

67 122

0A/0980-161

PATENTE N°. 86 484

"Processo para a preparação de oligossacarídeos, de imunogénios e de vacinas contendo tal imunogénio"

para que

DE STAAT DER NEDERLANDEN representado pelo DEPUTY DIRECTOR-GENERAL do RIVM de BILTHOVEN, pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de preparação de novos oligossacarídeos que compreendem a estrutura (D-ribose-D-ribitol-fosfato)_m, (D-ribitol-fosfato-D-ribose)_m ou (fosfato-D-ribose-D-ribitol)_m, sendo m 2,3,4, 19 ou 20, o qual compreende a substituição dos grupos protectores num oligossacarídeo com a estrutura referida, por um átomo de hidrogénio e tendo sido, no referido oligossacarídeo, o átomo de hidrogénio dos grupos hidroxilo livres substituído por um grupo protector. O invento refere-se ainda ao processo de preparação de imunogénios e de vacinas as quais são úteis no tratamento de infecções provocadas pelo Haemophilus Influenzae tipo b.

MEMÓRIA DESCRIPTIVA

O invento refere-se a novos oligossacáridos contendo unidades D-ribose, D-ribitol e fosfato, a imunogenes contendo tais oligossacáridos, a vacinas contendo tais imunogenes e a processos para preparar tais oligossacáridos, imunogenes e vacinas.

O polissacárido capsular da bactéria Haemophilus influenzae tipo b consiste de muitas unidades de D-ribose-D-ribitol-fosfato ($\rightarrow 3$)-D-ribf-(1 \rightarrow 1)-ribitol-(5 \rightarrow PO₄²⁻). O Haemophilus influenzae tipo b é, inter alia, uma bactéria patogénica que provoca meningite e outras doenças infecciosas.

Verificou-se que a imunidade pode ser obtida através da administração do polissacárido capsular do Haemophilus influenzae tipo b (HIB). Verificou-se também que, em particular, em crianças com menos de 2 anos de idade, a imunidade obtida é de curta duração e em crianças com menos de 16 meses de idade, não pode ser detectada. Isto pode ser melhorado administrando o polissacárido capsular associado ao denominado transportador tipo-dependente (proteína). Tais conjugados polissacárido-proteína têm a desvantagem de a estrutura não estar rigorosamente definida e de a porção polissacárido no produto não ser homogénea. Isto tem como consequência que cada lote de vacina acabado de preparar que contenha tais conjugados tem de ser testado em animais e/ou humanos experimentais em relação à eficácia da vacina. Em adição, a utilização de um tal produto numa vacina pode produzir anticorpos ou toxicidade indesejados.

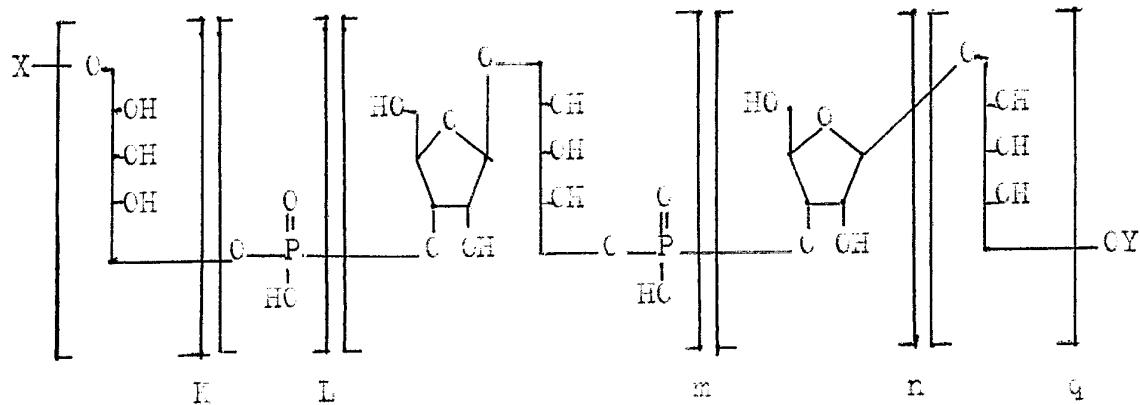
Os oligossacáridos obtidos através da degradação do polissacárido capsular do HIB também não são puros, embora melhor definidos. Neste caso, também, a eficácia terá sempre que ser novamente testada.

