



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112013030552-5 B1



(22) Data do Depósito: 28/05/2012

(45) Data de Concessão: 15/03/2022

(54) Título: COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, MÉTODO IN VITRO PARA PRODUÇÃO DA DITA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA E USO DA MESMA PARA PREVENIR OU INIBIR UMA INFECÇÃO POR MALÁRIA OU PARA TRATAR UMA INFECÇÃO POR MALÁRIA EXISTENTE

(51) Int.Cl.: A61K 39/015; A61P 33/06.

(30) Prioridade Unionista: 23/08/2011 NL 2007292; 27/05/2011 US 61/490,761; 29/03/2012 US 61/617,435.

(73) Titular(es): GRIFFITH UNIVERSITY; LA TROBE UNIVERSITY; MOSES LEE.

(72) Inventor(es): MICHAEL GOOD; TERRY W. SPITHILL; MOSES LEE.

(86) Pedido PCT: PCT AU2012000594 de 28/05/2012

(87) Publicação PCT: WO 2012/162731 de 06/12/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 27/11/2013

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA E USO DA DITA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA. A presente invenção se refere a uma composição imunogênica para uso como uma vacina contra a malária na fase sanguínea, a um método de produção da composição imunogênica e a um método para o tratamento da malária. A composição imunogênica inclui merozoítos isolados ou purificados, ou células vermelhas do sangue infectadas com merozoítos, tratadas com centanamycin ou tafuramycin A. A composição imunogênica não inclui um adjuvante. Uma dose única da composição imunogênica é suficiente para proteger um animal contra infecção por malária subsequente pelo mesmo isolado, cepa ou espécies de Plasmodium utilizados na composição imunogênica, ou por um ou mais isolados, cepas ou espécies heterólogos de Plasmodium.

“COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, MÉTODO *IN VITRO* PARA PRODUÇÃO DA DITA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA E USO DA MESMA PARA PREVENIR OU INIBIR UMA INFECÇÃO POR MALÁRIA OU PARA TRATAR UMA INFECÇÃO POR MALÁRIA EXISTENTE”

Campo Técnico

[001]A presente invenção refere-se à malária. Mais particularmente, esta invenção se refere ao uso de merozoítos da malária quimicamente atenuados como vacina contra malária na fase sanguínea.

Fundamentos

[002]Uma vacina eficaz contra a malária representará uma aquisição sustentável e econômica às intervenções atualmente disponíveis para o controle da malária. Vacinas contra a malária têm sido experimentadas contra as diferentes fases da infecção pela malária, tipicamente denominadas "fase de esporozoíto", "fase hepática" e "fase sanguínea". A fase hepática ocorre, quando os esporozoítos infectam os hepatócitos do hospedeiro, multiplicando-se assexuadamente e assintomaticamente por um período de 8-30 dias. Uma vez instalados no fígado, esses organismos se diferenciam em milhares de merozoítos que, após a ruptura de suas células hospedeiras, escapam para o sangue e infectam as células vermelhas sanguíneas, iniciando assim a fase eritrocítica ou "fase sanguínea" do ciclo de vida. No interior das células vermelhas do sangue, os parasitas continuam se multiplicando, mais uma vez assexuadamente, periodicamente deixando seus hospedeiros para invadir novas células vermelhas do sangue. Ocorrem vários destes ciclos de amplificação. Desse modo, descrições clássicas de ondas de febre surgidas das ondas simultâneas dos merozoítos que escapam e infectam as células vermelhas do sangue.

[003]Vacinas para a fase sanguínea assexuada têm sido dirigidas à redução do crescimento e multiplicação do parasita no sangue e, portanto, a ocorrência ou severidade dos sintomas. Essas vacinas deveriam reduzir a morbidade e a mortali-

dade em decorrência da malária nos grupos mais suscetíveis (por exemplo, crianças pequenas e mulheres grávidas) habitando áreas endêmicas para a malária.

[004]Uma abordagem é testar vacinas de subunidade recombinante contra a malária na fase sanguínea, mas até o momento nenhuma das vacinas candidatas de subunidade para a fase sanguínea evoluiu além dos testes de Fase III.

[005]Uma abordagem alternativa tem sido o uso de parasitas da fase sanguínea total (por exemplo, merozoítos). Parasitas totais da fase sanguínea foram administrados pela primeira vez a em 1948 quando Freund empenhou-se no desenvolvimento de uma vacina do parasita total. Ao longo dos 30 anos seguintes foram conduzidos mais de 12 estudos separados em macacos (resumidos em McCarthy e Good, 2010) até que os antígenos da malária foram clonados pela primeira vez em 1983, o que levou à era do paradigma da subunidade. A estratégia do parasita total foi abandonada pelo desenvolvimento da vacina na fase sanguínea, porque se acreditava que números altíssimos de parasitas ($5 \times 10^7 - 10^{10}$) seriam necessários, tornando impossível preparar esse tipo de vacina em escala no sangue humano. O único adjuvante considerado útil era o adjuvante completo de Freund, incompatível com o ser humano.

[006]Mais recentemente, foram efetuadas tentativas na abordagem do "parasita completo de baixa dose" que pode ser caracterizada da seguinte maneira: (i) pretende induzir uma resposta imune celular (célula T), contrariamente a uma resposta do anticorpo; (ii) doses baixíssimas dos parasitas não são apenas suficientes, mas essenciais para manter as baixas doses; e (iii) a imunidade heteróloga é induzida porque presumivelmente determinantes antigênicos-alvos das células T são altamente conservados entre cepas e espécies de *Plasmodium* (Pinzon-Charry et al, 2010), eliminando um dos principais impedimentos das vacinas de subunidades que buscam induzir anticorpos dirigidos às proteínas da superfície de célula vermelha infectada ou merozoíto polimórfico. Ademais, doses muito baixas dos parasitas su-

plantam o impedimento logístico de obter sangue em volume suficiente para a preparação de uma vacina em escala ou a necessidade de encontrar uma maneira de promover o crescimento dos parasitas em cultura axênica. Os dois fatores cruciais da dose do parasita e da resposta imune celular estão, na verdade, em estreita correlação. Para induzir uma vigorosa resposta imune celular é importante utilizar apenas uma baixa dose de parasitas (Elliott *et al*, 2005).

[007]Três estudos relatam que humanos ou camundongos foram imunizados com doses baixíssimas de parasitas totais – dois nos quais os vacinados receberam uma dose baixíssima de células vermelhas vivas infectadas (com suspensão da infecção pelos fármacos bem antes que os parasitas fossem visualizados no sangue por microscopia; Elliott *et al*, 2005; Pombo *et al*, 2002), e o outro em que camundongos foram imunizados com 100-1000 células vermelhas infectadas mortas misturadas com CpG e Alum para a imunização primária (Pinzon-Charry *et al*, 2010). Tanto em humanos quanto em camundongos, as respostas imunes foram caracterizadas pela forte resposta proliferativa *in vitro* aos parasitas das células T CD4+ +/- CD8+, secreção de γ -interferon e indução da sintase do óxido nítrico nas células mononucleares do sangue periférico. Anticorpos específicos do parasita não foram induzidos, ou foram induzidos em níveis muito baixos. Células T de memória (“central” e “efetora”) foram induzidas. Sugeriu-se que as células T de memória induzidas terão especificidade para antígenos internos do parasita e que serão altamente conservados, já que não estão sujeitos à pressão seletiva imune das células B e anticorpo. Esse foi o caso para o principal antígeno alvo da célula T de *Plasmodium falciparum* até então identificado, a enzima de salvamento da purina, HGXPRT (Makobongo *et al*, 2003) onde a imunidade pareceu ser mediada exclusivamente pelas células T.

[008]A exigência para o salvamento do nucleotídeo da purina pelos parasitas da malária na fase sanguínea tem sido explorada através da produção de parasitas da malária geneticamente atenuados desprovidos de um gene funcional codificador

do transportador do nucleotídeo da purina 1 (*Pyntl-*), que, com a administração a camundongos conferiu imunidade estéril contra a infecção por malária subsequente (Ahmed et al., 2010; Publicação Internacional 2008/094183). No entanto, a aplicabilidade desta abordagem aos humanos é questionável devido à possibilidade de seleção do "surto" genético após a administração a humanos.

Sumário

[009]A presente invenção reconhece que as preparações para a vacina do parasita da malária total até o momento consistiram em uma infecção viva (seguida de cuidados medicamentosos antes de a parasitemia tornar-se evidente e sintomática) ou uma preparação de congelamento/descongelamento requerendo que CpG e alum sejam eficazes. Nenhuma destas modalidades de entrega é adequada ao uso humano. Ademais, o uso de parasitas da malária totais geneticamente atenuados em humanos é obstruído por questões de segurança. No entanto, surpreende que o tratamento de merozoítos ou células vermelhas do sangue infectadas com merozoítos, junto com agentes de ligação ao DNA, como a tafuramicina A ou centanamicina, ou análogos ou derivados dessas substâncias, atenuem suficientemente os merozoítos para permitir a administração de merozoítos ou células vermelhas do sangue infectadas para fins de imunização contra malária. Causa ainda mais surpresa que esta imunização é eficaz como dose única na ausência de adjuvante. Outro benefício inesperado é que os merozoítos tratados de um isolado, cepa ou espécie de malária particular de *Plasmodium* imunizarão contra a infecção por isolados, cepas e espécies heterólogos de *Plasmodium*.

[0010]Portanto, a invenção é largamente dirigida a uma composição de vacina que compreende parasitas da malária na fase sanguínea, totais, quimicamente atenuados, preferencialmente na ausência de adjuvante.

[0011]Uma modalidade preferencial inclui a administração de uma dose baixa de parasitas da malária na fase sanguínea atenuados, tanto como células verme-

lhas do sangue infectadas por parasita quanto como parasitas purificados na fase sanguínea na ausência de adjuvante. Ainda mais preferencialmente, uma única baixa dose dos parasitas da malária na fase sanguínea atenuados ou células vermelhas do sangue infectadas é suficiente para imunizar a infecção por malária subsequente.

[0012] Preferencialmente, as células vermelhas do sangue infectadas por parasita são células intactas.

[0013] Em um aspecto, a invenção fornece um método de produção de uma composição imunogênica que inclui a etapa de tratar parasitas da malária na fase sanguínea ou células vermelhas do sangue infectadas com os ditos parasitas da malária na fase sanguínea com centanamicina, tafuramicina A ou análogo ou derivado dessas substâncias, para produzir deste modo a composição imunogênica.

[0014] Por conveniência, o método elimina a etapa de inclusão de um adjuvante.

[0015] Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição imunogênica que compreende parasitas da malária na fase sanguínea ou células vermelhas do sangue infectadas com os ditos parasitas da malária na fase sanguínea que foram tratados com centanamicina, tafuramicina A ou análogo ou derivado dessas substâncias; e um carreador, diluente ou excipiente imunologicamente aceitável.

[0016] Por conveniência, a composição imunogênica não inclui um adjuvante.

[0017] Em outro aspecto ainda, a invenção fornece uma composição imunogênica para uso no tratamento ou prevenção da malária, a dita composição imunogênica compreendendo parasitas da malária na fase sanguínea ou células vermelhas do sangue infectadas com os ditos parasitas da malária na fase sanguínea que foram tratados com centanamicina, tafuramicina A ou análogo ou derivado dessas substâncias; e um carreador, diluente ou excipiente imunologicamente aceitável.

