



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

(21) PI0806318-4 A2



(22) Data de Depósito: 11/01/2008
(43) Data da Publicação: 06/09/2011
(RPI 2122)

(51) Int.CI.:
C08B 37/00
A61K 39/02
A61K 47/48

(54) Título: SACARÍDEOS MODIFICADOS

(30) Prioridade Unionista: 11/01/2007 GB 0700562.2

(73) Titular(es): Novartis AG

(72) Inventor(es): Angela Bardotti, Francesco Berti, Paolo Costantino

(74) Procurador(es): Orlando de Souza

(86) Pedido Internacional: PCT IB2008001116 de 11/01/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/084411de
17/07/2008

(57) Resumo: SACARÍDEOS MODIFICADOS. Sacarídeos capsulares modificados compreendendo um grupo bloqueador em uma posição de grupo hidroxila em pelo menos uma das unidades de monossacarídeo do sacarídeo capsular nativo correspondente, em que o grupo bloqueador tem a fórmula (Ia) ou (Ib): -OX-Y (Ia) ou -O-R¹ (Ib) em que X é C(O), S(O) ou SO₂; Y é NR¹R² ou R³; R¹ é C₁₋₆ alquila substituída com 1, 2 ou 3 grupos independentemente selecionados de hidroxila, sulfidrila e amina; R² é H ou C₁₋₆ alquila; e R³ é C₁₋₆ alquila; processos para modificar um sacarídeo capsular com os grupos bloqueadores; conjugados de proteína sacarídea compreendendo o sacarídeo, capsular modificado; processos para fazer os conjugados de proteína sacarídea, composições farmacêuticas compreendendo os sacarídeos capsulares modificados e/ou conjugados de proteína sacarídea; e métodos e usos dos mesmos.

SACARÍDEOS MODIFICADOS

Todos os documentos mencionados aqui são incorporados por referência em sua totalidade.

CAMPO TÉCNICO

5 Esta invenção está no campo de química de polissacarídeo e relaciona-se aos sacarídeos modificados, processos para sua preparação, e derivados conjugados. Em particular, a invenção relaciona-se aos sacarídeos modificados tendo estabilidade melhorada em água.

10 TÉCNICA DE FUNDAMENTO

Os polissacarídeos são moléculas biológicas importantes e foram amplamente utilizados na indústria farmacêutica para a prevenção e tratamento de doenças. Por exemplo, os polissacarídeos capsulares foram usados por 15 muitos anos em vacinas contra bactérias capsuladas, tais como meningococo (*Neisseria meningitidis*), pneumococo (*Streptococcus pneumoniae*) e Hib (*Hemophilus influenzae* tipo B).

Para melhorar a imunogenicidade destes polissacarídeos, 20 particularmente em crianças, as vacinas conjugadas foram desenvolvidas. Estas compreendem um polissacarídeo capsular conjugado a uma proteína carreadora [por exemplo, referências 1, 2, 3]. A conjugação pode fazer抗ígenos T-independentes em抗ígenos T-dependentes.

25 Um problema com muitos tipos de polissacarídeo é a baixa estabilidade em água. A estabilidade de polissacarídeos em água pode depender da natureza das ligações O-glicosídicas unindo as unidades de sacarídeo. A baixa estabilidade em água é um resultado das ligações O-glicosídicas sendo prontamente hidrolisadas na presença de 30

ácidos ou glicosidases. O polissacarídeo capsular de meningococo de sorogrupo A é um exemplo de um polissacarídeo tendo baixa estabilidade em água.

A estabilidade de polissacarídeos é um problema particular na fabricação de vacinas conjugadas. A fim de preparar um conjugado de polissacarídeo-proteína, é necessário manipular grupos quimicamente funcionais no polissacarídeo de modo que o polissacarídeo possa ser ligado a uma proteína. A exposição de um polissacarídeo aos reagentes químicos em processos para fazer isto, e particularmente aos ácidos, pode resultar em clivagem indesejável de ligações glicosídicas e consequente fragmentação do polissacarídeo. Tal fragmentação é altamente indesejável, causando perda em rendimentos na síntese de conjugados de polissacarídeo-proteína.

Os polissacarídeos que são instáveis desta maneira geralmente requerem escolha cuidadosa de reagentes e condições para contornar os problemas descritos acima. Entretanto, isto limita os reagentes disponíveis para manipular o polissacarídeo, assim limitando a variedade de ligações que podem ser feitas entre o polissacarídeo e a proteína carreadora. Além disso, a instabilidade destes polissacarídeos significa que é difícil desenvolver procedimentos robustos, que podem ser usados para preparar vacinas em uma escala industrial.

A referência 4 divulga um sacarídeo capsular modificado compreendendo um grupo bloqueador em uma posição de grupo hidroxila em pelo menos uma das unidades de monossacarídeo do sacarídeo capsular nativo correspondente. O sacarídeo capsular modificado é dito ter melhorado a

estabilidade à hidrólise. É um objeto da invenção fornecer os sacarídeos capsulares modificados alternativos ou melhorados que tem estabilidade melhorada à hidrólise.

DIVULGAÇÃO DA INVENÇÃO

5 A invenção é baseada na descoberta que a modificação de grupos hidroxila em unidades de monossacarídeo de sacarídeos capsulares com grupos bloqueadores específicos oferece estabilidade melhorada. Os sacarídeos modificados obtidos pelo processo da invenção são mais estáveis à 10 hidrólise do que seus equivalentes nativos de sacarídeo.

A presente invenção fornece consequentemente um sacarídeo capsular modificado compreendendo um grupo bloqueador em uma posição de grupo hidroxila sobre pelo menos uma das unidades de monossacarídeo do sacarídeo 15 capsular nativo correspondente. O grupo bloqueador é definido abaixo. O sacarídeo capsular modificado da presente invenção é mais estável à hidrólise do que seus equivalentes de sacarídeo nativos. Preferivelmente, o sacarídeo capsular modificado da presente invenção retém a 20 reatividade cruzada imunológica com seus equivalentes de sacarídeo nativos.

A presente invenção também fornece processos para modificar um sacarídeo capsular com o grupo bloqueador; conjugados de sacarídeo-proteína compreendendo o sacarídeo 25 capsular modificado; processos para fazer os conjugados de sacarídeo-proteína, composições farmacêuticas compreendendo os sacarídeos capsulares modificados e/ou conjugados de sacarídeo-proteína; e métodos e usos dos mesmos.

Sacarídeos modificados da invenção

30 A invenção fornece um sacarídeo capsular modificado

compreendendo um grupo bloqueador em uma posição de grupo hidroxila em pelo menos uma das unidades de monossacarídeo do sacarídeo capsular nativo correspondente. O grupo bloqueador é de fórmula (Ia) ou (Ib):

5 - $O-X-Y$ (Ia) - $O-R^1$ (Ib)
 em que
 X é C(O), S(O) ou SO₂;
 Y é NR¹R² ou R³;
 R¹ é alquila C₁₋₆ substituído com 1, 2 ou 3 grupos
 10 independentemente selecionados de hidroxila, sulfidril e
 amina;
 R² é H ou alquila C₁₋₆; e
 R³ é alquila C₁₋₆.

Preferivelmente, o grupo bloqueador é de fórmula (Ia).

15 Nesta modalidade, prefere-se que X seja C(O). Tal grupos
 bloqueadores de éster e carbamato têm um efeito
 estabilizante na ligação glicosídica e podem ser preparados
 sob condições suaves. Os exemplos de processos para
 manipular um sacarídeo para fornecer grupos bloqueadores de
 20 éster e carbamato são descritos abaixo. Entretanto, a
 invenção não é limitada aos sacarídeos modificados
 preparados pelos processos exemplificados aqui, e outros
 processos para preparar sacarídeos modificados da invenção
 serão prontamente aparentes à pessoa hábil.

25 Preferivelmente, R² é H.

A alquila C₁₋₆ de R¹ é substituído com 1, 2 ou 3 grupos
 independentemente selecionados de hidroxila, sulfidril e
 amina. Quando alquila C₁₋₆ é substituída com 2 ou 3 grupos,
 as substituições podem ser com o mesmo grupo ou grupos
 30 diferentes, embora tipicamente serão com o mesmo grupo.

Preferivelmente, a alquila C_{1-6} de R^1 é substituída com 1, 2 ou 3 grupos hidroxila.

R^1 pode ser substituído em qualquer posição ao longo da cadeia de alquila C_{1-6} . Preferivelmente, pelo menos uma substituição está presente na extremidade distal da cadeia de alquila C_{1-6} . Onde a cadeia de alquila C_{1-6} é um grupo alquila de cadeia reta, isto significa que a alquila C_{1-6} é substituída em C_x , onde x é o número total de átomos de carbono na cadeia alquila C_{1-6} . Similarmente, onde a cadeia alquila C_{1-6} é um grupo alquila de cadeia ramificado, isto significa que a alquila C_{1-6} é substituída na extremidade distal de uma das ramificações, tipicamente a ramificação mais longa.

Em modalidades preferidas, R^1 é substituído com um único grupo, esta substituição sendo na extremidade distal da cadeia alquila C_{1-6} , como discutido acima. Tais grupos são particularmente eficazes em fornecer estabilidade melhorada à hidrólise. Preferivelmente, o único grupo é um grupo hidroxila. Os grupos preferidos incluem portanto, hidróximetila, 2-hidróxietila, 3-hidróxipropil, 4-hidróxibutila, 5-hidróxipentila e 6-hidróxihexila. O grupo particularmente preferido é 2-hidróxietila.

Em outras modalidades preferidas, R^1 é substituído com dois grupos vicinais, isto é dois grupos em posições adjacentes ao longo da cadeia alquila C_{1-6} . Tais grupos são particularmente eficazes em fornecer estabilidade melhorada à hidrólise. Preferivelmente, os dois grupos vicinais estão na extremidade distal da cadeia alquila C_{1-6} . Onde a cadeia alquila C_{1-6} é um grupo alquila de cadeia reta, isto significa que os dois grupos vicinais estão em C_x e C_{x-1}

onde x é o número total de átomos de carbono na cadeia alquila C_{1-6} . Similarmente, onde a cadeia alquila C_{1-6} é um grupo alquila de cadeia ramificada, isto significa que os dois grupos vicinais estão na extremidade distal de uma das 5 ramificações, tipicamente a ramificação mais longa. Preferivelmente, os dois grupos vicinais são grupos hidroxila. Tais grupos fornecem uma parte para conjugação a uma molécula carreadora, como discutido abaixo. Os grupos preferidos incluem portanto, 1,2-dihidróxietila; 1,2- 10 dihidróxipropila e 2,3-dihidróxipropila; 1,2-dihidróxibutila, 2,3-dihidróxibutila e 3,4-dihidróxibutila; 1,2-dihidróxipentila, 2,3-dihidróxipentila, 3,4-dihidróxipentila e 1,2-dihidróxihexila, 2,3-dihidróxihexila, 3,4-dihidróxihexila, 15 4,5-dihidróxihexil e 5,6-dihidróxihexila. Como notado acima, prefere-se que os dois grupos vicinais estejam na extremidade distal da cadeia alquila C_{1-6} . Particularmente os grupos preferidos incluem portanto, 1,2-dihidróxietila, 2,3-dihidróxipropila; 3,4-dihidróxibutila, 4,5-dihidróxipentila e 5,6-dihidróxihexila. Um grupo 20 particularmente preferido é 4,5-dihidróxipentila.

Em algumas modalidades, o sacarídeo capsular modificado compreende pelo menos dois tipos de grupo bloqueador (como descrito acima). Por exemplo, prefere-se para o sacarídeo compreender a) pelo menos um grupo bloqueador em que R^1 é substituído com um único grupo, esta substituição sendo na extremidade distal da cadeia alquila C_{1-6} (como descrito acima); e b) pelo menos um grupo bloqueador onde R^1 é substituído com dois grupos vicinais 25 (como descrito acima). Tais grupos bloqueadores misturados 30 (como descrito acima).

são particularmente eficazes em fornecer a estabilidade melhorada à hidrólise. Além disso, incluindo pelo menos um grupo bloqueador em que R^1 é substituído com dois grupos hidroxila vicinais, é fornecido uma parte para conjugação a 5 uma molécula carreadora, como discutido abaixo.

Preferivelmente, R^3 é alquil C_1-C_3 . Mais preferivelmente R^3 é C_1 alquila (CH_3), embora C_2 alquil e C_3 alquila são também preferidos.

Os grupos bloqueadores de fórmula $-O-X-Y$ ou $-O-R^1$ 10 podem ser preparados dos grupos hidroxila (por exemplo, como encontrado na molécula nativa) por procedimentos de derivatização padrões, tais como reação do grupo hidroxila com um haleto de acila, haleto de alquila, haleto de sulfonila etc. Consequentemente, o átomo de oxigênio em $-O-$ 15 $X-Y$ é preferivelmente o átomo de oxigênio do grupo hidroxila, enquanto o grupo $-X-Y$ em $-O-X-Y$ preferivelmente substitui o átomo de hidrogênio do grupo hidroxila. Alternativamente, os grupos bloqueadores podem ser 20 acessíveis através de uma reação de substituição, tal como uma substituição tipo Mitsunobu. Este e outros métodos de preparar grupos bloqueadores dos grupos hidroxila são bem conhecidos.

Tipicamente, os sacarídeos modificados da presente invenção são oligossacarídeos. Os oligossacarídeos podem 25 ser obtidos dos polissacarídeos por quaisquer dos métodos de despolimerização e dimensionamento descritos aqui.

Os sacarídeos capsulares modificados desta invenção são obteníveis dos sacarídeos capsulares nativos. Entretanto, a presente invenção não é limitada aos 30 sacarídeos modificados obtidos dos sacarídeos capsulares

nativos. Os sacarídeos capsulares modificados da presente invenção podem ser obtidos por outros métodos, tais como síntese total ou parcial (veja, por exemplo, referência 5).

Nos sacarídeos capsulares modificados da invenção, o número de unidades de monossacarídeo tendo grupos bloqueadores pode variar. Preferivelmente, todo ou substancialmente todas as unidades de monossacarídeo do sacarídeo capsular modificado podem ter grupos bloqueadores. Alternativamente, pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das unidades de monossacarídeo do sacarídeo capsular modificado pode ter grupos bloqueadores. 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40 unidades de monossacarídeo do sacarídeo capsular modificado podem ter grupos bloqueadores.

Onde o sacarídeo capsular modificado compreende pelo menos dois tipos de grupo bloqueador, o número de unidades de monossacarídeo tendo cada tipo de grupo bloqueador pode também variar. Por exemplo, a proporção do número total de grupos bloqueadores feitos por um tipo de grupo bloqueador relativo ao(s) outro(s) tipo(s) de grupo bloqueador pode variar. Em particular, quando houver dois tipos de grupo bloqueador presentes, a razão de um tipo de grupo bloqueador ao outro tipo de grupo bloqueador pode ser selecionada de 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2 e 1:1. Em particular, na modalidade descrita acima onde o sacarídeo compreende a) pelo menos um grupo bloqueador em que R^1 é substituído com um único grupo, esta substituição

sendo na extremidade distal da cadeia alquila C₁₋₆; e b) pelo menos um grupo bloqueador em que R¹ é substituído com dois grupos vicinais, prefere-se que a razão do tipo anterior de grupo bloqueador ao último tipo de grupo 5 bloqueador seja selecionada de 99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5, 94:6, 93:7, 92:8, 91:9, 90:10, 89:11, 88:12, 87:13, 86:14, 85:15, 84:16, 83:17, 82:18, 81:19 e 80:20. Destas razões, 95:5, 94:6, 93:7, 92:8, 91:9, 90:10, 89:11, 88:12, 87:13, 86:14 e 85:15 são particularmente preferidas. Destas, 90:10 10 é preferida.

Do mesmo modo, o número de grupos bloqueadores em uma unidade de monossacarídeo pode variar. Por exemplo, o número de grupos bloqueadores em uma unidade de monossacarídeo pode ser 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, preferivelmente 15 1-4, mais preferivelmente 1 ou 2, mais preferivelmente 1.

Em uma modalidade, pelo menos uma unidade de monossacarídeo tendo um grupo bloqueador inclui uma unidade de monossacarídeo não terminal. O termo "unidade de monossacarídeo não terminal" significa uma unidade de 20 monossacarídeo que não é uma das unidades de monossacarídeo terminais na cadeia de oligossacarídeo/polissacarídeo.

Esta invenção engloba sacarídeos capsulares modificados em que todas as posições de grupo hidroxila das unidades de monossacarídeo terminal e não terminal têm um 25 grupo bloqueador. Entretanto, em algumas modalidades preferidas há pelo menos um grupo hidroxila livre ou grupo amino no sacarídeo capsular modificado da presente invenção. Um grupo hidroxila ou grupo amino livre é vantajoso porque fornece uma parte para reações adicionais do sacarídeo 30 capsular modificado, por exemplo, para conjugação a uma

molécula carreadora, como discutido abaixo. Quando o sacarídeo modificado contém um grupo hidroxila livre, pode ser um grupo hidroxila anomérico, particularmente um grupo hidroxila anomérico terminal. Quando o sacarídeo modificado 5 contém um grupo amino, pode ser derivado de um grupo hidroxila anomérico. Os grupos amino são prontamente acessíveis dos grupos hidroxila anoméricos por aminação redutiva (usando, por exemplo, $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{Cl}$). Similarmente, em outras modalidades preferidas, há pelo menos uma unidade 10 de monossacarídeo do sacarídeo capsular modificado onde dois grupos hidroxila vicinais do sacarídeo capsular nativo correspondente não compreendem grupos bloqueadores. Preferivelmente, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% ou 20% das 15 unidades de monossacarídeo têm dois grupos hidroxila vicinais desta maneira. Por exemplo, 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40 unidades de monossacarídeo têm dois grupos 20 hidroxila vicinais desta maneira. Preferivelmente, entre 5- 15%, mais preferivelmente 10%, das unidades de monossacarídeo têm dois grupos hidroxila vicinais desta maneira. Os dois grupos hidroxila vicinais na(s) unidade(s) 25 de monossacarídeo são vantajosos, pois fornecem uma parte para conjugação a uma molécula carreadora, como discutido abaixo.

Alternativamente, em algumas modalidades preferidas, pelo menos um ou pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% ou 20% 30 das unidades de monossacarídeo do sacarídeo capsular

modificado têm grupos bloqueadores onde R^1 é substituído com dois grupos hidroxila vicinais, como descrito acima. Por exemplo, 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, 5 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40 unidades de monossacarídeo do sacarídeo capsular modificado podem ter tais grupos bloqueadores. Preferivelmente, entre 5-15%, mais preferivelmente 10%, das unidades de monossacarídeo do sacarídeo capsular modificado têm grupos bloqueadores em 10 que R^1 é substituído com dois grupos hidroxila vicinais. Mais uma vez, os dois grupos hidroxila vicinais na(s) unidade(s) de monossacarídeo são vantajosos, pois fornecem uma parte para conjugação a uma molécula carreadora, como discutido abaixo.

15 Foi sugerido na referência 4 que os grupos bloqueadores eficazes são grupos retiradores de elétron. Sem desejar ser limitado pela teoria, acredita-se que as ligações glicosídicas são instáveis à hidrólise devido ao auxílio de um ataque nucleofílico intramolecular de um 20 grupo hidroxila de sacarídeo na ligação glicosídica (isto é, pela formação de um intermediário cílico). Quanto maior a nucleofilicidade do grupo hidroxila, maior a tendência para ataque nucleofílico intramolecular. Um grupo bloqueador retirador de elétron tem o efeito de deslocalizar o par 25 solitário de oxigênio, desse modo diminuindo a nucleofilicidade do oxigênio e diminuindo a tendência para ataque nucleofílico intramolecular. Surpreendentemente, descobriu-se que os grupos compreendendo alquila C_{1-6} substituída com 1, 2 ou 3 grupos independentemente 30 selecionados de hidroxila, sulfidril e amina podem ser

grupos bloqueadores eficazes, apesar da presença da hidroxila, sulfidrila ou amina nucleofílica no grupo bloqueador. Além disso, estes grupos substituídos de hidroxila, sulfidrila ou amina são vantajosos, pois 5 permitem uma conjugação mais eficaz do sacarídeo capsular modificado a uma molécula carreadora. Sem desejar ser limitado pela teoria, acredita-se que este efeito surge da hidrofilicidade relativa de grupos compreendendo alquila C₁₋₆ substituída com 1, 2 ou 3 grupos independentemente 10 selecionados de hidroxila, sulfidrila e amina. Além disso, onde o grupo bloqueador compreende alquila C₁₋₆ substituída com dois grupos hidroxila vicinais, o próprio grupo bloqueador fornece uma parte para conjugação a uma molécula carreadora.

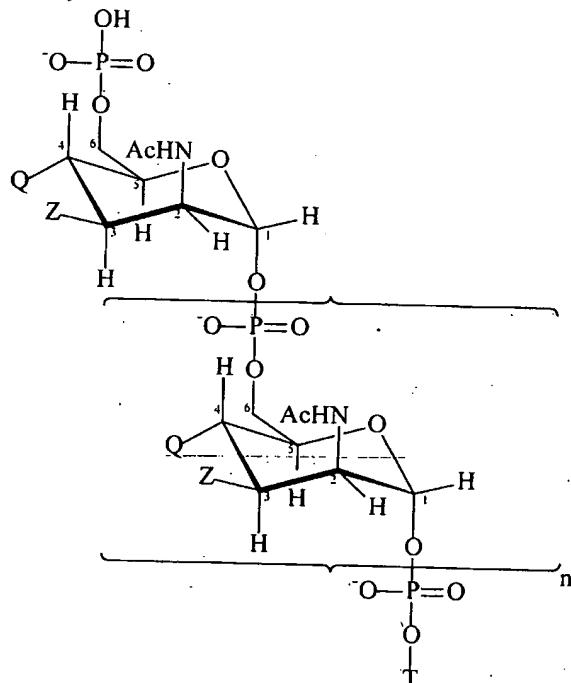
15 Em todas as modalidades descritas acima, o sacarídeo capsular modificado é preferivelmente um sacarídeo capsular modificado tendo ligações fosfodiéster. Mais preferivelmente, o sacarídeo capsular modificado é um sacarídeo de sorogrupo A de *Neisseria meningitidis* 20 modificado. Os sacarídeos de sorogrupo A de *Neisseria meningitidis* são particularmente instáveis à hidrólise.

Quando o sacarídeo capsular modificado é um sacarídeo de sorogrupo A de *Neisseria meningitidis* modificado, o grupo bloqueador está preferivelmente nas posições 4 e/ou 3, 25 mais preferivelmente na posição 4, do sacarídeo de sorogrupo A de *Neisseria meningitidis* correspondente. Os grupos bloqueadores nas posições 4 e/ou 3 do sacarídeo de sorogrupo A de *Neisseria meningitidis* foram mostrados por serem particularmente mais eficazes para melhorar a 30 estabilidade para hidrólise.

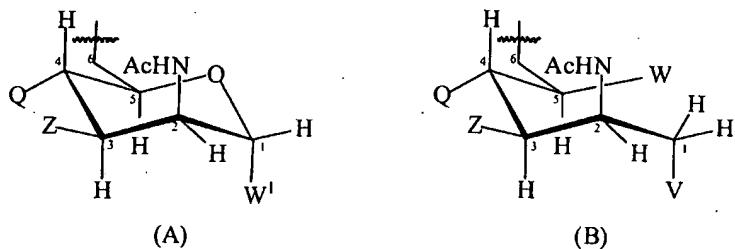
Em modalidades com grupos bloqueadores de éster (isto é, quando o grupo bloqueador é de fórmula (Ia), X é C(O) e Y é R³), os inventores descobriram que a estabilidade de um sacarídeo de sorogrupo A de *Neisseria meningitidis* modificado é influenciado pela proporção de posições 4 e/ou 3 tendo grupos bloqueadores. Por exemplo, a proporção de posições 4 tendo grupos bloqueadores pode ser aproximadamente 0%, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou aproximadamente 100%, com pelo menos 30% e aproximadamente 100% sendo preferidos. Similarmente, a proporção de posições 3 tendo grupos bloqueadores pode ser aproximadamente 0%, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou aproximadamente 100%, com pelo menos 95% e aproximadamente 100% sendo preferidas.

Tipicamente, a proporção de posições 4 e 3 tendo grupos bloqueadores é aproximadamente a mesma em cada posição. Em outras palavras, a razão de posições 4 tendo grupos bloqueadores para posições 3 tendo grupos bloqueadores é aproximadamente 1:1. Entretanto, em algumas modalidades, a proporção de posições 4 tendo grupos bloqueadores pode variar relativa à proporção de posições 3 tendo grupos bloqueadores. Por exemplo, a razão de posições 4 tendo grupos bloqueadores para posições 3 tendo grupos bloqueadores pode ser 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3 ou 1:2. Similarmente, a razão de posições 3 tendo grupos bloqueadores para posições 4 tendo grupos bloqueadores pode ser 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3 ou 1:2.

Esta invenção também fornece um sacarídeo de fórmula:



onde T é de fórmula (A) ou (B) :



n é um inteiro de 1 a 100;

cada grupo Z é independentemente selecionado de -OH,

20 OAc ou um grupo bloqueador como definido acima; e

cada grupo Q é independentemente selecionado de -OH,

OAc ou um grupo bloqueador como definido acima;

V é selecionado de -NH₂, -NHE, -NE¹E², W², ou -O-D,

onde: E, E¹ e E² são grupos protetores de nitrogênio, que

25 podem ser os mesmos ou diferentes, e D é um grupo protetor de oxigênio;

W é selecionado de -OH ou um grupo bloqueador como definido acima;

W¹ é selecionado de -OH ou um grupo bloqueador como

30 definido acima;

W^2 é selecionado de -OH ou um grupo bloqueador como definido acima.

e em que pelo menos um (por exemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 5 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40) dos grupos Z e/ou pelo menos um (por exemplo 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, 30, 10 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40) dos grupos Q são grupos bloqueadores como definidos acima.

Preferivelmente, n é um inteiro de 15 a 25.

Cada um dos grupos Z $n+2$ pode ser o mesmo ou diferente um do outro. Do mesmo modo, cada um dos grupos Q $n+2$ pode ser o mesmo ou diferente um do outro.

15 V é preferivelmente -NH₂ ou -NHE.

Os grupos protetores de nitrogênio apropriados são grupos silila (tais como TMS, TES, TBS, TIPS), derivados de acila (tais como, trifluoroacetamidas, metóxicarbonila, etóxicarbonila, t-butóxicarbonila (Boc), benzilóxicarbonila 20 (Z ou Cbz), 9-fluorenilmotóxicarbonila (Fmoc), 2-(trimetilsilil)etóxi carbonila, alliloxicarbonila (Alloc), 2,2,2-tricloroetóxicarbonila (Troc)), derivados de sulfonila (tais como β -trimetilsililetanosulfonila (SES)), derivados de sulfenila, alquil C₁₋₁₂, benzil, benzhidrila, 25 tritila, allila, 9-fenilfluorenila, etc. Um grupo protetor preferido de nitrogênio é Fmoc.

Os grupos protetores de nitrogênio divalentes, que podem ser usados como E¹E², incluem derivados de imida cílicos (tais como N-ftalimidas, N-ditiasuccinimidas, N-30 2,3-difenilmaleimidas), derivados de imina (tais como N-

1,1-dimetiltiometilenoaminas, N-benzildenoaminas, N-p-metóxibenzildenoaminas, N-difenilmetilenoaminas), derivados de enamina (tais como N-(5,5-dimetil-3-oxo-1-ciclohexenil)aminas), etc. Um grupo protetor de nitrogênio 5 divalente preferido é N-ftalimidil.

Os grupos protetores de oxigênio apropriados incluem ésteres, éteres (por exemplo, éteres de silih ou éteres de alquila) e acetais. Os exemplos específicos incluem allila, acetila, Aloc, benzila, benzilóximetila (BOM), t-butila, 10 tritila, tert-butildimethylsila (TBS), tert-butildifenilsila (TBDPS), trietilsila (TES), trimetilsila (TMS), tri-isopropilsila (TIPS), parametóxibenzila (PMB), MEM, metóximetila (MOM), MTM e tetrahidropiranila (THP).

15 Todos os grupos Z podem ser OH (submetido a pelo menos um dos grupos Z e/ou pelo menos um dos grupos Q sendo grupos bloqueadores). Como uma alternativa a todos os grupos Z sendo OH, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% dos grupos Z podem ser OAc. Preferivelmente, 20 aproximadamente 60-90% dos grupos Z são OAc, com o restante dos grupos Z sendo OH ou grupos bloqueadores como definidos acima. Preferivelmente, pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% ou 40% dos grupos Z são grupos bloqueadores, 60-90% são OAc e o restante é OH. 25 Preferivelmente, aproximadamente 10-40% dos grupos Z são grupos bloqueadores, 60-90% são OAc e o restante é OH. Alternativamente, aproximadamente 0%, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou aproximadamente 100% dos grupos Z são grupos bloqueadores, com pelo menos 30 95% e aproximadamente 100% sendo preferido.

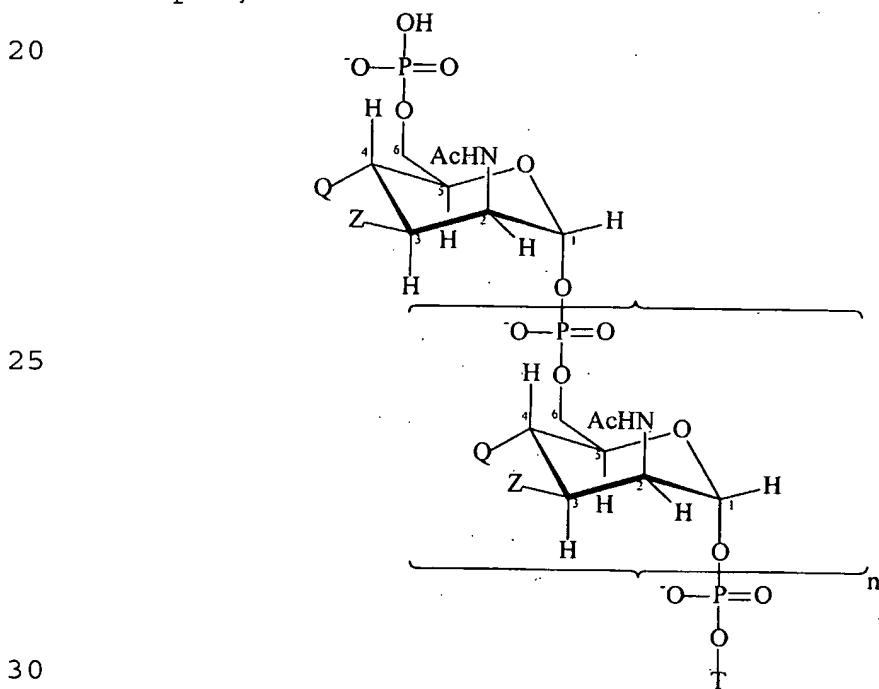
Todos os grupos Q podem ser OH (submetido a pelo menos um dos grupos Z e/ou grupos Q sendo grupos bloqueadores). Alternativamente, pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15% ou 20% dos grupos Q podem ser OAc.