Existe, portanto, a necessidade de uma vacina, contra a doença por HIB contendo um fragmento de oligossacárido puro, rigorosamente descrito, i.e. um fragmento de oligossacárido que não contenha oligossacáridos possuindo uma estrutura ou comprimento de cadeia diferentes.

Verificou-se agora que se podem obter tais oligossacáridos puros por uma via sintética e que se podem obter imunogenes ade-

quadros associando tais fragmentos com um transportador. Tais imunogenes podem ser usados em vacinas. O facto de que um tal oligossacárido possa ser preparado por uma via sintética tem também a vantagem de que a disponibilidade não fica dependente da disponibilidade da bactéria patogénica HIB.

O invento refere-se, portanto, ao processo de preparação de oligossacáridos que compreendem L-ribose-D-ribitol-fosfato, D-ribitol-fosfato-L-ribose ou fosfato-D-ribose-D-ribitol 2,3,4 19 ou 20 vezes e, em particular, a oligossacáridos possuin do a fórmula:



na qual

$K = 0$ ou $l \leq L = 1$,

$$K = 0 \text{ se } L = 0,$$

$L = 0$ ou 1,

$m = 2, 3, \dots, 19$ ou 20 , desde que m possa ser 1 , se $K, L \neq 1$,
ou se $L, n \neq q = 1$,

$$n = 0 \text{ ou } 1,$$

$q = 0$ ou $1 \leq n \leq 1,$

$$q = c \text{ se } n = 0$$

X = hidrogénio, um grupo reactivo que é capaz de formar, directa ou indirectamente, uma ligação com um transportador, ou um grupo possuindo uma cadeia hidrofóbica na extremidade não ligada, ou o grupo terminal $X\text{-}$ é substituído pelo grupo reactivo $\text{H}_2\text{N-}$ ou HS- , e

Y = hidrogénio, um grupo reactivo que é capaz de formar, directa ou inuirectamente, uma ligação com um transportador, ou um grupo com uma cadeia hidrofóbica na extremidade não ligada, ou o grupo terminal -CY é substituído pelo grupo reactivo -NH₂ ou -SH, desde que Y = hidrogénio se

X ≠ hidrogénio ou que X = hidrogénio se Y ≠ hidrogénio e seus sais.

O invento refere-se também ao processo de preparação de imunogenes contendo um oligossacárido como acima descrito, cujo oligossacárido está associado a um transportador, ou contendo uma associação de diversas moléculas de um oligossacárido como acima descrito, e a vacinas que contêm tais imunogenes.

Não tendo em conta X(XO-) e Y(-CY), o esqueleto D-ribose-D-ribitol-fosfato como mostrado na fórmula 1 pode terminar tanto no lado esquerdo como no lado direito, num grupo ribose, ribitol ou fosfato. Os oligossacáridos que, desprezando X(XO-) e Y(-CY), terminam num grupo ribitol ou ribose à esquerda e num grupo fosfato à direita, ou num grupo ribitol ou ribose à direita e num grupo fosfato à esquerda são, contudo, preferidos. De preferência, m é igual a 2,3,4,5 ou 6 visto que um esqueleto de oligossacárido com um tal comprimento está geralmente já adequado em relação ao objecto em vista. Mais preferivelmente, m é igual a 3,4,5 ou 6.

De preferência, K,L,n e q são iguais a zero, X é igual a H e Y não é igual a H.

Como os grupos fosfato nos oligossacáridos de acordo com o invento existem no estado ionizado em solução a, por exemplo, pH neutro, os oligossacáridos de acordo com o presente invento são preparados de preferência sob a forma de um sal, por exemplo um sal de sódio.

Como os oligossacáridos de acordo com o presente invento não têm per se qualquer imunogenicidade, ou têm imunogenicidade inadequada, é necessário associar os ditos oligossacáridos a um transportador, como resultado da qual a dita imunogenicidade é de facto obtida num grau suficiente. Dependendo do tipo de transportador, variará a forma na qual o oligossacárido é associado ao transportador. A associação do oligossacárido e ao transportador procede directa ou indirectamente via X(XO-) ou Y(-CY) na fórmula 1.