[0018] Por conveniência, a composição imunogênica não inclui um adjuvante.

[0019]Em outro aspecto ainda, a invenção fornece um método para o tratamento ou prevenção da malária, o dito método incluindo a etapa de administrar a composição imunogênica do aspecto antes mencionado a um animal para deste modo evitar ou inibir a infecção por malária ou tratar uma infecção por malária existente no dito animal.

[0020]Preferencialmente, o método inclui administrar uma dose única da dita composição imunogênica para deste modo evitar ou inibir infecção por malária ou tratar uma infecção por malária existente no dito animal.

[0021]Por conveniência, o método não inclui a administração de um adjuvante.

[0022]Tipicamente, os parasitas da malária na fase sanguínea ou células vermelhas do sangue infectadas com os ditos parasitas da malária na fase sanguínea são uma “dose baixa” de parasitas da malária na fase sanguínea.

[0023]Tipicamente, de acordo com os aspectos mencionados, os parasitas da malária na fase sanguínea incluem, ou são, merozoítos, esquizontes, anéis ou trofozoítos, muito embora sem limitar-se aos citados.

[0024]Preferencialmente, o animal dos aspectos mencionados é o ser humano.

[0025]Ao longo deste relatório descritivo, a menos que o contexto determine de outra forma, as palavras "compreendem", "compreende" e "que compreende" serão entendidas de forma a incluir um número inteiro informado ou grupo de números inteiros, porém não excluindo qualquer outro número inteiro ou grupo de números inteiros.

Breve Descrição das Figuras

[0026]Figura 1: camundongos A/J foram vacinados com 5 doses de 10^4 RBCs parasitadas por *P. chabaudi* (pRBC). Os parasitas foram atenuados *in vitro* utilizando centanamicina a 2 μ M por 40 minutos. pRBC foram então lavadas abun-

dantemente antes de administradas aos camundongos. Os camundongos foram infectados com *P. chabaudi* (10^5 pRBC/camundongo - iv) 21 dias após a vacinação final. Os dados no painel superior representam a parasitemia média de 5 camundongos por grupo +/- SEM. Todos os camundongos não expostos (*naive*) sucumbiram ou eliminado por eutanásia no 8º dia. Os dados no painel inferior mostram as pontuações clínicas, onde 0 representa ausência de sinais de sofrimento.

[0027]Figura 2: camundongos A/J foram vacinados com uma dose única de 10^4 pRBC de *P. chabaudi*. Os parasitas foram atenuados *in vitro* utilizando centanamicina a 2 μ M por 40 minutos. pRBC foram então lavadas abundantemente antes de administradas aos camundongos. Os camundongos foram infectados com *P. chabaudi* (10^5 pRBC/camundongo - iv) 35 dias após a vacinação final. Os dados representam a parasitemia média de 5 camundongos por grupo +/- SEM. Todos os camundongos não expostos (*naive*) sucumbiram ou foram eliminados por eutanásia no 8º dia.

[0028]Figura 3: camundongos A/J foram vacinados com 3 doses ou uma dose única de 10^4 RBCs parasitadas por *P. chabaudi*. Os parasitas foram atenuados *in vitro* utilizando centanamicina a 200 nM por 40 minutos. pRBC foram então lavadas abundantemente antes de administradas aos camundongos. Os camundongos foram infectados com *P. chabaudi* (10^5 pRBC/camundongo -iv) 21 dias após a vacinação final. Os dados representam a parasitemia média de 5 camundongos por grupo +/- SEM. todos os camundongos *naive* sucumbiram ou foram eliminados por eutanásia no 9º dia.

[0029]Figura 4: camundongos A/J foram vacinados com 3 doses (cada dose com intervalo de uma semana) de 10^4 , 10^5 ou 10^6 pRBC de *P. chabaudi*. Os parasitas foram atenuados *in vitro* utilizando centanamicina a 2 μ M por 40 minutos. pRBC foram então lavadas abundantemente antes de administradas aos camundongos. Os camundongos foram infectados com *P. chabaudi* (10^5 pRBC/camundongo - iv) 14

dias após a vacinação final representam a parasitemia média de 5 camundongos por grupo +/- SEM. todos os camundongos *naive* sucumbiram ou foram eliminados por eutanásia no 9º dia.

[0030]A Figura 5: camundongos A/J foram vacinados com uma dose única de 10^7 RBCs parasitadas por *P. chabaudi*. Os parasitas foram atenuados *in vitro* utilizando centanamicina a $2\mu\text{M}$ ou 200nM por 40 minutos. pRBC foram então lavadas abundantemente antes de administradas aos camundongos. Os camundongos foram infectados com *P. chabaudi* (10^5 pRBC/camundongo -iv) 14 dias após a vacinação final. Os dados representam a parasitemia média de 5 camundongos por grupo +/- SEM. #500 μl de sangue foram extraídos dos camundongos imunizados no 42º dia pós-inoculação e transferidos aos camundongos repórter *naive*. Não foram detectados parasitas por microscopia 14 dias antes da infecção.

[0031]A Figura 6: Dados da Pontuação Clínica.

[0032]0-4 pontos camundongos exibindo dois ou mais pontos na Categoria 2 por 2 dias consecutivos são selecionados.

[0033]Categoria 1:

Normal (0) Aparência saudável

Leve: (1) Ativo, responsivo, Pelo ligeiramente eriçado.

(2) Pelo eriçado, movimentos lentos, respostas lentas.

[0034]Categoria 2:

Moderado: (3) Pelo eriçado, inativo, não responsivo.

Severo: (4) Pelo opaco, imóvel, palour, carga parasitária alta, hematúria.

[0035]Figura 7: Comparação da vacina de pRBC preparada utilizando centanamicina (composto da fórmula III) ou um análogo, TH-III-149, também conhecido como tafuramicina A (composto da fórmula II). Os dois compostos foram utilizados na concentração de $2\mu\text{M}$ e pRBC foram incubadas por 40 minutos a 37°C antes que os compostos fossem lavados das células três vezes. Os camundongos A/J imuni-

zados com células vermelhas do sangue parasitadas por *P. chabaudi* atenuadas com centanamicina ou tafuramicina A (TH-III-149) (pRBC; fases de anel) foram submetidas a: (A) infecção homóloga com 10^5 parasitas de *P. chabaudi*; ou (B) infecção heteróloga com 10^4 parasitas de *P. vinckei*.

[0036]Figura 8: Condição para que as membranas da RBC permaneçam intactas para eficácia da vacina. Os camundongos foram imunizados com uma única injeção intravenosa de: 10^6 células vermelhas do sangue parasitadas na fase de anel de *P. chabaudi* intactas (pRBC) que foram atenuadas por incubação em centanamicina $2\mu\text{M}$ (composto da fórmula III) por 40 minutos; ou 10^6 pRBC na fase de anel de *P. chabaudi* que foram atenuadas *in vitro* por incubação em centanamicina $2\mu\text{M}$ (composto da fórmula III) por 40 minutos e então submetidas à lise em água destilada. Os camundongos foram infectados 2 semanas depois da imunização com 10^5 pRBC de *P. chabaudi*.

Descrição Detalhada

[0037]A presente invenção é confirmada, pelo menos parcialmente, na descoberta de que uma única dose baixa de parasitas da malária na fase sanguínea tratados com centanamicina ou tafuramicina A (por exemplo, merozoítos, esquizontes, anéis ou trofozoítos, sem limitar-se aos citados) ou de células vermelhas do sangue infectadas com os mesmos, imunizam efetivamente contra a infecção por malária subsequente na ausência de adjuvante. Ademais, merozoítos de um isolado, cepa ou espécie particular da malária tratados com centanamicina ou tafuramicina A, imunizarão contra a infecção através de isolados, cepas e espécies heterólogos da malária. Um atributo particular da invenção é que a imunização com células vermelhas do sangue parasitadas (pRBC) tratadas de acordo com a invenção são ideais quando utilizam pRBCs intactas.

[0038]Por conseguinte, em um aspecto preferencial, a invenção fornece um método de produção de uma composição imunogênica que inclui a etapa de tratar

parasitas da malária na fase sanguínea isolados ou purificados ou células vermelhas do sangue infectadas com os ditos parasitas da malária na fase sanguínea com centanamicina, tafuramicina A ou análogo ou derivado dessas substâncias, para produzir desse modo a dita composição imunogênica.

[0039]Em outro aspecto preferencial, a invenção fornece uma composição imunogênica que compreende uma dose baixa de parasitas da malária na fase sanguínea isolados ou purificados ou células vermelhas do sangue infectadas com os ditos parasitas da malária na fase sanguínea que foram tratados com centanamicina, tafuramicina A ou análogo ou derivado dessas substâncias, a dita composição excluindo adjuvante.

[0040]Em mais um aspecto preferencial, a invenção fornece uma composição imunogênica para evitar ou tratar a malária, a dita composição imunogênica compreendendo uma dose baixa de parasitas da malária na fase sanguínea isolados ou purificados ou células vermelhas do sangue infectadas com os ditos parasitas da malária na fase sanguínea que foram tratados com centanamicina, tafuramicina A ou análogo ou derivado dessas substâncias, a dita composição excluindo adjuvante.

[0041]Em outro aspecto preferencial, a invenção fornece um método para o tratamento ou prevenção da malária, o dito método incluindo a etapa de administrar a composição imunogênica do aspecto citado a um animal para deste modo evitar ou inibir a infecção por malária ou tratar uma infecção por malária existente no dito animal, o dito método excluindo a administração do adjuvante.

[0042]Tipicamente, os parasitas da malária na fase sanguínea são, ou incluem, merozoítos esquizontes, anéis ou trofozoítos, no entanto, sem limitar-se aos citados. Por exemplo, os parasitas da malária na fase sanguínea podem ser merozoítos purificados ou um mistura de merozoítos isolados e outros parasitas da malária na fase sanguínea, tais como esquizontes, anéis e ou trofozoítos.

[0043]É interessante perceber a partir do exposto que uma modalidade da

invenção se refere a um tratamento *in vitro* dos parasitas da malária na fase sanguínea isolados ou purificados, tais como merozoítos ou células vermelhas do sangue infectadas com parasitas na fase sanguínea (por exemplo, merozoítos, esquizontes, anéis ou trofozoítos, no entanto, sem limitar-se aos citados), com centanamicina, tafuramicina A ou um análogo ou derivado da centanamicina ou tafuramicina A. Este tratamento é eficaz na atenuação química dos parasitas da malária na fase sanguínea (por exemplo, merozoítos, esquizontes, anéis ou trofozoítos, no entanto, sem limitar-se aos citados) sem matar o parasita, por exemplo, inibindo a replicação do parasita. Tipicamente, os parasitas da malária na fase sanguínea atenuados não são capazes de proliferar, ou essa capacidade é limitada, depois da atenuação através do tratamento com centanamicina ou tafuramicina A.

[0044]A centanamicina é um agente alquilante e de ligação ao DNA aquiral sintetizada logicamente a partir da (+)-duocarmicina SA que é desprovida de um estereocentro. A centanamicina é ligada covalentemente à adenina-N3 no motivo da sequência de DNA (A/T)AAA.

[0045]A tafuramicina A é um agente alquilante e de ligação ao DNA sintetizada logicamente a partir das duocarmicinas que compreende um estereocentro.