5 Preferivelmente, aproximadamente 1-20% de grupos Q são OAc, com o restante dos grupos Q sendo OH ou grupos bloqueadores como definidos acima. Preferivelmente, pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%,

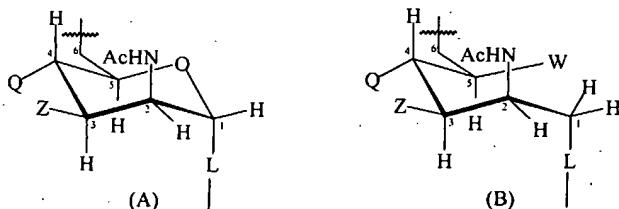
10 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% dos grupos de Q estão grupos bloqueadores, 1-20% são OAc e o restante é OH. Preferivelmente, aproximadamente 80-99% dos grupos Q são grupos bloqueadores, 1-20% são OAc e o restante é OH. Alternativamente, aproximadamente 0%, pelo

15 menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou aproximadamente 100% dos grupos Q são grupos bloqueadores, com pelo menos 30% e aproximadamente 100% sendo preferido.

A invenção também fornece uma molécula compreendendo uma porção de sacarídeo de fórmula:



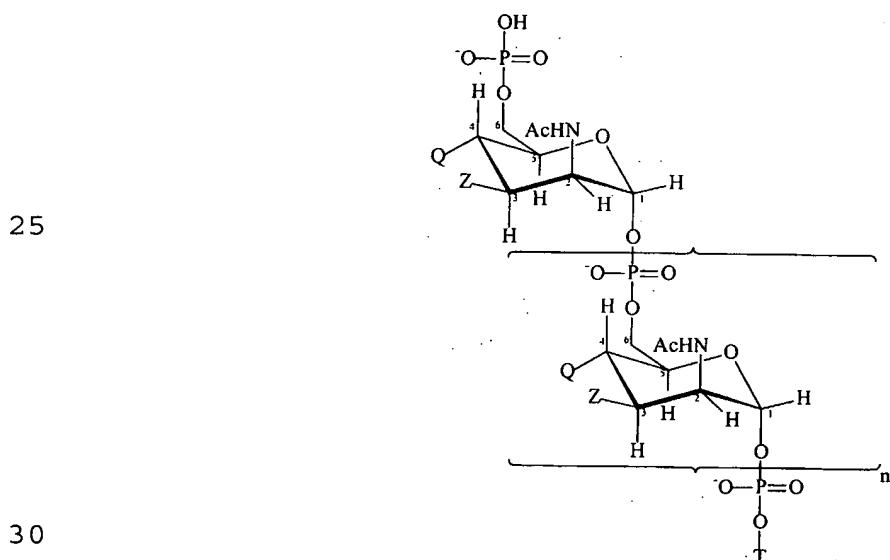
em que T é de fórmula (A) ou (B):



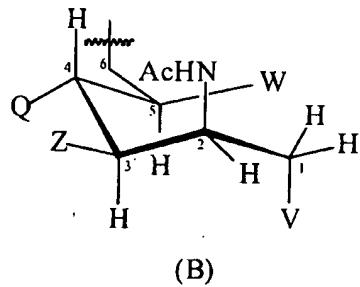
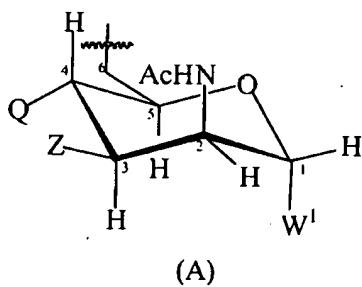
5 n, Z, Q e W são como definidos acima; pelo menos um (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40) dos grupos Z e/ou pelo menos um (por exemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 10 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40) dos grupos Q são grupos bloqueadores; e: L é O, NH, NE, S ou SE.

A ligação covalent livre de L pode ser unida a qualquer porção apropriada, por exemplo, -H, -E, um ligante, 15 um carreador de proteína, etc. L é preferivelmente N ou O. É também possível para L ser N, unido a um ligante divalente, a um grupo protetor divalente, ou a um carreador de proteína divalente. As identidades preferidas dos grupos n, Z, Q e W são descritas acima.

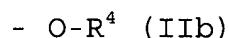
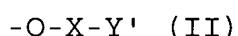
20 Esta invenção também fornece uma molécula compreendendo um sacarídeo de fórmula:



onde T é de fórmula (A) ou (B) :



n, Z, Q, W, W¹ e V são como definidos acima, e pelo menos um (por exemplo, 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, 10 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40) dos grupos Z e/ou pelo menos um (por exemplo 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40) dos grupos Q são de fórmula (IIa) ou 15 (IIb) :



em que X é como definido acima;

Y' é NR²R⁴;

R² é como definido acima; e

20 R⁴ é -C₁₋₄ alquíleno-CH(O) ou -C₁₋₅ alquíleno-NH, em que o grupo -NH- é parte de uma proteína carreadora.

Preferivelmente, pelo menos um do grupo Z e/ou Q é de fórmula (IIa). Nesta modalidade, prefere-se que X seja C(O).

25 Os grupos R² preferidos são descritos acima em relação à fórmula (Ia).

Os grupos R⁴ preferidos incluem -C₁ alquíleno-CH(O), -C₂ alquíleno-CH(O), -C₃ alquíleno-CH(O) e -C₄ alquíleno-CH(O). Um grupo R⁴ particularmente preferido é -C₃ alquíleno-CH(O).

30 Outros grupos R⁴ preferidos incluem -C₁ alquíleno-NH,

-C₂ alquíleno-NH; -C₃ alquíleno-NH, -C₄ alquíleno-NH e -C₅ alquíleno-NH. Um grupo R⁴ particularmente preferido é -C₄ alquíleno-NH. As identidades preferidas dos grupos n, Z, Q, W, W¹ e V são descritos acima.

5 **Processo para produzir um sacarídeo modificado.**

A invenção fornece um processo modificando um sacarídeo capsular compreendendo as etapas de:

(a) fornecer um sacarídeo capsular tendo pelo menos um grupo hidroxila em uma unidade de monossacarídeo; e

10 (b) converter pelo menos um referido grupo hidroxila em um grupo bloqueador.

O grupo bloqueador é qualquer dos grupos bloqueadores definidos acima.

O sacarídeo capsular pode ser um sacarídeo capsular 15 nativo (oligossacarídeo ou polissacarídeo). Como uma alternativa, o sacarídeo capsular pode ser, por exemplo, um sacarídeo capsular des-O-acetilado e/ou um sacarídeo capsular tendo um grupo amino terminal (por exemplo, obtido por aminação redutiva).

20 Um processo preferido para modificar um sacarídeo em que o grupo bloqueador é -OC(O)NR¹R² é quando a etapa (b) compreende as etapas de:

(b1) reagir o sacarídeo capsular com um reagente bifuncional em um solvente orgânico; e

25 (b2) reagir o produto de etapa (b1) com um composto amino de fórmula (III):



em que R¹ e R² são como definidos acima.

O termo "reagente bifuncional" significa qualquer 30 reagente que é capaz de realizar as funções duplas de (i)

fornecer na etapa (b1) um primeiro átomo de carbono electrofílico para acoplar com o(s) grupo(s) hidroxila no sacarídeo; e (ii) fornecer um segundo átomo de carbono electrofílico para acoplar com o grupo amino usado na etapa 5 (b2). Geralmente, o segundo átomo de carbono electrofílico é regenerado do primeiro átomo de carbono electrofílico durante a etapa (b). O reagente bifuncional fornece uma ligação -C(O)- entre o polissacarídeo e o composto amino.

Os reagentes bifuncionais para uso na presente 10 invenção incluem, mas não são limitados a, 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), carbonil di-1,2,4-triazol (CDT), carbonil di-1,2,3-benzotriazol (CDB), difenilcarbonato, brometo de cianogeno, fosgeno ou trifosgeno. A pessoa hábil 15 estará ciente de outros reagentes bifuncionais que podem realizar a mesma função que estes.

Um reagente bifuncional preferido é CDI. O CDI tem a vantagem de ser um reagente mais suave que, por exemplo, de brometo de fosfogeno ou cianogeno. Em particular, as reações de acoplamento usando CDI não geram gases ácidos 20 hidrohálicos, tais como HCl ou HBr. A geração de gás HCl ou HBr é indesejável, pois estes gases exigem a depuração da saída da câmara de reação para evitar seu escape na atmosfera. Além disso, a geração de gás HCl ou HBr pode afetar os grupos funcionais sensíveis no sacarídeo, 25 resultando na perda de rendimentos devido à decomposição ou fragmentação do sacarídeo.

O solvente orgânico usado na etapa (b1) é preferivelmente um solvente aprótico. Os solventes apróticos são conhecidos à pessoa hábil na técnica e não 30 contêm nenhum átomo de hidrogênio ionizável. Estes

solventes são vantajosos, pois facilitam a reação de grupo(s) hidroxila no sacarídeo com o reagente bifuncional, melhorando a nucleofilicidade do(s) grupo(s) hidroxila. Os solventes apróticos apropriados incluem, mas não são limitados a, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), formamida, triamida hexametilfósforo (HMPT), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU), dimetilacetamida (DMAC), ou hexametilfosforamida (HMPA). DMSO é preferido.

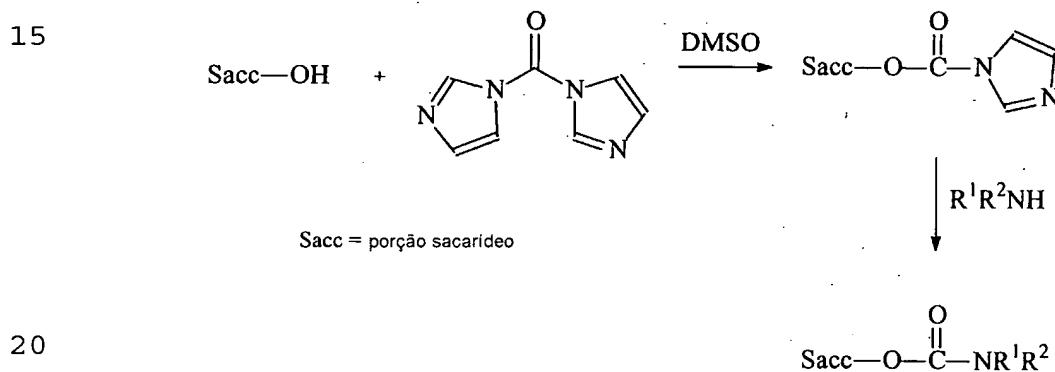
Na etapa (b2) do processo da invenção, o produto da etapa (b1) é reagido com um composto amino para formar o polissacarídeo modificado. O composto amino usado no processo da presente invenção é de fórmula (III), como definido acima.

Os composto aminos apropriados que podem ser usados na invenção dependem de R^1 e R^2 . Como descrito acima, em modalidades preferidas, R^1 é substituído com um único grupo hidroxila, esta substituição sendo na extremidade distal da cadeia alquila C_{1-6} , e R^2 é H. Os composto aminos preferidos que podem ser usados na invenção incluem portanto, aminometanol, 2-aminoetanol, 3-aminopropan-1-ol, 4-aminobutan-1-ol, 5-aminohexil-1-ol e 6-aminopentan-1-ol. Um composto amino particularmente preferido é 2-aminoetanol. Em outras modalidades preferidas, R^1 é substituído com dois grupos hidroxila vicinais e R^2 é H. Os compostos amino preferidos que podem ser usados na invenção incluem portanto, 1-aminoetano-1,2-diol; 1-aminopropano-1,2-diol e 3-aminopropano-1,2-diol; 1-aminobutano-1,2-diol, 1-aminobutano-2,3-diol e 4-aminobutano-1,2-diol; 1-aminopentano-1,2-diol, 5-aminopentano-1,2-diol, 1-aminopentano-2,3-diol,

aminopentano-2,3-diol e 5-aminopentano-1,2-diol; e 1-aminohexano-1,2-diol, 1-aminohexano-2,3-diol, 5-aminohexano-3,4-diol, 6-aminohexano-2,3-diol e 6-aminohexano-1,2-diol. Em modalidades particularmente preferidas, R¹ é substituído com dois grupos hidroxila vicinais na extremidade distal da cadeia alquila C₁₋₆. Os compostos aminados preferidos que podem ser usados na invenção incluem portanto, 3-aminopropano-1,2-diol, 4-aminobutano-1,2-diol, 5-aminopentano-1,2-diol e 6-aminohexano-1,2-diol.

Um composto amino particularmente preferido é 5-aminopentano-1,2-diol. Estes podem ser usados na forma de sal (por exemplo, sal de hidrocloreto).

Um processo preferido da invenção é exemplificado no esquema 1 abaixo:



Esquema 1

Neste esquema, o sacarídeo (por exemplo, polissacarídeo ou oligossacarídeo MenA) é primeiramente ativado através de pelo menos um de seus grupos hidroxila em uma unidade de monossacarídeo usando CDI em DMSO solvente. O intermediário de carbamato imidazol resultante é preso pela amina R¹R²NH (por exemplo, 2-aminoetanol) para dar o sacarídeo modificado.

Os sacarídeos modificados podem alternativamente ser preparados em um processo de uma etapa reagindo um ou mais

grupos hidroxila em um sacarídeo capsular com um reagente de fórmula $XC(O)NR^1R^2$, em que X é um grupo de saída, e R^1 e R^2 são como definidos acima. Os grupos de saída apropriados incluem, mas não são limitados a, -Cl, -Br, -CF₃, -OC₆F₅ ou 5 -CCl₃.

Um processo preferido para modificar um sacarídeo em que o grupo bloqueador é -OC(O)R₃ é quando a etapa (b) compreende a etapa de:

10 (b1) reagir o sacarídeo capsular com $[(R^3C(O)_2)O]$ na presença de um catalizador de imidazol.

Este processo é particularmente apropriado para modificar um sacarídeo em que o grupo bloqueador é -OC(O)CH₃. Nesta modalidade, a etapa (b) compreende a etapa de:

15 (b1) reagir o sacarídeo capsular com $[(CH_3C(O)_2)O]$ (anidrido acético) na presença de um catalizador de imidazol.

Alternativamente, os sacarídeos capsulares modificados da presente invenção podem ser preparados por meios 20 sintéticos, por exemplo, de unidades de monossacarídeo apropriadas. Tipicamente, a síntese total de um sacarídeo capsular modificado compreende a formação de ligações glicosídicas (por exemplo, ligações fosfodiéster) entre unidades de monossacarídeo apropriadas e então modificar o 25 sacarídeo resultante em qualquer maneira descrita acima. Alternativamente, as unidades de monossacarídeo podem ser modificadas antes de formar as ligações glicosídicas para fornecer o mesmo sacarídeo capsular modificado.

Os sacarídeos capsulares modificados desta invenção 30 são preferivelmente oligossacarídeos. Partindo dos

polissacarídeos capsulares nativos, os oligossacarídeos capsulares modificados podem ser obtidos por qualquer um dos dois métodos: (1) modificar o polissacarídeo capsular seguido por despolimerização e dimensionamento do 5 polissacarídeo modificado para formar um oligossacarídeo modificado; ou (2) despolimerizar e dimensionar o polissacarídeo capsular seguido por modificação do oligossacarídeo resultante para formar um oligossacarídeo modificado. Ambos os métodos são englobados dentro da 10 presente invenção. Entretanto, o primeiro método é preferido em determinadas modalidades, já que este método assegura que um grupo hidroxila terminal estará disponível para conjugação subsequente do oligossacarídeo modificado a uma molécula carreadora, tal como uma proteína.

15 A presente invenção também fornece um processo para modificar um polissacarídeo de sorogrupo A de *Neisseria meningitidis* compreendendo as etapas de:

- (a) fornecer um polissacarídeo de sorogrupo A de *Neisseria meningitidis*;
- 20 (b) despolimerizar e dimensionar o referido polissacarídeo para fornecer um oligossacarídeo; e
- (c) converter pelo menos um grupo hidroxila do oligossacarídeo em um grupo bloqueador, como descrito acima.

A etapa (b) deste processo pode opcionalmente ser 25 seguida por etapa(s) de derivatização conhecidas antes da etapa (c). As etapas de derivatização conhecidas incluem, por exemplo, animação redutiva seguida pela proteção do grupo -NH₂ resultante e/ou des-O-acetilação.

30 Esta invenção também fornece um processo para modificar um polissacarídeo de sorogrupo A de *Neisseria*

meningitidis compreendendo as etapas de:

(a) fornecer um polissacarídeo de sorogrupo A de *Neisseria meningitidis*;

5 (b) converter pelo menos um grupo hidroxila do polissacarídeo em um grupo bloqueador, como descrito acima; e

(c) despolimerizar e dimensionar o polissacarídeo resultante para fornecer um oligossacarídeo.

A etapa (c) deste processo pode opcionalmente ser 10 seguida por etapas de derivatização conhecidas. As etapas de derivatização conhecidas incluem, por exemplo, a aminação redutiva seguida pela proteção do grupo NH₂ resultante e/ou des-O-acetilação.

Quaisquer dos processos descritos acima podem ser 15 seguidos por uma etapa em que os contaminantes (por exemplo, contaminantes de baixo peso molecular) são removidos.

Materiais de partida de sacarídeo capsular

Os sacarídeos capsulares modificados da invenção são 20 obtidos dos sacarídeos capsulares nativos. O termo "sacarídeo capsular nativo" refere-se aos polímeros contendo açúcar (por exemplo, polímeros de açúcares, ácidos de açúcar, amino de açúcares, álcoois polhídricos, álcoois de açúcar, e fosfatos de açúcar etc.) que podem ser encontrados na cápsula de bactérias (ambas Gram-positiva e 25 Gram-negativa) tais como *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*. Além disso, o "sacarídeo capsular nativo" inclui ambos polissacarídeos e oligossacarídeos. Os oligossacarídeos capsulares nativos podem ser obtidos 30 despolimerização e dimensionamento de polissacarídeos nativos. A "posição do grupo hidroxila" de um sacarídeo

capsular nativo é uma posição no sacarídeo capsular nativo tendo um grupo hidroxila. Entretanto, não inclui posições em ligações glicosídicas, ou resíduos das mesmas, tendo grupos hidroxila (por exemplo, um grupo hidroxila que é parte de uma ligação de fosfato não ocupa uma posição de grupo hidroxila). Nem inclui as posições onde há um grupo acetóxi (AcO) no sacarídeo capsular nativo não são também posições de grupo hidroxila.

O sacarídeo capsular nativo pode compreender as unidades de sacarídeo ligadas por ligações fosfodiéster. Os sacarídeos compreendendo ligações fosfodiéster podem ser instáveis à hidrólise.

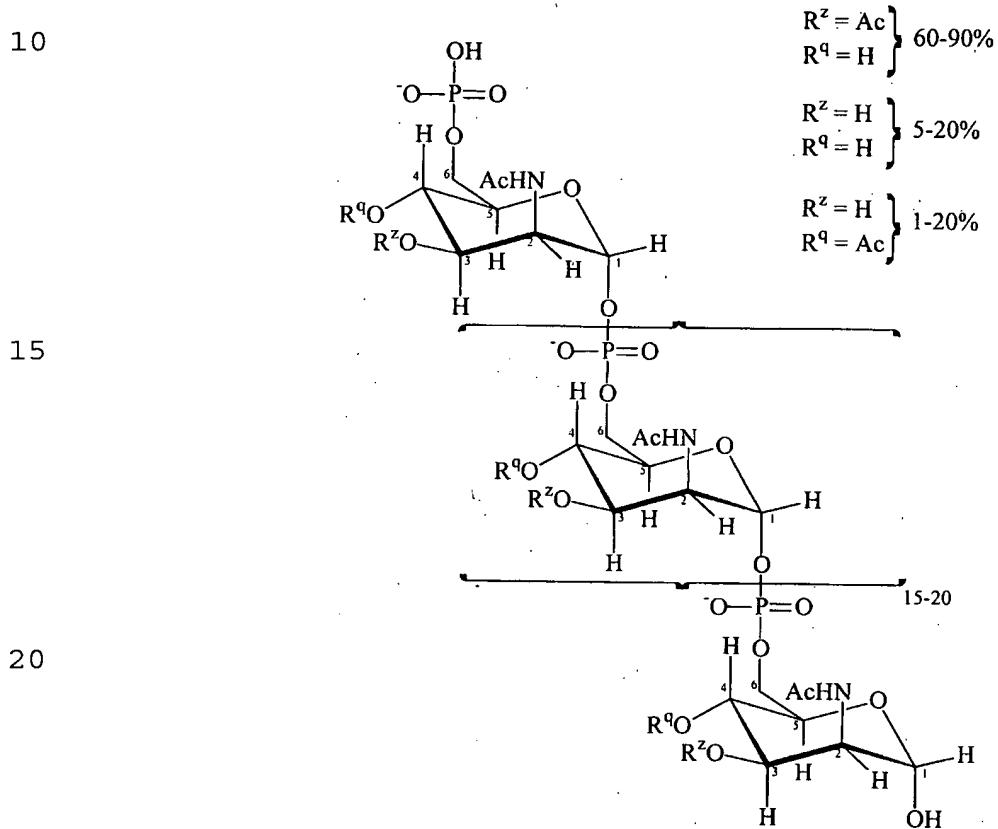
O sacarídeo capsular nativo e o sacarídeo capsular modificado da invenção são preferivelmente imunogênicos em mamíferos (por exemplo, humanos). O mamífero pode ser um adulto ou uma criança humanos.

O sacarídeo capsular nativo é preferivelmente um polissacarídeo (ou fragmento de oligossacarídeo do mesmo) de *N. meningitidis* (incluindo sorogrupo A, B, C, W135 e Y), *S. pneumoniae* (incluindo sorotipos 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*.

Embora a invenção possa ser aplicada a qualquer sorogrupo de *N. meningitidis*, prefere-se usar um sacarídeo capsular do sorogrupo A ("MenA"). O sacarídeo capsular MenA é particularmente instável em solução aquosa, significando que procedimentos especiais precisam ser usados para

realizar as manipulações químicas (por exemplo, conjugação às proteínas carreadoras) nesta molécula. Entretanto, os sacarídeos MenA modificados de acordo com a invenção são descobertos por serem vantajosamente estáveis em solução aquosa.

O polissacarídeo capsular MenA $\{ \rightarrow 6 \} -D-\text{ManpNAc}(3/4\text{OAc}) - \alpha - (1 \rightarrow \text{OPO}_3 \rightarrow \}$ é composto de resíduos de N-acetilmannosamina ligado juntamente por ligações $\alpha 1-6$ fosfodiéster tendo as unidades de repetição mostradas abaixo.



De acordo com as definições acima, aproximadamente 80-99% das posições 4 são posições de grupo hidroxila, e 25 aproximadamente 10-40% das posições 3 são posições de grupo hidroxila. O grupo 1-hidróxi terminal também ocupa uma posição de grupo hidroxila. O grupo 1-hidróxi terminal é um grupo hidroxila anomérico terminal. O grupo hidroxila que é parte do grupo $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})\text{O}^-$ não é uma posição de grupo hidroxila.

Conjugados de sacarídeo-proteína

Os sacarídeos modificados da invenção podem ser submetidos a qualquer processamento à jusante usual que é aplicado aos sacarídeos (por exemplo, derivatização, 5 conjugação, fragmentação, etc.). Para melhorar a imunogenicidade, os sacarídeos modificados da invenção são conjugados preferivelmente a uma proteína carreadora. A conjugação às proteínas carreadoras é particularmente útil para vacinas pediátricas [6] e é uma técnica bem conhecida 10 [por exemplo, revisto nas refs. 7 a 15 etc.]. O polissacarídeo pode ser ligado diretamente à proteína [2, 16] ou pode ser ligado através de um grupo ligante. Muitos tipos diferentes de grupos ligantes foram propostos para ligar polissacarídeos às proteínas [por exemplo, 3, 17].

15 A invenção assim fornece um conjugado de uma proteína e um sacarídeo modificado da invenção. A proteína pode ser conjugada ao sacarídeo diretamente, ou um ligante pode ser usado. Qualquer ligante química apropriado pode ser usado. A estabilidade melhorada do polissacarídeo modificado 20 permite vantajosamente que uma variedade ampla de ligações seja usada.

Como descrito acima, em algumas modalidades prefere-se que o sacarídeo capsular modificado tenha pelo menos um grupo hidroxila ou grupo amino livre que podem ser usados 25 como uma parte para ligação subsequente a uma proteína carreadora.

Um sacarídeo capsular modificado tendo um grupo hidroxila livre pode ser obtido seletivamente bloqueando grupos hidroxila em um sacarídeo capsular, ou seletivamente 30 desbloqueando um sacarídeo capsular modificado em que todos

os grupos hidroxila estão bloqueados. Alternativamente, um grupo hidroxila livre pode ser revelado despolimerizando e dimensionando um sacarídeo capsular modificado. Preferivelmente, pelo menos um grupo hidroxila livre é um grupo hidroxila anomérico terminal. O grupo hidroxila anomérico terminal é preferido como o grupo hidroxila livre, pois um grupo hidroxila anomérico terminal pode ser revelado por despolimerizar e dimensionar um sacarídeo capsular modificado.

Um sacarídeo capsular modificado tendo um grupo amino livre pode ser obtido por aminação redutiva de um grupo hidroxila anomérico terminal, opcionalmente seguido por proteção do grupo NH_2 resultante. A reação de aminação redutiva pode ser realizada antes ou depois da etapa de modificação da presente invenção. Preferivelmente, a aminação redutiva é realizada antes da etapa de modificação da presente invenção já que o grupo NH_2 resultante pode seletivamente ser protegido/desprotegido na presença de grupos hidroxila/grupos bloqueadores.

Por exemplo, a presente invenção fornece um processo para fazer um conjugado de sacarídeo-proteína compreendendo as etapas de:

(a) fornecer um sacarídeo capsular modificado da invenção, em que o sacarídeo modificado compreende um grupo hidroxila anomérico terminal ou um grupo amino derivado de um grupo hidroxila anomérico terminal; e

(b) ligar o sacarídeo capsular modificado a uma proteína através do grupo hidroxila anomérico terminal ou o grupo amino derivado de um grupo hidroxila anomérico terminal.

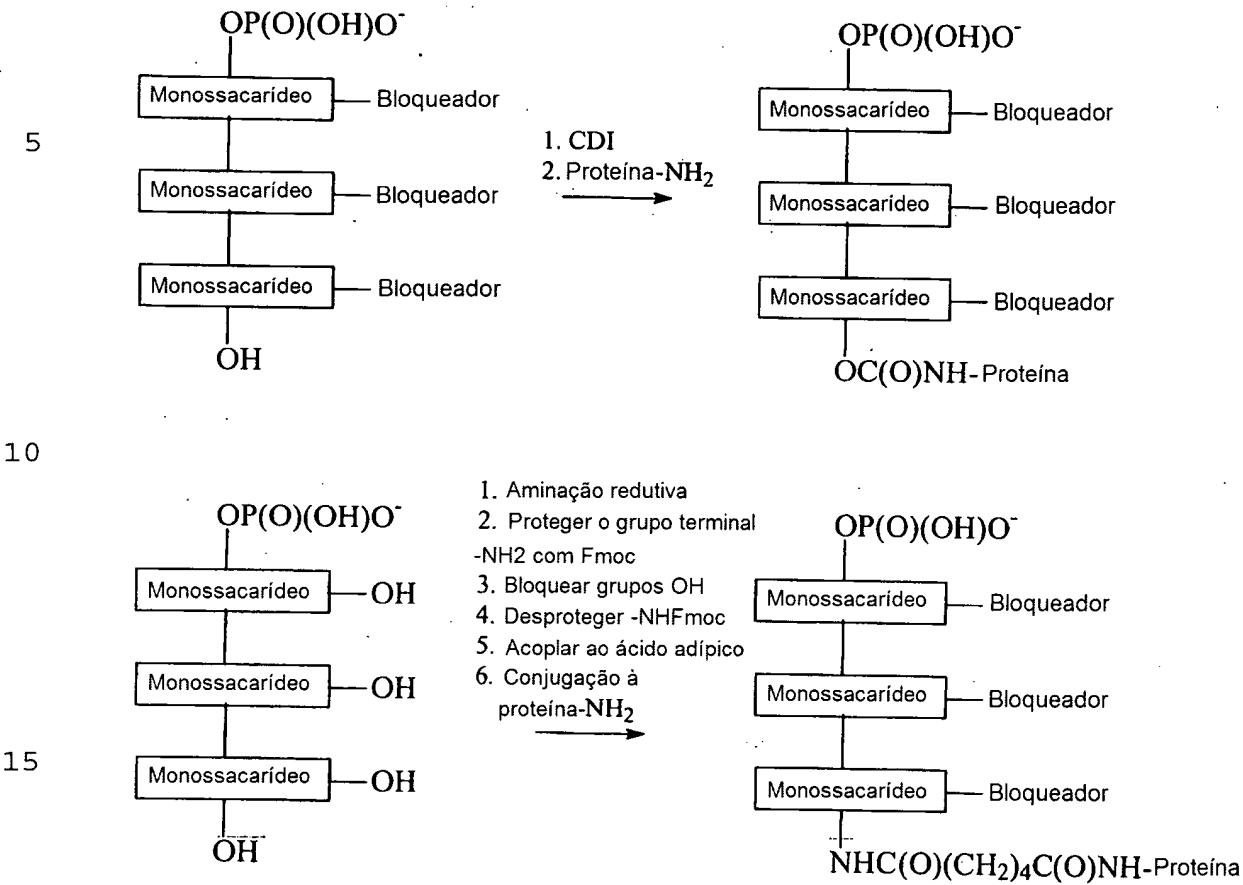
A proteína é preferivelmente uma toxina ou toxóide bacteriano, em particular toxina ou toxóide de difteria. Por exemplo, a proteína é preferivelmente CRM₁₉₇.

As ligações através de um grupo ligante podem ser feitas usando qualquer procedimento conhecido, por exemplo, os procedimentos descritos nas referências 3 e 17. Um tipo preferido de ligação é um ligante carbonila, que pode ser formado pela reação de um grupo hidroxila livre do sacarídeo modificado com CDI [18, 19] seguido pela reação com uma proteína para formar uma ligação de carbamato. Um outro tipo preferido de ligação é um ligante de ácido adípico, que pode ser formado acoplando um grupo -NH₂ livre no sacarídeo modificado com ácido adípico (usando, por exemplo, ativação de diimida), e então acoplar uma proteína ao intermediário de ácido adípico-sacarídeo resultante [11, 20, 21]. Outros ligantes incluem B-propionamido [22], nitrofenil-etilamina [23], haletos de haloacila [24], ligações glicosídicas [25], ácido 6-aminocapróico [26], ADH [27], porções C₄ a C₁₂ [28] etc.

A conjugação pode envolver: redução do terminal anomérico a um grupo hidroxila primário, proteção/desproteção opcional do grupo hidroxila primário; reação do grupo hidroxila primário com CDI para formar um intermediário de carbamato CDI; e acoplamento do intermediário de carbamato CDI com um grupo amino em uma proteína.

O esquema 2 mostra dois exemplos diferentes de como um sacarídeo capsular pode ser conjugado a uma proteína carreadora, de acordo com a presente invenção. No primeiro exemplo, a proteína é conjugada através de um grupo

hidroxila terminal. No segundo exemplo, a proteína é ligada através de um grupo amino terminal.



Esquema 2

20 As ligações diretas à proteína podem compreender oxidação do polissacarídeo seguido por aminação redutiva com a proteína, como descrito nas, por exemplo, referências 2 e 16. Por exemplo, em modalidades onde há pelo menos uma unidade de monossacarídeo do sacarídeo capsular modificado 25 onde dois grupos hidroxila vicinais do sacarídeo capsular nativo correspondente não compreendem grupos bloqueadores, um ou mais pares de grupos hidroxila vicinais podem ser convertidos em grupos aldeído por clivagem oxidativa (por exemplo, NaIO_4 , $\text{Pb}(\text{OAc})_4$, etc.). O sacarídeo capsular 30 modificado pode então ser ligado à proteína por aminação

reduktiva.