Se X e Y são hidrogénio, o oligossacárido terá de ser modificado num desses locais para fazer a associação com o possível transportador. Como os grupos -OH e =O apresentados na fórmula 1, que são activos em maior ou menor grau, são protegidos por

um período de tempo maior ou menor durante a preparação dos oligossacáridos de acordo com o invento, é vantajoso introduzir as modificações necessárias para a associação com o transportador antes dos grupos protectores serem removidos. Como já mencionado, a associação do oligossacárido com o transportador efectua-se via X(XO-) ou via Y(-CY). Mas se X e Y fossem hidrogénio na fórmula 1, os grupos protectores teriam de ser introduzidos novamente antes do grupo necessário para a associação com o transportador poder ser introduzido. X é portanto, de preferência igual a hidrogénio e Y(-CY) igual a um dos outros grupos especificados cu Y é igual a hidrogénio e X(XO-) igual a um dos outros grupos especificados.

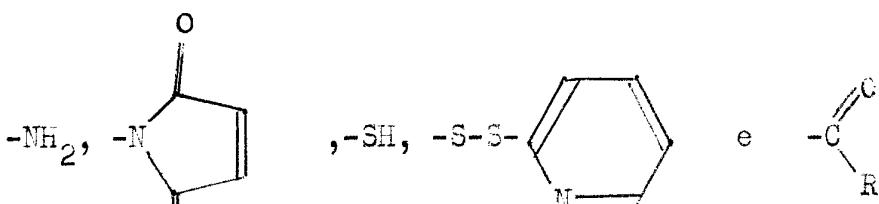
Daqui em diante, se "X" ou "Y" ou o termo "grupo reactivo" são usados, significa também em qual grupo reactivo consiste o grupo reactivo -NH₂ ou -SH, tornando-se necessário ler -NH₂ ou -SH respectivamente para XO- ou para -CY. O oligossacárido de acordo com o presente invento termina, portanto, de preferência numa extremidade, num grupo hidroxilo e na outra extremidade num grupo reactivo ou num grupo possuindo uma cadeia hidrofóbica na extremidade não ligada. A escolha entre estes dois tipos de grupos é determinada pela forma na qual a associação do oligossacárido e do transportador é conseguida. Em princípio, existem disponíveis dois processos conhecidos per se para esta finalidade. De acordo com o primeiro processo, o oligossacárido é ligado ao transportador. Neste caso, o transportador é, usualmente, uma proteína. De acordo com o segundo processo, a associação do oligossacárido é obtida por uma interacção hidrofóbica entre um grupo ligado ao oligossacárido possuindo uma cadeia hidrofóbica na extremidade não ligada e o transportador, sendo o transportador uma micela, uma vesícula ou um lipossoma, ou por uma interacção hidrofóbica dos oligossacáridos entre si. No primeiro caso, o grupo hidrofóbico entra numa interacção hidrofóbica com as regiões hidrofóbicas dos compostos anfifílicos (lípidos) na micela, na vesícula ou no lipossoma, enquanto o oligossacárido termina na interface da micela, da vesícula ou do lipossoma.

São conhecidos os grupos reactivos que são capazes de for-

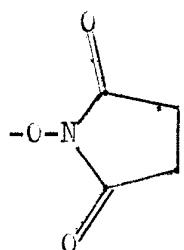
-6-

mar, directa ou indirectamente, uma ligação com uma proteína. Por uma ligação indirecta neste contexto entende-se que a ligação é efectuada entre o grupo reactivo e a proteína através de um composto adicional. Se X ou Y na fórmula 1 for um grupo reactivo, todos os grupos reactivos capazes de formar uma ligação com um carboxilo, amina ou outra função reactiva da proteína opcionalmente introduzida, ou aqueles que podem ser ligados através de um composto adicional a um carboxilo, amina, ou outra função reactiva da proteína opcionalmente introduzida, são em princípio adequados.

Exemplos de tais grupos reactivos são os grupos possuindo a seguinte função reactiva:



na qual R = -OH, -N₃, -o-alquil(C₁-₁₂), -OC₆F₅, -H, -Br, -Cl ou



O grupo reactivo pode consistir de uma destas funções reactivas ou, se o grupo reactivo for maior, pode conter uma das ditas funções reactivas, caso em que o grupo termina de preferência numa das ditas funções reactivas.

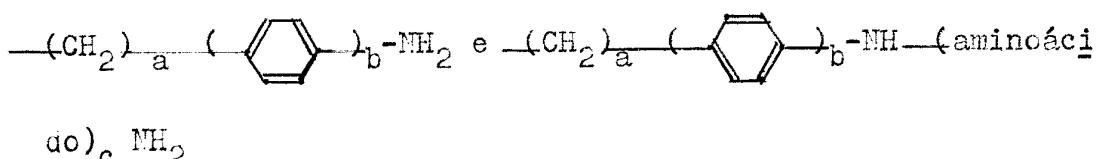
Se as unidades ribose-ribitol-fosfato no oligossacárido estiverem a alguma distância da proteína após ligação do oligossacárido à proteína é vantajoso na promoção da imunogenicidade que o grupo reactivo seja de preferência, um grupo bastante longo com uma das funções reactivas acima mencionadas.