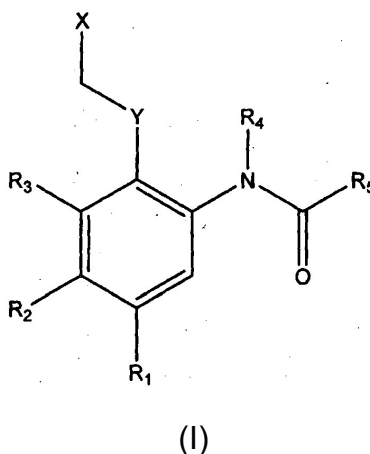
[0046]Por "análogos ou derivados da centanamicina ou tafuramicina A" entende-se qualquer molécula com afinidades estruturais à centanamicina ou tafuramicina A que exiba ligação às sequências de nucleotídeo contendo AT para induzir, desta maneira, danos ao DNA.

[0047]Centanamicina, tafuramicina A, análogos ou derivados, inclusive análogos e derivados racêmicos, quirais e aquirais da duocarmicina e CC-1065, isômeros, sais ou solvatos racêmicos, quirais e aquirais dessas substâncias também são descritos nos documentos WO2002/030894, WO2008/050140, WO2009/064908, Howard et al., 2002 e Purnell et al., 2006, Chavda et al., 2010 e Patente dos Estados Unidos 6660742. Cita-se particularmente os análogos seco-iso-

ciclopropilfurano[2,3-e]indolina-TMI (TH-III-149 ou tafuramicina A) e *seco*-ciclopropiltetrahidrofurano[2,3-f]quinolina-TMI (TH-III-151 ou tafuramicina B) de CC-1065 e as duocarmicinas como descritas em Howard et al., 2002, *supra* e Purnell et al., 2006, *supra*.

[0048]O *seco*-hidroxi-aza-CBI-TMI aquiral, um composto *seco*-ciclopropilpirido[e]indolona (CPyl), é um exemplo de um análogo da centanamicina como descrito em Chavda et al., 2010, *supra*. Os análogos 5-metil-furano racêmicos e quirais da tafuramicina A são descritos em Purnell et al., 2006, *supra*.

[0049]Em uma modalidade preferencial, a centanamicina, tafuramicina A ou o análogo ou derivado é um composto da fórmula I:



onde,

R₁ é NHR ou OR, onde R é selecionado entre H, benzil, benziloxicarbonil, 4-nitrobenziloxicarbonil e N'-metilpiperazinil-N-carbonil;

R₂ é selecionado entre H e alquila C₁₋₆;

R₃ é selecionado entre H e alquila C₁₋₆;

ou R₂ e R₃, formam um anel fundido selecionado entre o grupo formado por um anel de benzeno, um anel de pirrol, um anel de piridina, um anel de furano e um anel de 5-metil-furano, e esse anel fundido pode ser opcionalmente substituído por alquila C₁₋₆, CF₃ ou alquilocarbonil C₁₋₆;

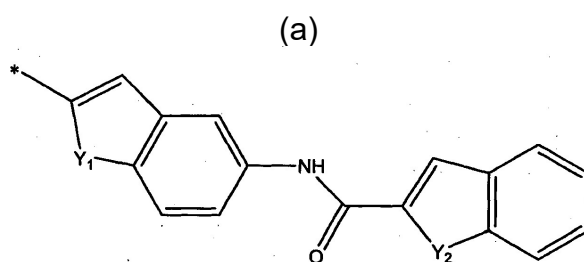
Y é um radical alquilenos selecionado entre -CH₂-, -CH₂CH₂- ou -CH₂CH₂CH₂-

; ou Y pode ser -CH- para formar um anel com cinco membros com R₄;

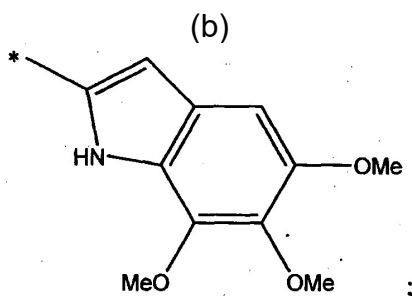
X é um grupo abandonador eletrofílico;

R₄ é selecionado entre H, alquila C₁₋₆, um grupo -CH₂- ligado a Y para formar um anel com cinco membros ou um grupo -CH₂- ligado a -CH₂- ao qual X é anexado para formar um anel com seis membros;

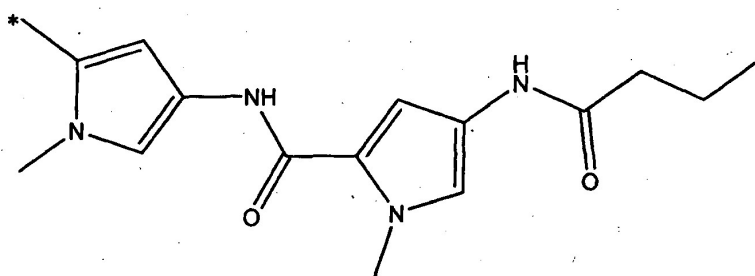
R₅ é formado do grupo formado por:



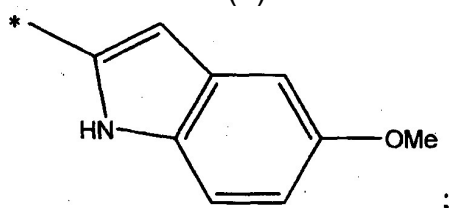
onde Y₁ e Y₂ são independentemente selecionados entre O e NH;

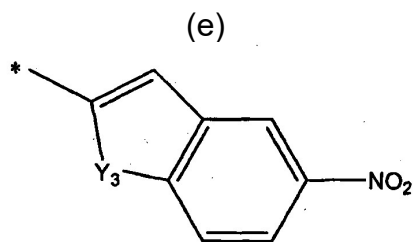


(c)

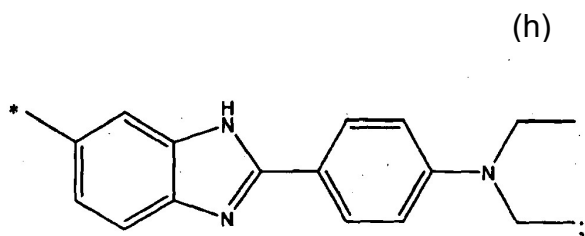
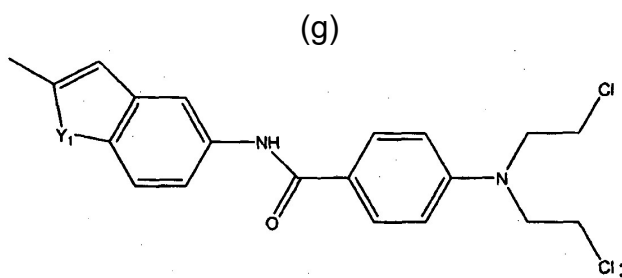
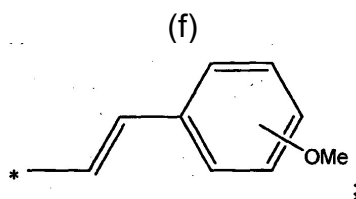


(d)





onde Y_3 é selecionado entre O e NH



e

(i) t-butoxi, benziloxi e 9-fluorenilmetiloxi.

[0050] Em uma modalidade particular do composto da fórmula I:

Preferencialmente, R_1 é OH.

Preferencialmente, R_2 e R_3 juntos formam um anel de furano.

Preferencialmente, Y é -CH- e forma um anel de cinco membros com R_4 .

Preferencialmente, X é selecionado entre cloro, bromo, iodo, mesilato, tosilato, tio, amônio, alquilsulfoxil.

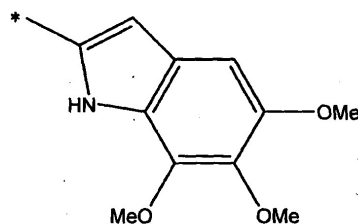
Mais preferencialmente, X é selecionado entre cloro, bromo, iodo, mesilato e

tosilato.

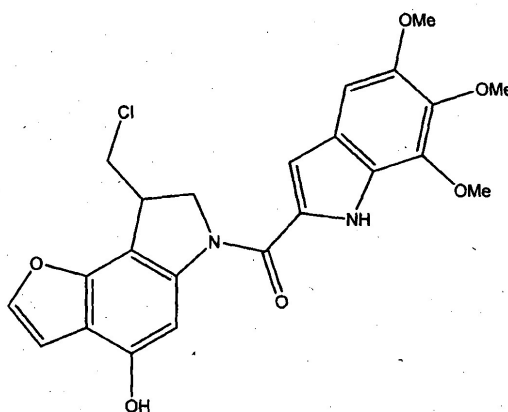
Ainda mais preferencialmente, X é cloro.

Preferencialmente, R₄ é um grupo -CH₂- ligado a Y para formar uma estrutura de anel com cinco membros.

Preferencialmente, R₅ é:



[0051] Uma forma preferencial desta modalidade é um composto da fórmula II (tafuramicina A):



(II)

[0052] Em outra modalidade do composto da fórmula I:

Preferencialmente, R₁ é NH₂.

Preferencialmente, R₂ e R₃ juntos formam um anel de benzeno.

Preferencialmente, Y é -CH-.

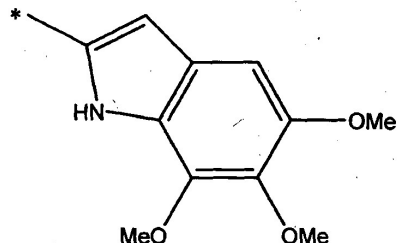
Preferencialmente, X é selecionado entre cloro, bromo, iodo, mesilato, tosilato, tio, amônio, alquilsulfonil C₁₋₆ e alquilsulfoxil C₁₋₆.

Mais preferencialmente, X é selecionado entre cloro, bromo, iodo, mesilato e tosilato.

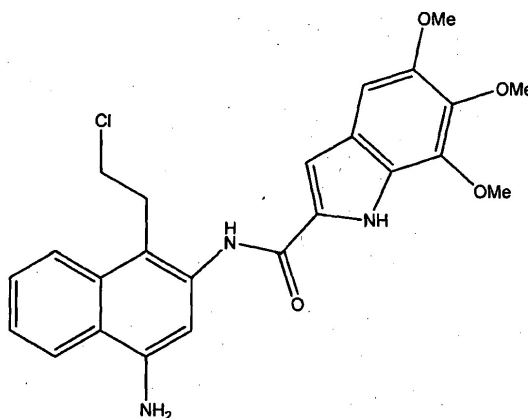
Ainda mais preferencialmente, X é cloro.

Preferencialmente, R₄ é H ou alquila C₁₋₆.

Preferencialmente R₅ é



[0053]Uma forma preferencial desta modalidade é um composto da fórmula III (centanamicina):



(III)

[0054]Em outra modalidade do composto da fórmula I;

Preferencialmente, R₁ é OH.

Preferencialmente, R₂ e R₃ juntos formam um anel de piridina opcionalmente substituído por com alquila C₁₋₆.

Preferencialmente, Y é -CH-.

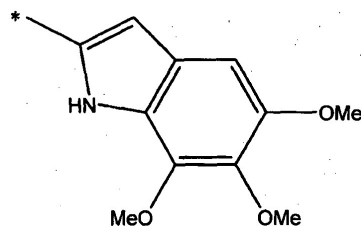
Preferencialmente, X é selecionado entre cloro, bromo, iodo, mesilato, tosilato, tio, amônio, alquilsulfonil C₁₋₆ e alquilsulfoxil C₁₋₆.