Por exemplo, a presente invenção fornece um processo para fazer um conjugado de sacarídeo-proteína compreendendo as etapas de:

5 (a) fornecer um sacarídeo capsular modificado da invenção em que haja pelo menos uma unidade de monossacarídeo do sacarídeo capsular modificado onde dois grupos hidroxila vicinais do sacarídeo capsular nativo correspondente não compreendem grupos bloqueadores;

10 (b) converter pelo menos um dos pares de grupos hidroxila vicinais em grupos aldeído por clivagem oxidativa; e

(c) ligar o sacarídeo capsular modificado a uma proteína por aminação reduktiva.

15 A proteína é preferivelmente uma toxina ou toxóide bacteriano, em particular toxina ou toxóide de difteria. Por exemplo, a proteína é preferivelmente CRM₁₉₇.

Como descrito acima, em algumas modalidades, é preferido que pelo menos uma das unidades de monossacarídeo 20 do sacarídeo capsular modificado compreende grupos bloqueadores em que R¹ é substituído com dois grupos hidroxila vicinais. Os dois grupos hidroxila vicinais podem ser usados como uma parte para ligação subsequente a uma proteína carreadora. Por exemplo, um ou mais pares de 25 grupos hidroxila vicinais podem ser convertidos em grupos aldeído por clivagem oxidativa (por exemplo, NaIO₄, Pb(OAc)₄, etc.). O sacarídeo capsular modificado pode então ser ligado à proteína por aminação reduktiva.

Por exemplo, a presente invenção fornece um processo 30 para fazer um conjugado de sacarídeo-proteína compreendendo

as etapas de:

(a) fornecer um sacarídeo capsular modificado da invenção em que pelo menos uma das unidades de monossacarídeo compreende grupos bloqueadores em que R^1 é substituído com dois grupos hidroxila vicinais;

(b) converter pelo menos um dos pares de grupos hidroxila vicinais em grupos aldeído por clivagem oxidativa; e

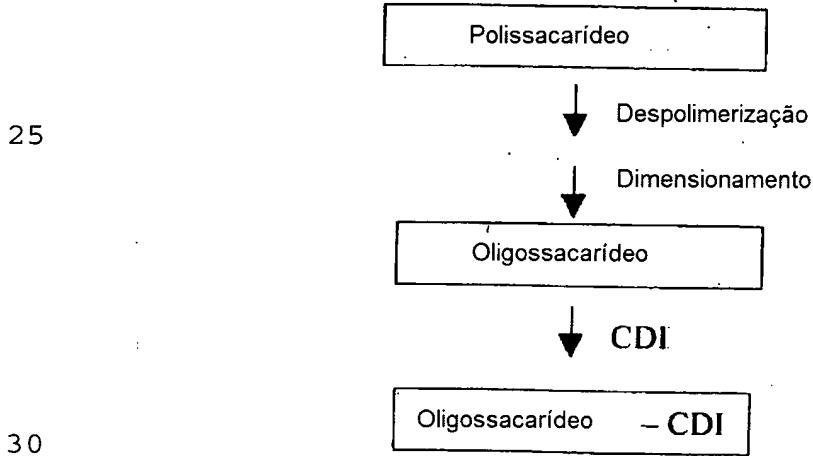
(c) ligar o sacarídeo capsular modificado a uma proteína por aminação redutiva.

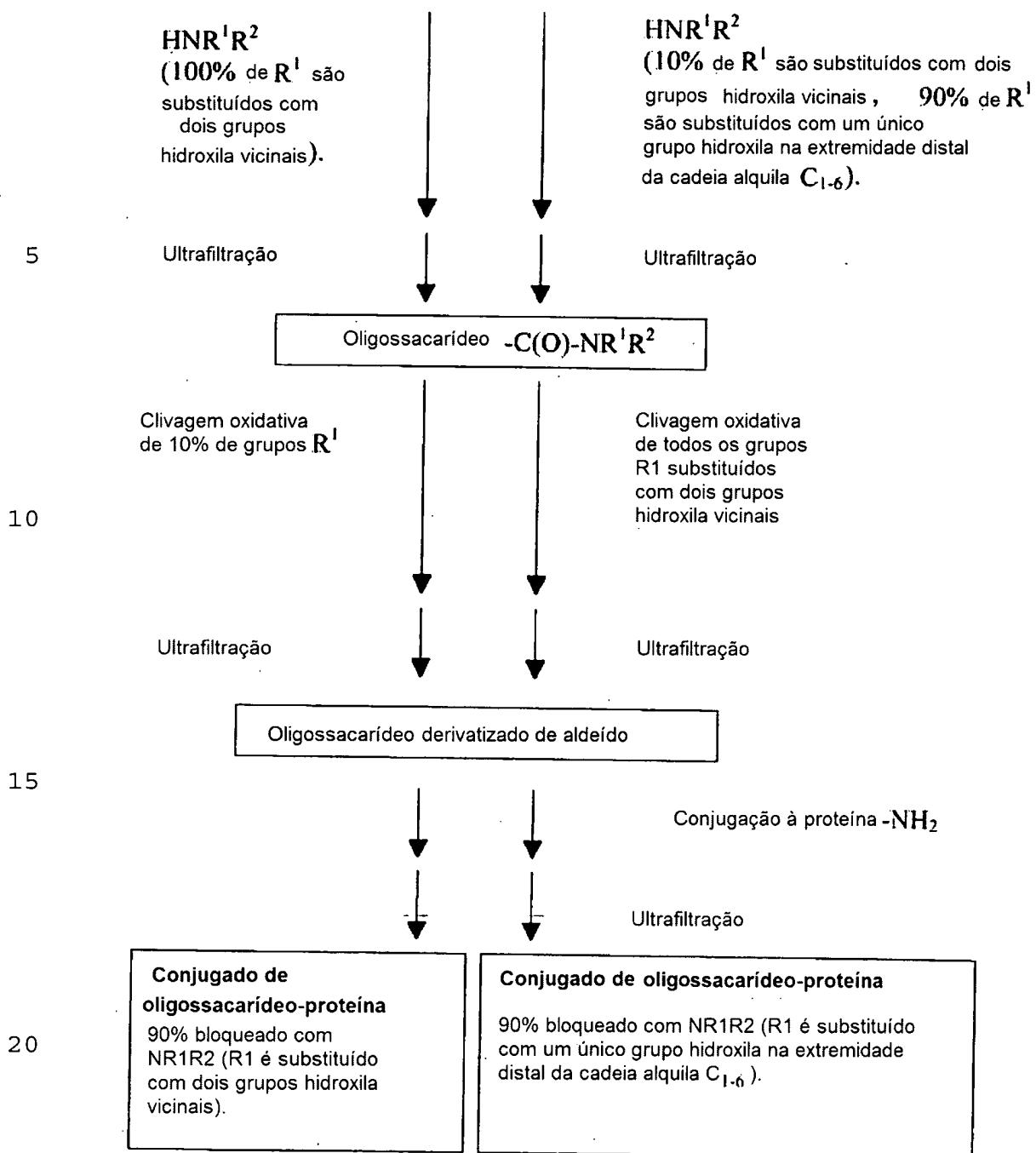
A proteína é preferivelmente uma toxina ou toxóide bacteriano, em particular toxina ou toxóide de difteria. Por exemplo, a proteína é preferivelmente CRM₁₉₇.

Em algumas modalidades deste processo, todos os grupos hidroxila vicinais presentes nos grupos bloqueadores são convertidos em grupos aldeído na etapa (b). Nestas modalidades, o número grupos aldeído produzidos depende do número total de grupos bloqueadores em que R^1 é substituído com dois grupos hidroxila vicinais que estão presentes no sacarídeo capsular modificado. Em outras modalidades, as condições para clivagem oxidativa são selecionadas tais que somente uma proporção dos grupos hidroxila vicinais presentes nos grupos bloqueadores é convertida em grupos aldeído. Nestas modalidades, o número de grupos de aldeído produzidos depende do número total de grupos bloqueadores em que R^1 é substituído com dois grupos hidroxila vicinais que estão presentes no sacarídeo capsular modificado e as condições selecionados. Em tais modalidades, prefere-se que 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% ou 20% das unidades de

monossacarídeo do sacarídeo capsular modificado tenham grupos bloqueadores que são convertidos em grupos aldeído. Por exemplo, 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, 5 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40 unidades de monossacarídeo tem grupos bloqueadores que são convertidos em grupos aldeído. Preferivelmente, entre 5-15%, mais preferivelmente 10%, das unidades de monossacarídeo têm grupos bloqueadores que são convertidos em grupos aldeído.

10 O esquema 3 mostra dois exemplos adicionais de como um sacarídeo capsular pode ser conjugado a uma proteína carreadora, de acordo com a presente invenção. No primeiro exemplo (lado da mão esquerda), todos os grupos bloqueadores têm um grupo R^1 que é substituído com dois 15 grupos hidroxila vicinais. Uma proporção (por exemplo, 10%) destes grupos hidroxila vicinais é convertida em grupos aldeído para conjugação a uma proteína. No segundo exemplo (lado da mão direita), dois tipos de grupo bloqueador estão presentes. Uma proporção destes (por exemplo, 10%) tem um 20 R^1 que é substituído com dois grupos hidroxila vicinais. Todos estes grupos hidroxila vicinais são convertidos em grupos aldeído para conjugação a uma proteína.





Esquema 3

As proteínas carreadoras preferidas são toxinas ou toxóides bacterianos, tais como toxóides de difteria ou tétano. Estes são geralmente usados em vacinas conjugadas. O toxóide de difteria CRM₁₉₇ é particularmente preferido [29]. Outras proteínas carreadoras apropriadas incluem a proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [30], peptídeos sintéticos [31,32], proteínas de choque a calor

[33,34], proteínas de coqueluche [35,36], proteína D de *H. influenzae* [37], citocinas [38], linfocinas [38], hormônios [38], fatores de crescimento [38], toxina A ou B de *C. difficile* [39], proteínas de captação de ferro [40] etc.

5 É possível usar misturas de proteínas carreadora.

Após a conjugação, os sacarídeos livres e conjugados podem ser separados. Há muitos métodos apropriados, incluindo cromatografia hidrofóbica, ultrafiltração tangencial, diafiltração etc. [veja também refs. 41, 42
10 etc.] .

Uma única proteína carreadora pode carregar sacarídeos diferentes múltiplos [43].

Composições e métodos farmacêuticos

As composições feitas usando os métodos da invenção
15 são farmaceuticamente aceitáveis. Podem incluir componentes além do sacarídeo modificado e/ou conjugado, por exemplo, tipicamente incluirão um ou mais carreadores farmacêuticos. Um discussão completa de tais componentes está disponível na referência 44. Assim a invenção fornece uma composição
20 farmacêutica compreendendo (a) um sacarídeo modificado da invenção e/ou um conjugado da invenção, e (b) um carreador farmaceuticamente aceitável. A composição é preferivelmente uma composição imunogênica (por exemplo, uma vacina). As vacinas baseadas em sacarídeos ou conjugados de sacarídeo-
25 proteína são conhecidas na técnica.

As composições podem incluir um ou mais tampões. Os tampões típicos incluem: um tampão de fosfato; um tampão de Tris; um tampão de borato; um tampão de succinato; um tampão de histidina; ou um tampão de citrato. Os tampões
30 serão tipicamente incluídos na faixa 5-20 mM.

Para controlar a tonicidade, prefere-se incluir um sal fisiológico, tal como um sal de sódio. O cloreto de sódio (NaCl) é preferido, que pode estar presente entre em 1 e 20 mg/ml. Outros sais que podem estar presentes incluem 5 cloreto de potássio, fosfato de dihidrogênio potássio, dehidrato de fosfato disódio, cloreto de magnésio, cloreto de cálcio, etc.

As composições terão geralmente uma osmolaridade entre 200 mOsm/kg e 400 mOsm/kg, preferivelmente entre, 240-360 10 mOsm/kg, e cairá mais preferivelmente dentro da faixa de 290-310 mOsm/kg. A osmolaridade tem sido previamente relatada para não ter um impacto na dor causada pela vacinação [45], mas manter a osmolaridade nesta faixa não obstante é preferida.

15 O pH de uma composição estará geralmente entre 5,0 e 80, e mais tipicamente entre 5,5 e 6,5, por exemplo, entre 6,5 e 7,5. Um processo da invenção pode portanto, incluir uma etapa de ajustar o pH do volume vacina antes de embalar.

20 A composição é preferivelmente estéril. A composição é preferivelmente não-pirogênica, por exemplo, contendo <1 UE (unidade de endotoxina, uma medida padrão) por dose, e preferivelmente <0,1 UE por dose. A composição é preferivelmente glúten livre.

25 A composição pode incluir um conservante, tal como tiomersal ou 2-fenoxietanol. Prefere-se, entretanto, que a vacina deva estar substancialmente livre de (isto é, menos do que 5 µg/ml) material com mercúrio, por exemplo, tiomersal-livre. As vacinas não contendo mercúrio são mais preferidas.

30 A composição pode incluir material para uma única

imunização, ou pode incluir material para imunizações múltiplas (isto é, um kit 'multidose'). A inclusão de um conservante é preferida em arranjos multidose.

As vacinas são tipicamente administradas em um volume 5 de dosagem de aproximadamente 0,5 ml.

As composições são preferivelmente armazenadas entre em 2°C e 8°C. Não devem ser congelados. Devem idealmente ser mantidas fora da luz direta.

Onde uma composição inclui um conjugado então pode 10 também compreender a proteína carreadora não conjugada, mas prefere-se que a quantidade de carreador não conjugado relativo à quantidade total desse carreador é menos de 5%.

As composições da invenção são apropriadas para administração aos pacientes humanos, e a invenção fornece 15 um método de aumentar uma resposta imune em um paciente, compreendendo a etapa de administrar tal composição ao paciente. A invenção também fornece as composições da invenção para uso como medicamento. A invenção também fornece o uso de um sacarídeo modificado e/ou de um 20 conjugado da invenção, na fabricação de um medicamento para aumentar uma resposta imune em um paciente. A resposta imune aumentada por estes métodos e usos geralmente incluirão uma resposta de anticorpo, preferivelmente uma resposta de anticorpo protetora contra a infecção 25 meningocócica. As doenças causadas por *Neisseria* incluem meningite, septicemia e gonorréia. A prevenção e/ou tratamento de meningite bacteriana é preferido.

As composições podem ser administradas em várias maneiras. A rota de imunização mais preferida é por injeção 30 intramuscular (por exemplo, no braço ou perna), mas outras

rotas disponíveis incluem injeção subcutânea, intranasal [46-48], oral [49], intradérmica [50,51], transcutânea, transdérmica [52], etc.

As composições preparadas de acordo com a invenção 5 podem ser usadas para tratar crianças e adultos. O paciente pode ter menos de 1 ano de idade, 1-5 anos de idade, 5-15 anos de idade, 15-55 anos de idade, ou pelo menos 55 anos de idade. O paciente pode ser idoso (por exemplo, >50 anos de idade, preferivelmente >65 anos), os jovens (por exemplo, 10 <5 anos de idade), pacientes hospitalizados, trabalhadores de cuidados médicos, serviço armado e pessoal militar, mulheres grávidas, pacientes cronicamente doentes, pacientes imunodeficientes, e pessoas que viajam ao exterior. As composições não são apropriadas unicamente para estes 15 grupos, entretanto, podem ser usadas mais geralmente em uma população.

O tratamento pode ser por uma programação de dose única ou por uma programação de dose múltipla. As doses múltiplas podem ser usadas em uma programação de imunização 20 primária e/ou em uma programação de imunização de reforço. Em uma programação de dose múltipla as várias doses podem ser dadas pela mesma ou diferentes rotas, por exemplo, principal parenteral e reforço mucosal, um principal mucosal e reforço parenteral, etc. A administração de mais 25 de uma dose (tipicamente duas doses) é particularmente útil em pacientes imunologicamente desprotegidos. As doses múltiplas serão tipicamente administradas pelo menos com 1 semana de distância (por exemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, 30 aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas,

aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.).

As composições da invenção podem ser administradas aos pacientes substancialmente no mesmo tempo que (por exemplo, 5 durante a mesma consulta ou visita médica a um profissional de cuidados médicos) outras composições, e em particular ao mesmo tempo que outras vacinas.

As composições imunogênicas compreendem uma quantidade imunologicamente eficaz de antígeno de sacarídeo, assim 10 como qualquer outro de outros componentes especificados, como necessário. Por "quantidade imunologicamente eficaz", significa que a administração dessa quantidade a um indivíduo, em uma única dose ou como parte de uma série, é eficaz para tratamento ou prevenção. Esta quantidade varia 15 dependendo da saúde e condição física do indivíduo a ser tratado, idade, grupo taxonômico de indivíduo a ser tratado (por exemplo, primata não humano, primata, etc.), a capacidade do sistema imune do indivíduo para sintetizar anticorpos, o grau de proteção desejado, a formulação da 20 vacina, a avaliação de tratamento do médico da situação médica, e outros fatores relevantes. Espera-se que a quantidade cairá em uma faixa relativamente ampla que possa ser determinada com os ensaios rotineiros. A dosagem de tratamento pode ser uma programação de dose única ou uma 25 programação de dose múltipla (por exemplo, incluindo doses de reforço).

As vacinas de acordo com a invenção podem ser profiláticas (isto é, para prevenir a infecção) ou terapêuticas (isto é, para tratar a doença após infecção), 30 mas serão tipicamente profiláticas.

Adjuvantes

As composições da invenção podem vantajosamente incluir um adjuvante, que pode funcionar para melhorar as respostas imunes provocadas em um paciente que recebe a 5 composição. Os adjuvantes que podem ser usados com a invenção incluem, mas não são limitados a:

- Uma composição contendo mineral, incluindo sais de cálcio e sais de alumínio (ou misturas dos mesmos). Os sais de cálcio incluem fosfato de cálcio (por exemplo, as 10 partículas de CAP divulgadas na ref. 53). Os sais de alumínio incluem hidróxidos, fosfatos, sulfatos, etc., com os sais tomando qualquer forma apropriada (por exemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.). A adsorção a estes sais é preferida. As composições contendo minerais podem também 15 ser formuladas como uma partícula de sal de metal [54]. Os adjuvantes de sal de alumínio são descritos mais detalhadamente abaixo.

- Uma emulsão óleo em água, como descrita mais detalhadamente abaixo.

20 - Um oligonucleotídeo imunoestimulatório, tal como um contendo uma porção CpG (uma sequência de dinucleotídeo contendo uma citosina não metilada ligada por uma ligação de fosfato a uma guanosina), uma porção TpG [55], um RNA de fita dupla, um oligonucleotídeo contendo uma sequência palíndroma, ou um oligonucleotídeo contendo uma sequência 25 poli(dG). Os oligonucleotídeos imunoestimulatórios podem incluir modificações/análogos de nucleotídeo, tais como modificações fósforotioato e podem ser fita dupla ou (exceto para RNA) fita simples. As referências 56 a 58 30 divulgam as substituições análogas possíveis, por exemplo,

substituição de guanosine com 2'-deoxi-7-deazaguanosina. O efeito de adjuvante de oligonucleotídeos CpG é ainda discutido nas refs. 59-64. Uma sequência CpG pode ser direcionada para TLR9, tal como a porção GTCGTT ou TTTCGTT [65]. A sequência CpG pode ser específica para induzir uma resposta imune de Th1, tal como um CpG-A ODN (oligodeoxinucleotídeo), ou pode ser mais específica para induzir uma resposta de célula B, tal como CpG-B ODN. CpG-A e CpG-B ODNs são discutidos nas refs. 66-68.

10 Preferivelmente, o CpG é um CpG-A ODN. Preferivelmente, o oligonucleotídeo CpG é construído de modo que a extremidade 5' seja acessível para o reconhecimento de receptor. Opcionalmente, duas sequências de oligonucleotídeo CpG podem ser unidas em suas extremidades 3' para formar

15 "imunômeros". Veja, por exemplo, as referências 65 e 69-71. Um adjuvante de CpG útil é CpG7909, também conhecido como ProMune™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.). Os oligonucleotídeos imunoestimulatórios tipicamente compreenderão pelo menos 20 nucleotídeos. Podem compreender

20 menos de 100 nucleotídeos.

- Lipido A de monofosforil 3-O-desacilado ('3dMPL', também conhecido como 'MPL™') [72-75]. 3dMPL foi preparado de um mutante sem heptose de *Salmonella minnesota*, e é quimicamente similar ao lipido A, mas falta um grupo fosforil ácido-instável e um grupo acila base-instável. A preparação de 3dMPL foi originalmente descrita na referência 76. 3dMPL pode tomar a forma de uma mistura de moléculas relacionadas, variando por sua acilação (por exemplo, tendo 3, 4, 5 ou 6 cadeias acila, que podem ser de

25 comprimentos diferentes). Os dois monossacarídeos de

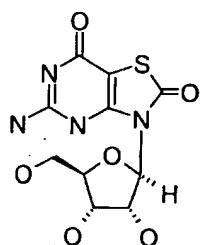
glucosamina (também conhecidos 2-deoxi-2-amino-glicose) como são N-acilados em seus carbonos de posição 2 (isto é, em posições 2 e 2'), e há também O-acilação na posição 3'.

- Um composto de imidazoquinolina, tal como Imiquimod 5 ("R-837") [77,78], Resiquimod ("R-848") [79], e seus análogos; e sais dos mesmos (por exemplo, os sais de hidrocloreto). Detalhes adicionais sobre imidazoquinolinas imunoestimulatórias podem ser encontrados nas referências 80 a 84.

10 - Um composto de tiosemicarbazona, tal como aqueles divulgados na referência 85. Métodos de formulação, fabricação, e seleção para compostos ativos são descritos também na referência 85. As tiosemicarbazonas são particularmente eficazes na estimulação de células 15 mononucleares sanguíneas periféricas humanas para a produção de citocinas, tais como TNF- α .

- Um composto de triptantrina, tal como aqueles divulgados na referência 86. Os métodos de formulação, fabricação, e seleção para compostos ativos são descritos 20 também na referência 86. As tiosemicarbazonas são particularmente eficazes na estimulação de células mononucleares sanguíneas periféricas humanas para a produção de citocinas, tais como TNF- α .

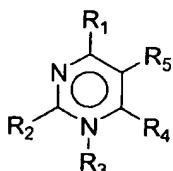
- Um análogo de nucleosídeo, tal como: (a) Isatorabina 25 (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina) :



30 e pró-fármacos dos mesmos; (b) ANA975; (c) ANA-025-1;

(d) ANA380; (e) os compostos divulgados nas referências 87 a 89; (f) um composto tendo a fórmula:

5

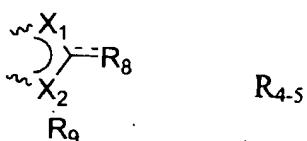


em que:

R₁ e R₂ são cada um independentemente H, halo, -NR_aR_b, -OH, alcóxi C₁₋₆, alcóxi C₁₋₆ substituído, heterociclica, heterociclica substituída, arila C₆₋₁₀, arila C₆₋₁₀ substituída, alquila C₁₋₆, ou alquila C₁₋₆ substituída;

10 R₃ está ausente, H, alquila C₁₋₆, alquila C₁₋₆ substituída, arila C₁₋₆, arila C₆₋₁₀ substituída, heterociclica, ou heterociclica substituída;

15 R₄ e R₅ são cada um independentemente H, halo, heterociclica, heterociclica substituída, -C(O)-R_d, alquila C₁₋₆, alquila C₁₋₆ substituída, ou ligado junto para formar um anel de 5 membros como em R₄₋₅:



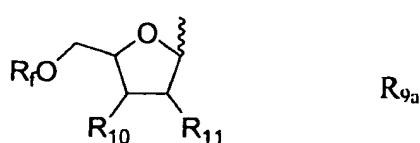
20 a ligação serão conseguidas nas ligações indicadas por um ~~~

X₁ e X₂ são cada uma independentemente N, C, O, ou S;

25 R₈ é H, halo, -OH, alquila C₁₋₆, alquenila C₂₋₆, alquinila C₂₋₆, -OH, -NR_aR_b, -(CH₂)_n-O-R_c, -O-(C₁₋₆ alquila), -S(O)_p(R)_e, ou -C(O)-R_d;

R₉ é H, alquila C₁₋₆, alquila C₁₋₆ substituída, heterociclica, heterociclica substituída ou R_{9a}, em que R_{9a} é:

