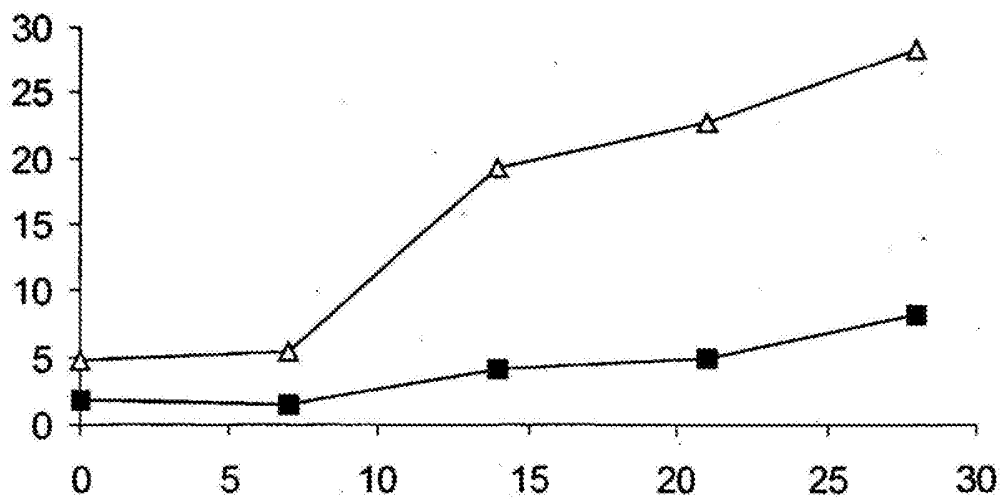
Figura 13*Figura 14*

Figura 15

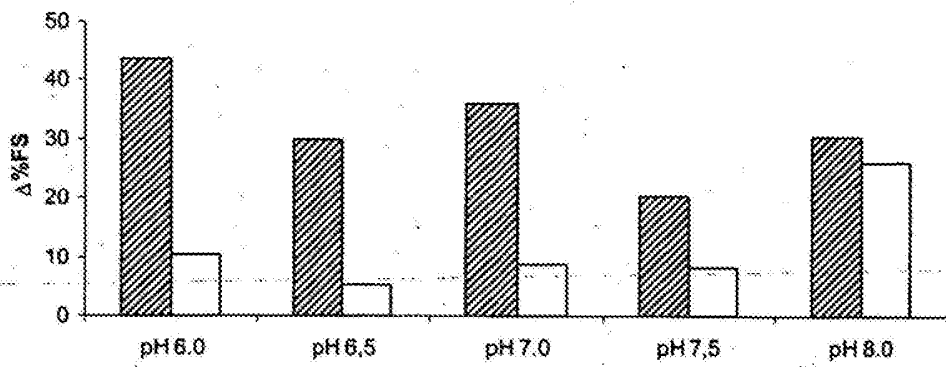


Figura 16

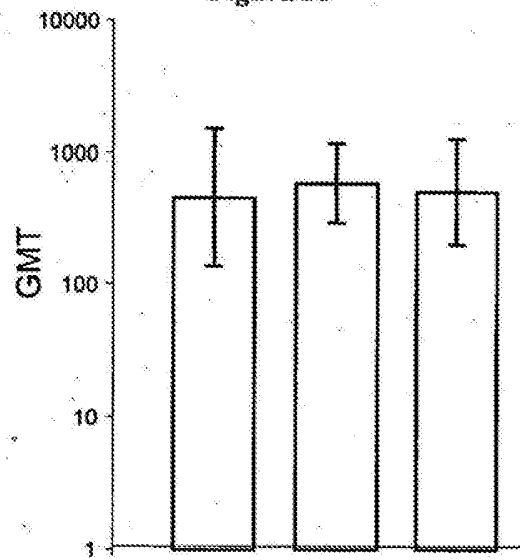
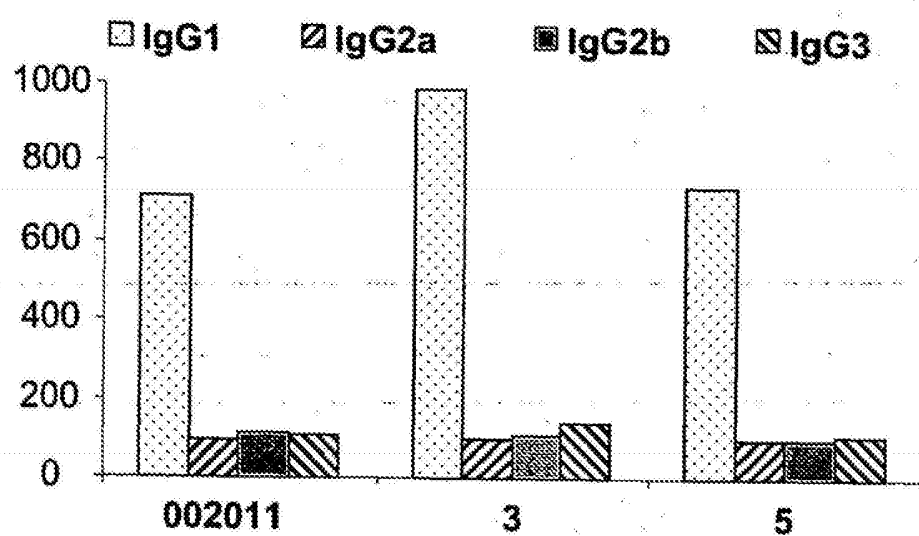
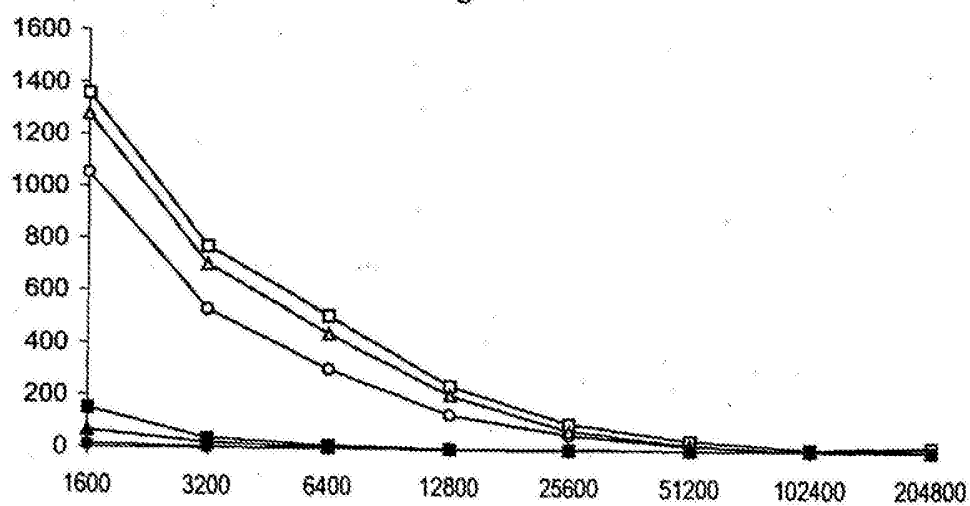
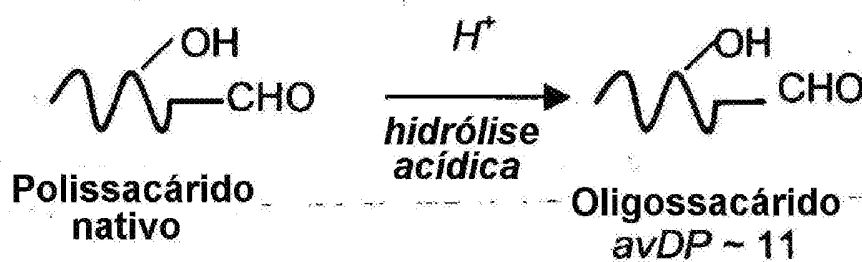
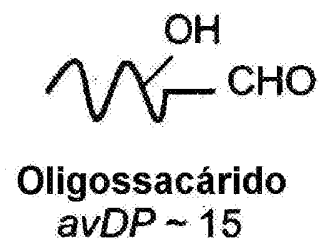