Mais preferencialmente, X é selecionado entre cloro, bromo, iodo, mesilato e tosilato.

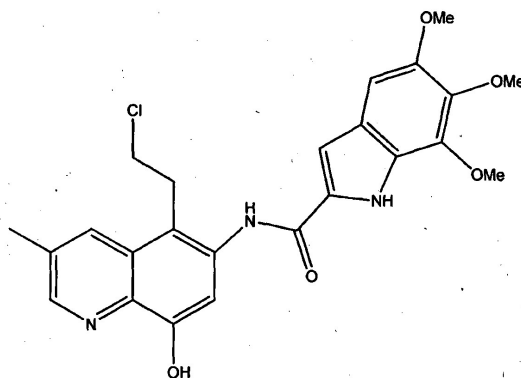
Ainda mais preferencialmente, X é cloro.

Preferencialmente, R₄ é H ou alquila C₁₋₆.

Preferencialmente, R₅ é



[0055]Uma forma preferencial desta modalidade é um composto da fórmula IV (AS-VIII- 104):



(IV)

[0056]Concentrações típicas, embora não limitantes de centanamicina, tafuramicina A ou análogos ou derivados para o tratamento de parasitas da malária na fase sanguínea estão na faixa de 0,01 a 10 μM . Preferencialmente, a concentração é inferior a 5 μM , mais preferencialmente inferior a 2 μM ou na faixa de cerca de 0,1-1 μM ou cerca de 0,2 μM . A duração do tratamento pode estar na faixa de 1 minuto a 12 horas, preferencialmente 10 minutos a 4 horas ou mais preferencialmente por cerca de 0,5, 1, 1,5 ou 2 horas.

[0057]Os parasitas da malária na fase sanguínea tratados com centanamicina ou tafuramicina A podem ser utilizados na preparação da composição imunogênica como preparação do parasita isolado, purificado ou parcialmente purificado, ou os parasitas da malária na fase sanguínea tratados com centanamicina ou tafuramicina A podem ser utilizados para infectar as células vermelhas do sangue, que são então utilizadas na preparação da composição imunogênica. Como opção, as células vermelhas do sangue infectadas com parasitas da malária na fase sanguínea podem ser tratadas com centanamicina e então utilizadas para preparar a composição imu-

nogênica.

[0058] Neste contexto, entende-se por "isolado" o material (por exemplo, parasitas da malária na fase sanguínea) que tenha sido removido de seu estado natural ou senão submetidos à manipulação humana. O material isolado pode estar substancialmente ou essencialmente livre de componentes que normalmente o acompanham em seu estado natural, ou pode ser manipulado para permanecer em estado artificial junto com componentes que normalmente o acompanham em seu estado natural. O material isolado (por exemplo, parasitas na fase sanguínea, tais como merozoítos, esquizontes, trofozoítos ou anéis) pode estar na forma purificada ou parcialmente purificada.

[0059] Como antes descrito, um atributo preferencial da presente invenção é que a composição imunogênica compreende uma dose baixa de parasitas da malária na fase sanguínea, a saber, merozoítos esquizontes, trofozoítos ou anéis.

[0060] Por "dose baixa" no contexto de parasitas da malária na fase sanguínea (como merozoítos, esquizontes, anéis ou trofozoítos, no entanto, sem limitar-se aos citados) significa uma dose administrada em que a densidade resultante do parasita é suficientemente baixa para não permitir sua detecção no esfregaço do sangue. Em relação à malária, a baixa dose é tipicamente mencionada como uma infecção subpatente. Uma baixa dose é, por conveniência, capaz de induzir a resposta de uma célula T quando administrada a um animal. Preferencialmente, a resposta imune é caracterizada por induzir a resposta de uma célula T e preferencialmente não induzir as células B a produzirem níveis detectáveis, ou somente baixos níveis, de anticorpos. Um baixo nível de produção de anticorpo preferencialmente se refere a um nível em que não seria suficiente proteger o animal contra o parasita da malária.

[0061] A dose baixa pode estar na forma de células vermelhas do sangue infectadas por parasita (pRBC). As pRBC podem ser administradas como células intactas ou como lisato. Preferencialmente, as pRBC estão na forma intacta.

[0062]As pRBC podem ser obtidas a partir do sangue de um animal infectado pelo parasita antes do tratamento com centanamicina ou tafuramicina A. Como alternativa, para produzir pRBCs *in vitro*, células vermelhas do sangue não infectadas podem ser obtidas de um animal e então infectadas *in vitro* com parasitas da malária na fase sanguínea pré-tratados com centanamicina ou tafuramicina A, ou com parasitas da malária na fase sanguínea não tratados para que as pRBC sejam posteriormente tratadas com centanamicina ou tafuramicina A, e assim atingir a pRBC em baixa dose.

[0063]Uma baixa dose típica é no máximo de 10^7 pRBC por exemplo, incluindo 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 ou 10 pRBC. As faixas preferenciais para a baixa dose incluem 10^1 - 10^6 , 10^1 - 10^5 , 10^1 - 10^4 , 10^1 - 10^3 , 10^1 - 10^3 , 10^2 - 10^6 , 10^2 - 10^5 , 10^2 - 10^4 , 10^2 - 10^3 , 10^3 - 10^6 , 10^3 - 10^5 , 10^3 - 10^4 , 10^4 - 10^6 , 10^4 - 10^5 pRBC per dose.

[0064]Em outra modalidade, a dose baixa pode estar na forma de parasitas da malária na fase sanguínea purificados, como merozoítos purificados ou uma mistura de merozoítos e esquizontes, por exemplo. Uma baixa dose preferencialmente é de não mais que 10^7 parasitas da malária na fase sanguínea isolados ou purificados, inclusive 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 ou 10 parasitas da malária na fase sanguínea. Faixas preferenciais de baixa dose incluem 10^1 - 10^6 , 10^1 - 10^5 , 10^1 - 10^4 , 10^1 - 10^3 , 10^1 - 10^3 , 10^2 - 10^6 , 10^2 - 10^5 , 10^2 - 10^4 , 10^2 - 10^3 , 10^3 - 10^6 , 10^3 - 10^5 , 10^3 - 10^4 , 10^4 - 10^6 , 10^4 - 10^5 parasitas na fase sanguínea isolados ou purificados por dose.

[0065]Como aqui utilizado, "malária" inclui todas as formas da doença causada pelos protistas protozoários do gênero *Plasmodium*.

[0066]O gênero "*Plasmodium*" inclui as espécies *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium chabaudi* e *Plasmodium vinckeii*. Nas modalidades relevantes à malária em humanos, a espécie *Plasmodium* causadora são tipicamente *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*. Por conve-

niência, para o tratamento de humanos a composição imunogênica e o método de tratamento profilático e terapêutico da malária compreende uma ou mais cepas ou isolados de *Plasmodium falciparum* e/ou *Plasmodium vivax* tratados com centanamicina ou tafuramicina.

[0067]Uma vantagem preferencial esperada da presente invenção é que os parasitas da malária na fase sanguínea tratados com centanamicina ou tafuramicina A de um isolado, cepa ou espécie particular de *Plasmodium*, pela administração a um animal, imunizarão contra a infecção por isolados, cepas e ou espécies heterólogas de *Plasmodium*. Por patógeno "heterólogo" entende-se patógenos relacionados que podem ser diferentes cepas ou variantes de uma mesma espécie ou de uma espécie relacionada. Um exemplo de diferentes cepas de uma mesma espécie é *P. c. chabaudi AS* e *P. c. chabaudi CB*. Heterólogo também pode ser referir a espécies relacionadas, por exemplo, *P. falciparum* e *P. vivax*.

[0068]A partir do exposto, é interessante observar que outra vantagem preferencial da presente invenção é que a composição imunogênica elimina a necessidade de adjuvante, seja como componente da composição imunogênica seja quando administrado junto com a composição imunogênica. Por "adjuvante" entenda-se um agente que auxilia, aumenta ou senão facilita a elicitação de uma resposta imune por um antígeno. Exemplos não limitantes dos adjuvantes excluídos incluem, adjuvante de Freund, hidróxido de alumínio (alum), fosfato de alumínio, esqualeno, IL-12, CpG-oligonucleotídeo, Montanide ISA720, imiquimod, SBAS2, SBAS4, MF59, MPL, Quil A, QS21 e ISCOMs.

[0069]Embora preferível que o adjuvante esteja ausente da composição imunogênica, seria interessante que outros componentes, tais como carreadores, diluentes e/ou excipientes imunologicamente aceitáveis pudessem ser incluídos. Tipicamente, esses incluem cargas sólidas ou líquidas, diluentes ou substâncias encapsulantes que podem ser seguramente utilizadas na administração sistêmica. De-

pendendo da via administração particular, carreadores, diluentes e/ou excipientes podem ser selecionados entre um grupo formado por açúcares, amidos, celulose e seus derivados, malte, gelatina, talco, sulfato de cálcio, óleos vegetais, óleos sintéticos, polióis, ácido algínico, solução salina isotônica, água livre de pirogênio, agentes umectantes ou emulsionáveis, agentes de volume, revestimentos, aglutinantes, cargas, desintegrantes, lubrificantes e agentes tamponadores do pH (por exemplo, tampões fosfato) no entanto, sem limitar-se aos citados. A composição imunogênica e o método de tratamento profilático e terapêutico da malária podem ser administrados a um animal em qualquer uma ou mais formas de dosagem as quais incluem comprimidos, dispersões, suspensões, soluções injetáveis, xaropes, troches, cápsulas, supositórios, aerossóis, adesivos transdérmicos e outros do gênero.

[0070]Por conveniência, a composição imunogênica e o método de prevenção ou tratamento da malária são eficazes contra a malária na fase sanguínea. A malária na fase sanguínea é uma fase onde o parasita da malária (por exemplo, merozoíto) acessa os eritrócitos. Na fase de esquizonte do sangue, o parasita se divide inúmeras vezes para produzir novos merozoítos, que abandonam as células vermelhas do sangue e se deslocam através da corrente sanguínea para invadir novas células vermelhas do sangue. Para o paciente, a malária na fase sanguínea é tipicamente caracterizada por ondas sucessivas de febre surgidas de ondas simultâneas de merozoítos escapando e infectando as células vermelhas do sangue.

[0071]A composição imunogênica e o método de prevenção ou tratamento da malária podem elicitar uma resposta imune que é caracterizada como uma resposta mediada pela célula T CD4+ (inclusive respostas mediadas unicamente pela célula T CD4+ e respostas mediadas pela mistura de célula T CD4+ e CD8+), tipicamente com pouca ou nenhuma resposta do anticorpo. Preferencialmente, a composição imunogênica e/ou o método imunizam o animal para prevenir, inibir ou se não proteger o animal contra a infecção por malária subsequente. Preferencialmen-

te, uma dose única da composição imunogênica impede, inibe ou senão protege o animal contra a infecção por malária subsequente.

[0072]Como aqui utilizado "animal" se refere a qualquer animal suscetível à infecção por um parasita da malária, particularmente mamíferos, e preferencialmente humanos.

[0073]Para que as modalidades preferenciais possam ser detalhadamente descritas e colocadas em prática, são mencionados os seguintes Exemplos não limitantes.

Exemplos

Métodos

[0074]Camundongos passagem foram sacrificados por inalação de CO₂ e os parasitas recolhidos por punção cardíaca em tubos de coleta de EDTA. Esfregaços finos do sangue foram realizados para determinar a parasitemia.