Como foi dito, um grupo reactivo é incorporado na extremidade do esqueleto do oligossacárido de preferência quando o dito

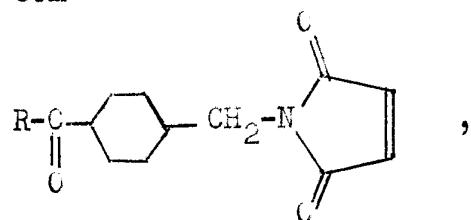
-7-

esqueleto está ainda protegido. Uma vez que um grupo reactivo contendo uma das ditas funções reactivas tenha sido incorporado, a dita função reactiva pode ser convertida numa das outras funções reactivas se o esqueleto oligossacárido estiver ainda protegido, mas também se o esqueleto já estiver completamente desprotegido.

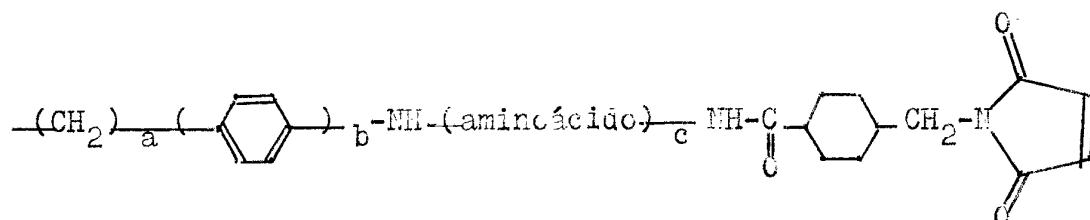
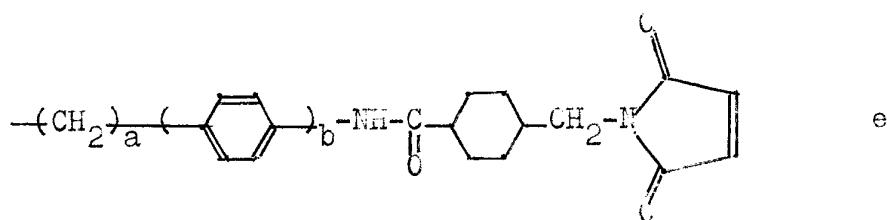
Assim, os grupos reactivos contendo uma função $-\text{NH}_2$ tal como



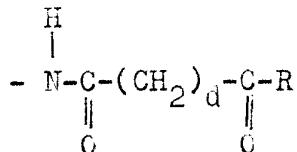
na qual $a = 0-16$, $b = 0-2$, $c = 1-10$ e o aminoácido terminal é de preferência glicina, podem através de um composto contendo um éster activo e uma função maleimida, ser convertidos num grupo reactivo contendo uma função maleimida (os ditos grupos deram, com



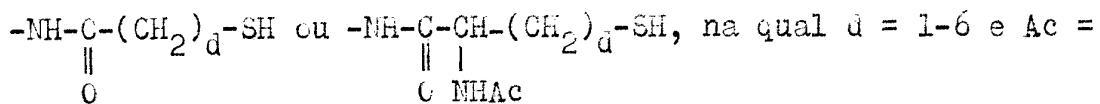
na qual R tem o mesmo significado que na página (6), os grupos



Além disso, os grupos reactivos contendo uma função -NH_2 podem ser convertidos através de um composto contendo duas funções éster ou aldeído activas num grupo reactivo contendo um éster ou aldeído activo como função reactiva, por exemplo,

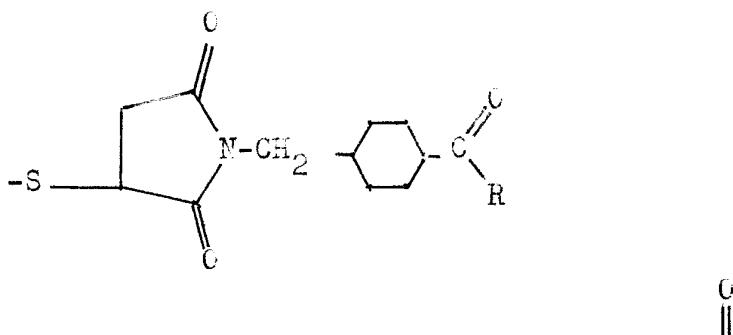


na qual R tem o mesmo significado que na página (6) e d = 1-6, ou através de um composto contendo um éster activo e uma função -SH num grupo reactivo contendo uma função -SH , por exemplo,