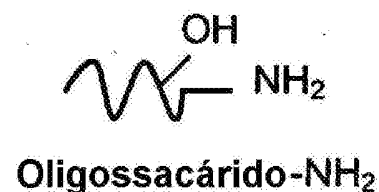
Figura 17*Figura 18*



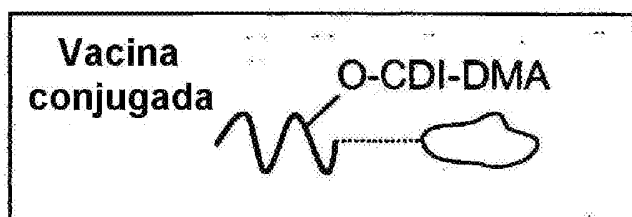
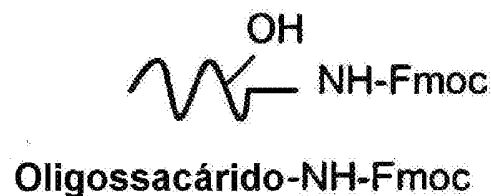
dimensionamento molecular



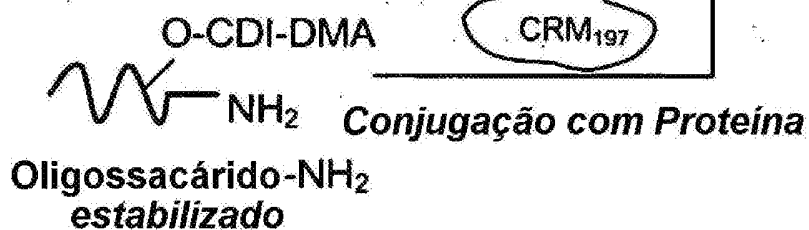
Aminação reductiva NH_4^+



protecção do NH₂ Fmoc



SIDEA +



desprotecção do NH₂

CDI + DMA

Reacção de estabilização