30



a ligação sendo conseguida na ligação indicada por um

~~~

$R_{10}$  e  $R_{11}$  são cada um independentemente H, halo,  $C_{1-6}$  alcóxi, alcóxi  $C_{1-6}$  substituído,  $-NR_aR_b$  ou  $-OH$ ;

5 cada  $R_a$  e  $R_b$  são independentemente H, alquila  $C_{1-6}$ , alquila  $C_{1-6}$  substituída,  $-C(O)R_d$ ,  $C_{6-10}$  arila;

cada  $R_c$  é independentemente H, fosfato, difosfato, trifosfato, alquila  $C_{1-6}$ , ou alquila  $C_{1-6}$  substituída;

10 cada  $R_d$  é independentemente H, halo, alquila  $C_{1-6}$ , alquila  $C_{1-6}$  substituída, alcóxi  $C_{1-6}$ , alcóxi  $C_{1-6}$  substituído,  $-NH_2$ ,  $-NH(alquila\ C_{1-6})$ ,  $-NH(alquila\ C_{1-6}\ substituída)$ ,  $-N(alquila\ C_{1-6})_2$ ,  $-N(alquila\ C_{1-6}\ substituída)_2$ , arila  $C_{6-10}$ , ou heterociclila;

15 cada  $R_e$  é independentemente H, alquila  $C_{1-6}$ , alquila  $C_{1-6}$  substituída, arila  $C_{6-10}$ , arila  $C_{6-10}$  substituída, heterociclila, ou heterociclila substituída;

cada  $R_f$  é independentemente H, alquila  $C_{1-6}$ , alquila  $C_{1-6}$  substituída,  $-C(O)R_d$ , fosfato, difosfato, ou trifosfato;

cada  $n$  é independentemente 0, 1, 2, ou 3;

20 cada  $p$  é independentemente 0, 1, ou 2; ou

(g) um sal farmaceuticamente aceitável de quaisquer de  
 (a) a (f), um tautômero de quaisquer de (a) a (f), ou um sal farmaceuticamente aceitável do tautômero.

- Loxoribina (7-allil-8-oxoguanosina) [90].

25 - Os compostos divulgados na referência 91, incluindo: compostos de acilpiperazina, compostos de indolediona, compostos de tetrahidraisoquinolina (THIQ), compostos de benzociclodiona, compostos de aminoazavinil, compostos de quinolinona aminobenzimidazol (ABIQ) [92,93], compostos de hidraptalamida, compostos de benzofenona, compostos de

isoxazol, compostos de esterol, compostos de quinazilinona, compostos de pirrol [94], compostos de antraquinona, compostos de quinoxalina, compostos de triazina, compostos de pirazalopirimidina, e compostos de benzazol [95].

5 - Os compostos divulgados na referência 96, incluindo 3,4-di(1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-dionas, análogos de estaurosponina, piridazinas derivatizadas, cromen-4-onas, indolinonas, quinazolininas, e análogos de nucleosídeo.

10 - Um derivado de fosfato de glucosaminida aminoalquila, tal como RC-529 [97, 98].

- Um fosfazeno, tal como poli[di(carboxilatofenóxi) fosfazeno] ("PCPP") como descrito, por exemplo, nas referências 99 e 100.

15 - Imunopotenciadores de molécula pequena (SMIPs) tais como:

N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina,

N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

20 N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

25 1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

N2-butil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina

30 N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo[4,5-c]

quinolina-2,4-diamina  
 N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo  
 [4,5-c]quinolina-2,4-diamina  
 1-(2-metilpropil)-2[(fenilmetil)lio]-1H-imidazo[4,5-c]  
 5 quinolin-4-amina  
 1-(2-metilpropil)-2-(propiltio)-1H-imidazo[4,5-c]  
 quinolin-4-amina  
 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]  
 quinolin-2-il](metil)amino]etanol  
 10 acetato de 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-  
 imidazo[4,5-c] quinolin-2-il](metil)amino]etila  
 4-amino-1-(2-metilpropil)-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]  
 quinolin-2-ona  
 N2-butil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-  
 15 imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina  
 N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis  
 (fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina  
 N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-  
 imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina  
 20 N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-  
 1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina  
 1-{4-amino-2-[metil(propil)amino]-1H-imidazo[4,5-c]-il}  
 -2-metilpropan-2-ol  
 1-{4-amino-2-(propilamino)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-  
 25 1-il}-2-metilpropan-2-ol  
 N4,N4-dibenzil-1-(2-metóxi-2-metilpropil)-N2-propil-  
 1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina.  
 Saponinas [capítulo 22 da ref. 131], que são um grupo  
 heterólogo de glicosídeos de esterol e glicosídeos de  
 30 triterpenóide que são encontrados na casca, folhas, caules,

raizes e mesmo flores de uma variedade ampla de espécies de planta. A saponina da casca da árvore *Molina Quillaia saponaria* foi amplamente estudada como adjuvante. A saponina pode também ser comercialmente obtida de *Smilax ornata* (salsaparrilha), *Gypsophilla paniculata* (véu de noiva), e *Saponaria officianalis* (raiz de sabão). As formulações de adjuvante saponina incluem formulações purificadas, tais como QS21, assim como formulações de lipídio, tais como [SCOMs QS2] é comercializado como 5 Stimulon™. As composições de saponina foram purificadas usando HPLC e RP-HPLC. As frações purificadas específicas usando estas técnicas foram identificadas, incluindo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B e QH-C. Preferivelmente, a saponina é QS21. Um método de produção de QS21 é divulgado 10 na referência. 101. As formulações de saponina podem também compreender um esterol, tal como colesterol [102].

15

As combinações de saponinas e colesteróis podem ser usadas para formar as partículas originais chamadas complexos imunoestimulantes (ISCOMs) [capítulo 23 da ref. 20 131]. ISCOMs tipicamente também incluem um fosfolipídio, tal como fosfatidiletanolamina ou fosfatidilcolina. Qualquer saponina conhecida pode ser usada em ISCOMs. Preferivelmente, o ISCOM inclui um ou mais de QuilA, QHA e QHC. ISCOMs são ainda descritos nas refs. 102-104. 25 Opcionalmente, o ISCOMS pode ser desprovido de detergente adicional [105]. Uma revisão do desenvolvimento de adjuvantes à base de saponina pode ser encontrada nas refs. 106 e 107.

30 - As toxinas ADP-ribosilantes bacterianas (por exemplo, enterotoxina instável ao calor *E.coli* "LT", toxina de

cólera "CT", ou toxina de coqueluche "PT") e derivados desintoxicados das mesmas, tais como as toxinas mutantes conhecidas como LT-K63 e LT-R72 [108]. O uso de toxinas ADP-ribosilantes desintoxicadas como adjuvantes mucosos é 5 descrito na ref. 109 e como adjuvantes parenterais na ref. 110.

- Bioadesivos e mucoadesivos, tais como microsferas de ácido hialurônico esterificadas [111] ou quitosana e seus derivados [112].

10 - As micropartículas (isto é, uma partícula de ~100nm a ~150 $\mu$ m em diâmetro, mais preferivelmente ~200nm a ~30 $\mu$ m em diâmetro, ou ~500nm a ~10 $\mu$ m em diâmetro) formadas dos materiais que são biodegradáveis e não tóxicos (por exemplo, um ácido poli(a-hidróxi), um ácido polihidróxibutírico, um 15 poliortoéster, um polianidrido, uma policaprolactona, etc.), com poli(lactida-co-glicolida) sendo preferida, opcionalmente tratada para ter uma superfície negativamente carregada (por exemplo, com SDS) ou uma superfície positivamente carregada (por exemplo, com um detergente 20 catiônico, tal como CTAB).

- Lipossomas (Capítulos 13 e 14 da ref. 131). Os exemplos de formulações de lipossoma apropriadas para uso como adjuvantes são descritas nas refs. 113-115.

25 - Éteres de polioxietileno e ésteres de polioxietileno [116]. Tais formulações adicionais incluem tensoativos de éster de sorbitano polioxietileno em combinação com um octoxinol [117] assim como éteres de alquil polioxietileno ou tensoativos de éster em combinação com pelo menos um tensoativo não iônico adicional, tal como um octoxinol 30 [118]. Os éteres de polioxietileno preferidos são

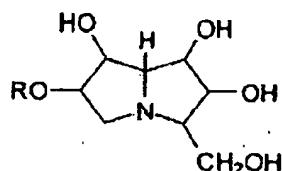
selecionados do seguinte grupo: éter de polioxietileno-9-lauril (lauret 9), éter de polioxietileno-9-esteoril, éter de polioxietileno-8-esteoril, éter de polioxietileno-4-lauril, éter de polioxietileno-35-lauril, e éter de 5 polioxietileno-23-lauril.

- Peptídeos de muramil, tais como N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina ("thr-MDP"), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitóxi propilamida 10 ("DTP-DPP", ou "Teramida™"), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidróxifosforilóxi)-etilamina ("MTP-PE").

- Uma preparação de proteossoma de proteína de membrana externa preparada de uma primeira bactéria Gram-negativa em combinação com uma preparação de lipossacarídeo (LPS) derivada de uma segunda bactéria Gram-negativa, em que o proteossoma de proteína de membrana externa e preparações de LPS forma um complexo adjuvante não covalente estável. Tais complexos incluem "IVX- 908", um 20 complexo compreendido de membrana externa de *Neisseria meningitidis* e LPS.

- 5'-monofosfato de metil inosina ("MIMP") [119].

- Um composto de pirrolizidina polihidroxilada [120], tal como um tendo a fórmula:

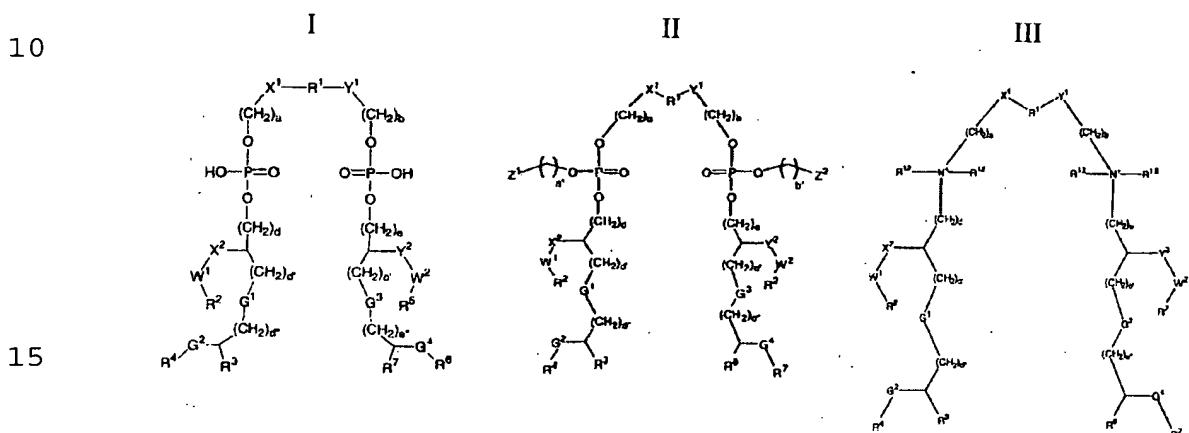


onde R é selecionado do grupo compreendendo grupos hidrogênio, reta ou ramificada, não substituído ou 30 substituído, saturado ou insaturado acila, alquila (por

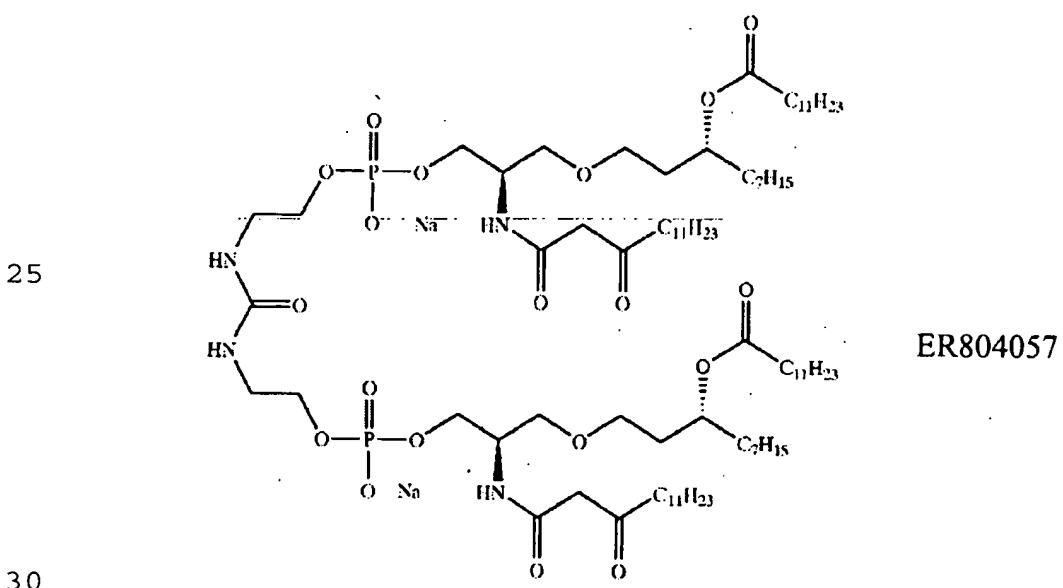
exemplo, cicloalquila), alquenila, alquinila e arila, ou um sal ou derivado farmaceuticamente aceitável dos mesmos. Os exemplos incluem, mas não são limitados a: casuarina, casuarina-6- $\alpha$ -D-glucopiranose, 3-*epi*-casuarina, 7-*epi*-casuarina, 3,7-die*epi*-casuarina, etc.

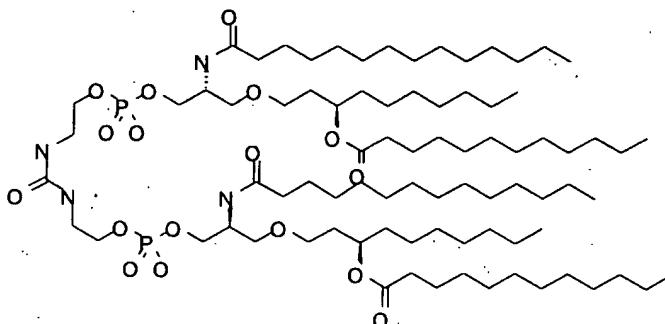
- Uma gama inulina [121] ou derivado da mesma, tais como algamulina.

Um composto de fórmula I, II ou III, ou um sal do mesmo:



como definido na referência 122, tais como 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', 'ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER 804680', 'ER 804764', 'ER 803022' ou 'ER 20 804057' por exemplo:



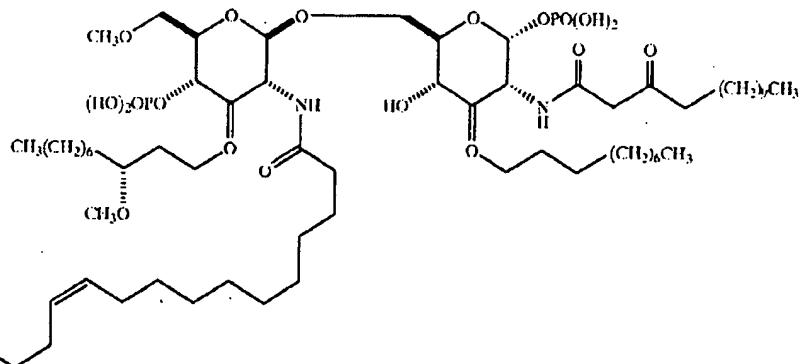


ER-803022:

- Derivados de lipídio A de *Escherichia coli*, tal como OM-174 (descrito nas refs. 123 e 124).

- Uma formulação de um lipídio catiônico e co-lipídio (geralmente neutro), tal como aminopropil-dimetil-10 miristoleiloxi-propanamínio brometo-difitanoilfosfatidiletanolamina ("Vaxfectin™") ou aminopropil-dimetil-bis-dodecileloxi-propanamínio brometo-dioleoilfosfatidiletanolamina ("GAP-DLRIE: DOPE"). Formulações contendo sais de de (+)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(syn-9-15 tetradeceneiloxi)-1-propanamínio são preferidos [125].

- Os compostos contendo lipídios ligados a uma estrutura principal acíclica contendo fosfato, tal como TLR4 antagonista E5564 [126,127]:



25 Estas e outras substâncias ativas adjuvantes são discutidas mais detalhadamente nas referências 131 e 132.

As composições podem incluir dois ou mais dos referidos adjuvantes.

Os antígenos e adjuvantes em uma composição estarão 30 tipicamente em mistura.

Adjuvantes de emulsão óleo em água

As emulsões óleo em água são particularmente úteis como adjuvantes. Várias tais emulsões são conhecidas, e incluem tipicamente pelo menos um óleo e pelo menos um tensoativo, com o(s) óleo(s) e tensoativo(s) sendo biodegradáveis (metabolisáveis) e biocompatíveis. As gotas de óleo na emulsão são geralmente menos de 5µm em diâmetro, e podem mesmo ter um diâmetro de submícron, com estes tamanhos pequenos sendo conseguidos com um microfluidizador para fornecer emulsões estáveis. As gotas com um tamanho menor do que 220nm são preferidas enquanto podem ser submetidas à esterilização de filtro.

A invenção pode ser usada com óleos, tais como aqueles de uma fonte animal (como peixes) ou vegetal. As fontes para óleos vegetais incluem frutos secos, sementes e grãos. O óleo de amendoim, óleo de soja, óleo de coco, e óleo de oliva, os mais geralmente disponíveis, exemplificam os óleos de fruto seco. O óleo de jojoba pode ser usado, por exemplo, obtido da fava de jojoba. Os óleos de semente incluem óleo de girassol, óleo de semente de algodão, óleo de semente de girassol, óleo de semente de gergelim e semelhantes. No grupo de grão, o óleo de milho é o mais prontamente disponível, mas o óleo de outros grãos de cereal tais como trigo, aveia, centeio, arroz, teff, triticale e semelhantes pode também ser usados. 6-10 Os ésteres de ácido graxo de carbono de glicerol e 1,2-propanodiol, ao não ocorrer naturalmente em óleos de semente, podem ser preparados por hidrólise, separação e esterificação dos materiais de partida apropriados dos óleos de fruto seco e semente. As gorduras e óleos do leite

mamífero são metabolizáveis e podem portanto ser usados na prática desta invenção. Os procedimentos para separação, purificação, saponificação e outros meios necessários para obter óleos puros das fontes animais são conhecidos na 5 técnica. A maioria de peixes contém óleos metabolizáveis que podem prontamente ser recuperados. Por exemplo, óleo de fígado de bacalhau, óleos de fígado de tubarão, e óleo de baleia, tal como espermacete exemplificam diversos dos óleos de peixes que podem ser usados aqui. Vários óleos de 10 cadeia ramificados são sintetizados bioquimicamente em 5 unidades de isopreno de 5-carbono e são geralmente referidas como terpenóides. O óleo de fígado de tubarão contém terpenóides ramificados, insaturados conhecidos como escaleno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22- 15 tetracosahexaeno, que é particularmente preferido aqui. O escaleno, o análogo saturado ao escaleno, é também um óleo preferido. Os óleos de peixes, incluindo escaleno e escalano, estão prontamente disponíveis das fontes comerciais ou podem ser obtidos por métodos conhecidos na 20 técnica. Outros óleos preferidos são os tocoferóis (veja abaixo). As misturas de óleos podem ser usadas.

Os tensoativos podem ser classificados por seu 'HLB' (balanço hidrófilo/lipofílico). Os tensoativos preferidos da invenção têm um HLB de pelo menos 10, preferivelmente 25 pelo menos 15, e mais preferivelmente pelo menos 16. A invenção pode ser usada com tensoativos incluindo, mas não limitados a: tensoativos de ésteres de sorbitano polioxietileno (geralmente referidos como Tweens), especialmente polisorbato 20 e polisorbato 80; copolímeros 30 de óxido de etileno (EO), óxido de propilene (PO), e/ou

óxido de butileno (BO), vendido sob o nome comercial de DOWFAX™, tal como copolímeros bloco EO/PO lineares; octoxinóis, que podem variar no número de grupos etóxi repetidos (oxi-1,2-etanodiil), com octoxinol-9 (Triton X-5 100, ou t-octilfenóxipolietóxietanol) sendo de interesse particular; (octilfenóxi)polietóxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolipídios, tais como fosfatidilcolina (lecitina); éteres graxos de polioxietileno derivados dos álcoois lauril, cetil, estearil e oleil (conhecidos como 10 tensoativos de Brij), tais como éter de monolauril trietilenoglicol (Brij 30); e ésteres de sorbitano (geralmente conhecidos como os SPANS), tais como trioleato de sorbitano (Span 85) e monolaurato de sorbitano. Os tensoativos preferidos para incluir na emulsão são Tween 80 15 (monooleato de sorbitano polioxietileno), Span 85 (trioleato de sorbitano), lecitina e Triton X-100. As misturas de tensoativos podem ser usadas, por exemplo, misturas de Tween 80/Span 85.

Os adjuvantes de emulsão óleo em água específicos 20 úteis com a invenção incluem, mas não são limitados a:

- Uma emulsão submícron de escaleno, Tween 80, e Span 85. A composição da emulsão por volume pode ser aproximadamente 5% de escaleno, aproximadamente 0,5% de polisorbato 80 e aproximadamente 0,5% de SPANS 85. Em 25 termos de peso, estas razões se tornaram 4,3% de escaleno, 0,5% de polisorbato 80 e 0,48% de SPANS 85. Este adjuvante é conhecido como 'MF59' [128-130], como descrito mais detalhadamente no capítulo 10 da ref. 131 e capítulo 12 da ref. 132. A emulsão MF59 inclui vantajosamente íons de 30 citrato, por exemplo, 10 mM de tampão de citrato de sódio.

- Uma emulsão de escaleno, um tocoferol, e Tween 80. A emulsão pode incluir solução salina tamponada de fosfato. Pode também incluir Span 85 (por exemplo, em 1%) e/ou lecitina. Estas emulsões podem ter de 2 a 10% de escaleno, 5 de 2 a 10% de tocoferol e de 0,3 a 3% de Tween 80, e a razão de peso de escaleno:tocoferol é preferivelmente  $\leq 1$ , pois isto fornece uma emulsão mais estável. Tal emulsão pode ser feita dissolvendo Tween 80 em PBS para dar uma solução de 2%, misturando então 90ml desta solução com uma 10 mistura de (5g de DL- $\alpha$ -tocoferol e 5ml de escaleno), microfluidizando então a mistura. A emulsão resultante pode ter gotas de óleo de submícrons, por exemplo, com um diâmetro médio entre 100 e 250nm, preferivelmente aproximadamente 180nm.

15 - Uma emulsão de escaleno, um tocoferol, e um detergente Triton (por exemplo, Triton X-100).

- Uma emulsão de escalano, polisorbato 80 e poloxâmero 401 ("Pluronic™ L121"). A emulsão pode ser formulada em solução salina tamponada de fosfato, pH 7,4. Esta emulsão é 20 um veículo de liberação útil para dipeptídeos de muramil, e tem sido usada com treonil-MDP no adjuvante "SAF-1" [133] (0,05-1% Thr-MDP, 5% de escalano, 2,5% de Pluronic L121 e 0,2% de polisorbato 80). Pode também ser usado sem o Thr-MDP, como no adjuvante "AF" [134] (5% de escalano, 1,25% 25 Pluronic L121 e 0,2% polisorbato 80). A microfluidização é preferida.

- Uma emulsão tendo de 0,5-50% de um óleo, 0,1-10% de um fosfolipídio, e 0,05-5% de um tensoativo não iônico. Como descrito na referência 135, os componentes de 30 fosfolipídio preferidos são fosfatidilcolina,

fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina e cardiolipina. Os tamanhos de gota de submícrone são vantajosos.

5 - Uma emulsão óleo em água submícrone de um óleo não metabolisável (tal como óleo mineral leve) e pelo menos um tensoativo (tal como lecitina, Tween 80 ou Span 80). Os aditivos podem ser incluídos, tais como Quila saponina, colesterol, um conjugado de saponina-lipófilo (tal como 10 GPI-0100, descrito na referência 136, produzido pela adição de amina alifática à desacilsaponina através do grupo carboxila de ácido glucurônico), brometo de dimetidioctadecilamônio e/ou N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidróxietil)propanodiamina.

15 - Uma emulsão em que uma saponina (por exemplo, Quila ou QS21) e um esterol (por exemplo, um colesterol) são associados como micelas helicoidais [137].

As emulsões podem ser misturadas com o antígeno extemporaneamente, no momento da liberação. Assim o 20 adjuvante e antígeno podem ser mantidos separadamente em uma vacina empacotada ou distribuída, pronta para formulação final no momento de uso. O antígeno estará geralmente em uma forma aquosa, tal que a vacina é finalmente preparada misturando dois líquidos. A razão de 25 volume dos dois líquidos para misturar pode variar (por exemplo, entre 5:1 e 1:5), mas é geralmente aproximadamente 1:1.

#### Adjuvantes de sal de alumínio

Os adjuvantes conhecidos como hidróxido de alumínio e 30 fosfato de alumínio podem ser usados. Estes nomes são

convencionais, mas são usados para conveniência somente, como nenhum é uma descrição precisa do composto químico real que está presente (por exemplo, veja o capítulo 9 da referência 131). A invenção pode usar quaisquer dos 5 adjuvantes de "hidróxido" ou "fosfato" que estão em uso geral como adjuvantes.

Os adjuvantes conhecidos como "hidróxido de alumínio" são sais tipicamente de oxihidróxido de alumínio, que são geralmente pelo menos parcialmente cristalinos. O 10 oxihidróxido de alumínio, que pode ser representado pela fórmula  $\text{AlO(OH)}$ , pode ser distinto de outros compostos de alumínio, tais como hidróxido de alumínio  $\text{Al(OH)}_3$ , por espectroscopia de infravermelho (IR), em particular pela presença de uma banda de adsorção em  $1070\text{cm}^{-1}$  e um 15 sobreposição forte em  $3090-3100\text{cm}^{-1}$  [capítulo 9 da ref. 131]. O grau de cristalinidade de um adjuvante de hidróxido de alumínio é refletido pela largura da banda de difração na meia altura (WHH), com partículas fracamente cristalinas mostrando maior alargamento de linha devido aos tamanhos de 20 cristalito menores. A área de superfície aumenta enquanto WHH aumenta, e os adjuvantes com valores mais elevados de WHH foram vistos por ter maior capacidade para adsorção de antígeno. Uma morfologia fibrosa (por exemplo, como visto em micrografia de eletrônica de transmissão) é típica para 25 adjuvantes de hidróxido de alumínio. O PI de adjuvantes de hidróxido de alumínio é tipicamente aproximadamente 11, isto é, o próprio adjuvante tem uma carga de superfície positiva em pH fisiológico. As capacidades adsorptivas entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg  $\text{Al}^{+++}$  em pH 7,4 foram 30 relatadas para adjuvantes de hidróxido de alumínio.

Os adjuvantes conhecidos como "fosfato de alumínio" são tipicamente hidróxifosfatos de alumínio, frequentemente também contendo uma pequena quantidade de sulfato (isto é, sulfato de hidróxifosfato de alumínio). Podem ser obtidos 5 por precipitação, e as condições de reação e concentrações durante a precipitação influenciam o grau de substituição de fosfato por hidroxila no sal. Os hidróxifosfatos têm geralmente uma razão molar  $\text{PO}_4/\text{Al}$  entre 0,3 e 1,2. Os hidróxifosfatos podem ser distintos de  $\text{AlPO}_4$  estrito pela 10 presença de grupos hidroxila. Por exemplo, uma banda de espectro de IR em  $3164\text{cm}^{-1}$  (por exemplo, quando aquecido a  $200^\circ\text{C}$ ) indica a presença de hidroxilas estruturais [cap.9 da ref. 131].

A razão molar de  $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$  de um adjuvante de fosfato de 15 alumínio estará geralmente entre 0,3 e 1,2, preferivelmente entre 0,8 e 1,2, e mais preferivelmente  $0,95\pm0,1$ . O fosfato de alumínio será geralmente amorfó, particularmente para sais de hidróxifosfato. Um adjuvante típico é hidróxifosfato de alumínio amorfó com razão molar de  $\text{PO}_4/\text{Al}$  20 entre 0,84 e 0,92, incluído em  $0,6\text{mg Al}^{3+}/\text{ml}$ . O fosfato de alumínio será geralmente particulado (por exemplo, morfologia tipo placa como visto em micrografias de eletrônica de transmissão). Os diâmetros típicos das 25 partículas estão na faixa de  $0,5\text{-}20\mu\text{m}$  (por exemplo, aproximadamente  $5\text{-}10\mu\text{m}$ ) após qualquer adsorção de antígeno. As capacidades adsorptivas entre 0,7-1,5 mg de proteína por mg de  $\text{Al}^{+++}$  em pH 7,4 foram relatadas para adjuvantes de fosfato de alumínio.

O ponto de carga zero (PZC) de fosfato de alumínio é 30 inversamente relacionado ao grau de substituição de fosfato

para hidroxila, e este grau de substituição pode variar dependendo das condições de reação e concentração de reagentes usados preparando o sal por precipitação. PZC é também alterado mudando a concentração de íons fosfato 5 livres em solução (mais fosfato é associado com um PZC mais ácido) ou adicionando um tampão, tal como um tampão de histidina (torna PZC mais básico). Os fosfatos de alumínio usados de acordo com a invenção terão geralmente um PZC entre 4,0 e 7,0, mais preferivelmente entre 5,0 e 6,5, por 10 exemplo aproximadamente 5,7.

As suspensões de sais de alumínio usadas para preparar as composições da invenção podem conter um tampão (por exemplo, um tampão de fosfato ou um de histidina ou um de Tris), mas isto não é sempre necessário. As suspensões são 15 preferivelmente estéreis e livres de pirogênio. Uma suspensão pode incluir os íons de fosfato aquosos livres, por exemplo, presentes em uma concentração entre 1,0 e 20 mM, preferivelmente entre 5 e 15 mM, e mais preferivelmente aproximadamente 10 nM. As suspensões podem também 20 compreender cloreto de sódio.

A invenção pode usar uma mistura de ambos um hidróxido de alumínio e um fosfato de alumínio. Neste caso pode haver mais fosfato de alumínio do que hidróxido, por exemplo, uma razão de peso de pelo menos 2:1, por exemplo, >5:1, >6:1, 25 >7:1, >8:1, >9:1, etc.