= acetil

Os grupos reactivos contendo uma função -SH podem ser convertidos através de um composto contendo um éster activo e uma função maleimida num grupo reactivo contendo um éster activo como a função reactiva, por exemplo,



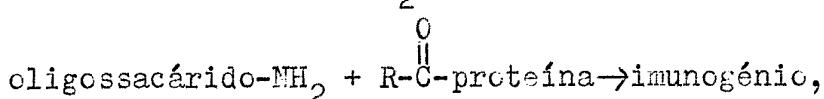
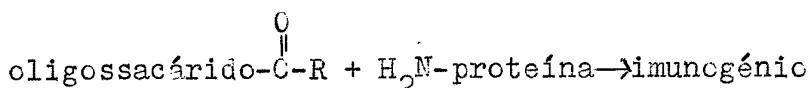
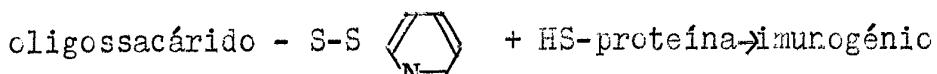
Os grupos reactivos contendo um grupo -C-R como a função reactiva podem ser convertidos, por reacção com compostos contendo uma função -NH_2 e -SH ou uma função maleimida e -NH_2 , num grupo reactivo contendo, respectivamente, um grupo -SH ou maleimida como função reactiva.

Tais conversões do grupo reactivo são conhecidas per se na literatura.

Os oligossacáridos assim preparados de acordo com o invento estão ligados a uma proteína ou a um péptido. Os grupos

reactivos $-\text{NH}_2$, $-\text{COCH}$ ou $-\text{SH}$ na proteína, podem ser convertidos num dos outros grupos reactivos acima descritos por um processo análogo àqueles aqui descritos.

O oligossacárido de acordo com o invento e a proteína podem então ser ligados entre si, inter alia, da seguinte forma:
oligossacárido - maleimida + HS-proteína \rightarrow imunogénio
oligossacárido - SH + maleimida-proteína \rightarrow imunogénio



nas quais R tem o mesmo significado que na página 6.

Tais ligações podem ser efectuadas directa ou indirectamente

Além disso, os oligossacáridos com uma função $-\text{NH}_2$ reactiva podem, por exemplo, ser ligados a um grupo NH_2 de uma proteína através de um agente de ligação, tal como ésteres bis-N-hidroxissuccinimida ou dialdeído glutárico.

Se X ou Y na fórmula 1 for um grupo contendo uma cadeia hidrofóbica na extremidade não ligada, aqueles grupos são adequados para esta finalidade e são capazes de entrar numa interacção hidrofóbica com uma micela, uma vesícula ou um lipossoma, ou são capazes de formar uma micela através de interacções hidrofóbicas.

A cadeia hidrofóbica é, de preferência, um grupo alquilo contendo 12-24 átomos de carbono. É dada maior preferência a grupos nos quais o grupo alquilo contendo 12-24 átomos de carbono forma o dito grupo.

Ainda mais preferivelmente, o grupo é um grupo alquilo não ramificado contendo 14-22 átomos de carbono.

-10-

Os oligossacáridos de acordo com o presente invento podem ser usados adequadamente para produzir uma vacina contra a doença por HIB. Como os oligossacáridos de acordo com o presente invento não são imunogénicos per se, devem ser associados a um transportador que dê imunogenicidade à associação. Este princípio é conhecido per se nos chamados haptenos, os quais, embora não sejam imunogénicos per se, podem ser tornados imunogénicos associando-os a um transportador. Transportadores adequados são proteínas, péptidos, micelas, vesículas e lipossomas. A maior preferência é dada a proteínas ou a micelas.