[0075]O sangue foi diluído até 10 mL em IMDM livre de soro (meio de Dulbeccos modificado por Iscoves). O sangue sempre foi diluído a 10% do hematócrito.

[0076]Tafuramicina A ou centanamicina foi diluída a partir do estoque 2 mM (em solução P.E.T.) até 20 µM em meio. A diluição do estoque 2 mM até 20 µM em meio foi necessária já que a solução P.E.T causava lise das células vermelhas do sangue. Para o tratamento 200 nM das células vermelhas do sangue, 50 µl da solução 20 µM foram adicionados por 5 mL de sangue. Para o tratamento 2 µM das células vermelhas do sangue, 500 µl da solução 20 µM foram adicionados por 5 mL de sangue.

[0077]As células vermelhas do sangue parasitadas (pRBC) tratadas foram lavadas uma vez com meio e uma vez com PBS antes da diluição a 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 ou 5×10^4 mL em cloreto de sódio 0,9%.

[0078]Cinco camundongos por tratamento receberam 200 µl de imunização intravenosa cinco vezes com uma semana de intervalo. O número final de pRBC

tratadas administradas por camundongo foram 10^7 , 10^6 , 10^5 ou 10^4 , como exigia cada experimento.

[0079]Esfregaços de sangue foram realizados a cada 2 dias e a parasitemia registrada.

Resultados

[0080]Os dados na Figura 1 mostram que a exposição dos camundongos às pRBC atenuadas com centanamicina de *P. chabaudi* induz a imunidade à infecção virulenta. Neste estudo as pRBC foram tratadas por 30 min *in vitro* com centanamicina 2 μ M (AS-I-145, composto da fórmula III) e os camundongos receberam 5 doses da vacina i.v. (cada dose com intervalo de 1 semana), cada dose contendo 10^4 parasitas. Os camundongos foram então infectados com 10^5 pRBC WT homólogos e a parasitemia acompanhada. Este experimento foi repetido diversas vezes com constatações similares. Nós observamos que 3 doses da vacina funcionam efetivamente e que até mesmo uma única dose da vacina induz a proteção em grande parte dos animais, como mostra a Figura 2.

[0081]A Figura 3 mostra uma comparação dos camundongos efetivamente vacinados com 3 doses ou com uma dose única de 10^4 pRBC de *P. chabaudi* tratada com centanamicina 200 nM.

[0082]A Figura 4 mostra uma comparação dos camundongos vacinados com 3 doses de 10^4 , 10^5 ou 10^6 pRBC de *P. chabaudi*. Os parasitas foram atenuados *in vitro* utilizando centanamicina a 2 μ M por 30 minutos. Embora a parasitemia tenha sido mais baixa para os camundongos imunizados com 10^6 *P. chabaudi* (por exemplo, no 9º dia após a infecção), cada camundongo imunizado com 10^4 , 10^5 ou 10^6 *P. chabaudi* mostraram baixa ou ausência de parasitemia no 11º dia após a infecção.

[0083]Com referência à Figura 5, os camundongos foram vacinados com uma dose única de 10^7 pRBC de *P. chabaudi* atenuadas *in vitro* utilizando centanamicina a 2 μ M ou 200 nM por 30 minutos. Os camundongos imunizados com 10^7

pRBC de *P. chabaudi* atenuadas utilizando centanamicina 200 nM desenvolveram parasitemia mais significativa no 8º e 9º dias após a infecção do que os camundongos tratados com parasitas atenuados com centanamicina 2 µM. Possivelmente, a razão para isso é que a subsequente replicação do DNA "dilui" efetivamente o volume de centanamicina ligada ao DNA por parasita. No entanto, no 13º dia após inoculação, os camundongos tratados com 10⁷ pRBC de *P. chabaudi* atenuadas utilizando centanamicina 200 nM haviam mostrado recuperação em grau similar aos camundongos tratados com parasitas atenuados com centanamicina 2 µM.

[0084] Neste experimento, 500 µl de sangue foram extraídos dos camundongos imunizados no 42º dia pós-inoculação e transferidos aos camundongos repórteres *naives*. Não foram detectados parasitas por microscopia 14 dias antes da infecção.

[0085] Fazendo neste momento referência à Figura 6, os dados da pontuação clínica em seguida à imunização com parasitas tratados com 10⁶ centanamicina e infecção mostram que os camundongos foram protegidos não somente da morte e da elevada parasitemia como também dos sintomas. Este resultado foi surpreendente à luz de um relato anterior (Hirunpetcharat et al., 1999) mostrando que, embora as células T possam limitar o crescimento parasitário, elas também podem ser causadoras de doença e morte. Acreditava-se que um subproduto da resposta inflamatória da T célula que estava matava os parasitas fosse uma resposta anti-hospedeiro que adoecia os camundongos. Desse modo, é importante notar que depois da vacinação de acordo com a presente invenção, o crescimento do parasita é limitado, mas os camundongos não adoecem.

[0086] Conduzimos ainda experimentos para comparar a vacina preparada utilizando a centanamicina (composto da fórmula III) ou TH-III-149, também conhecida como tafuramicina A (composto da fórmula II)

[0087] Camundongos AJ (5 por grupo, fêmeas) foram imunizados por via in-

travenosa com 3 doses de 10^6 células vermelhas do sangue parasitadas por *P. chabaudi* (pRBC; fases de anel) atenuadas tanto com centanamicina quanto com tafuramicina A (composto da fórmula II). Ambos os compostos foram utilizados na concentração de $2 \mu\text{M}$ e as pRBC foram incubadas por 40 minutos a 37°C antes que os compostos fossem lavados das células três vezes. Cada imunização foi administrada com intervalo de 2 semanas e os camundongos foram então infectados com 10^5 *P. chabaudi* ou 10^4 *P. vinckei*. As pRBC e a densidade do parasita no sangue foram acompanhadas utilizando esfregaços finos corados com Diff Quick. Números mais baixos de *P. vinckei* foram utilizados porque este parasita é mais virulento que *P. chabaudi*.

[0088]Os dados nas Figuras 7A e B respectivamente mostram os resultados da infecção homóloga e heteróloga. Os dados mostram a proteção quase completa contra a infecção homóloga e proteção bastante significativa contra a infecção heteróloga quando a vacina foi produzida utilizando tafuramicina A (composto da fórmula II). A proteção contra a infecção homóloga foi menor, e contra a infecção heteróloga foi ainda menos eficaz quando a vacina foi produzida com centanamicina para *P. vinckei*, uma espécie particularmente virulenta do parasita. Cabe ressaltar que os dados para tafuramicina A, a infecção com *P. vinckei* foi ainda mais impressionante, salvo por 1 camundongo em que a densidade de pico do parasita foi de aproximadamente 20%. Contudo, no 12º dia, todos os animais haviam se recuperado completamente.

[0089]Os experimentos com infecção heteróloga também foram realizados com tratamento de AS-VIII-104 (composto da fórmula IV), que mostrou comportamento similar ao da centanamicina (não mostrado).

[0090]Em outros experimentos, realizou-se a comparação das células vermelhas do sangue tratadas lisadas versus intactas. Os camundongos foram imunizados com uma única injeção intravenosa de: (i) 10^6 parasitas na fase de anel de *P.*

chabaudi (em células vermelhas) que foram atenuados *in vitro* por incubação em centanamicina 2µM por 40 minutos; ou (ii) 10⁶ parasitas na fase de anel de *P. chabaudi* (em células vermelhas) que foram atenuados *in vitro* por incubação em centanamicina 2µM por 40 minutos e em seguida submetidas à lise em água destilada por 2 minutos depois da adição de um volume igual de 2xPBS para restaurar a isotonicidade da preparação. Os camundongos foram infectados 2 semanas depois da imunização com 10⁵ pRBC de *P. chabaudi*.

[0091]Os resultados são mostrados na Figura 8 e indicam que pRBC intactas são uma vacina ligeiramente mais eficaz que as pRBC lisadas, mostrando parasitemia bastante baixa no 10^o dia em comparação às pRBC lisadas.

[0092]Ao longo de todo o relatório descritivo, o objetivo foi descrever as modalidades preferenciais da invenção sem limitá-la a uma modalidade qualquer ou coleção específica de atributos. Diversas alterações e modificações podem ser realizadas nas modalidades descritas e ilustradas sem desviar da presente invenção.

[0093]A divulgação de cada patente e documento científico, programa de computador e algoritmo mencionados neste relatório descritivo é incorporadas por meio de citação em sua totalidade.

Referências

Ahmed, S. I. et al, Cellular Microbiology, 12: 930-938, 2010 Boger, D. Publicação Internacional WO2009/064908

Chavda, S. et al, Bioorganic & Med. Chem. 18:5016-5024, 2010 Elliott, S.,R. et al, Infect. Immun. 73:2478, 2005

Hirunpetcharat et al, Parasite. Immunol. 21:319-329, 1999 Howard, T.T. et al, Bioorganic & Med. Chem. 10:2941-2952, 2002 Lee, M. Publicação Internacional WO2002/030894

Lee, M. et al. Publicação Internacional WO2008/050140

Lee, M. Patente dos Estados Unidos 6660742

McCarthy, J. e Good, M.F. Hum. Vaccine 6:114, 2010

Makobongo, M. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:2628, 2003 Mamoun,

C. B. Publicação Internacional 2008/094183

Pinzon-Charry, A. et al. , J. Clin. Invest. 120:2967, 2010

Pombo, DJ. et al, Lancet 360:610, 2002

Purcell, L.A. et ai, Infect. Immun. 76:1193, 2008a

Purcell, L.A. et al, Vaccine. 26:4880, 2008b

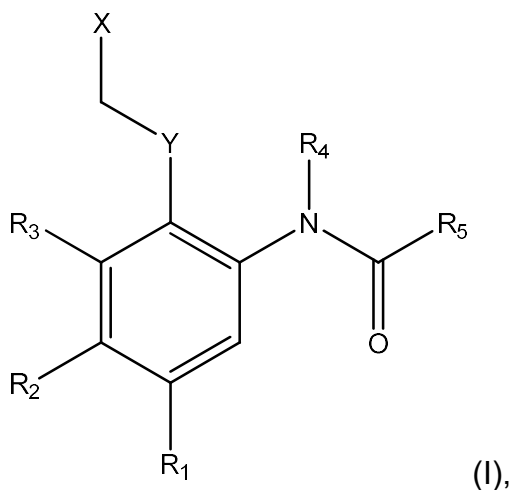
Purnell B, et al., Med Chem. 2: 139, 2006

Sato, A. et al, J. Med. Chem 48:3903, 2005 5

REIVINDICAÇÕES

1. Método *in vitro* para produção de uma composição imunogênica, **CARACTERIZADO** pelo fato de que inclui a etapa de tratar parasitas da malária na fase sanguínea ou nas células vermelhas do sangue infectadas com os ditos parasitas da malária na fase sanguínea com um composto de Fórmula I, II ou III, para produzir, deste modo, a dita composição imunogênica, em que o dito composto de Fórmula I, II ou III é:

Fórmula I



em que:

R₁ é OH;