A concentração de  $\text{Al}^{+++}$  em uma composição para administração a um paciente é preferivelmente menos do que 10mg/ml, por exemplo, 5 mg/ml, 4 mg/ml, 3 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, etc. Uma faixa preferida está entre 0,3 e 1 mg/ml.

Assim como sacarídeos e/ou conjugado modificados, a composição pode compreender componentes antigênicos adicionais. Por exemplo, a composição pode incluir um ou mais sacarídeos adicionais (mesmo se modificados de acordo com a invenção). Por exemplo, a composição pode compreender sacarídeos de sorogrupos C, W135 e Y de *N. meningitidis* (por exemplo, além de um sacarídeo MenA modificado). Estes serão tipicamente conjugados às proteínas carreadoras, e sacarídeos dos diferentes sorogrupos de *N. meningitidis* podem ser conjugados às mesmas ou proteínas carreadoras diferentes. Onde uma mistura compreende sacarídeos capsulares dos sorogrupos A e C, prefere-se que a razão (peso/peso) de sacarídeo MenA:sacarídeo de MenC seja maior que 1 (por exemplo 2:1, 3:1, 4:1, 5:1; 10:1 ou maior). A imunogenicidade melhorada do componente MenA tem sido observada quando está presente em excesso (massa/dose) ao componente MenC [138].

A composição pode também compreender antígenos de proteína.

Os antígenos que podem ser incluídos na composição da invenção incluem:

- um antígeno de proteína de sorogrupo B de *N. meningitidis* (veja abaixo).

- uma preparação de vesícula de membrana externa (OMV) de *N. meningitidis*, tal como aquelas divulgadas nas refs. 139, 140, 141, 142 etc.

- antígenos de *Helicobacter pylori*, tais como CagA [143 a 146], VacA [147, 148], NAP [149, 150, 151], HopX [por exemplo, 152], HopY [por exemplo, 152] e/ou urease.

- um antígeno de sacarídeo de *Streptococcus pneumoniae*

[por exemplo, 153, 154, 155].

- um antígeno de vírus de hepatite A, tal como vírus inativado [por exemplo, 156, 157].

5 - um antígeno de vírus de hepatite B, tal como antígenos de superfície e/ou núcleo [por exemplo 157, 158].

- um antígeno de vírus de hepatite C [por exemplo, 159].

10 - um antígeno acelular de *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina de coqueluche (PT) e hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B.pertussis*, opcionalmente também em combinação com pertactina e/ou aglutinonêios 2 e 3 [por exemplo, refs. 160 e 161].

- um antígeno de *Bordetella pertussis* celular.

15 - um antígeno de difteria, tal como um toxóide de difteria [por exemplo, capítulo 3 da ref. 162], por exemplo, o mutante CRM<sub>197</sub> [por exemplo, 163].

- antígenos de poliomielite [por exemplo, 164, 165] tais como o vírus de poliomielite inativado (IPV).

20 - um antígeno de tétano, tal como um toxóide de tétano [por exemplo, capítulo 4 da ref. 162].

- um antígeno de sacarídeo de *Haemophilus influenzae* B [por exemplo, refs. 166 a 174].

- antígenos de sarampo, caxumba e/ou rubéola [por exemplo, capítulos 9, 10 e 11 da ref. 162].

25 - um antígeno de *N. gonorrhoeae*.

- um antígeno de *Clamydia pneumoniae* [por exemplo, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181].

- um antígeno de *Clamydia trachomatis* [por exemplo, 182].

30 - um antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por exemplo,

183] .

- antígeno(s) de raiva [por exemplo, 184] tais como vírus inativado liofilizado [por exemplo, 185, RabAvert™] .

5 - antígeno(s) de gripe [por exemplo, 19 da ref. 162] , tal como proteínas de superfície de hemaglutinina e/ou neuraminidase.

- um antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por exemplo, 186] .

10 - um antígeno de *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* de grupo B) [por exemplo 187, 188] .

- um antígeno de sacarídeo de *Streptococcus agalactiae* (*streptococcus* de grupo B) .

- um antígeno de *Streptococcus pyogenes* (*streptococcus* de grupo A) [por exemplo, 188, 189, 190] .

15 - um antígeno de *Staphylococcus aureus* [por exemplo, 191] .

- um antígeno de *Bacillus anthracis* [por exemplo, 192, 193, 194] .

20 - um antígeno de vírus de herpes simplex (HSV). Um antígeno de HSV preferido para uso com a invenção é glicoproteína de membrana gD. Prefere-se usar gD de uma cepa HSV-2 (antígeno 'gD2'). A composição pode usar uma forma de gD em que a região de ancoramento de membrana C-terminal foi deletada [195], por exemplo, um gD truncado 25 compreendendo aminoácidos 1-306 da proteína natural com adição de aparagina e glutamina no C-terminal. Esta forma de proteína inclui o peptídeo de sinal que é clivado para render uma proteína de aminoácido 283 madura. A deleção do ancoramento permite a proteína ser preparada na forma 30 solúvel.

- um antígeno de papilomavírus humano (HPV). Os antígenos de HPV preferidos para uso com a invenção são proteínas de capsídeo L1, que podem montar para formar estruturas conhecidas como partículas tipo vírus (VLPs). Os 5 VLPs podem ser produzidos pela expressão recombinante de L1 em células de levedura (por exemplo, em *S.cerevisiae*) ou em células de inseto (por exemplo, em células de *Spodoptera*, tais como *S.frugiperda*, ou em células de *Drosophila*). Para células de levedura, os vetores de plasmídeo podem carregar 10 o(s) gene(s) de L1; para células de inseto, os vetores de baculovírus podem carregar o(s) gene(s) de L1. Mais preferivelmente, a composição inclui L1 VLPs das cepas de HPV-16 e HPV-18. Esta combinação bivalente foi mostrada por ser altamente eficaz [196]. Além das cepas de HPV-16 e HPV- 15 18, é também possível incluir L1 VLPs de cepas HPV-6 e HPV-11. O uso de cepas de HPV oncogênicas é também possível. Uma vacina pode incluir entre 20-60 $\mu$ g/ml (por exemplo, aproximadamente 40 $\mu$ g/ml) de L1 por cepa de HPV.

- um antígeno de um vírus na família flaviviridae 20 (gênero flavivirus), tal como vírus da febre amarela, vírus da encefalite japonesa, quatro sorotipos de vírus da Dengue, vírus da encefalite do carapato, vírus do Oeste do Nilo.

- um antígeno de pestivirus, tal como de vírus da febre suína clássico, vírus da diarreia viral bovina, e/ou 25 vírus da doença de fronteira.

- um antígeno de parvovírus, por exemplo, de parvovírus B19.

- uma proteína de príon (por exemplo, proteína de príon CJD)

30 - uma proteína amilóide, tal como um beta peptídeo

[197]

- um antígeno de câncer, tal como aqueles listados na Tabela 1 da ref. 198 ou nas tabelas 3 e 4 da ref. 199.

A composição pode compreender um ou mais destes 5 antígenos adicionais.

Os antígenos de proteína tóxicos podem ser desintoxicados se necessário (por exemplo, desintoxicação de toxina de coqueluche por meios químicos e/ou genéticos [161]).

10 Onde um antígeno de difteria é incluído na composição prefere-se também incluir antígeno de tétano e antígenos de coqueluche. Similarmente, onde um antígeno de tétano é incluído prefere-se também incluir antígenos de difteria e de coqueluche. Similarmente, onde um antígeno de coqueluche 15 é incluído prefere-se também incluir antígenos de difteria e de tétano.

Os antígenos podem ser adsorvidos a um sal de alumínio.

Os antígenos na composição estarão tipicamente presentes em uma concentração de pelo menos 1 $\mu$ g/ml cada um. 20 Geralmente, a concentração de qualquer antígeno dado será suficiente para provocar uma resposta imune contra esse antígeno.

Como uma alternativa para usar antígenos de proteínas na composição da invenção, o ácido nucleico codificando o 25 antígeno pode ser usado [por exemplo, refs. 200 a 208]. Os componentes de proteína das composições da invenção podem assim ser substituídos pelo ácido nucleico (preferivelmente DNA, por exemplo, na forma de um plasmídeo) codificando a proteína.

30 Antígenos meningocócicos não sacarídeos

Embora os sacarídeos capsulares de sorogrupos meningocócicos A, C, W135 e Y podem ser usados para gerar imunidade protetora, a mesma abordagem não trabalhou para o sorogrupo B. Assim os sacarídeos e conjugados modificados da invenção podem ser usados juntos (por exemplo, separadamente ou em mistura) com antígenos meningocócicos que não são baseados em sacarídeos capsulares, por exemplo, antígenos de proteína, lipopolissacarídeos, ou vesículas de membrana.

As sequências de genoma para sorogrupos meningocócicos A [209] e B [210,211] foram relatadas, e antígenos de proteína apropriados podem ser selecionados dos polipeptídeos codificados [por exemplo, refs. 212-217]. Os antígenos de candidato foram manipulados para melhorar a expressão heteróloga [refs. 218 a 220].

Uma composição preferida inclui uma proteína Tbp e uma proteína Hsf [221]. Hsf é uma proteína autotransportadora [222-224], também conhecida como nhhA [224], GNA0992 [212] ou NMB0992 [210]. Tbp é a proteína de ligação de transferrina [225-228], e engloba TbpA e TbpB e as formas de alto peso molecular e baixo peso molecular de TbpA e TbpB. Tbp engloba proteínas individuais descritas acima e complexos das proteínas e quaisquer outras proteínas ou complexos das mesmas capazes de ligar transferrina. Embora Tbp possa referir às formas moleculares de alto e baixo peso molecular de TbpA ou TbpB, é preferido que ambas as formas de peso molecular alto e peso molecular baixo de TbpA e/ou TbpB estejam presentes. Mais preferivelmente, TbpA de peso molecular alto e peso molecular baixo está presente.

Outra composição preferida inclui pelo menos um antígeno selecionado de cada um de pelo menos duas categorias diferentes de proteína tendo funções diferentes dentro da *Neisseria*. Os exemplos de tais categorias de 5 proteínas são: adesinas, proteínas autotransportadoras, toxinas, proteínas de membrana externas integrais e proteínas de aquisição de ferro. Estes antígenos podem ser selecionados como segue, usando a nomenclatura de referência 229: pelo menos uma adesina de *Neisseria* 10 selecionada do grupo consistindo de FhaB, NspA PiIC, Hsf, Hap, MafA, MafB, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119 e NadA; pelo menos um autotransportador de *Neisseria* selecionado do grupo consistindo de Hsf, Hap, protease de IgA, AspA, e NadA; pelo menos uma toxina de *Neisseria* selecionada do 15 grupo consistindo de FrpA, FrpC, FrpA/C, VapD, NM-ADPRT (NMB1343) e um ou outro ou ambos LPS imunotipo L2 e LPS imunotipo L3; pelo menos uma proteína de aquisição de Fe de *Neisseria* selecionada do grupo consistindo de TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, HpuA, HpuB, Lipo28 (GNA2132), Sibp, NMB0964, 20 NMB0293, FbpA, Bcp, BfrA, BfrB e P2086 (XthA); pelo menos uma proteína associada à membrana de *Neisseria*, preferivelmente proteína de membrana externa, particularmente proteína de membrana externa integral, selecionada do grupo consistindo de PilQ, OMP85, FhaC, NspA, 25 TbpA, LbpA, TspA, TspB, TdfH, PorB, MItA, HpuB, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA (GNA1946), NMB1124, NMB1162, NMB1220, NMB1313, NMB1953, HtrA, e PLDA (OMPLA). Estas combinações de antígenos de *Neisseria* são ditas conduzir a uma melhora surpreendente da eficácia da vacina contra infecção de 30 *Neisseria* [229].

As composições particularmente preferidas incluem um ou mais dos seguintes cinco antígenos [230]: (1) uma proteína 'NadA', preferivelmente na forma oligomérica (por exemplo, na forma trimérica); (2) uma proteína '741'; (3) 5 uma proteína '936'; (4) uma proteína '953'; e (5) uma proteína '287'.

'NadA' (adesina A de Neisserial) de MenB é divulgado como a proteína '961' na referência 215 (ID. de SEQs. 2943 e 2944) e como 'NMB1994' na referência 210 (veja também o 10 GI de acesso de GenBank: 11352904 e 7227256). Um estudo detalhado da proteína pode ser encontrado na referência 231. Quando usado de acordo com a presente invenção, NadA pode tomar várias formas. As formas preferidas de NadA são variantes de truncamento ou deleção da sequência tipo 15 selvagem, tal como aquelas divulgadas nas referências 218 a 220. Em particular, NadA sem seu ancoramento de membrana C-terminal é preferido (por exemplo, deleção de resíduos 351-405 para a cepa 2996).

A proteína '741' de MenB é divulgada na referência 215 (ID. de SEQs. 2535 e 2536) e como 'NMB 1870' na referência 210 (veja também número de acesso de GenBank: 7227128). A proteína correspondente no sorogrupo A [209] tem o número de acesso de GenBank 7379322. 741 é naturalmente uma lipoproteína. Quando usada de acordo com a presente 20 invenção, a proteína 741 pode tomar várias formas. As formas preferidas de 741 são variantes de truncamento ou deleção da sequência tipo selvagem, tal como aquelas divulgadas nas referências 218 a 220. Em particular, o N-terminal de 741 pode ser deletado até e incluindo sua 25 sequência de poli-glicina (isto é, deleção de resíduos 1 a 30

72 para a cepa MC58), que pode às vezes ser distinguida aqui pelo uso de um prefixo 'ΔG'. Esta deleção pode melhorar a expressão. A deleção também remove sítio de lipidação de '741'. As várias sequências de 741 podem ser 5 encontradas nas ID. de SEQs. 1 a 22 da referência 220, nas ID. de SEQs. 1 a 23 da referência 232, e em ID. de SEQs. 1-299 da referência 233.

A proteína '936' do sorogrupo B é divulgada na referência 215 (ID. de SEQs. 2883 e 2884) e como 'NMB2091' 10 na referência 210 (veja também o número de acesso de GenBank GL7227353). O gene correspondente no sorogrupo A [209] tem o número de acesso de GenBank 7379093. Quando usada de acordo com a presente invenção, a proteína 936 pode tomar várias formas. As formas preferidas de 936 são 15 variantes de truncamento ou deleção da sequência tipo selvagem, tal como aquelas divulgadas nas referências 218 a 220. Em particular, o peptídeo líder N-terminal de 936 pode ser deletado (por exemplo, deleção dos resíduos 1 a 23 para cepa MC58, para dar 936<sup>(NL)</sup>).

20 A proteína '953' do sorogrupo B é divulgada na referência 215 (ID. de SEQs. 2917 e 2918) e como 'NMB1030' na referência 210 (veja também GI de número de acesso de GenBank: 7226269). A proteína correspondente no sorogrupo A [209] tem o número de acesso de GenBank 7380108. Quando 25 usada de acordo com a presente invenção, a proteína 953 pode tomar várias formas. As formas preferidas de 953 são variantes de truncamento ou deleção da sequência tipo selvagem, tal como aquelas divulgadas nas referências 218 a 220. Em particular, o peptídeo líder N-terminal de 953 pode 30 ser deletado (por exemplo, deleção de resíduos 1 a 19 para

cepa MC58).

A proteína '287' de sorogrupo B é divulgada na referência 215 (ID. de SEQs. 3103 e 3104), como 'NMB2132' na referência 210, e como 'GNA2132' na referência 212 (veja 5 também GI de número de acesso de GenBank: 7227388). A proteína correspondente no sorogrupo A [209] tem um número de acesso de GenBank 7379057. Quando usada de acordo com a presente invenção, a proteína 287 pode tomar várias formas. As formas preferidas de 287 são variantes de truncamento ou 10 deleção da sequência tipo selvagem, tal como aquelas divulgadas nas referências 218 a 220. Em particular, o N-terminal de 287 pode ser deletado até e incluir sua sequência de poli-glicina (por exemplo, deleção de resíduos 1 a 24 para a cepa MC58, para dar  $\Delta G287$ ).

15 A proteína 287 é preferivelmente da cepa 2996 ou, mais preferivelmente, da cepa 394/98. A proteína 741 é preferivelmente das cepas de sorogrupo B MC58, 2996, 394/98, ou 95N477, ou da cepa de sorogrupo C90/18311. A cepa MC58 é mais preferida. As proteínas 936, 953 e NadA são 20 preferivelmente da cepa 2996. Onde uma composição inclui um antígeno de proteína particular (por exemplo, 741 ou 287), a composição pode incluir esse antígeno em mais de uma forma variante, por exemplo, a mesma proteína, mas de mais de uma cepa. Estas proteínas podem ser incluídas como 25 proteínas tandem ou separadas.

Outros抗ígenos de polipeptídeo de MenB que podem ser incluídos nas composições da invenção incluem aqueles compreendendo uma das seguintes sequências de aminoácido: ID. de SEQ. Nº.: 650 da ref. 213; ID. de SEQ. Nº.: 878 da 30 ref. 213; ID. de SEQ. Nº.: 884 da ref. 213; ID. de SEQ. Nº.:

4 da ref. 214; ID. de SEQ. Nº.: 598 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 818 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 864 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 866 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 1196 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 1272 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 1274 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 1640 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 1788 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 2288 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 2466 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 2554 de referência 215; ID. de SEQ. Nº.: 2576 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 2606 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 2608 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 2616 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 2668 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº. 2780 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 2932 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 2958 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 2970 da ref. 215; ID. de SEQ. Nº.: 2988 da ref. 215, ou um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido que: (a) tem 50% ou mais identidade (por exemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% ou mais) às referidas sequências; e/ou (b) compreende um fragmento de pelo menos  $n$  aminoácidos consecutivos das referidas sequências, em que  $n$  é 7 ou mais (por exemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou mais). Os fragmentos preferidos para (b) compreendem um epítopo da sequência relevante. Mais do que um (por exemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou mais) destes polipeptídeos pode ser incluídos.

25 Em algumas modalidades, entretanto, a composição da invenção inclui a mesma proteína, mas de mais de uma cepa. Esta abordagem foi descoberta por ser eficaz com a proteína 741. Esta proteína é um antígeno extremamente eficaz para provocar respostas de anticorpo antimeningocócico, e é expressa através de todos os sorogrupos meningocócicos. A

análise filogenética mostra que a proteína se divide em dois grupos, e que uma destas se divide outra vez para dar três variantes no total [234], e enquanto o soro aumentado contra um dado variante é bactericida dentro de mesmo grupo 5 variante, não está ativo contra cepas que expressam uma das outras duas variantes, isto é, há proteção cruzada intra-variante, mas não proteção cruzada de inter-variante [232,234]. Para eficácia máxima de cepa cruzada, portanto,, prefere-se que uma composição deva incluir mais de uma 10 variante de proteína 741.

As composições da invenção incluem um número pequeno (por exemplo, menos do que  $t$  antígenos, onde  $t$  é 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 ou 3) de proteínas de sorogrupo B purificadas.

As proteínas são preferivelmente expressas 15 recombinantemente em um hospedeiro heterólogo e então purificadas. Para uma composição incluindo  $t$  antígenos de MenB, pode haver polipeptídeos de  $t$  separados mas, para reduzir a complexidade ainda mais, prefere-se que pelo menos dois dos antígenos sejam expressos como uma única 20 cadeia de polipeptídeo (uma proteína 'híbrida' [refs. 218 a 220]) isto é tal que os antígenos  $t$  formam menos polipeptídeos  $t$ . As proteínas híbridas oferecem duas vantagens principais: primeiro, uma proteína que pode ser instável ou fracamente expressa por si própria pode ser 25 ajudada adicionando um parceiro híbrido apropriado que supera o problema; segundo, a fabricação comercial é simplificada como somente uma expressão e purificação necessária para ser empregada a fim de produzir duas proteínas separadamente úteis. Um híbrido incluído em uma 30 composição da invenção pode compreender dois ou mais (isto

é, 2, 3, 4 ou 5) das cinco proteínas listadas acima. Os híbridos consistindo de duas das cinco proteínas são preferidos.

Outra composição preferida inclui o 5 lipooligossacarídeo de sorogrupo B (LOS) [235]. O LOS pode ser usado além do(s) polipeptídeo(s) de sorogrupo B ou pode ser usado no lugar dele(s).

As vesículas de membrana podem também ser usadas nas composições. Estas vesículas podem ser de qualquer vesícula 10 proteolipossômica obtidas rompendo uma membrana externa meningocócica para formar vesículas da membrana externa que incluem componentes de proteína da membrana externa. 'OMVs' são preparados artificialmente de bactérias (por exemplo, por tratamento de detergente) e são assim distintos das 15 microvesículas (MVs [236]) e de 'OMVs nativos' ('NOMVs' [237]), ambos os quais são vesículas de membrana de ocorrência natural que se formam espontaneamente durante o crescimento bacteriano e são liberadas no meio de cultura. Os MVs podem ser obtidos cultivando *Neisseria* em meio de 20 cultura de caldo, separando células inteiras das bolhas menores no meio de cultura de caldo, e então coletando os MVs do meio esgotado de célula. As cepas para uso na produção de MVs podem geralmente ser selecionadas com base na quantidade de MVs produzida em cultura, por exemplo, 25 refs. 238 e 239 descrevem *Neisseria* com produção de MV elevada. As vesículas podem também ser obtidas das cepas de nocaute de *mltA* [240].

Para reduzir a atividade pirogênica, prefere-se que a bactéria deva ter baixos níveis de endotoxina (LPS). As 30 bactérias mutantes apropriadas são conhecidas, por exemplo,

*Neisseria* mutante [241] e *Helicobacter* mutante [242]. Os processos para preparar as membranas externas esgotadas de LPS das bactérias gram-negativas são divulgados na referência 243.

5 A bactéria pode ser uma bactéria tipo selvagem, ou pode ser uma bactéria recombinante. As bactérias recombinantes preferidas super-expressam (relativa à cepa tipo selvagem correspondente) imunógenos, tais como NspA, proteína 287 [244], proteína 741 [244], TbpA, TbpB, 10 dismutase superóxido [245], etc. A bactéria pode expressar mais de uma proteína de membrana externa PorA classe I, por exemplo, 2, 3, 4, 5 ou 6 de subtipos PorA: P1.7,16; P1.5,2; P1.19,15; P1.5c,10; P1.12,13; e P1.7h,4 [por exemplo, refs. 246 e 247].

15 Outras bactérias recombinantes que podem ser usadas com a invenção têm uma ou mais mutações para diminuir (ou, preferivelmente, nocautear) a expressão de produtos de gene particulares (por exemplo, veja as refs 248 e 249). Os genes preferidos para para sub-regulação e/ou nocaute 20 incluem: (a) Cps, CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, Gale, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Ope, PilC, PorA, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, e/ou TbpB [248]; (b) CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, Gale, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Ope, PhoP, PilC, PmrE, PmrF, PorA, SiaA, SiaB, SiaC, 25 SiaD, TbpA, e/ou TbpB [249]; (c) transglicosilase lítica NMBOO33 [250]; (d) ExbB, ExbD, rmpM, CtrA, CtrB, CtrD, Gale, LbpA, LpbB, Opa, Ope, PilC, PorA, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, e/ou TbpB [251]; e (e) CtrA, CtrB, CtrD, FrpB, OpA, OpC, PilC, PorA, PorB, SiaD, SynA, SynB, e/ou Sync 30 [252].

As cepas preferidas dentro do sorogrupo B como a fonte para estes antígenos não sacarídeos são MC58, 2996, H44/76, 394/98 e cepa 98/254 da Nova Zelândia. Os melhores sorotipos e cepas para usar, entretanto, dependerão das 5 cepas predominantes em uma posição geográfica particular. Por exemplo, o meningococo pode ser de qualquer sorotipo (por exemplo, 1, 2a, 2b, 4, 14, 15, 16, etc.), de qualquer sorosubtipo (P1.2; P1.4; P1.5; P1.5,2; P1.7,16; P1.7,16b; P1.9; P1.9,15; P1.12,13; P1.13; P1.14; P1.15; P1.21,16; 10 P1.22,14; etc.) e de qualquer imunotipo (por exemplo, L1; L3,3,7; L10; etc.), e as cepas preferidas incluem: (a) B:4:P1.4; (b) B:4:P1.15; (c) B:15:P1.7,16; e (d) B:4:P1.7b,4. O meningococo pode ser de qualquer linhagem apropriada, incluindo linhagens hiperinvasivas e 15 hipervirulentas, por exemplo, quaisquer das seguintes sete linhagens hipervirulentas: subgrupo I; subgrupo III; subgrupo IV-I; ET-5 complexo; ET-37 complexo; A4 conjunto; linhagem 3. Estas linhagens foram definidas pela eletroforese de enzima multilocus (MLEE), mas a tipagem de 20 sequência multilocus (MLST) foi usada também para classificar o meningococci [ref. 253], por exemplo, o ET-37 complexo é o ST-11 complexo por MLST, o ET-5 complexo é ST-32 (ET-5), a linhagem 3 é ST-41/44, etc.