Como proteínas e péptidos especialmente adequados, têm-se mencionado toxina tetânica, toxóide tetânico, toxina de difteria toxóide da difteria, toxina de pertussis, toxóide da pertussis, hemaglutinina filamentosa da pertussis, fimbriae da pertussis, proteínas da membrana externa da pertussis, proteínas da membrana externa de meningococcus (Neisseria meningitidis), proteínas da membrana externa do Haemophilus influenzae, fimbriae do Haemophilus influenzae, proteínas de sub-unidades de vírus polio e proteínas de sub-unidades de vírus do Sarampo. São preferidas as proteínas do Haemophilus influenzae. Uma vantagem de tais transportadores é que eles são ou podem ser usados em vacinas DPTP existentes. As ditas proteínas são conhecidas per se, bem como os processo de isolamento de tais proteínas. São também conhecidos processos de associação de sacárido a tais proteínas. Geralmente está envolvida uma ligação covalente entre o sacárido e a proteína.

Se X ou Y na fórmula 1 for um grupo contendo uma cadeia hidrofóbica na extremidade não ligada, o oligossacárido pode ser tornado imunogénico de uma forma apropriada associando o dito oligossacárido a micelas, vesículas ou lipossomas. A associação é obtida através de uma interacção hidrofóbica da cadeia hidrofóbica com partes hidrofóbicas da micela, da vesícula ou do lipossoma. Tais processos de associação são conhecidos per se.

Se X ou Y na fórmula 1 for um grupo reactivo, pode-se efectuar opcionalmente em primeiro lugar uma reacção com um composto contendo um grupo reactivo e uma cadeia hidrofóbica. O

produto assim obtido pode então ser associado a micelas, vesículas ou lipossomas.

Outro processo de dar imunogenicidade aos oligossacáridos de acordo com o invento consiste em tratar os oligossacáridos nos quais X ou Y é um grupo contendo uma cadeia hidrofóbica na extremidade não ligada de uma forma tal que as ditas cadeias hidrofóbicas formem uma estrutura de micela através de interacções hidrofóbicas. Neste caso, a imunogenicidade não é obtida por uma associação do oligossacárido com um transportador mas por associação de diversas moléculas do dito oligossacárido entre si.

Ainda uma outra possibilidade de preparar um imunogénio consiste em ligar os oligossacáridos de acordo com a fórmula 1 na qual X ou Y é um grupo reactivo, a uma molécula adjuvante anfifílica através de uma ligação covalente via o dito grupo reactivo. Esta associação pode ser directa ou indirecta. Após ligação do oligossacárido e do adjuvante, a extremidade não ligada do adjuvante pode formar uma micela possivelmente com um adjuvante não ligado ou com outras substâncias lipídicas. São adjuvantes anfifílicos adequados, por exemplo, avridina (*N,N*-diocatadecil-*N'*,*N'*-bis(2-hidroxietil)-propanodiamina), a amina lipoidal 4-aminometil-1(2,3-(di-n-decilogi)-n-propil)-4-fenil-piperidina, brometo de dimetil-uioctadecilamónico, dipéptido de dilaurilmuramilo, tetrapéptido de laurilo, ácido (*N*²-*N*-(*N*-lauril-L-alanil)- γ -D-glutamil-7-*N*⁶-(glicil)-D,D-L,L-2,6-diamina-pimélico, L-tirosina e seus derivados alquílicos, tetrapalmitato de maltose, poliôis plurónicos, azobenzeno-p-arsonato de L-tirosina, monocleato de sorbitano (Span 80), derivados da trihalose (tais como dimicolato de tre-halose) ácido retinoílico e seus derivados, D,L- α -tocopherol (vitamina E), lípido A e análogos e glicósidos, tais como, por exemplo saponinas (por exemplo, Quil A da casca da Quillaja Saponaria Molina).

Tais imunogénios e métodos para preparar estes imunogénicos são conhecidos per se pelo pedido de patente europeia 86.200.2037 O lípido A e análogos são conhecidos como adjuvantes através do pedido de patente Alema 8.500.499. O uso de saponinas como adjuvantes e a formação de micela de saponinas ligadas a determi-

nantes antigénicos são conhecidos por meio do Pedido de Patente Alemã 8.303.646.

Os imunogénios de acordo com o presente invento podem ser usados apropriadamente na preparação de uma vacina contra a doença HIB. Para melhorar ainda mais a imunogenicidade, podem-se usar, com vantagem, adjuvantes. O uso de tais adjuvantes e os referidos adjuvantes são conhecidos per se. Os adjuvantes podem ser adicionados ao imunogénio. É também possível associar adjuvantes ao imunogénio. Tais métodos de melhoramento da imunogenicidade são também conhecidos per se. Os imunogénios de acordo com o presente invento, compreendem assim, além das associações de oligossacáridos com transportadores e das associações entre os próprios oligossacáridos, associações dos dois tipos referidos com as quais se associa também um adjuvante.