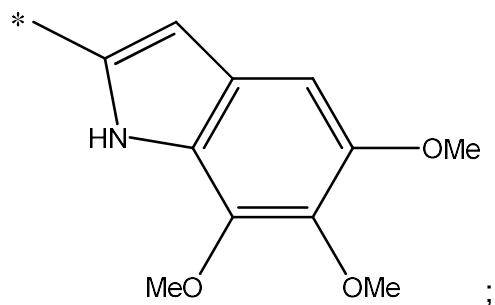
R₂ e R₃ formam um anel furano fundido;

Y é -CH- e forma um anel com cinco membros com R₄;

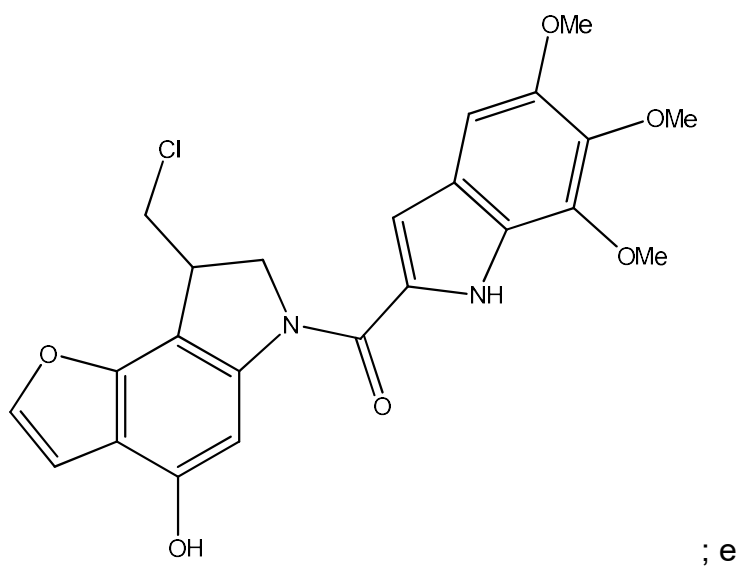
X é selecionado a partir de cloro, bromo, iodo, mesilato, tosilato, tio, amônio, alquilsulfonil C₁₋₆ e alquilsulfoxil C₁₋₆;

R₄ é um grupo -CH₂- ligado a Y para formar um anel com cinco membros; e

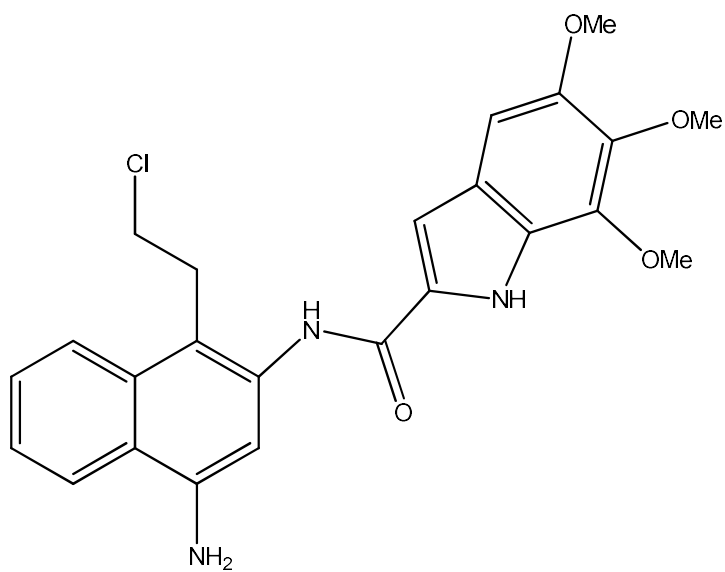
R₅ é:



Fórmula II:



Fórmula III



2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de

que o método exclui a etapa de inclusão de um adjuvante.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os parasitas na fase sanguínea isolados ou purificados são tratados com o dito composto de Fórmula I, II ou III, para impedir, deste modo, a replicação do parasita.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células vermelhas do sangue são subsequentemente infectadas com os parasitas na fase sanguínea tratados para produzir células vermelhas do sangue parasitadas (pRBC).

5. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células vermelhas do sangue infectadas com parasitas na fase sanguínea (pRBC) são tratadas com o dito composto de Fórmula I, II ou III, para impedir, deste modo, a replicação do parasita.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição imunogênica compreende uma dose de 10^4 a 10^7 parasitas da malária na fase sanguínea ou 10^4 a 10^7 células vermelhas do sangue infectadas com os parasitas da malária na fase sanguínea (células vermelhas do sangue parasitadas; pRBC).

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 e 4 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as pRBC são intactas.

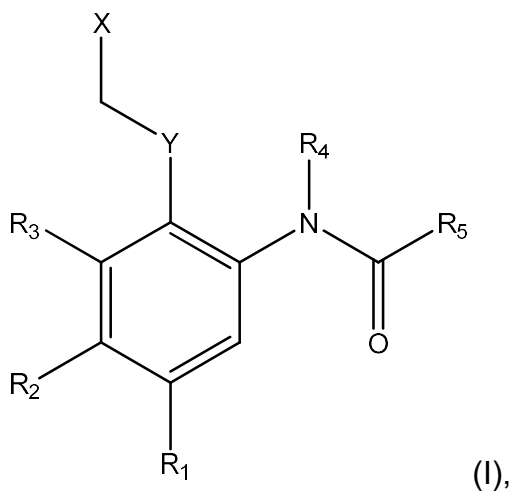
8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os parasitas na fase sanguínea são merozoítos, esquizontes, trofozoítos ou anéis.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a concentração do composto de Fórmula I, II ou III é 0,2 a 2 μM .

10. Composição imunogênica **CARACTERIZADA** pelo fato de que compre-

ende parasitas da malária na fase sanguínea ou células vermelhas do sangue infectadas com os ditos parasitas da malária na fase sanguínea que foram tratados com um composto de Fórmula I, II ou III; e um veículo, diluente e/ou excipiente imunologicamente aceitável, em que o dito composto de Fórmula I, II ou III é:

Fórmula I



em que:

R₁ é OH;

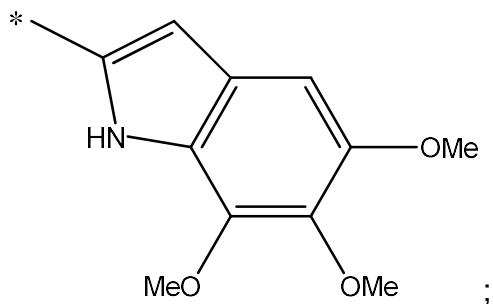
R₂ e R₃ formam um anel furano fundido;

Y é -CH- e forma um anel com cinco membros com R₄;

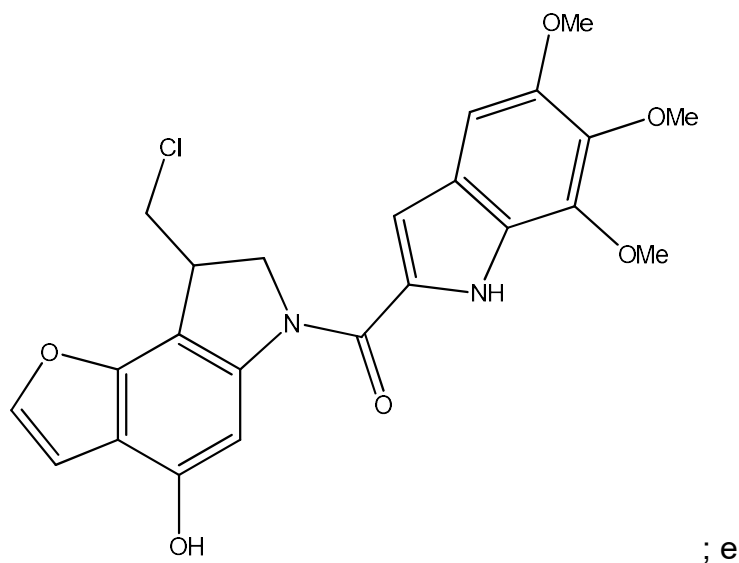
X é selecionado a partir de cloro, bromo, iodo, mesilato, tosilato, tio, amônio, alquilsulfonil C₁₋₆ e alquilsulfoxil C₁₋₆;

R₄ é um grupo -CH₂- ligado a Y para formar um anel com cinco membros; e

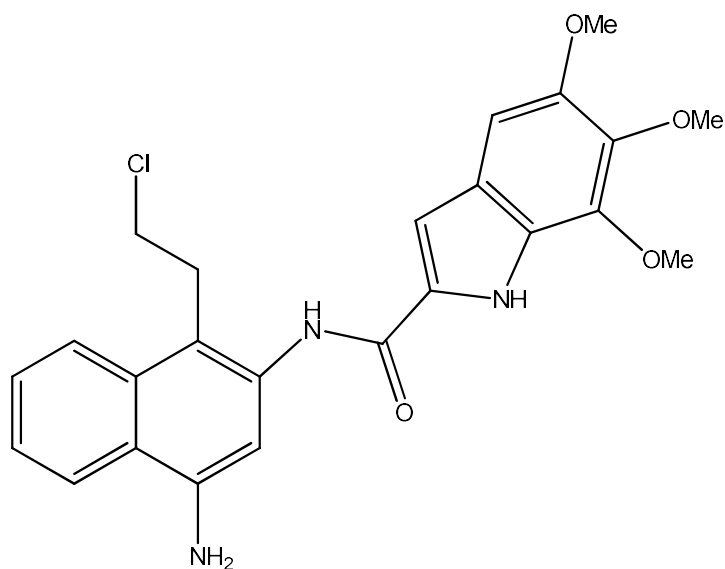
R₅ é:



Fórmula II:



Fórmula III



11. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que não inclui um adjuvante.

12. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 10 ou 11, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende uma dose de 10^4 a 10^7 parasitas da malária na fase sanguínea ou 10^4 a 10^7 células vermelhas do sangue infectadas com os parasitas da malária na fase sanguínea (células vermelhas do sangue parasitadas; pRBC).

13. Composição imunogênica, de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 10 a 12, **CARACTERIZADA** pelo fato de que as pRBC são intactas.

14. Composição imunogênica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 13, **CARACTERIZADA** pelo fato de que os parasitas da malária na fase sanguínea compreendem merozoítos, esquizontes, trofozoítos e/ou anéis.

15. Composição imunogênica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 14, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a administração de uma dose única da composição imunogênica previne a infecção subsequente de malária.

16. Composição imunogênica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 15, **CARACTERIZADA** pelo fato de que confere proteção heteróloga contra infecção por um ou mais outros isolados, cepas e/ou espécies de *Plasmodium*.

17. Composição imunogênica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 16, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a concentração do composto de Fórmula I, II ou III é 0,2 a 2 μM .

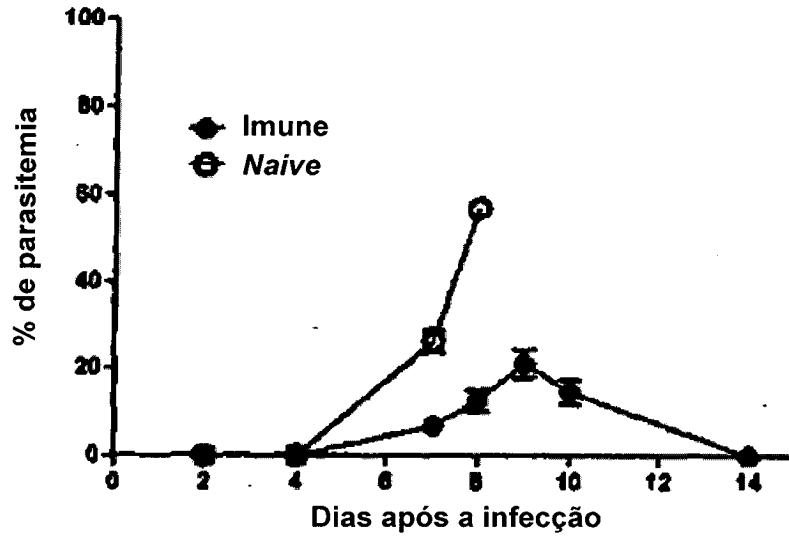
18. Uso da composição imunogênica, como definida em qualquer uma das reivindicações 10 a 17, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para prevenir ou inibir uma infecção por malária ou para tratar uma infecção por malária existente em um animal.