Os antígenos não sacarídeos podem ser usados para 25 induzir uma resposta de anticorpo bactericida de soro que é eficaz contra duas ou três das linhagens de MenB hipervirulentas A4, ET-5 e linhagem 3. Podem adicionalmente induzir respostas de anticorpo bactericidas contra um ou mais das linhagens hipervirulentas subgrupo I, subgrupo III, 30 subgrupo IV-I ou ET-37 complexo, e contra outras linhagens,

por exemplo, linhagens hiperinvasivas. Estas respostas de anticorpo são convenientemente medidas em camundongos e são um indicador padrão da eficácia de vacina [por exemplo, veja a nato final 14 da referêcia 212]. A atividade 5 bactericida de soro (SBA) mede a morte bacteriana mediada por complemento, e pode ser analisada usando complemento humano ou de coelho bebê. Os padrões WHO exigem uma vacina para induzir pelo menos um aumento de 4 vezes em SBA em mais de 90% de receptores.

10 A composição não precisa induzir anticorpos bactericidas contra cada cepa de MenB dentro destas linhagens hipervirulentas; ao invés, para qualquer grupo dado de quatro de mais cepas de meningococo de sorogrupo B dentro de uma linhagem hipervirulenta particular, os 15 anticorpos induzidos pela composição são bactericidas contra pelo menos 50% (por exemplo, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais) do grupo. Os grupos preferidos de cepas incluirão cepas isoladas em pelo menos quatro dos seguintes países: GB, AU, CA, NO, IT, US, NZ, NL, BR, e CU. O soro tem preferivelmente um título bactericida de pelo menos 1024 20 (por exemplo.  $2^{10}$ ,  $2^{11}$ ,  $2^{12}$ ,  $2^{13}$ ,  $2^{14}$ ,  $2^{15}$ ,  $2^{16}$ ,  $2^{17}$ ,  $2^{18}$  ou maior, preferivelmente pelo menos  $2^{14}$ ) isto é, o soro é capaz de matar pelo menos 50% das bactérias teste de uma 25 cepa particular quando diluído 1/1024, como descrito na referêcia 212.

As composições preferidas podem induzir respostas bactericidas contra as seguintes cepas de meningococo de sorogrupo B: (i) de conjunto A4, cepa 961-5945 (B:2b:P1.21,16) e/ou cepa G2136 (B:-); (ii) de ET-5 30 complexo, cepa MC58 (B:15:P1.7,16b) e/ou cepa 44/76

(B:15:P1.7,16); (iii) de linhagem 3, cepa 394/98 (B:4:P1.4) e/ou cepa BZ198 (B:NT:-). Mais composições preferidas podem induzir respostas bactericidas contra as cepas 961-5945, 44/76 e 394/98. As cepas 961-5945 e G2136 são ambas as 5 cepas de referência de *Neisseria* MLST [ids. 638; 1002 na ref. 254]. A cepa MC58 está amplamente disponível (por exemplo, ATCC BAA-335) e foi a cepa sequenciada na referência 210. A cepa 44/76 foi amplamente utilizada e caracterizada (por exemplo, ref. 255) e é uma das cepas de 10 referência de *Neisseria* MLST [id. 237 na ref. 254; fileira 32 da tabela 2 na ref. 256]. A cepa 394/98 foi originalmente isolada na Nova Zelândia em 1998, e houve diversos estudos publicados usando esta cepa (por exemplo, refs. 257 e 258). A cepa BZ198 é outra cepa de referência 15 de MLST [id. 409 na ref. 254; fileira 41 da tabela 2 na ref. 256]. A composição pode adicionalmente induzir uma resposta bactericida contra a cepa LNP17592 de sorogrupo W135 (W135:2a:P1.5,2), de ET-37 complexo.

#### Geral

20 O termo "compreendendo" engloba "incluso" assim como "consistindo", por exemplo uma composição "compreendendo" X pode consistir exclusivamente em X ou pode incluir algo adicional, por exemplo, X + Y.

A palavra "substancialmente" não exclui 25 "completamente", por exemplo, uma composição que está "substancialmente livre" de Y pode estar completamente livre de Y. Onde necessário, a palavra "substancialmente" pode ser omitida da definição da invenção.

O termo "aproximadamente" com relação a um valor 30 numérico x significa, por exemplo,  $x \pm 10\%$ .

O termo "alquila" é usado aqui para se referir aos grupos alquila em formas reta e ramificada. Entretanto, o termo "alquila" refere-se geralmente aos grupos alquila em formas retas. O grupo alquila pode ser interrompido com 1, 5 2 ou 3 heteroátomos selecionados -O, -NH- ou -S. O grupo alquila pode também ser interrompido com 1, 2 ou 3 ligações duplas e/ou triplas. Entretanto, o termo "alquila" refere-se geralmente ao grupo alquila não tendo nenhuma interrupção de heteroátomo ou interrupções de ligação dupla 10 ou tripla. Onde referência é feita a alquila C<sub>1-6</sub>, significa que o grupo alquila pode conter qualquer número de átomos de carbono entre 1 e 6 (por exemplo C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>).

O termo "alquíleno" é usado aqui para se referir a um grupo alquila divalente, como definido acima. Onde 15 referência é feita ao alquíleno C<sub>1-5</sub>, significa que o grupo alquíleno pode conter qualquer número de átomos de carbono entre 1 e 5 (por exemplo, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>). Similarmente, onde referência é feita ao alquíleno C<sub>1-4</sub>, significa que o grupo alquíleno pode conter qualquer número de átomos de 20 carbono entre 1 e 4 (por exemplo, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>).

O termo "grupo amino" inclui grupos de fórmula -NH<sub>2</sub> ou -NH-E, onde E é um grupo protetor de nitrogênio. Os exemplos de grupos protetores de nitrogênio típicos são descritos acima.

25 O termo "amina" significa um grupo de fórmula -NH<sub>2</sub>, a menos que o contexto indicar de outra maneira.

O termo "sacarídeo capsular modificado" significa um sacarídeo que é obtenível de um sacarídeo capsular nativo pela modificação apropriada. Consequentemente, a sequência 30 básica de unidades de repetição de monossacarídeo no

sacarídeo capsular nativo é retida nos sacarídeos capsulares modificados da presente invenção.

O termo "sacarídeo" engloba oligossacarídeos (por exemplo, contendo 2 a 39 unidades de monossacarídeo) e 5 polissacarídeos (por exemplo, contendo 40 ou mais unidades de monossacarídeo). Como encontrado naturalmente nas bactérias, os sacarídeos capsulares nativos tomam geralmente a forma de polissacarídeos. Os polissacarídeos podem ser manipulados para dar oligossacarídeos mais curtos. 10 Os oligossacarídeos podem ser obtidos por purificação e/ou despolimerização seguido por dimensionamento do polissacarídeo nativo (por exemplo, por hidrólise em ácido suave, por aquecimento, por cromatografia de dimensionamento etc.).

15 Onde os materiais animais (e particular bovinos) são usados na cultura de células, devem ser obtidos das fontes que estão livres de encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs), e em particular livres de encefalopatia espongiforme bovina (EBS). No geral, prefer-se para células de cultura na ausência total de materiais 20 derivados de animal.

Será apreciado que os grupos ionizáveis podem existir na forma neutra mostrada nas fórmulas aqui, ou podem existir na forma carregada, por exemplo, dependendo do pH. 25 Assim um grupo fosfato pode ser mostrado como  $-P-O-(OH)_2$ , esta fórmula é meramente representativa do grupo fosfato neutro, e outras formas carregadas são englobadas pela invenção. Similarmente, as referências aqui aos grupos catiônicos e aniônicos devem ser tiradas para referir à 30 carga que está presente nesse grupo sob condições

fisiológicas, por exemplo, onde uma amina  $-NH_2$  é protonada para dar o grupo catiônico  $NH^{3+}$ , esta protonação é uma que ocorre em pH fisiológico. Além disso, onde uma carboxila  $-COOH$  é deprotonada para dar o grupo aniónico  $-COO^-$ , esta 5 protonação pode ocorrer em pH fisiológico. Além disso, a invenção engloba sais das formas carregadas de moléculas da invenção. Os anéis de açúcar podem existir na forma aberta e fechada e, enquanto as formas fechadas são mostradas em fórmulas estruturais aqui, as formas abertas são também 10 englobadas pela invenção. Similarmente, a invenção engloba formas isoméricas das moléculas da invenção, incluindo tautômeros (por exemplo, tautômeros de imina/enamina), conformadores, enantiômeros, diastereoisômeros, etc.

Após o sorogrupo, a classificação meningocócica inclui 15 sorotipo, sorosubtipo e então imunotipo, e a nomenclatura de padrão lista sorogrupo, sorotipo, sorosubtipo, e imunotipo, cada um separado por dois pontos, por exemplo B:4:P1.15:L3,7,9. Dentro do sorogrupo B, algumas linhagens causam doença frequentemente (hiperinvasiva), algumas 20 linhagens causam formas mais severas de doença do que outras (hipervirulentas), e outras raramente causam doença. Sete linhagens hipervirulentas são reconhecidas, especificamente subgrupos I, III e IV-I, ET-5 complexo, ET- 25 37 complexo, conjunto A4 e linhagem 3. Estes foram definidos por eletroforese de enzima multilocus (MLEE), mas tipagem de sequência multilocus (MLST) foi usada também para classificar o meningococci [ref. 256].

#### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A Figura 1 fornece um esquema para a síntese química 30 de conjugados de MenA CRM<sub>197</sub>. As estruturas predominantes de

"MenA10/90" (oligossacarídeo MenA compreendendo um grupo bloqueador de 4,5-dihidróxipentilcarbamato em aproximadamente 10% das unidades de monossacarídeo e um grupo bloqueador 2-hidróxietilcarbamato em aproximadamente 5 90% das unidades de monossacarídeo) e "MenA 10/0" (oligossacarídeo MenA compreendendo um grupo bloqueador 4,5-dihidróxipentilcarbamato em aproximadamente 10% das unidades de monossacarídeo) são representados.

A Figura 2 fornece o perfil analítico de troca de 10 ânion em oligossacarídeos de MenA 214 mmantes (pained A) e após dimensionamento (pained B).

A Figura 3 fornece o espectro de 600 MHz  $^1\text{H}$  em 25°C de oligossacarídeo MenA sem a modificação química (pained A), oligossacarídeo MenA 10/90 (pained B) e oligossacarídeo 15 MenA10/0 (pained C).

A Figura 4 compara a porcentagem de fosfomonooéster desenvolvida durante o armazenamento em 37°C pelo oligossacarídeo MenA sem modificação química, oligossacarídeo MenA 10/90 e oligossacarídeo MenA10/0.

20 A Figura 5 fornece o espectro  $^{31}\text{P}$  NMR de oligossacarídeo MenA.

Figura 6 compara o grau de polimerização (DP), medido por  $^{31}\text{P}$  NMR, durante o armazenamento em 37°C de oligossacarídeo MenA sem modificação química, 25 oligossacarídeo MenA10/90 e oligossacarídeo MenA10/0.

A Figura 7 fornece o perfil de SDS-PAGE de conjugados de oligossacarídeo de CRM-MenA: Marcadores Linha M - Mw; Linha 1 - CRM; Linha 2 - CRM-MenA 10/90; e linha 3 - CRM-MenA 10/0.

30 A Figura 8 compara o sacarídeo livre (FS) liberado

durante o armazenamento em 37°C dos conjugado de oligossacarídeo CRM-MenA10/90 e conjugados de oligossacarídeo de CRM-MenA10/0.

A Figura 9 compara a porcentagem de fosfomonoéster desenvolvida durante o armazenamento em 37°C pelos conjugados de oligossacarídeo CRM- MenA 10/90 e conjugados de oligossacarídeo CRM-MenA 10/90.

#### MODOS PARA REALIZAR A INVENÇÃO

##### EXEMPLO 1

###### Modificação de oligossacarídeo de Men A

###### Hidrólise controlada de polissacarídeo MenA

Os oligossacarídeos de MenA foram gerados por hidrólise química de uma solução de polissacarídeo MenA. Momentaneamente, o polissacarídeo MenA foi solubilizado em uma concentração final de 10 mg/ml em 50 mM de tampão de acetato, pH 4,75. A solução foi aquecida em 73°C até que um grau de polimerização (DP) de aproximadamente 10 fosse alcançado. A hidrólise foi controlada monitorando a variação da atividade ótica da solução (a Hg 365 nm) sobre o tempo de acordo com a seguinte equação:  $DP=1/(0,5817[1-(\alpha_t/\alpha_m)])$ , onde o  $\alpha_m$  é o valor médio do poder rotatório ótico de 6 amostras quando a solução de temperatura é 50°C, e  $\alpha_t$  é o poder rotatório ótico no tempo t. A hidrólise foi parada quando o valor de a correspondendo a um DP de 10 foi alcançado. No fim da reação de hidrólise a solução foi resfriada na temperatura ambiente e o pH corrigido para aproximadamente 6,5.

###### Fracionamento de tamanho de oligossacarídeo MenA

A hidrólise ácida controlada de polissacarídeo MenA

gera uma polidispersão com o DP médio alvo. Para a

preparação conjugada, a polidispersão de oligossacarídeo pode ser mais restringida usando um fracionamento de tamanho de duas etapas. Estas etapas de dimensionamento mudam tipicamente o DP dos oligossacarídeos de MenA de um valor de aproximadamente 10 a um valor entre 15 e 20, como medido pela razão molar entre valores de fósforo total (Pt) e fosfato de monoéster terminal (Pm). A concentração de Pt foi determinada de acordo com o método descrito na referência 259 e Pm foi determinado medindo o fosfato inorgânico liberado pela reação enzimática com fosfatase ácida de batata [260].

Momentaneamente, o hidrolisado de MenA ultrafiltrado primeiramente através de uma membrana de fluxo tangencial de 30 KDa para remover espécies de alto peso molecular. Durante este procedimento o produto foi concentrado aproximadamente 10 vezes e então diafiltrado contra 13 volumes de tampão de acetato 5 mM, pH 6,5. O permeado, contendo os oligossacarídeos desejados, foi coletado enquanto o retido foi rejeitado.

Na segunda etapa, o permeado foi fracionado por cromatografia de coluna de troca aniónica. Esta etapa é projetada para remover espécies de Mw baixa caracterizada por um DP de menos de 6, que podem ser fracamente imunogênicas [261]. A mistura de oligossacarídeo obtida da ultrafiltração de 30 KDa foi carregada em uma coluna embalada com Q-Sefarose Fast Flow equilibrada previamente com 5 mM de acetato de sódio, pH 6,5. A razão oligossacarídeo/volume embalado foi 17 mg/ml de resina embalada. A coluna foi lavada então com 5 volumes de coluna (cv) do tampão de equilíbrio. Uma lavagem de 10 cv de 5 mM

de tampão de acetato de sódio/125 mM de NaCl, pH 6,5 foi então aplicado à coluna para eluir oligossacarídeos de DP  $\leq 6$ . A fração de oligossacarídeo desejada foi então recuperada por eluição com 5 mM de tampão de acetato de sódio/125 mM de NaCl, pH 6,5. A remoção com 5 cv de NaCl 2M e sanitização com 1M de NaOH terminaram o procedimento.

A cromatografia de troca de ânion analítica foi usada para medir a polidispersão de oligossacarídeo antes e depois do fracionamento. Momentaneamente, as polidispersões de oligossacarídeo MenA foram analisadas por HPLC que usando uma coluna Mono-Q HR 5/5. Após equilíbrio com água, 1 ml de amostra contendo aproximadamente 1 mg de sacarídeo foi carregado na coluna, que foi então desenvolvida com uma forma linear de 0 a 60% de NaCl 1 M na taxa de fluxo de 0,5 ml. O cromatograma foi monitorado em 214 nm. Uma preparação padrão de um oligossacarídeo MenA monodispersado tendo um DP definido de 5 e 6 respectivamente como evidenciado pela espectrometria de massa e  $^1\text{H}$  NMR, foi usado para identificar a presença ou remoção de oligossacarídeos tendo um DP menor de 6 nas amostras de polidispersão testadas. A Figura 2 mostra os perfis analíticos do hidrolisado (painele A) em comparação ao oligossacarídeo MenA dimensionado (painele B).

#### Troca de contra-íon

O eluato de Q-Sefarose do procedimento de fracionamento de tamanho de duas etapas foi ultrafiltrado em uma membrana de 3 KDa a fim de trocar o contra-íon de sódio com tetrabutilamônio, que conferencia solubilidade ao oligossacarídeo em solventes não aquosos. Momentaneamente, a solução de oligossacarídeo MenA diafiltrada contra 4

volumes de 10 mM de tetrabutilamôniobrometo seguido por 10 volumes de água. O retido, contendo o produto desejado, foi coletado e o permeado descartado. A água foi removida do retido por evaporação rotatória.

5                   Modificação química de oligossacarídeo MenA

O oligossacarídeo MenA foi modificado usando ativação de 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) seguida pela reação com 1-amino-4,5-pentandiol (APD) sozinho ou APD e 2-aminoetanol (ETA), a fim de obter duas estruturas alvo diferentes 10 (Figura 1):

i) Oligossacarídeo MenA compreendendo um grupo bloqueador de 4,5-dihidróxipentilcarbamato em aproximadamente 10% das unidades de monossacarídeo e um grupo bloqueador de 2-hidróxietilcarbamato em 15 aproximadamente 90% das unidades de monossacarídeo (MenA 10/90); e

ii) Oligossacarídeo MenA compreendendo um grupo bloqueador de 4,5-dihidróxipentilcarbamato em aproximadamente 10% das unidades de monossacarídeo (MenA 20 10/0).

Momentaneamente, o oligossacarídeo MenA derivado da ultrafiltração de membrana de 3 KDa descrito acima foi solubilizado em DMSO a uma concentração final de aproximadamente 10 mg/ml. A esta solução um excesso molar 25 de 20 vezes de CDI (relativo ao número de mols de unidades de monossacarídeo MenA) foi adicionado e a solução foi agitada em temperatura ambiente por 2 horas. A solução de oligossacarídeo ativada foi então adicionada a 9 volumes de acetato de etila frio (-20°C) seguido por uma solução de 2 30 M de CaCl<sub>2</sub> a uma concentração final equimolar com as

unidades de monossacarídeo MenA. A mistura foi agitada por 30 minutos e, após sedimentação do oligossacarídeo, a maioria do sobrenadante foi removida por sucção e o pélete recuperado por centrifugação, lavado 3 vezes com acetato de etila e seco sob vácuo.

Para adição de grupos bloqueadores, o oligossacarídeo ativado foi solubilizado em DMSO a uma concentração final de 10 mg/ml. Para obter o oligossacarídeo "MenAlO/0", um excesso molar de 0,1 vez (relativo ao número de mols de 10 unidades de monossacarídeo MenA) de APD foi adicionado, e a reação foi agitada por 2 horas em temperatura ambiente. Após este tempo, dezenove volumes de tampão de fosfato de sódio 0,25 M, pH 6.5 foram adicionados sob agitação. Qualquer opalescência formada durante esta operação foi 15 removida por filtragem através de uma membrana de 0,2 µm. Para obter o oligossacarídeo "MenA 10/90", um excesso molar de 0,6 vez de trietilamina e um excesso de molar de 0,1 vez de APD foi adicionado e a reação foi agitada por 2 horas em temperatura ambiente. Subsequentemente, um excesso molar de 20 50 vezes (relativo ao número de mols de unidades de monossacarídeo MenA) de ETA foi adicionado e a reação continuou sob agitação por 2 horas adicionais. Mais uma vez, após este tempo dezenove volumes de tampão de fosfato de sódio de 0,25 M, pH 6,5 foram adicionados sob agitação e 25 qualquer opalescência foi removida por filtragem através de uma membrana de 0,2 µm.

As soluções cruas de oligossacarídeo derivatizado foram purificadas do excesso de reagentes de baixo peso molecular por ultrafiltração em uma membrana de 3 KDa. As 30 soluções foram primeiramente concentradas aproximadamente a

20 vezes e então diafiltradas contra 10 volumes de tampão de fosfato de sódio de 0,1 M, pH 7,2, seguido por 10 volumes de água destilada. Os produtos purificados foram recuperados dos retidos, com os permeados sendo descartados.

5 Confirmação de modificações químicas por  $^1\text{H}$  NMR

Os oligossacarídeos de MenA quimicamente modificados foram caracterizados por NMR para confirmar que as modificações químicas desejadas tinham ocorrido.

O espectro de  $^1\text{H}$  NMR do oligossacarídeo MenA nativo é mostrado na figura 3, painel A. O espectro está em conformidade com a literatura publicada [262, 263].  $^1\text{H}$  NMR conduzido em APD e ETA puros deu os seguintes sinais: sinais de APD:  $\text{HOCH}_2^{\text{A}}\text{CH}^{\text{B}}(\text{OH})\text{CH}_2^{\text{C}}\text{CH}_2^{\text{D}}\text{CH}_2^{\text{E}}\text{NH}_2$  ( $\text{H}^{\text{A}}$  em 3,6 ppm,  $\text{H}^{\text{B}}$  em 3,7 ppm,  $\text{H}^{\text{C}}$  em 1,5 ppm,  $\text{H}^{\text{D}}$  em 1,6 ppm,  $\text{H}^{\text{E}}$  em 2,7 ppm); 15 sinais ETA:  $\text{HOCH}_2^{\text{F}}\text{CH}_2^{\text{G}}\text{NH}_2$  ( $\text{H}^{\text{F}}$  em 4,4 ppm,  $\text{H}^{\text{G}}$  em 3,6 ppm). Estas atribuições foram usadas como um guia para identificar os sinais APD e ETA nos espectros dos oligossacarídeos derivatizados. Os espectros de  $^1\text{H}$  NMR do oligossacarídeo MenA 10/90 são relatados na figura 3, 20 painel B. O espectro de  $^1\text{H}$  NMR do oligossacarídeo MenA 10/0 é relatado na figura 3, painel C. A ligação covalente entre ETA ou os grupos APD e os grupos carbonila introduzidos na posição 4 e/ou 3 de N-acetil-mannosamina foi confirmada pela correlação heteronuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) detectada nos 25 espectros de HSQC. Os picos de correlação de faixa longa entre os grupos carbonila e o  $\text{H}^{\text{G}}$  de ETA ou  $\text{H}^{\text{E}}$  de APD foram detectados. Similarmente, os grupos carbonila deram correlação de faixa longa com prótons geminais em posição 3/4 de N-acetil-mannosamina. As porcentagens de grupos APD 30 introduzidos pelo tratamento químico foram estimadas por

integração de sinais selecionados vindo de APD e MenA. Os 5 sinais de  $H^D+H^C$  sobrepostos em 1,5 ppm (grupos APD) foram integrados versus o pico  $H_2$  em 4,6 ppm (oligossacarídeo MenA). Em experimentos diferentes de 6% a 14% das unidades de monossacarídeo MenA foram substituídas com grupos APD. Depois da mesma abordagem, os grupos ETA foram estimados 10 pela razão com sinais  $H^F$  sobrepostos em 3,6 ppm (grupos ETA) versus o pico  $H_2$  em 4,6 ppm (oligossacarídeo MenA). Devido a sobreposição parcial com os sinais APD ( $H^A$  em 3,6 ppm e  $H^B$  em 3,7 ppm) a integral de  $H^F$  foi subtraída por 3/4 do valor de  $H^D+H^C$ . Em experimentos diferentes de 66% a 85% das 15 unidades de monossacarídeo MenA foram substituídas com grupos ETA. Como esperado, na figura 3, os sinais do painel C relativos aos grupos ETA não estão presentes, que 20 confirma a estrutura proposta e a conformidade de NMR como uma ferramenta para a elucidação de estrutura e avaliação de identidade. Figura 3, painel A indica que a O-acetilação é preservada após a hidrólise ácida de polissacarídeo meningocócico de sorogrupo A e, embora os grupos de 25 carbamato mudem o campo magnético local e façam a atribuição mais complicada, o status de O-acetilação parece ser mantido após a modificação química (figura 3, painéis B e C).

#### **Estabilidade de oligossacarídeo MenA**

25 A degradação de oligossacarídeos MenA, uma consequência de hidrólise em ligações fosfodiéster, resulta em grupos de fosfomonooéster recentemente formados. A estabilidade de oligossacarídeos MenA 10/90 e MenA 10/0 foi comparada com a estabilidade de um oligossacarídeo nativo.

30 Momentaneamente, as soluções dos oligossacarídeos MenA,

em uma faixa de concentração de 1,4 a 3 mg/ml, foram incubadas em 37°C em tampão de histidina de 10 mM, pH 7,2. Em pontos diferentes de tempo durante 42 dias, os oligossacarídeos foram analisados para a quantidade de 5 fosfomonoéster gerada durante o armazenamento.

A Figura 4 mostra o incremento de grupos fosfomonoéster durante o armazenamento em 37°C para os três oligossacarídeos mencionados acima. A porcentagem de fosfomonoéster foi calculada como  $[Pm(t) - Pm(0)] \times 100 / [(Pt(0) - Pm(0))]$ , onde  $Pm(t)$  e  $Pt(t)$  são as concentrações de grupos fosfomonoéster e fósforo total no tempo  $t$ ; e  $Pm(0)$  e  $Pt(0)$  são as concentrações de grupos fosfomonoéster e de fósforo total no tempo 0. A concentração total de fósforo ( $Pt$ ) foi determinada de acordo com o método descrito na referência 259 e o fosfato de monoéster terminal ( $Pm$ ) foi determinado medindo o fosfato inorgânico liberado pela reação enzimática com a fosfatase ácida de batata [260].

Os oligossacarídeos MenA 10/90 e MenA 10/0 mostraram estabilidade melhorada comparada ao oligossacarídeo nativo, como evidenciado pela tendência reduzida de liberar grupos fosfomonoéster sobre o tempo. Estes resultados mostram que a estabilidade do oligossacarídeo MenA pode ser melhorada bloqueando os grupos hidroxila em posição 4 e 3 de N-acetilmannosamina com um grupo bloqueador de acordo com a presente invenção.