A vacina de acordo com o presente invento contém, pelo menos, imunogénios de acordo com o presente invento. Usualmente o imunogénio estará na vacina numa solução, emulsão ou suspensão aquosas às quais se podem fazer adições que são habituais em vacinas, tais como, de adjuvantes, estabilizantes, tampões e outros imunogénios. Adjuvantes adequados que podem ser adicionados são hidróxido, fosfato ou óxido de alumínio, ou uma composição que consiste num óleo mineral, por exemplo Marcol 52, ou um óleo vegetal e um ou mais agentes emulsionantes, tal como Tween 80 ou Span 80, ou um dos adjuvantes anfifílicos já mencionados anteriormente.

São estabilizantes adequados carbo-hidratos tais como sorbitol, lactose, manitol, amido, sacarose, dextrano e glucose ou proteínas tais como albumina ou caseína.

Como tampões é possível usar, por exemplo, um tampão de fosfato de metal alcalino, de carbonato de metal alcalino ou de carbonato de metal alcalino-terroso.

Como já mencionado, a vacina pode também conter outros imunogénios. Neste caso tem-se o chamado "cocktail" que tem a vantagem de se conseguir imunidade contra vários patógenos por meio de uma única administração. Outros imunogénios que podem ser usados são, por exemplo, os imunogénios usados nas vacinas DPTP conhecidas. A vacina é preparada de acordo com métodos conhe-

cidos per se usando um imunogénio de acordo com o presente invento, por exemplo, por dissolução, emulsão ou suspensão do imunogénio num meio aquoso. Pode adicionar-se um ou mais dos aditivos usuais ao referido meio aquoso ou estes podem estar nele presentes.

Uma tal vacina pode ser usada para imunização contra a doença HIB mas também, para a assim chamada "inoculação" (na qual o corpo não é directamente estimulado para formar anticorpos livres específicos, mas é na realidade pré-condicionado de modo que, após infecção subsequente ou revacinação seja provocada uma reacção imunológica forte). A vacina é habitualmente administrada por meio de injecção intra-muscular ou subcutânea. Em geral, a quantidade de imunogénio administrada por injecção estará entre 0,1 e 100 μ g por dose.

A vacina, de acordo com o presente invento oferece, em princípio, protecção a todos os indivíduos contra a doença por HIB e é extremamente adequada, em particular, para vacinação de crianças pequenas (menos de 2 anos de idade). Como resultado da pureza do oligossacárido de acordo com o presente invento, não é necessário testar cada lote de vacina contendo tal oligossacárido, preparado, em relação à sua eficácia. Além disso, limitam-se com uma tal vacina a quantidade de anticorpos indesejavelmente estimulados, e a ocorrência de outros efeitos secundários, como toxicidade.

Os oligossacáridos de acordo com o presente invento podem ser preparados fazendo reagir uns com os outros, em vários passos, diversos compostos seleccionados do grupo que consiste em compostos que contêm unidades ribose, ribose-ribitol, ribose-ribitol-fosfato, ribitol, ribitol-fosfato, ribitol-fosfato-ribose, fosfato, fosfato-ribose e fosfato-ribose-ribitol, sendo as referidas unidades providas com os grupos protectores necessários, e finalmente removendo os grupos protectores. Os oligossacáridos de acordo com o presente invento são preparados principalmente por substituição dos grupos protectores nos oligossacáridos por um átomo de hidrogénio, os quais compreendem a estrutura $(D\text{-ribose}\text{-}D\text{-ribitol}\text{-fosfato})_n$, $(D\text{-ribitol}\text{-fosfato}\text{-}D\text{-ribose})_n$ ou $(\text{fosfato}\text{-}D\text{-ribose}\text{-}D\text{-ribitol})_n$, onde $n = 2$,

3,4... 19 ou 20 e onde o átomo de hidrogénio nos grupos hidroxí livres foi substituído por um grupo protector. Na generalidade sabe-se que os oligossacáridos podem ser preparados ligando unidades maiores ou menores umas às outras, a partir das quais o oligossacárido final é construído por meio de várias reacções, sendo as unidades providas com os grupos protectores necessários. Depois do oligossacárido desejado ter sido construído, os grupos protectores são removidos. Se um dos grupos X e Y na fórmula 1 de acordo com a página das fórmulas anexa não é hidrogénio, e estes grupos não ocorrem nos compostos a partir dos quais o oligossacárido foi construído, estes grupos devem ser também incorporados antes dos grupos protectores serem removidos.