19. Uso, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o medicamento confere proteção heteróloga contra infecção por um ou mais outros isolados, cepas e/ou espécies de *Plasmodium*.

20. Uso, de acordo com a reivindicação 18 ou 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o medicamento exclui um adjuvante.

21. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o animal é um ser humano.

Imunização por *P. chabaudi* atenuado com CM
5 doses semanais



Pontuação clínica de 5 doses

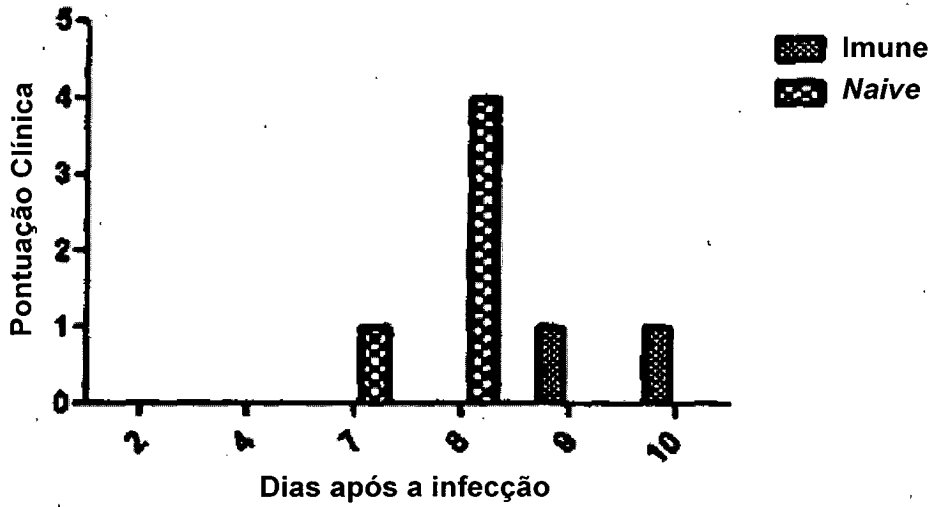


Figura 1

Dose única atenuada com CM infectada +5 semanas

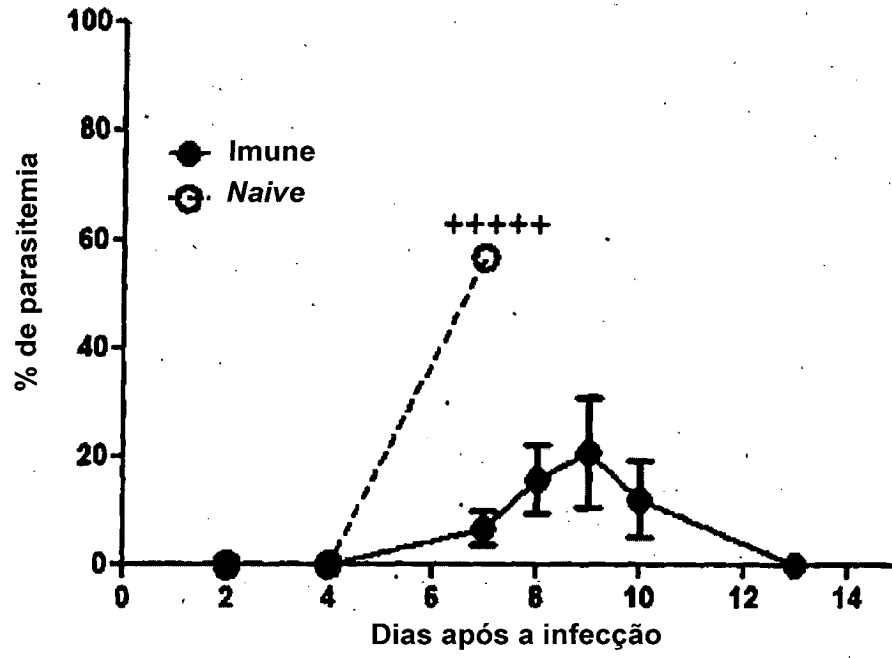


Figura 2

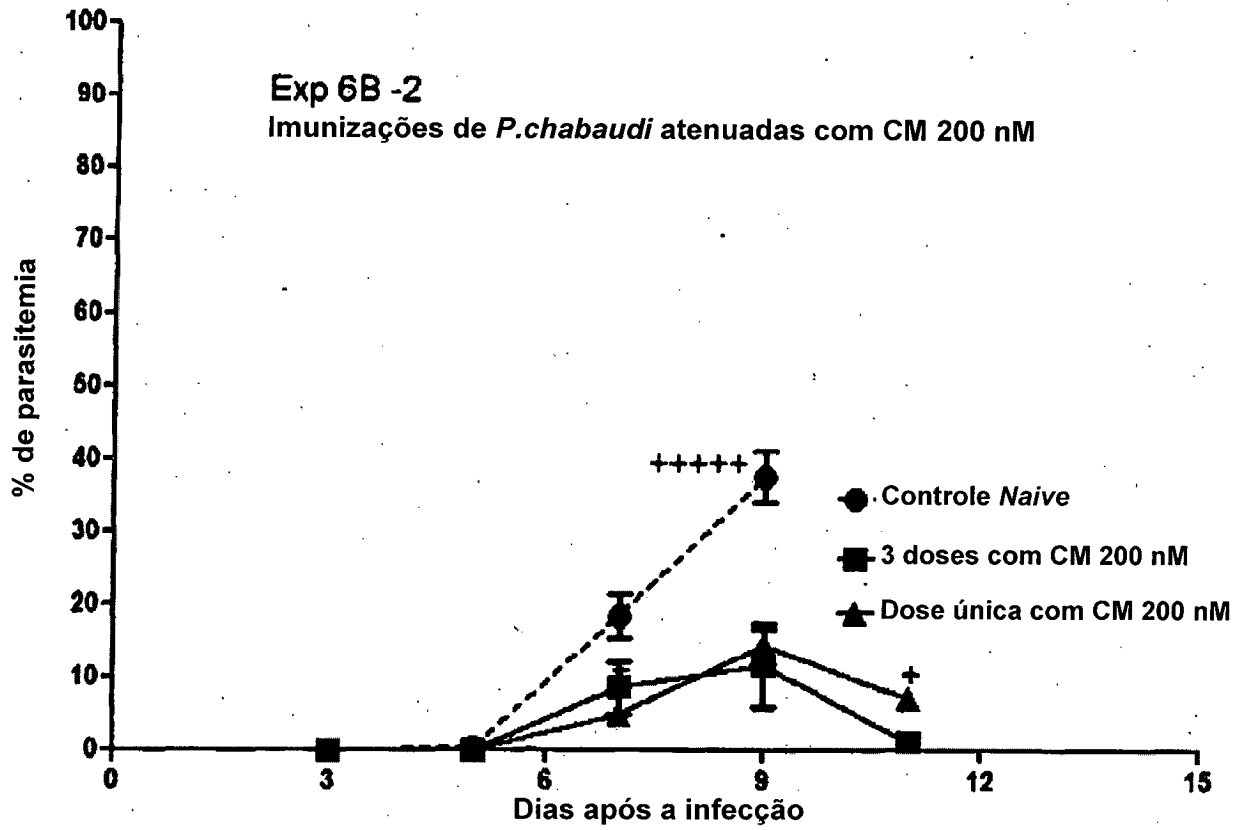


Figura 3

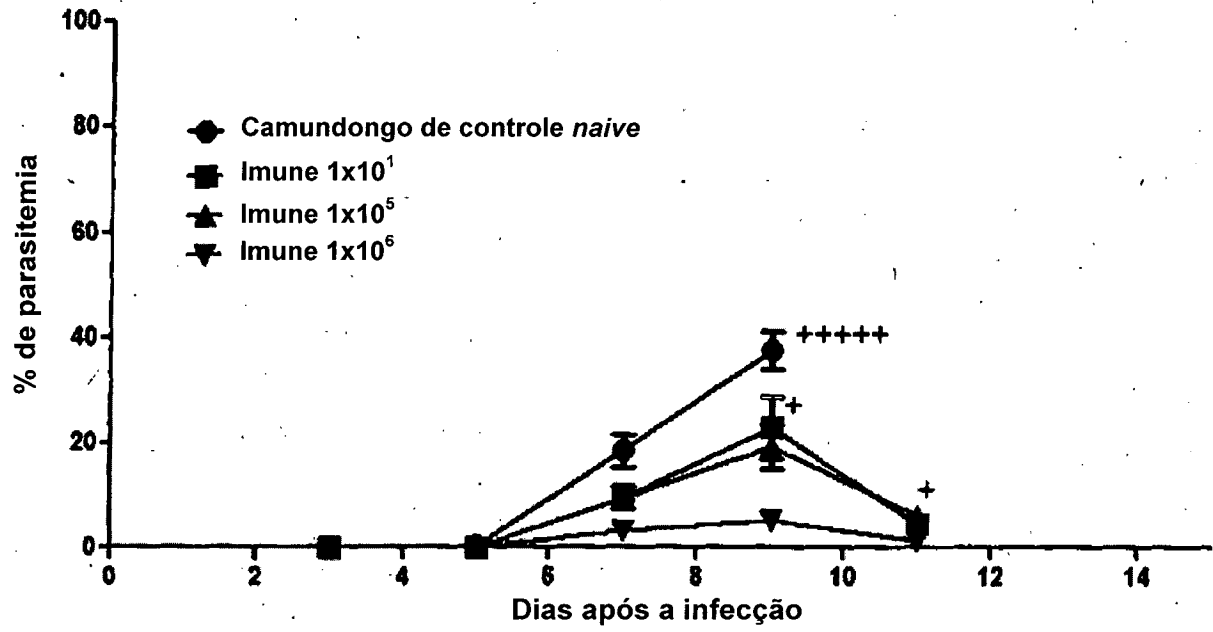
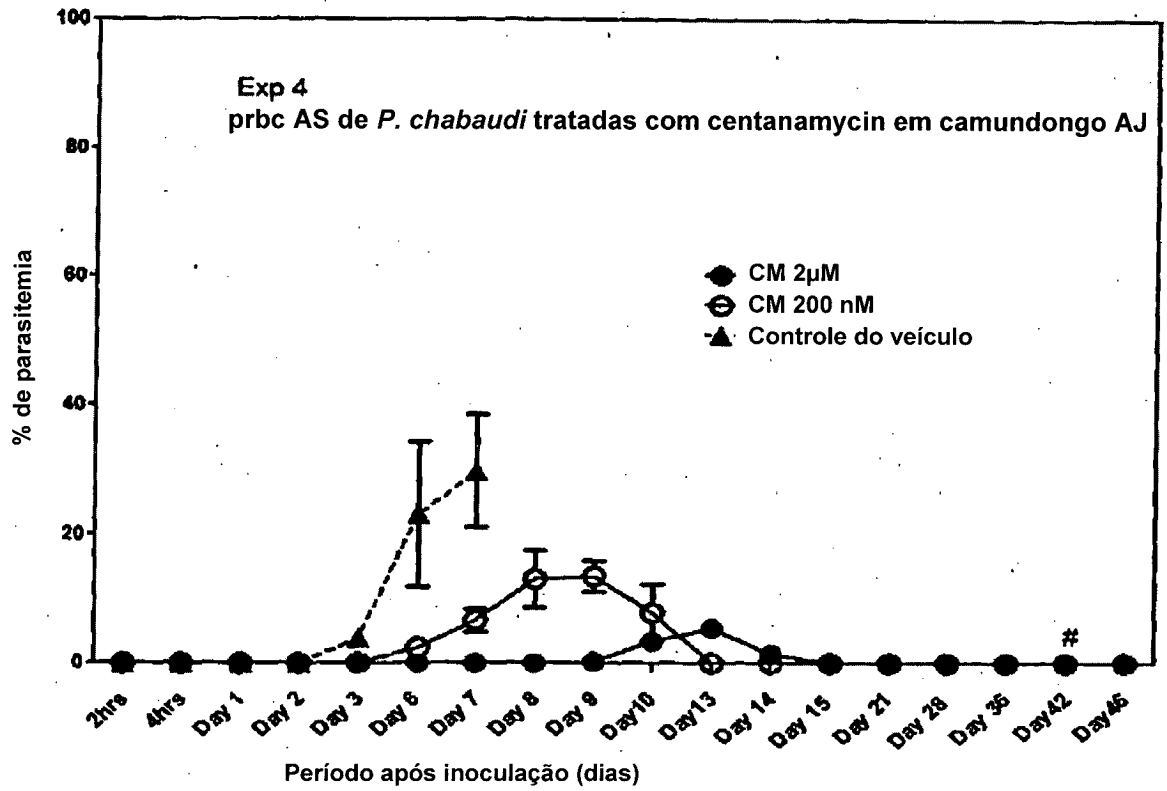
Imunização AS de *P.chabaudi* atenuada com CM 2 μ M