Similarmente, a análise  $^{31}P$  NMR [264] foi usada para avaliar a estabilidade dos oligossacarídeos MenA modificados em comparação com o oligossacarídeo nativo em 30 37°C por 42 dias em pH 7,2 de tampão de histidina 10 mM.

Momentaneamente, o grau médio de despolimerização (avDP) foi determinado pela razão molar entre o fosfodiéster nos grupos em cadeia ( $P_{em\ cadeia}$ ) e nos grupos de extremidade não redutores de fosfomonooéster ( $P_{extremidade\ não\ red}$ ) (figura 5).

5  $avDP = [P_{em\ cadeia} + 1] / P_{extremidade\ não\ red}$

Mais uma vez, os oligossacarídeos MenA 10/90 e MenA 10/0 mostraram a estabilidade melhorada comparada ao oligossacarídeo nativo, como evidenciado pelo grau de polimerização maior em qualquer ponto de tempo (figura 6).

10 Tabela I

| Amostra           | avDP |      |      |      |      |      |      |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|
|                   | 0d   | 7d   | 14d  | 21d  | 28d  | 35d  | 42d  |
| Oligo MenA Nativo | 19.2 | 17.5 | 17.1 | 14.7 | 13.8 | 12.8 | 11.5 |
| Oligo MenA10/0    | 24.9 | 23.8 | 22.6 | 20.5 | 19.1 | 18.2 | 16.8 |
| Oligo MenA10/90   | 24.3 | 24.3 | 24.1 | 23.5 | 23.5 | 23.6 | 23.1 |

15 Tabela I

#### Conjugados de CRM<sub>197</sub>-MenA

20 Geração de grupos aldeídos reativos por oxidação de periodato controlada

Os grupos hidroxila vicinais dos grupos bloqueadores 4,5-dihidróxipentilcarbamato derivados de APD nos oligossacarídeos MenA10/90 e MenA10/0 foram oxidados por tratamento de periodato de sódio limitado para gerar grupos aldeídicos reativos. Momentaneamente, as soluções de oligossacarídeos MenA10/90 e MenA10/0 em tampão de fosfato de sódio de 0,1 M, pH 7,2, foram reagidos com 0,1 mol de NaIO<sub>4</sub> por mol de unidades de monossacarídeo MenA. As reações foram realizadas no escuro com agitação, e monitoradas espectrofotometricamente em 225 nm. Após

aproximadamente 2 horas a absorvência de 225 nm alcançou um platô. A quantidade de grupos aldeídicos gerados pela reação foi determinada analisando a quantidade equimolar de formaldeído liberada durante a oxidação [265]. As reações 5 foram paradas pela adição de etileno glicol a uma concentração final equimolar com o NaIO<sub>4</sub>.

A geração de grupos aldeídicos foi quase quantitativa em comparação ao número inicial de grupos bloqueadores 4,5-dihidróxipentilcarbamato.

10 Purificação de oligossacarídeos oxidados

Os oligossacarídeos oxidados foram purificados por ultrafiltração em uma membrana de 3 KDa. As soluções foram concentrada 2 vezes e então diafiltrada contra 10 volumes de NaCl de 0,5 M seguido por 10 volumes de água destilada. 15 O retido, contendo o produto desejado, foi coletado e o permeado descartado. A água foi removida do retido por evaporação rotatória.

Conjugação à CRM<sub>197</sub>

Os oligossacarídeos de MenA oxidados foram conjugados 20 à CRM<sub>197</sub>, um mutante não tóxico da toxina de difteria [266], através de aminaçāo redutiva para obter CRM-MenA 10/90 e CRM-MenA10/0 respectivamente (figura 1).

Momentaneamente, os oligossacarídeos de MenA oxidados foram solubilizados em 50 mg/ml de solução de CRM<sub>197</sub> em uma 25 razão de 13 mols de grupos aldeídicos por mol de proteína. O tampão de fosfato de sódio de 100 mM, pH 7,2, foi adicionado para obter uma concentração de proteína final de 30 mg/ml. Uma solução de 2M de NaBH<sub>3</sub>CN em tampão de fosfato de sódio de 10 mM, pH 7,2, foi então adicionado para obter 30 um excesso de molar de 70 vezes de NaBH<sub>3</sub>CN com relação aos

grupos aldeídicos. As reações foram realizadas por 3 dias em 37°C. Quatorze volumes de tampão de fosfato de sódio 10mM, pH 7,2, foram então adicionados, seguido por um excesso molar de 25 vezes de NaBH<sub>4</sub> (relativo ao número de 5 mols de grupos aldeídicos). O pH foi controlado em 8,5 e as misturas foram agitadas por 2 horas em temperatura ambiente a fim de resfriar quaisquer grupos aldeídicos residuais. No fim da etapa de resfriamento, o pH foi corrigido outra vez a 7,2, e as soluções filtradas através de uma membrana de 10 poro de 0,2 µm.

#### Purificação de conjugado

Os conjugados foram purificados do excesso de reagentes e oligossacarídeos residuais, não reagidos pelo ultrafiltração em uma membrana de 30 KDa. As misturas de 15 reação foram diafiltradas contra 100 volumes de tampão de fosfato de sódio de 0,01 M, pH 7,2, seguido por 50 volumes de 10 mM de histidina, pH 7,2. As soluções contendo os conjugados purificados foram então filtradas através de uma membrana de poro de 0,2 µm e armazenadas em 2-8°C.

#### Confirmação de conjugação à CRM<sub>197</sub>

A conjugação dos oligossacarídeos MenA à CRM<sub>197</sub> foi demonstrada por SDS-Page (figura 7). A SDS-Page foi realizada de acordo com a referência 267 usando 7,5% acrilamida para empilhar e 7,5% de acrilamida para a 25 separação de gel. Antes da eletroforese, as amostras foram tratadas 1:4 com tampão de amostra e fervidas por 10 min. A eletroforese foi realizada em 200 V de voltagem constante por aproximadamente 40 min. Os géis foram desenvolvidos com uma solução de tinta de Coomassie por aproximadamente 20 30 min e descolorida no ácido acético/solução de EtOH (7/40%)

por aproximadamente 4 horas.

O perfil dos conjugado na figura 7 é deslocado para pesos moleculares mais elevados comparados a CRM<sub>197</sub>, e é marcadamente diferente de CRM<sub>197</sub>. A análise de SDS-Page 5 também demonstra a presença de material de alto peso molecular. Este material pode ser formado durante a reação de conjugação, que permite pontos de união múltiplos da CRM<sub>197</sub> por molécula de oligossacarídeo.

Os conjugado foram também analisados para teor de 10 sacarídeo e proteína. As razões de sacarídeo/proteína variando de 0,20 a 0,32 (peso/peso) foram observadas.

#### **Estabilidade de conjugados de CRM<sub>197</sub>-MenA**

A estabilidade dos conjugado de CRM<sub>197</sub>-MenA foi determinada medindo a liberação de sacarídeo não conjugado 15 sobre o tempo, que os resultados da hidrólise das ligações de fosfodiéster.

Centricon 30 dispositivos (2 ml de capacidade) foi condicionado enxaguando com 1 ml de água destilada e girando duas vezes. 60 µl de solução salina foi adicionado 20 à amostra de 940 µl (CRM-MenA 10/90 ou CRM-MenA10/0) contendo aproximadamente 0,3 mg/ml de sacarídeo. O teor de fósforo total foi medido como descrito acima antes de adicionar as misturas aos dispositivos. Os dispositivos foram girados em 1942 g até que 100-200µl de solução foi 25 deixado na câmara de retido, e então lavado com 2x 1 ml de solução salina e girados outra vez. A solução na câmara de permeado foi recuperada e o volume de amostra foi ajustado com a solução salina para 3 ml. O permeado derivado de cada amostra foi analisado para o teor total de fósforo como 30 descrito acima.

O valor  $(P_2/P_1) \times 100$ , onde o  $P_1$  é o fósforo total antes de tratamento de centricon e  $P_2$  é o fósforo total após o tratamento de centricon, representa a porcentagem do sacarídeo livre. Os experimentos de pico para demonstrar a 5 recuperação do oligossacarídeo livre através da membrana foram conduzidos adicionando 60  $\mu\text{l}$  de aproximadamente 2 mg/ml de oligossacarídeo a 940  $\mu\text{l}$  de amostra ou solução salina e então aplicando o procedimento de separação descrito acima. A recuperação foi consistentemente acima de 10 80%.

A Figura 8 mostra que o conjugado CRM-MenA 10/90 mostrou uma tendência reduzida para liberar sacarídeo livre comparado a CRM-MenA10/0. FS (sacarídeo livre) é calculado como  $FS\%(t) - FS\%(0)$  onde  $FS\%(t)$  e  $FS\%(0)$  são as porcentagens 15 livres de sacarídeo no tempo  $t$  e 0 respectivamente.

A estabilidade dos conjugado de CRM<sub>197</sub>-MenA foi determinada também medindo a geração de fosfomonoéster durante o armazenamento. Momentaneamente, as soluções dos conjugado, em uma faixa de concentração de 157 a 253  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , foram incubadas em 37°C no tampão de histidina de 10 mM, pH 20 7,2. Em pontos de tempo diferentes durante 42 dias, os conjugados foram analisados para a quantidade de fosfomonoéster gerada durante o armazenamento.

A Figura 9 mostra o incremento de grupos 25 fosfomonoéster durante o armazenamento em 37°C para os dois conjugados mencionados acima. A porcentagem de fosfomonoéster foi calculada como descrito acima: O conjugado CRM-MenA 10/90 mostrou uma tendência reduzida para gerar fosfomonoéster comparado a CRM-MenA10/0.

30 Imunogenicidade de conjugados de CRM-MenA

A fim de avaliar a habilidade dos conjugados MenA para provocar os anticorpos que reconhecem o polissacarídeo capsular nativo de MenA, os experimentos de imunogenicidade foram conduzidos em camundongos.

5        Formulação de vacina

Os conjugados de CRM-MenA 10/90 e CRM MenA 10/0 foram misturados com o tampão de fosfato de sódio e uma suspensão  $\text{AlPO}_4$  para obter concentrações finais de sacarídeo de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e 0,6 mg/ml de  $\text{Al}^{3+}$  em 10 mM de tampão de fosfato de 10 sódio, pH 7,2. Para formulações sem adjuvantes, a suspensão de  $\text{AlPO}_4$  foi substituída com o tampão de fosfato de sódio. Antes da imunização, as vacinas resultantes foram diluídas 1:5 com solução salina.

Imunização de camundongos

15       Os grupos de 8 camundongos Balb/c, fêmeas de 6-8 semanas, foram imunizados duas ou três vezes s.c. com 0,5 ml de vacinas conjugadas contendo 2  $\mu\text{g}$  de sacarídeo. No caso da programação de duas-injeções, o intervalo entre a primeira e a segunda dose foi de quatro semanas. Os 20 sangramentos foram executados antes da imunização e duas semanas após a segunda dose. No caso da programação de três doses, as vacinas foram dadas em 0, 14 e 28 dias e os sangramentos foram executados no tempo zero, um dia antes (pós 2 doses de soro) e 14 dias após (pós 3 doses de soro) 25 a terceira imunização.

Imunogenicidade

Os soros dos camundongos imunizados foram analisados para anticorpos IgG totais de polissacarídeo capsulares anti-MenA específicos e para atividade bactericida de soro 30 mediada por complemento (SBA) contra sorogrupo A de

*Neisseria meningitidis.*

Os anticorpos IgG totais de polissacarídeo capsulares anti-MenA específicos foram determinados essencialmente de acordo com o método de referência 268, adaptado para 5 análise de soros animais. Cada soro individual de camundongo foi analisado em duplicata por uma curva de titulação. Os títulos de polissacarídeo Anti-MenA foram calculados como unidade de Elisa de camundongo (MEU)/ml usando o software baseado no método de ensaio de linha de 10 referência. Os títulos de média geométrica (GMT) foram calculados para grupos de cada imunização.

SBA foi medido em associações de soros pós II e pós III (onde apropriado) para cada grupo de imunização. O protocolo padrão de SBA foi baseado na inoculação da cepa 15 bacteriana de teste (MenA F8238) no caldo de Mueller Hinton com a adição de 0,25% glicose. A cultura bacteriana foi incubada em 37°C na presença de CO<sub>2</sub> 5% e o crescimento parado quando as bactérias alcançaram a fase exponencial adiantada de crescimento, ao redor de 0,220-0,240 OD<sub>600</sub>. As 20 bactérias foram então diluídas a 10<sup>-4</sup> com 1% BSA em tampão de GBBS e incubadas por 1 hora em 37°C com CO<sub>2</sub> 5% na presença de associações de soros inativados por calor (30 minutos em 56°C) e 25% de soro de coelho bebê como uma fonte de complemento. As misturas de reação foram então 25 plaqueadas em ágar de Mueller Hinton e incubadas durante a noite em 37°C. Os títulos bactericidas foram expressos como a diluição de soro recíproca rendendo a morte de 50% das bactérias.

A tabela II mostra os títulos de IgG totais de 30 polissacarídeo anti-MenA capsulares expressos como GMT (+/-

95 limites de confiança) como medidos por ELISA e os títulos de SBA induzidos por CRM-MenA 10/90, e CRM-MenA10/0. Ambos os conjugado foram capazes de indução em anticorpos de polissacarídeo anti-MenA específicos de camundongos com 5 atividade funcional bactericida.

| Vacina                                  | Título pós 2 ELISA<br>GMT (+/- 95 % CI) | Título pós 2 SBA |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------|------------------|
| CRM-MenA 10/0 lot 5/ AlPO <sub>4</sub>  | 346 ( 230; 520)                         | >4096<8192       |
| CRM-MenA 10/90 lot 5 /AlPO <sub>4</sub> | 270 (217;336)                           | 4096             |

Tabela II

10 Em um segundo experimento, a imunogenicidade em camundongos de CRM-MenA 10/90 foi testada com e sem AlPO<sub>4</sub>. A imunogenicidade do CRM-MenA 10/90 é confirmada na tabela III, que mostra os títulos de anticorpo de IgG anti-MenA específicos induzidos após duas e três imunizações e a 15 atividade bactericida mediada por complemento destes anticorpos. Os títulos de pré-imunização foram descobertos sendo negativos (SBA <4). Estes dados sugerem que a presença do adjuvante melhora a resposta do anticorpo. A imunogenicidade observada no conjugado é claramente uma 20 consequência da conjugação química do oligossacarídeo à proteína carreadora, como uma mistura física de oligossacarídeo MenA, CRM<sub>197</sub> e AlPO<sub>4</sub> não foi imunogênico.

| Vacina                                                                                                      | Título pós 2<br>ELISA<br>GMT (+/- 95 %<br>CI) | Título pós 3 ELISA<br>GMT (+/- 95 % CI) | Título pós 2 SBA | Título pós 3 SBA |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------|------------------|
| CRM-MenA10/90 lot11<br>AlPO <sub>4</sub>                                                                    | 867 (585; 1285)                               | 1299 (1008; 1675)                       | 2048             | 4096             |
| CRM-MenA 10/90 lot 11                                                                                       | 388 (249; 604)                                | 426 (241; 751)                          | 1024             | 2048             |
| OligoMenA10/90 lot 11+<br>CRM <sub>197</sub> + AlPO <sub>4</sub><br>(mistura física de抗原<br>não conjugados) | 2                                             | 2                                       | <4               | <4               |

Tabela III

## EXEMPLO 2

## Modificação de polissacarídeo Men A

Modificação química de polissacarídeo MenA

20 mg de polissacarídeo capsular nativo MenA (0,072 mmol) foi adicionada a 170 mg (mmol 2,5) de imidazol e 1 mL de CH<sub>3</sub>CN. Agitando com uma barra magnética, 163 µL (1,59 mmol) de anidrido acético foi adicionado e a reação foi incubada em 55°C por 21 h. A razão de molar de imidazol:anídrido acético foi 2:4. Uma etapa de diafiltração usando uma membrana de celulose de Centricon (limite de peso molecular 1 kDa) contra água de Milli-Q (1:7 vol/vol) foi usada para purificar o produto de reação. O material foi finalmente seco sob o vácuo (SpeedVac).

Confirmação de modificações químicas por <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR

Para estabelecer o grau de acetilação, uma caracterização estrutural completa do polissacarídeo capsular MenA modificado foi realizada por espectroscopia <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR.

A análise de NMR quantitativa foi usada para quantificar o nível de O-acetilação das cadeias de sacarídeo. A porcentagem de O-acetilação foi estimada por integração de pico de H<sub>2</sub><sup>3OAc</sup> (prótons em posição C-2 dos resíduos de N-acetil-mannosamina O-acetilados em C-3), pico de H<sub>2</sub><sup>4OAc</sup> (próton na posição C-2 dos resíduos de N-acetil-mannosamina O-acetilados em C-4) e pico de H<sub>2</sub><sup>deOAc</sup> (próton na posição C-2 dos resíduos de N-acetil-mannosamina sem O-acetilação), em comparação com H<sub>1</sub> (próton na posição C-1 dos resíduos de N-acetil-mannosamina). O nível total de O-acetilação foi obtido pela soma de integrações de pica H<sub>2</sub><sup>3OAc</sup> e H<sub>2</sub><sup>4OAc</sup>.

$$\% \text{O-Acetilação} = [H_2^{30\text{Ac}} + H_2^{40\text{Ac}}] / [H_1^{O\text{Ac}} + H_1^{\text{de}O\text{Ac}}].$$

Além disso, a porcentagem de O-acetilação foi estimada por integração de pico de  $H_2^{30\text{Ac}}/H_2^{40\text{Ac}}$  (próton na posição C-3 dos resíduos de N-acetil-mannosamina O-acetilados em C-3 e 5 próton na posição C-4 dos resíduos de N-acetil-mannosamina O-acetilados em C-4), em comparação com H1 (próton na posição C1 dos resíduos de N-acetil-mannosamina).

$$\% \text{O-Acetilação} = [H_2^{30\text{Ac}}/H_2^{40\text{Ac}}] / [H_1^{O\text{Ac}} + H_1^{\text{de}O\text{Ac}}]$$

#### Estabilidade de polissacarídeos MenA

10 A análise  $^{31}\text{P}$  NMR foi usada para avaliar a estabilidade do polissacarídeo capsular MenA modificado inteiramente acetilado em comparação com o polissacarídeo 15 nativo e o oligossacarídeo correspondente em 37°C por 42 dias em 10 mM de tampão de histidina pH 7,2, como descrito acima.

O polissacarídeo MenA modificado inteiramente O-acetilado foi muito mais estável do que o polissacarídeo capsular nativo e o oligossacarídeo correspondente.

| Amostra                    | avDP |      |      |      |      |      |      |
|----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
|                            | 0d   | 7d   | 14d  | 21d  | 28d  | 35d  | 42d  |
| Poli MenA Nativo           | >50  | >50  | 44.6 | 29.6 | 26.9 | 20.8 | 18.3 |
| Oligo MenA Nativo          | 17.3 | 15.5 | 13.0 | 12.0 | 11.0 | 10.4 | 9.6  |
| Poli MenA completamente Ac | >50  | >50  | >50  | >50  | >50  | >50  | >50  |

Tabela IV

25 Estes resultados confirmam que a estabilidade do oligossacarídeo MenA pode ser melhorada bloqueando os grupos hidroxila em posição 4 e 3 de N-acetilmannosamina com um grupo bloqueador de acordo com a presente invenção.

Será compreendido que a invenção foi descrita como 30 exemplo somente e as modificações podem ser feitas enquanto

permanecendo dentro do escopo e conceito inventivo da invenção.

REFERÊNCIAS (os conteúdos dos quais são incorporados aqui por referência)

- 5 [1] Patente US 4,711,779  
[2] Patente US 4,761,283  
[3] Patente US 4,882,317  
[4] WO 03/080678  
[5] Berkin e col. (2002) Chemistry 8:4424-33
- 10 [6] Ramsay e col. (2001) Lancet 357(9251):195-6  
[7] Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:S28-36  
[8] Buttery & Moxon (2000) JR Coll Physicians Lond 34:  
163-8  
[9] Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am  
15 13: 113-33, vii  
[10] Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567  
[11] EP-B-O 477 508  
[12] Patente US 5,306,492  
[13] WO98/42721
- 20 [14] Dick e col. in Conjugate Vaccines (eds. Cruse e col.) Karger, Basel, 1989, Vol. 10, 48-114  
[15] Hermanson Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego CA (1996)  
[16] Patente US 4,356,170
- 25 [17] Patente US 4,695,624  
[18] Bethell G.S. e col., J. Biol. Chem., 1979, 254,  
2572-4  
[19] Hearn MT. W., J. Chromatogr., 1981, 218, 509-18  
[20] MoI. Immunol, 1985, 22, 907-919
- 30 [21'] EP-A-0208375

- [22] WO00/10599
- [23] Gever e col., Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979).
- [24] Patente US 4,057,685.
- 5 [25] Patente US 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
- [26] Patente US 4,459,286.
- [27] Patente US 4,965,338
- [28] Patente US 4,663,160.
- [29] Research Disclosure, 453077 (Jan 2002)
- 10 [30] EP-A-0372501
- [31] EP-A-0378881
- [32] EP-A-0427347
- [33] WO93/17712
- [35] WO98/58668
- 15 [36] EP-A-0471177
- [37] WO00/56360
- [38] WO91/01146
- [39] WO00/61761
- [40] WO01/72337
- 20 [41] Lei e col. (2000) Dev Biol (Basel) 103:259-264
- [42] WO00/38711
- [43] WO99/42130
- [44] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- 25 [45] Nony e col. (2001) Vaccine 27:3645-51.
- [46] Greenbaum e col. (2004) Vaccine 22:2566-77.
- [47] Zurbriggen e col. (2003) Expert Rev Vaccines 2:295-304.
- [48] Piascik (2003) JAm Pharm Assoc (Wash DC). 43:728-
- 30 30.

- [49] Mann e col. (2004) Vaccine 22:2425-9.
- [50] Halperin e col. (1979) Am J Public Health 69: 1247-50.
- [51] Herbert e col. (1979) J Infect Dis 140:234-8.
- 5 [52] Chen e col. (2003) Vaccine 21:2830-6.
- [53] Patente US 6355271.
- [54] WO00/23105.
- [55] WO01/22972.
- [56] Kandimalla e col (2003) Nucleic Acids Research 10 31 :2393-2400.
- [57] WO02/26757.
- [58] WO99/62923.
- [59] Krieg (2003) Nature Medicine 9:831-835.
- [60] McCluskie e col. (2002) FEMS Immunology and 15 Medical Microbiology 32: 179- 185.
- [61] WO98/40100.
- [62] Patente US 6,207,646.
- [63] Patente US 6,239,116.
- [64] Patente US 6,429,199.
- 20 [65] Kandimalla e col. (2003) Biochemical Society Transactions 31 (part 3):654-658.
- [66] Blackwell e col. (2003) J Immunol 170:4061-4068.
- [67] Krieg (2002) Trends Immunol 23:64-65.
- [68] WO01/95935.
- 25 [69] Kandimalla e col. (2003) BBRC 306:948-953.
- [70] Bhagat e col. (2003) BBRC 300:853-861.
- [71] WO03/035836.
- [72] Myers e col. (1990) páginas 145-156 of Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions.
- 30 [73] Ulrich (2000) Chapter 16 (páginas 273-282) of

reference 132.

[74] Johnson e col. (1999) J Med Chem 42:4640-9.

[75] Baldrick e col. (2002) Regulatory Toxicol Pharmacol 35:398-413.

5 [76] Pedido de patente UK GB-A-2220211.

[77] US 4,680,338.

[78] US 4,988,815.

[79] WO92/15582.

[80] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:571-577.

10 [81] Wu e col. (2004) Antiviral Res. 64(2):79-83.

[82] Vasilakos e col. (2000) Cell Immunol. 204(1):64-74.

[83] Patentes US 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 15 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 and 6924293.

[84] Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4:214-218.

20 [85] WO2004/060308.

[86] WO2004/064759.

[87] US 6,924,271.

[88] US2005/0070556.

[89] US 5,658,731.

25 [90] Patente US 5,01 1,828.

[91] WO2004/87153.

[92] US 6,605,617.

[93] WO02/18383.

[94] WO2004/018455.

30 [95] WO03/082272.

[96] WO2006/002422.

9:2273-2278.

[98] Evans e col. (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229.

5 [99] Andrianov e col. (1998) Biomaterials 19: 109-1 15.

[100] Payne e col ( 1998) Adv Drug Delivery Review 31:  
185-196.

[101] US 5,057,540.

[102] WO96/33739.

10 [103] EP-A-0109942.

[104] WO96/11711.

[105] WO00/07621.

[106] Barr e col. (1998) Advanced Drug Delivery  
Reviews 32:247-271.

15 [107] Sjolanderet e col. (1998) Advanced Drug Delivery  
Reviews 32:321-338.

[108] Pizza e col. (2000) bit J Med Microbiol 290:455-  
461.

[109] WO95/17211.

20 [110] WO98/42375.

[111] Singh e col. (2001) J Cont Release 70:267-276.

[112] WO99/27960.

[113] US 6,090,406

[114] US 5,916,588

25 [115] EP-A-0626169.

[116] WO99/52549.

[117] WO01/21207.

[118] WO01/21152.

[119] Signorelli & Hadden (2003) Int Immunopharmacol

30 3 (8): 1177-86.

- [120] WO2004/064715.
- [121] Cooper (1995) Pharm Biotechnol 6:559-80.
- [122] WO03/011223.
- [123] Meraldi e col. (2003) Vaccine 21:2485-2491.
- 5 [124] Pajak e col. (2003) Vaccine 21 :836-842.
- [125] US-6586409.
- [126] Wong e col. (2003) J Clin Pharmacol 43(7):735-42.
- [127] US2005/0215517.
- [128] WO90/14837.
- 10 [129] Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2: 197-203.
- [130] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.
- [131] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- 15 [132] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 of Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [133] Allison & Byars (1992) Res Immunol 143:519-25.
- 20 [134] Hariharan e col. (1995) Cancer Res 55:3486-9.
- [135] WO95/11700.
- [136] Patente US 6,080,725.
- [137] WO2005/097181.
- [138] Pedido de patente internacional WO 03/007985.
- 25 [139] WO01/52885.
- [140] Bjune e col. (1991) Lancet 338(8115):1093-1096.
- [141] Fukasawa e col. (1999) Vaccine 17:2951-2958.
- [142] Rosenqvist e col. (1998) Dev. Biol. Stand.
- 92:323-333.
- 30 [143] Covacci & Rappuoli (2000) J. Exp. Med. 19:587-

592.

[144] WO93/18150.

[145] Covacci e col. (1993) Proc. Natl. Acad. ScL USA  
90: 5791-5795.5 [146] Tummuru e col. (1994) Infect. Immun. 61:1799-  
1809.

[147] Marchetti e col. (1998) Vaccine 16:33-37.

[148] Telford e col. (1994) J. Exp. Med. 179:1653-1658.

[149] Evans e col. (1995) Gene 153:123-127.

10 [150] WO96/01272 &amp; WO96/01273, especially SEQ ID NO:6.

[151] WO97/25429.

[152] WO98/04702.

[153] Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19:331 -332.

[154] Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47:269-285,

15 v.

[155] Jedrzejas (2001 ) Microbiol MoI Biol Rev 65:  
187-207.

[156] Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19: 1187- 1188.

[157] Iwarson (1995) APMIS 103:321-326.

20 [158] Gerlich e col. (1990) Vaccine 8 Suppl:S63-68 &  
79-80.

[159] Hsu e col. (1999) Clin Liver Dis 3:901-915.

[160] Gustafsson e col. (1996) N. Engl. J. Med.  
334:349-355.

25 [161] Rappuoli e col. (1991) TIBTECH 9:232-238.

[162] Vaccines (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-  
7216-1946-0.[163] Del Guidice e col. (1998) Molecular Aspects of  
Medicine 19:1-70.

30 [164] Sutter e col. (2000) Pediatr Clin North Am

47:287-308.

[165] Zimmerman & Spann (1999) Am Fam Physician 59: 1  
13-118, 125-126.

[166] Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:S28-36.

5 [167] Buttery & Moxon (2000) JR Coll Physicians Lond  
34: 163-168.

[168] Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am  
13: 113-133, vii.

[169] Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 41:563-561.

10 [170] Patente européia 0477508.

[171] Patente US 5,306,492.

[172] WO98/42721.

[173] Conjugate Vaccines (eds. Cruse e col.) ISBN  
3805549326, particularmente vol. 10:48-1 14.

15 [174] Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN:  
0123423368 ou 012342335X.

[175] WO02/02606.

[176] Kalman e col. (1999) Nature Genetics 21:385-389.

20 [177] Read e col. (2000) Nucleic Acids Res 28: 1397-  
406.

[178] Shirai e col. (2000) J. Infect. Dis. 181(Suppl  
3):S524-S527.

[179] WO99/27105.

[180] WO00/27994.

25 [181] WO00/37494.

[182] WO99/28475.

[183] Ross e col. (2001) Vaccine 19:4135-4142.

[184] Dreesen (1997) Vaccine 15 Suppl:S2-6.

[185] MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998 Jan 16;47(1):12,

30 19.

- [186] McMichael (2000) Vaccine 19 Suppl 1:S101-107.
- [187] Schuchat (1999) Lancet 353(9146):51-6.
- [188] WO02/34771.
- [189] Dale (1999) Infect Dis Clin North Am 13:227-43,  
5 viii.
- [190] Ferretti e col. (2001) PNAS USA 98: 4658-4663.
- [191] Kuroda e/ a/. (2001) Lancet 357(9264): 1225-1240;  
see also páginas 1218-1219.
- [192] J Toxicol Clin Toxicol (2001) 39:85-100.
- 10 [193] Demicheli e col. (1998) Vaccine 16:880-884.
- [194] Stepanov e col. ( 1996) J Biotechnol 44: 155-  
160.
- [195] EP-A-0139417.
- [196] Harper e col. (2004) Lancet 364(9447): 1757-65.
- 15 [197] Ingram (2001) Trends Neurosci 24:305-307.
- [198] Rosenberg (2001) Nature 411 :380-384.
- [199] Moingeon (2001) Vaccine 19: 1305-1326.
- [200] Robinson & Torres (1997) Seminars in Immunology  
9:271-283.
- 20 [201] Donnelly e col. (1997) Annu Rev Immunol 15:617-  
648.
- [202] Scott-Taylor & Dalgleish (2000) Expert Opin  
Investig Drugs 9:471-480.
- [203] Apostolopoulos & Plebanski (2000) Curr Opin MoI  
25 Ther 2:441-447.
- [204] Ilan (1999) Curr Opin MoI Ther 1:1 16-120.
- [205] Dubensky e col. (2000) MoI Med 6:723-732.
- [206] Robinson & Pertmer (2000) Adv Virus Res 55: 1-74.
- [207] Donnelly e col. (2000) Am J Respir Crit Care Med  
30 162(4 Pt 2): S 190- 193.

- [208] Davis (1999) Mt. Sinai J. Med. 66:84-90.
- [209] Parkhill e col. (2000) Nature 404:502-506.
- [210] Tettelin e col. (2000) Science 287: 1809- 1815.
- [211] WO00/66791.
- 5 [212] Pizza e col. (2000) Science 287:1816-1820.
- [213] WO99/24578.
- [214] WO99/36544.
- [215] WO99/57280.
- [216] WO00/22430.
- 10 [217] WO00/66741.
- [218] WO0 1/64920.
- [219] WO01/64922.
- [220] WO03/020756.
- [221] WO2004/014419.
- 15 [222] WO99/31132; Patente US '6,495,345.
- [223] WO99/58683.
- [224] Peak e col. (2000) FEMS Immunol Med Microbiol 28:329-334.
- [225] WO93/06861.
- 20 [226] EP-A-0586266.
- [227] WO92/03467.
- [228] Patente US 5912336.
- [229] WO2004/014418.
- [230] Pedidos de patente UK 0223741.0, 0305831.0 &
- 25 0309115.4; e WO2004/032958.
- [231] Comanducci e col. (2002) J. Exp. Med. 195:1445-1454.
- [232] WO2004/048404
- [233] WO03/063766.
- 30 [234] Massignani e col. (2003) J Exp Med 197:789-799.

- [235] WO2004/015099.
- [236] WO02/09643.
- [237] Katial e col. (2002) Infect. Immun. 70:702-707.
- [238] Patente US 6,180,111.
- 5 [239] WO01/34642.
- [240] PCT/IB2005/003494.
- [241] WO99/10497.
- [242] WO02/07763.
- [243] Patente européia 0624376.
- 10 [244] WO01/52885.
- [245] WO00/2581 1.
- [246] Claassen e col. (1996) Vaccine 14:1001-1008.
- [247] Peeters e col. (1996) Vaccine 14:1009-1015.
- [248] WO01/09350.
- 15 [249] WO02/09746.
- [250] Adu-Bobie e col. (2004) Infect Immun 72:1914-1919.
- [251] WO 02/062378.
- [252] WO 2004/014417.
- 20 [253] Maiden e col. (1998) PNAS USA 95:3140-3145.
- [254] <http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>
- [255] Pettersson e col. (1994) Microb Pathog 17(6):395-408.
- [256] Maiden e col. (1998) PNAS USA 95:3140-3145.
- 25 [257] Welsch e col. (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. Genome-derived antigen (GNA) 2132 elicits protective serum antibodies to groups B and C Neisseria meningitidis strains.
- 30 [258] Santos e col. (2002) Thirteenth International

Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. Serum bactericidal responses in rhesus macaques immunized with novel vaccines containing recombinant proteins derived from 5 the genome of *N. meningitidis*.

[259] Chen e col. (1956) Anal. Chem. 28:1756-1758.

[260] Anderson e col. (1985) J. Clin. Invest. 76:52-59.

[261] Costantino e col. (1999) Vaccine 17: 1251-1263.

[262] Lemercinier and Jones (1996) Carbohydr.

10 Res. 296:83 -96.

[263] Gudlavalleti e col. (2004) J. Biol. Chem. 279 (41):42765-42773.

[264] Berti F., Bartoloni A., Norelli F., Averani G., Giannozzi A., Berti S. and Costantino P. Congress 15 Presentation - 15th Internation Pathogenic Neisseria Conference (2006)

[265] Nash (1953) J. Biochem. 55:416-421.

[266] Giannini e col. (1984) Nucleic Acids Res. 12:4063-4069

20 [267] Laemmli (1970) Nature, Lond. 227:680-685.

[268] Carbone e col. (1992) J. Clin. Microbiol. 30:154-159.

## REIVINDICAÇÕES

1. Sacarídeo capsular modificado caracterizado pelo fato de que compreende um grupo bloqueador em uma posição do grupo hidroxila em pelo menos uma das unidades de 5 monossacarídeo do sacarídeo capsular nativo correspondente, em que o grupo bloqueador tem a fórmula (Ia) ou (Ib) :



em que

X é C(O), S (O) ou SO<sub>2</sub>;

10 Y é NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> ou R<sup>3</sup>;

R<sup>1</sup> é C<sub>1-6</sub> alquila substituída com 1, 2 ou 3 grupos independentemente selecionados de hidroxila, sulfidrila e amina;

R<sup>2</sup> é H ou C<sub>1-6</sub> alquila;

15 R<sup>3</sup> é C<sub>1-6</sub> alquila.

2.. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o grupo bloqueador tem a fórmula (Ia) .

20 3. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que X é C(O) .

4. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que Y é NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> .

25 5. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que R<sup>2</sup> é H.

6. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que R<sup>1</sup> é substituído com 1, 2 ou 3 grupos hidroxila.

30 7. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4, 5 ou 6, caracterizado

pelo fato de que  $R^1$  é substituído com um único grupo, esta substituição sendo na extremidade distal da cadeia  $C_{1-6}$  alquila.

8. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com 5 qualquer uma das reivindicações 4, 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que  $R^1$  é substituído com dois grupos vicinais.

9. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo compreende a) 10 pelo menos um grupo bloqueador em que  $R^1$  é substituído com um único grupo, esta substituição sendo na extremidade distal da cadeia  $C_{1-6}$  alquila e b) pelo menos um grupo bloqueador em que  $R^1$  é substituído com dois grupos vicinais.

15 10. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a razão de grupos bloqueadores em que  $R^1$  é substituído com um único grupo para grupos bloqueadores em que  $R^1$  é substituído com dois grupos vicinais é 90:10.

20 11. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que  $Y$  é  $R^3$ .

12. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que  $R^3$  é  $CH_3$ .

25 13. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que pelo menos 10% das unidades de monossacarídeo do sacarídeo têm grupos bloqueadores.

30 14. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com

qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que todas as unidades de monossacarídeo do sacarídeo têm grupos bloqueadores.

5        15. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo capsular nativo correspondente compreende unidades de monossacarídeo ligadas por ligações de  
10        fosfodiéster.

16. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo capsular nativo correspondente é um sacarídeo de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo A.

15        17. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o grupo bloqueador está em quaisquer das 3 e/ou 4 posições do sacarídeo de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo A correspondente.

20        18. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o grupo bloqueador está em quaisquer das 4 posições do sacarídeo de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo A correspondente.

25        19. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo capsular modificado é um oligossacarídeo.

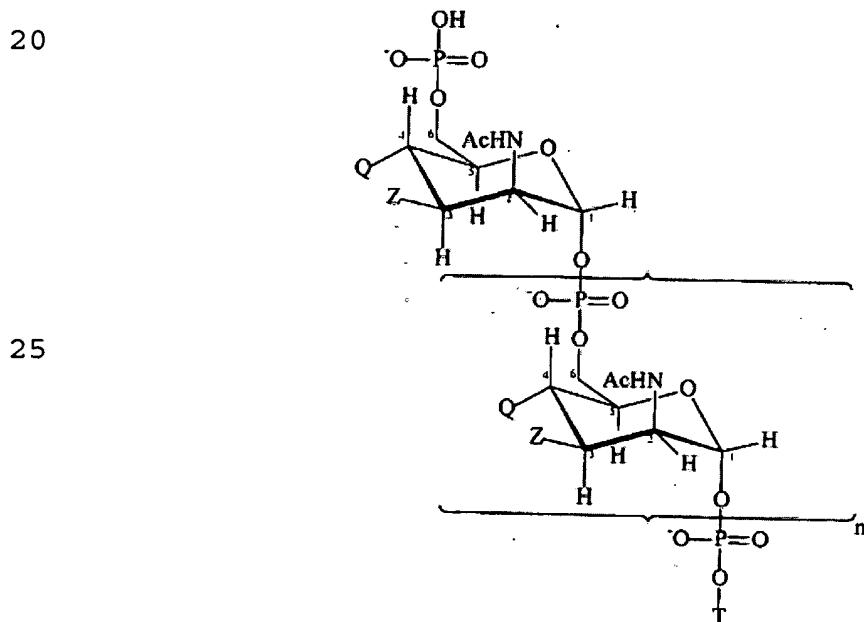
30        20. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,

10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ou 19, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo modificado compreende um grupo hidroxila anomérico terminal ou um grupo amino derivado de um grupo hidroxila anomérico terminal.

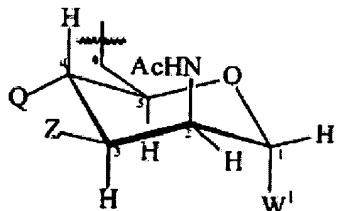
5 21. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ou 19, caracterizado pelo fato de que há pelo menos uma unidade de monossacarídeo do sacarídeo capsular modificado onde dois 10 grupos hidroxila vicinais do sacarídeo capsular nativo correspondente não compreende grupos bloqueadores.

22. Sacarídeo capsular modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ou 19, caracterizado 15 pelo fato de que pelo menos uma das unidades de monossacarídeo do sacarídeo compreende grupos bloqueadores em que  $R^1$  é substituído com dois grupos hidroxila vicinais.

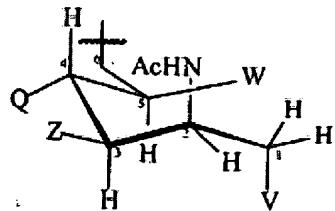
23. Sacarídeo caracterizado pelo fato de possuir a fórmula:



30 onde que T tem a fórmula (A) ou (B) :



(A)



(B)

5 n é um inteiro de 1 a 100;

cada grupo Z é independentemente selecionado de OH,  
OAc ou um grupo bloqueador como definido nas reivindicações  
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 ou 11 ou 12; e

10 cada grupo Q é independentemente selecionado de OH,  
OAc ou um grupo bloqueador como definido nas reivindicações  
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 ou 11 ou 12;

15 V é selecionado de -NH<sub>2</sub>, -NHE, -NE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>, W<sup>2</sup>, ou -O-D,  
onde: E, E<sup>1</sup> e E<sup>2</sup> são grupos protetores de nitrogênio, que  
podem ser os mesmos ou diferentes, e D é um grupo protetor  
de oxigênio;

W é selecionado de -OH ou um grupo bloqueador como  
definido nas reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 ou 11  
ou 12;

20 W<sup>1</sup> é selecionado de -OH ou um grupo bloqueador como  
definido nas reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 ou 11  
ou 12;

25 W<sup>2</sup> é selecionado de -OH ou um grupo bloqueador como  
definido nas reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 ou 11  
ou 12;

e em que pelo menos um dos grupos Z e/ou pelo menos um  
dos grupos Q são grupos bloqueadores como definido nas  
reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 ou 11 ou 12.

24. Sacarídeo, de acordo com a reivindicação 23,  
caracterizado pelo fato de que pelo menos 10% dos grupos Z  
30 são grupos bloqueadores.

25. Sacarídeo, de acordo com a reivindicação 23 ou 24, caracterizado pelo fato de que n é um inteiro de 15 a 25.

26. Sacarídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23, 24 ou 25, caracterizado pelo fato de que 5 pelo menos 1% dos grupos Q são grupos bloqueadores.

27. Processo para modificar um sacarídeo capsular caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) fornecer um sacarídeo capsular tendo pelo menos um grupo hidroxila em uma unidade de monossacarídeo; e

10 (b) converter pelo menos um grupo hidroxila em um grupo bloqueador como definido nas reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 ou 11 ou 12.

28. Processo, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o grupo bloqueador é - 15 OC(O)NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> e etapa (b) compreende as etapas de:

(b1) reagir o sacarídeo capsular com um reagente bifuncional em um solvente orgânico; e

(b2) reagir o produto de etapa (b1) com um composto amino de fórmula (I):

20 HNR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> (I)

em que R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> são como definidos nas reivindicações 1 a 8.

29. Processo, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o grupo bloqueador é - 25 OC(O)R<sup>3</sup> e etapa (b) compreende a etapa de:

(b1) reagir o sacarídeo capsular com [(R<sup>3</sup>C(O))<sub>2</sub>O na presença de um catalisador de imidazol.

30. Processo, de acordo com a reivindicação 28 ou 29, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo capsular na etapa (a) é um oligossacarídeo capsular.

31. Processo, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o oligossacarídeo capsular é obtido por despolimerização e dimensionamento do polissacarídeo capsular nativo correspondente.

5 32. Processo, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o sacarídeo capsular na etapa (a) é um polissacarídeo capsular nativo e o processo ainda comprehende uma etapa (c) em que o produto da etapa (b) é dimensionado, desse modo fornecendo um  
10 oligossacarídeo capsular modificado.

33. Processo para modificar um polissacarídeo de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo A caracterizado pelo fato de que comprehende as etapas de:

(a) fornecer um polissacarídeo de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo A nativo;  
15 (b) despolimerização e dimensionamento do referido polissacarídeo para fornecer um oligossacarídeo; e  
20 (c) converter pelo menos um grupo hidroxila do oligossacarídeo em um grupo bloqueador, das reivindicações 27, 28 ou 29.

34. Processo para modificar um polissacarídeo de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo A caracterizado pelo fato de que comprehende as etapas de:

(a) fornecer um polissacarídeo de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo A nativo;  
25 (b) converter pelo menos um grupo hidroxila do polissacarídeo em um grupo bloqueador das reivindicações 27 a 29; e  
30 (c) despolimerizar e dimensionar o polissacarídeo resultante.

35. Processo caracterizado pelo fato de que é para preparar o sacarídeo capsular modificado das reivindicações 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 ou 26 que é um processo de 5 síntese total compreendendo formar ligações glicosídicas entre duas ou mais unidades de monossacarídeo.

36. Sacarídeo capsular modificado caracterizado pelo fato de que é obtido pelo processo das reivindicações 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 ou 35.

10 37. Conjugado de proteína sacarídea caracterizado pelo fato de ser de um sacarídeo modificado das reivindicações 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 ou 26 ou 36.

15 38. Conjugado, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que a proteína é uma toxina ou toxóide bacteriano.

39. Conjugado, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a toxina ou toxóide bacteriano é toxina ou toxóide da difteria.

20 40. Conjugado, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que a toxina ou toxóide bacteriano é CRM<sub>197</sub>.

25 41. Processo para fazer um conjugado de proteína sacarídea caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(c) fornecer um sacarídeo capsular modificado da reivindicação 20; e

30 (d) conjugar o sacarídeo capsular modificado a uma proteína através do grupo hidroxila anomérico terminal ou do grupo amino derivado de um grupo hidroxila anomérico

terminal.

42. Processo para fazer um conjugado de proteína sacarídea caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

5 (a) fornecer um sacarídeo capsular modificado da reivindicação 21;

(b) converter pelo menos um dos pares de grupos hidroxila vicinais em grupos aldeído por clivagem oxidativa; e

10 (c) ligar o sacarídeo capsular modificado a uma proteína por aminação redutiva.

43. Processo para fazer um conjugado de proteína sacarídea caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

15 (a) fornecer um sacarídeo capsular modificado da reivindicação 22;

(b) converter pelo menos um dos pares de grupos hidroxila vicinais em grupos aldeído por clivagem oxidativa; e

20 (c) ligar o sacarídeo capsular modificado a uma proteína por aminação redutiva.

44. Processo, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que todos os grupos hidroxila vicinais presentes nos grupos bloqueadores são convertidos 25 em grupos aldeído na etapa (b).

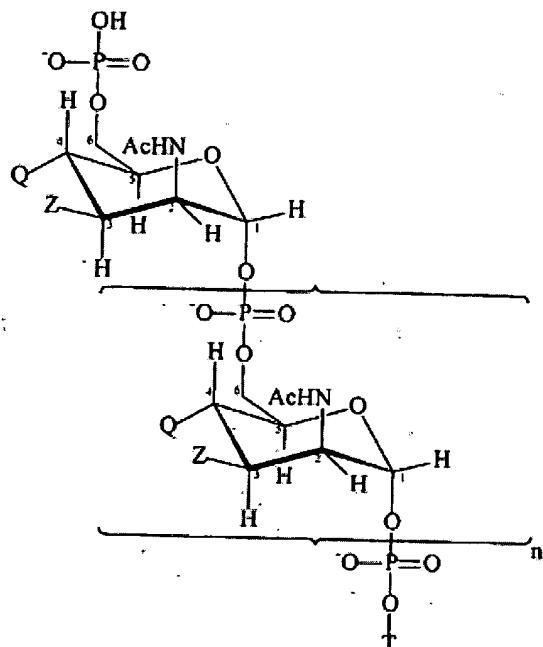
45. Processo, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que as condições para a clivagem oxidativa são selecionadas, tais que somente uma proporção dos grupos hidroxila vicinais presentes nos grupos 30 bloqueadores é convertida em grupos de aldeído na etapa

(b).

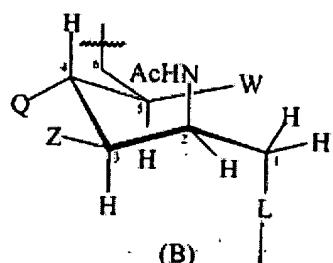
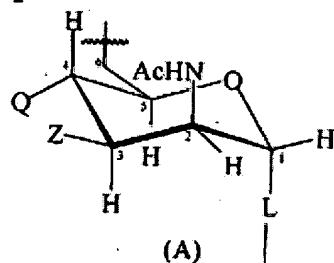
46. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41, 42, 43, 44 ou 45, caracterizado pelo fato de que a proteína é como definida em quaisquer das 5 reivindicações 38, 39 ou 40.

47. Conjugado de proteína sacarídea de um sacarídeo modificado caracterizado pelo fato de ser obtido pelo processo das reivindicações 41, 42, 43, 44, 45 ou 46.

48. Molécula caracterizada pelo fato de que compreende  
10 uma porção sacarídea de fórmula:



em que  $T$  tem a fórmula (A) ou (B):



n é um inteiro de 1 a 100;

cada grupo Z é independentemente selecionado de OH ou um grupo bloqueador como definido nas reivindicações 1, 2,

cada grupo Q é independentemente selecionado de OH ou um grupo bloqueador como definido nas reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 ou 11 ou 12;

W é selecionado de OH ou um grupo bloqueador como definido nas reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 ou 11 ou 12;

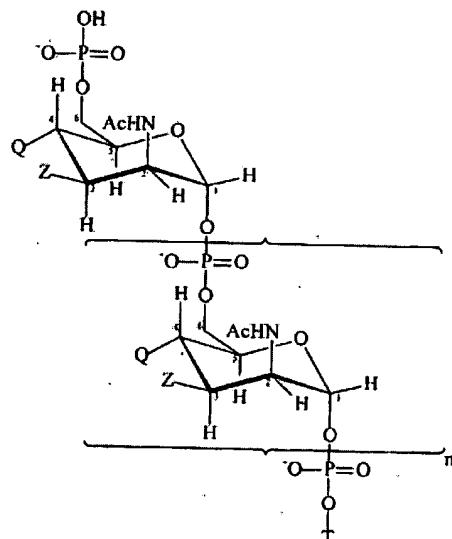
L é O, NH, NE, S ou Se;

em que a ligação covalente livre de L é unida a um carreador de proteína; e

10 em que o carreador de proteína é como definido nas reivindicações 38, 39 ou 40; e

em que pelo menos um dos grupos Z e/ou pelo menos um dos grupos Q são grupos bloqueadores como definidos nas reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 ou 11 ou 12.

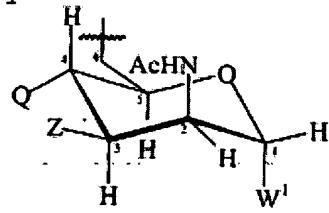
15 49. Molécula caracterizada pelo fato de que compreende um sacarídeo de fórmula:



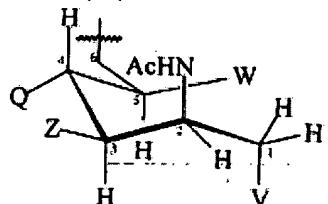
20

25

em que T tem a fórmula (A) ou (B):



(A)



(B)

30

n, Z, Q, W, W<sup>1</sup> e V são como definidos na reivindicação 23, e pelo menos um dos grupos Z e/ou pelo menos um dos grupos Q tem a fórmula (IIa) ou (IIb):

-O-X-Y' (IIa) -O-R<sup>4</sup> (IIb)

5 em que X é C(O), S(O) ou SO<sub>2</sub>;

Y' é NR<sup>2</sup>R<sup>4</sup>;

R<sup>2</sup> é H ou C<sub>1-6</sub> alquil; e

R<sup>4</sup> é C<sub>1-4</sub> alquíleno-CH(O) ou -C<sub>1-5</sub> alquíleno-NH-, em que o grupo -NH- é parte de um carreador de proteína; e

10 em que o carreador de proteína é uma proteína definida nas reivindicações 38, 39 ou 40.

50. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende (a) um sacarídeo modificado das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou 26 ou 36 e/ou um conjugado de proteína sacarídea das reivindicações 37, 38, 39 ou 40 ou 47 e/ou uma molécula da reivindicação 48 ou 49, e (b) um carreador farmaceuticamente aceitável.

51. Composição, de acordo com a reivindicação 50, 20 caracterizada pelo fato de que ainda compreende um antígeno de sacarídeo de um ou mais dos sorogrupos de *N.meningitidis* C, W135 e Y, o sacarídeo opcionalmente sendo um oligossacarídeo e opcionalmente sendo conjugado a uma proteína carreadora.

25 52. Composição, de acordo com a reivindicação 50 ou 51, caracterizada pelo fato de que ainda compreende um adjuvante de vacina.

53. Composição, de acordo com a reivindicação 52, 30 caracterizada pelo fato de que o adjuvante é um fosfato de alumínio.

54. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 50, 51, 52 ou 53, caracterizada pelo fato de que é uma vacina contra uma doença causada por *N. meningitidis*.

5 55. Método para gerar uma resposta de anticorpo em um mamífero caracterizado pelo fato de que compreende administrar a composição farmacêutica das reivindicações 50 a 54 ao mamífero.

10 56. Sacarídeo modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 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 ou 26 ou 36; conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 37, 38, 39 ou 40 ou 47; ou molécula, de acordo com a reivindicação 48 ou 49, caracterizado pelo 15 fato de ser para uso como um medicamento.

20 57. Uso do polissacarídeo modificado das reivindicações 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 ou 26 ou 36, ou conjugado das reivindicações 37, 38, 39 ou 40 ou 47, ou molécula, da reivindicação 48 ou 49, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para prevenir ou tratar uma doença causada por uma ou mais bactérias encapsuladas.

25 58. Uso, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a doença é meningite bacteriana.

Figura 1

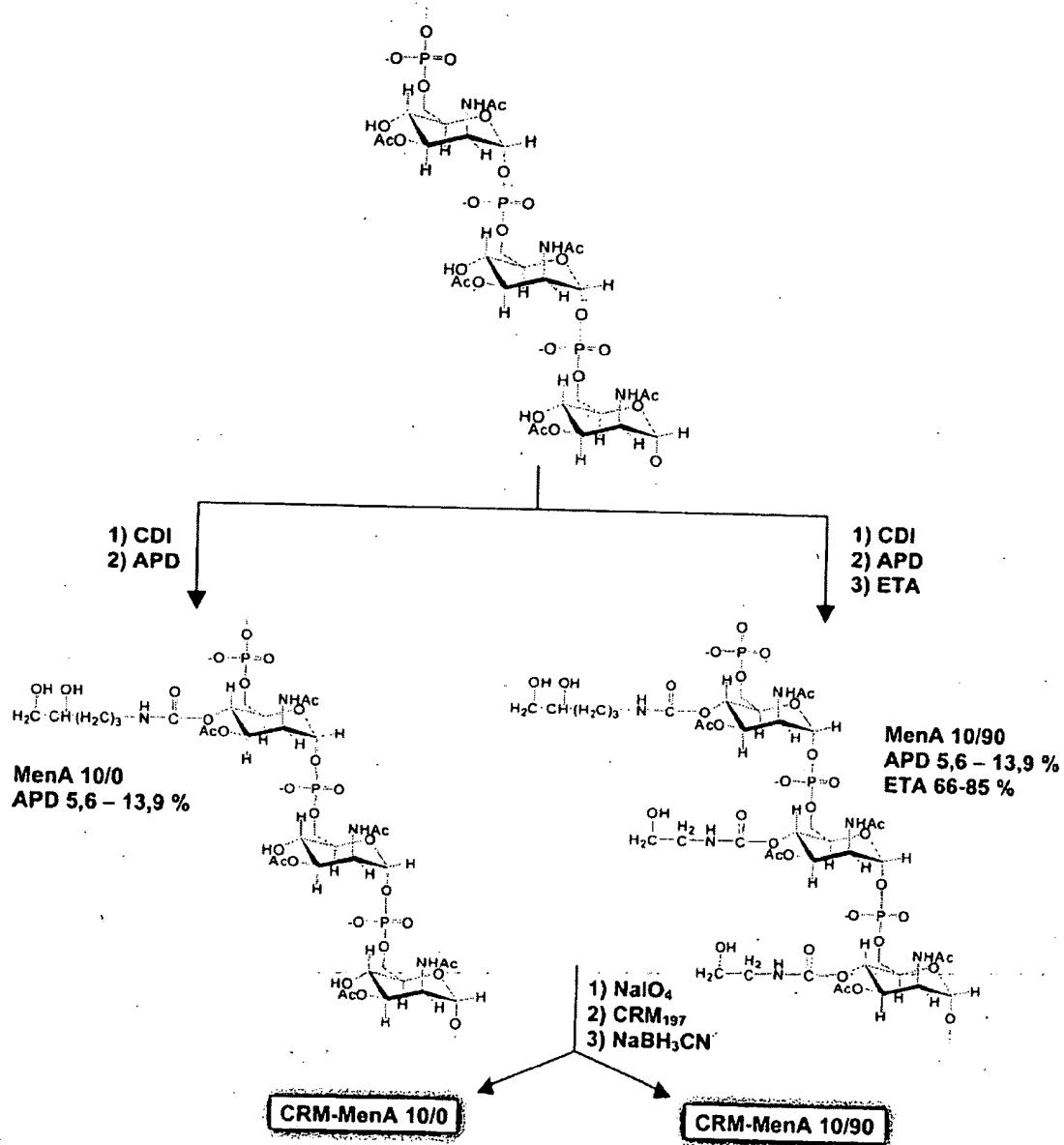


Figura 2

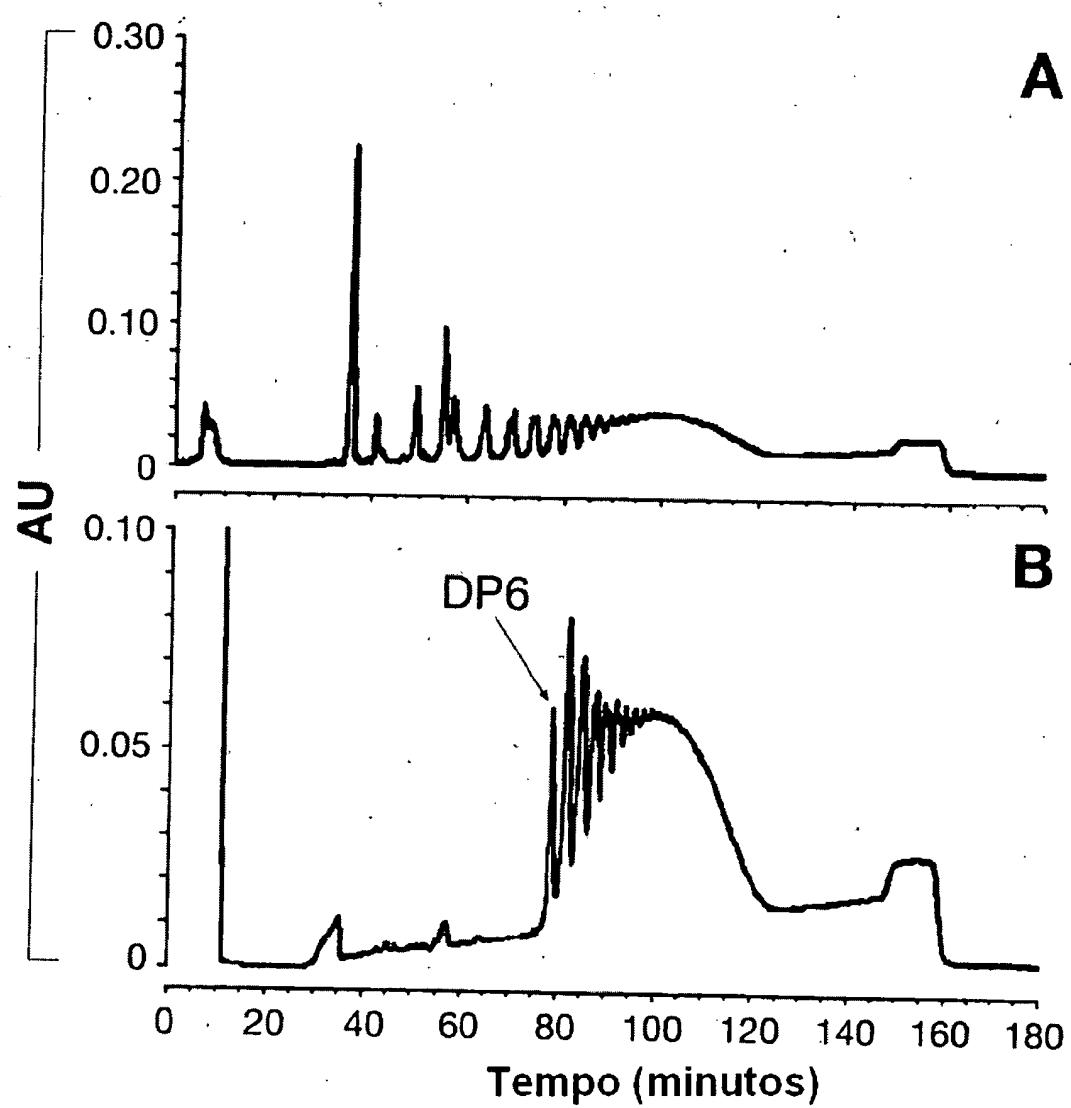


Figura 3

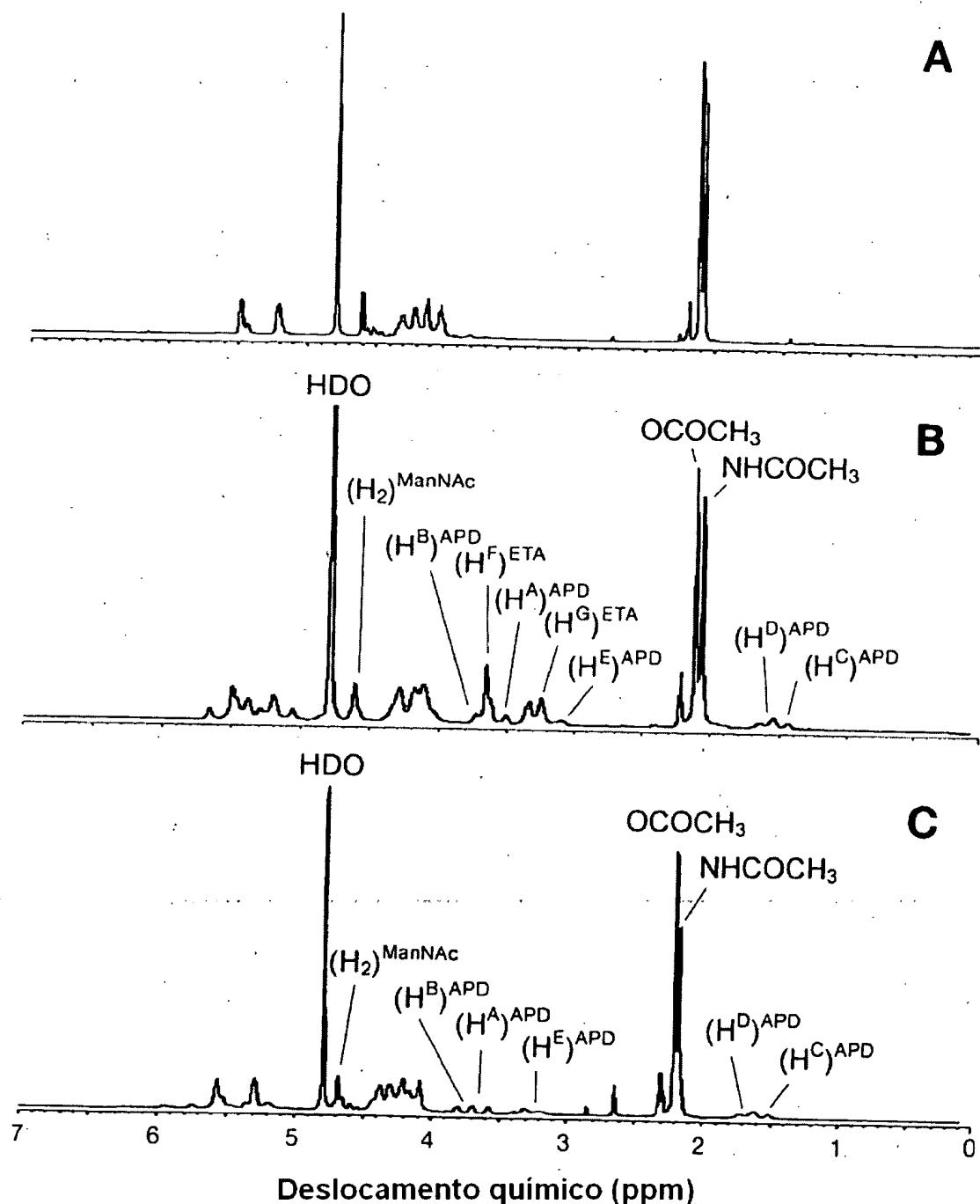
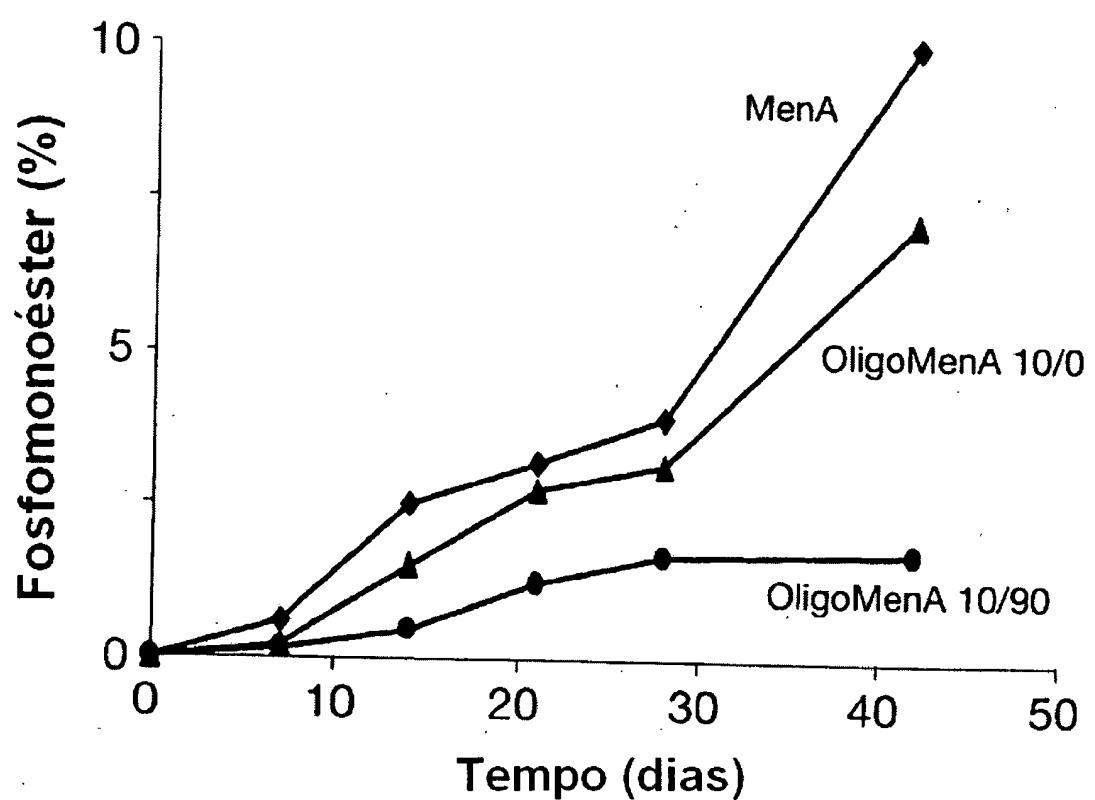


Figura 4



**Figura 5**

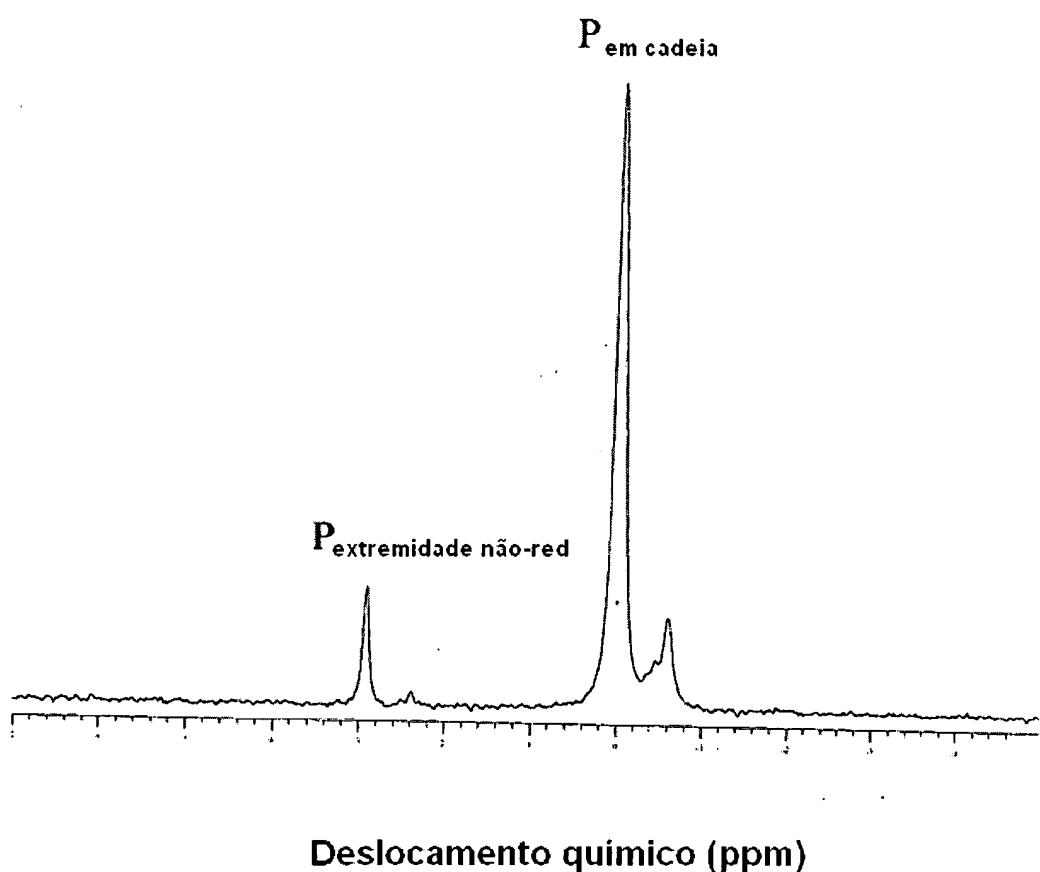


Figura 6

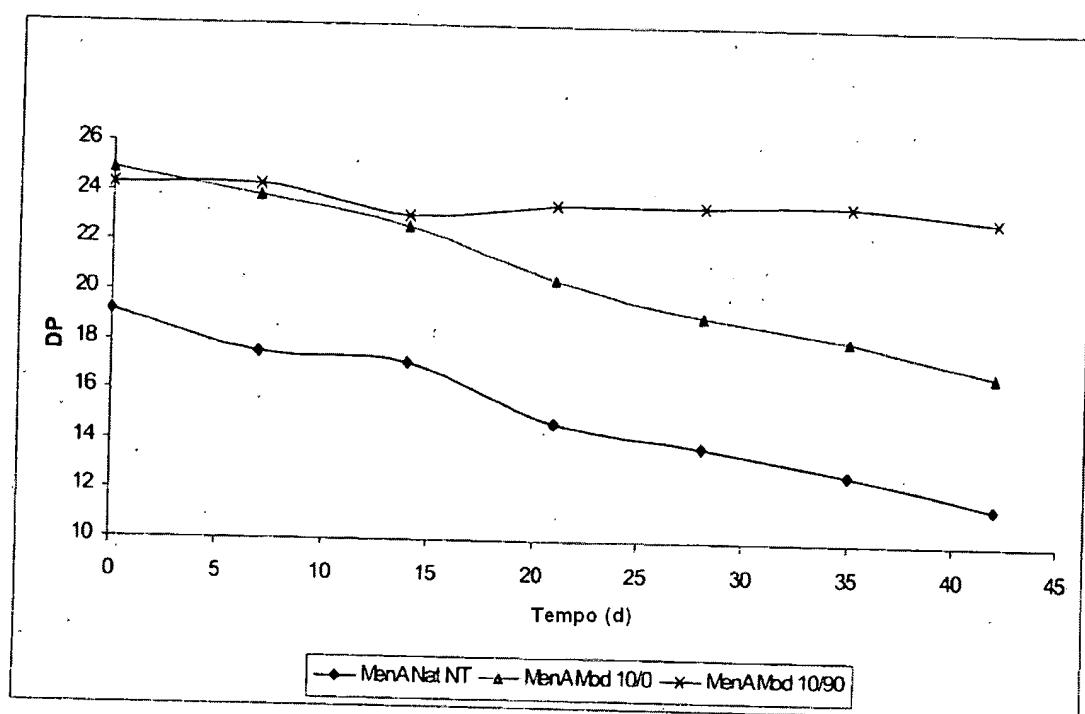


Figura 7

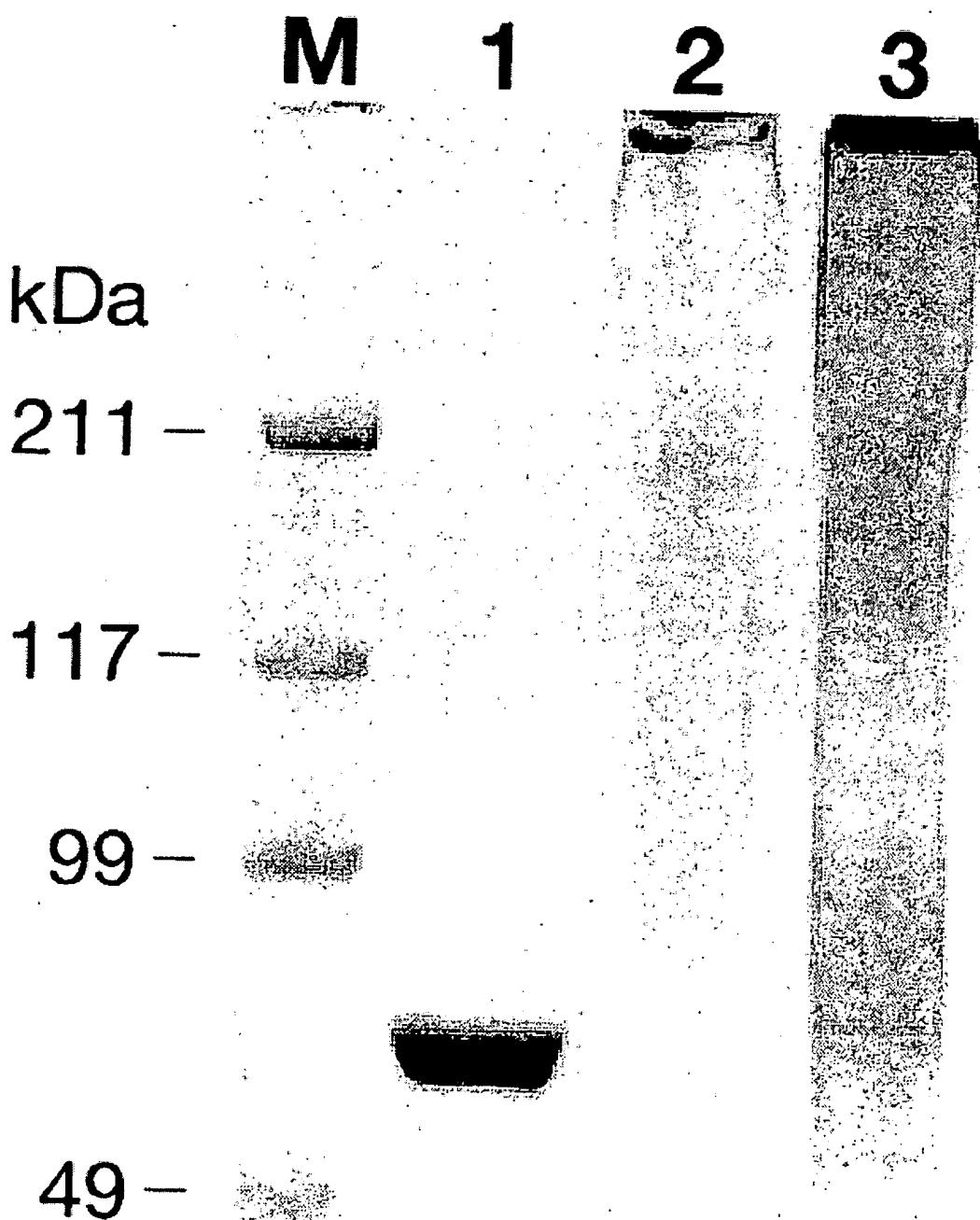


Figura 8

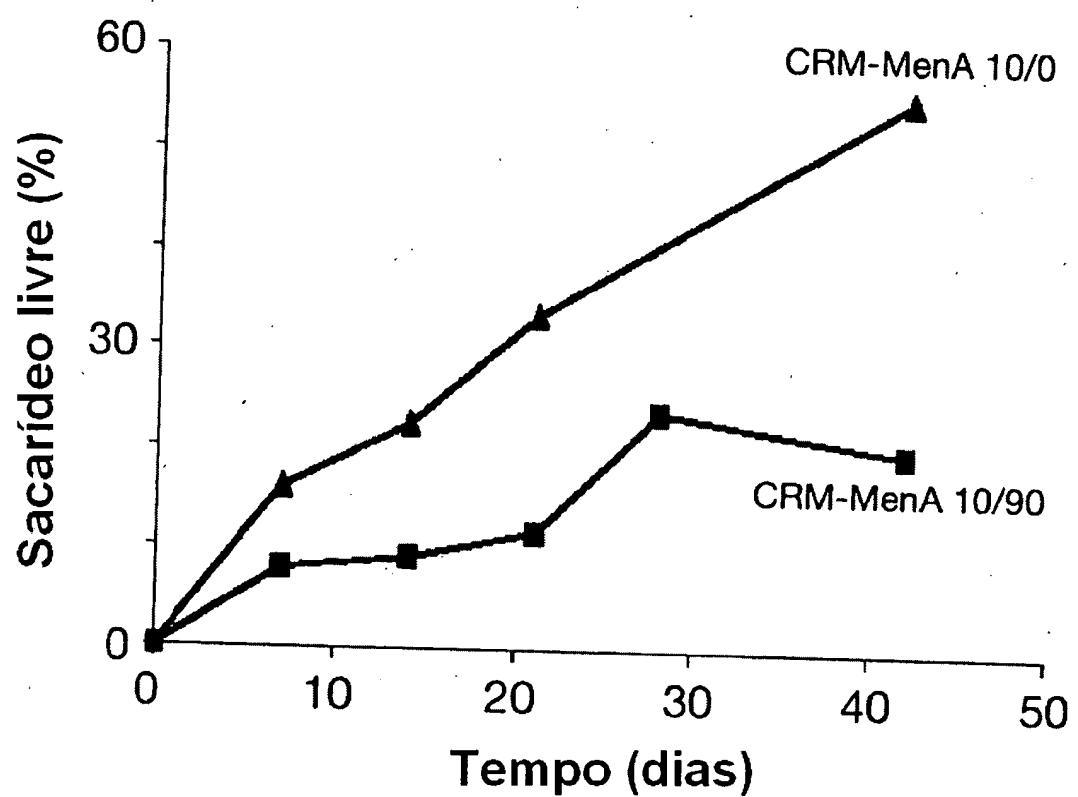
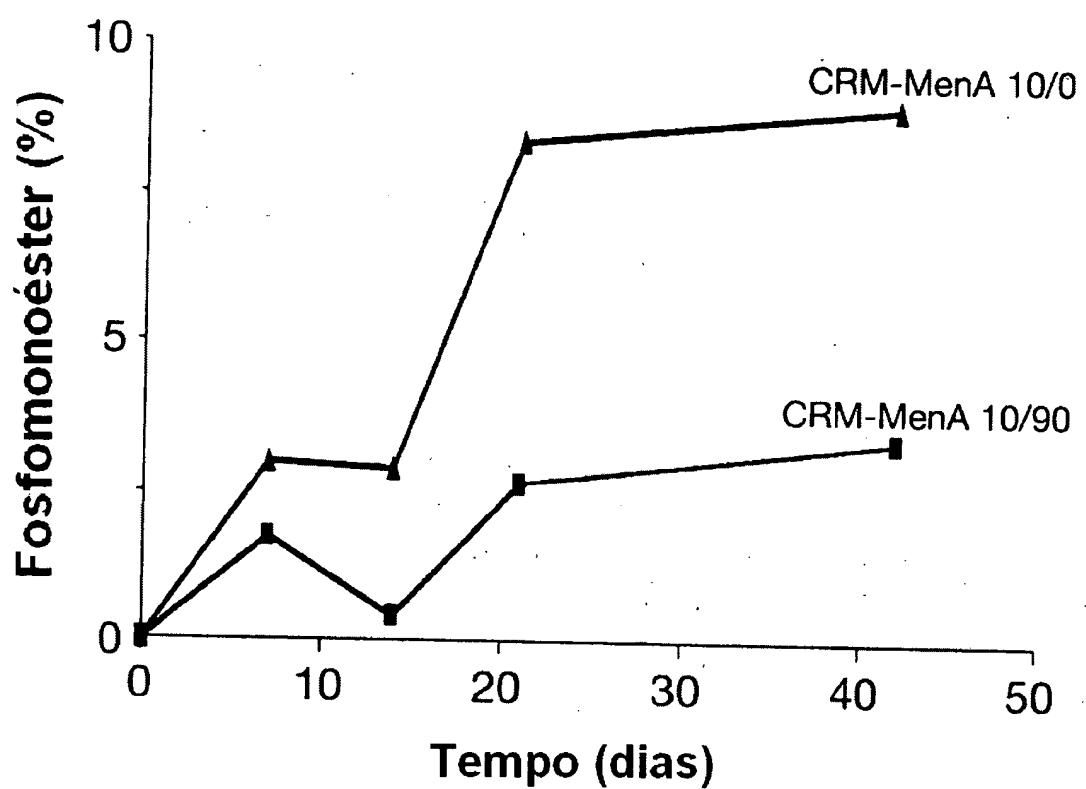


Figura 9



**SACARÍDEOS MODIFICADOS**

Sacarídeos capsulares modificados compreendendo um grupo bloqueador em uma posição de grupo hidroxila em pelo menos uma das unidades de monossacarídeo do sacarídeo capsular nativo correspondente, em que o grupo bloqueador tem a fórmula (Ia) ou (Ib):  $-OX-Y$  (Ia) ou  $-O-R^1$  (Ib) em que X é C(O), S(O) ou SO<sub>2</sub>; Y é NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> ou R<sup>3</sup>; R<sup>1</sup> é C<sub>1-6</sub> alquila substituída com 1, 2 ou 3 grupos independentemente selecionados de hidroxila, sulfidrila e amina; R<sup>2</sup> é H ou C<sub>1-6</sub> alquila; e R<sup>3</sup> é C<sub>1-6</sub> alquila; processos para modificar um sacarídeo capsular com os grupos bloqueadores; conjugados de proteína sacarídea compreendendo o sacarídeo capsular modificado; processos para fazer os conjugados de proteína sacarídea, composições farmacêuticas compreendendo os sacarídeos capsulares modificados e/ou conjugados de proteína sacarídea; e métodos e usos dos mesmos.