Figura 4



500µl de sangue transferidos para os camundongos repórteres *naives*, não detecção de parasitas 14 dias antes da infecção

Figura 5

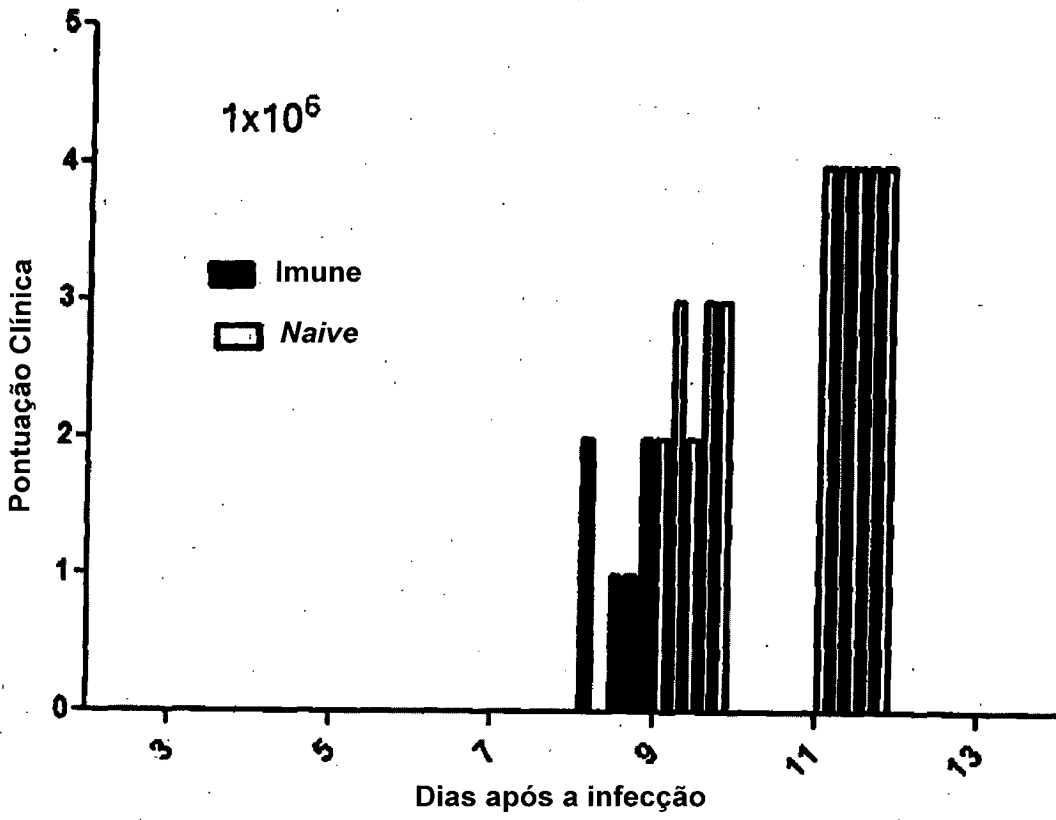


Figura 6

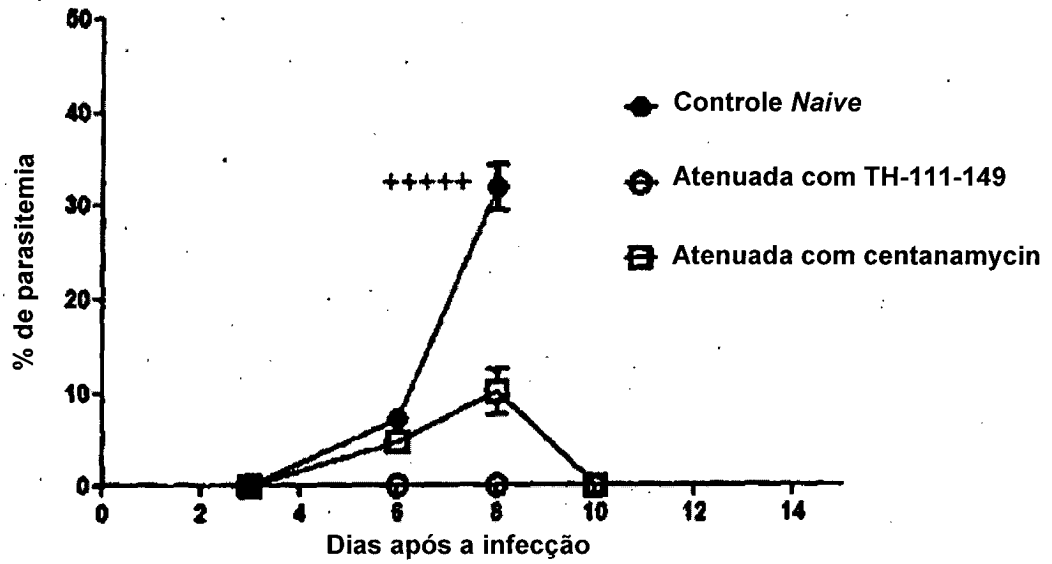
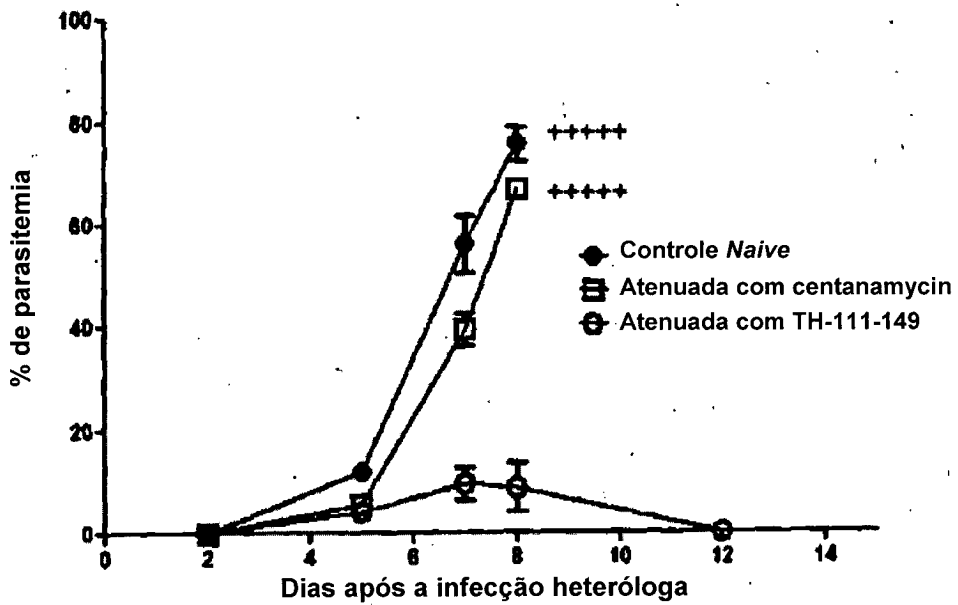
A**B**

Figura 7

Exp 41 R

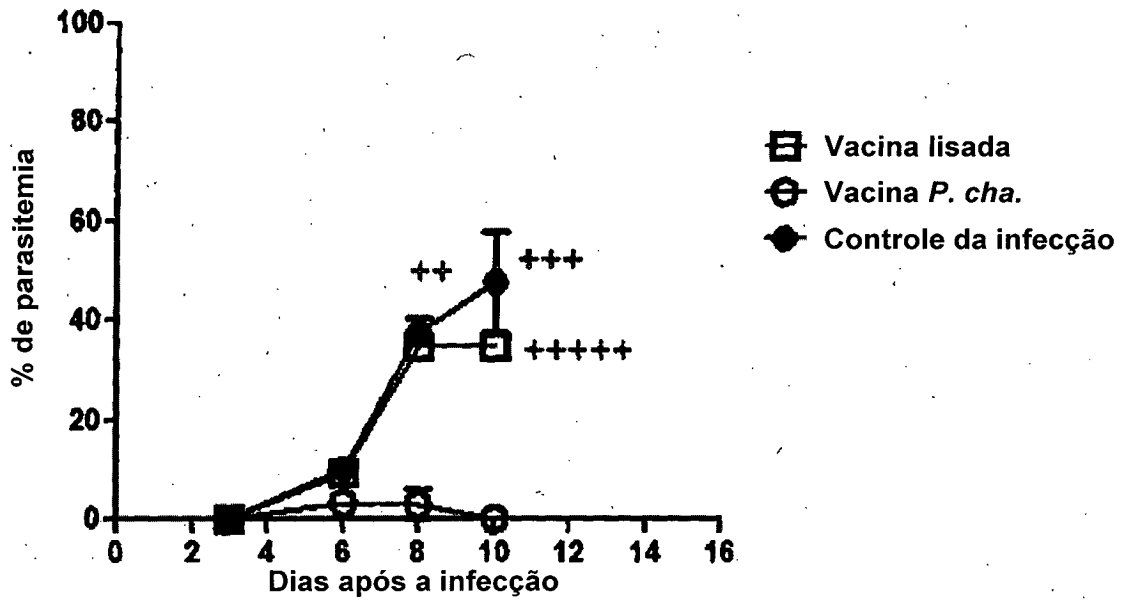


Figura 8