Os oligossacáridos de acordo com o presente invento podem ser preparados partindo de um composto de fórmula 2 de acordo com a página das fórmulas. Partindo deste composto há vários métodos de preparar os oligossacáridos de acordo com o presente invento.

O primeiro método consiste em construir o oligossacárido por incorporação contínua de uma unidade pequena. Isto pode ser realizado por fosforilação de compostos de fórmula 2 com compostos de fórmula 3 acoplando em seguida um composto de fórmula 5 ao grupo fósforo, repetindo estes dois passos tantas vezes quantas as desejadas, e finalmente, terminando a construção por reacção com um composto de fórmula 6 de acordo com a página das fórmulas, após a qual, os grupos protectores devem ainda ser removidos. Outro método consiste na fosforilação de um composto de fórmula 5 com um composto de fórmula 3, ligação do produto obtido, por meio do produto fósforo, a um composto de fórmula 2, repetição deste passo, tantas vezes quanto desejadas e, finalmente, terminação da construção por reacção com um composto de fórmula 6, de acordo com a página das fórmulas, após a qual os grupos protectores devem ainda ser removidos. O invento refere-se assim, em particular a um método de preparação dos oligossacáridos de acordo com o presente invento caracterizado por

1) um composto de fórmula 2 de acordo com a página das fórmulas é reagido com um composto de fórmula 3 de acordo com a página das fórmulas, fórmulas nas quais:

$K = 0$ se $L = 0$,

$K = 0$ ou 1 se $L = 1$,

$L = 0$ ou 1

R_1 = a um grupo protector permanente,

um grupo reactivo capaz de formar directa ou indirectamente uma ligação com um transportador, e que contém uma função reactiva que tem um grupo protector permanente, ou um grupo contendo na extremidade não ligada uma cadeia hidrofóbica, ou o grupo terminal R_1O^- é substituído pelo grupo reactivo H_{2n} ou HS^- , grupo reactivo que é provido com um grupo protector permanente.

R_2 = a um grupo protector permanente

A = a um átomo de oxigénio ligado por meio de uma ligação dupla ao átomo de fósforo ou a nada (neste caso o átomo de fósforo tem um par de electrões livre),

R_3 = a um grupo reactivo, e

R_4 = a um grupo reactivo ou um grupo de fórmula 4 de acordo com a página das fórmulas na qual $q = 0$ ou 1 , R_2 = a um grupo protector permanente e R_5 = a um grupo protector permanente, um grupo reactivo que é capaz de formar, directa ou indirectamente uma ligação com um transportador e que contém uma função reactiva que tem um grupo protector permanente, ou um grupo com uma cadeia hidrofóbica na extremidade não ligada, ou o grupo terminal $-CR_5$ é substituído por um grupo reactivo H_2N^- ou HS^- , grupo reactivo que é provido com um grupo protector permanente, e por

2) se R_4 não é um grupo de fórmula 4, o produto obtido no passo 1) é reagido com um composto de fórmula 5 de acordo com a página das fórmulas onde R_2 é um grupo protector permanente e R_6 é um grupo protector temporário sendo o produto assim obtido desprotegido por substituição de R_6 por um átomo de hidrogénio e por

3) o passo 2) ser repetido $m-2$ vezes com produto obtido no passo 2) em lugar do produto obtido no passo 1) e por

4) o produto obtido no passo 2) ou no passo 3) ser reagido com um composto de fórmula 6 de acordo com a página das fórmu-

las, na qual

R_2 = a um grupo protector permanente,

R_3 = a um grupo reactivo,

R_7 = a um grupo protector permanente, um grupo reactivo capaz de formar uma ligação, directa ou indirectamente com um transportador e que contém uma função reactiva que tem um grupo protector permanente, ou um grupo com uma cadeia hidrofóbica na extremidade não ligada, ou o grupo exterior R_7C- é substituído pelo grupo reactivo H_2N- ou $HS-$, grupo reactivo que é provido com um grupo protector permanente,

$n = 0$ ou 1 ,

$q = 0$ se $n = 0$,

$q = 0$ ou 1 se $n = 1$, e por

5) no produto assim obtido c grupo protector permanente R_1 ou R_7 , se presente e se desejado, é substituído por X ou Y desde que X ou Y não sejam hidrogénio e por

6) o composto obtido no passo 1), 4) ou 5) ser desprotegido por substituição dos grupos protectores permanentes por um átomo de hidrogénio.

O invento refere-se também a um processo para preparar oligossacáridos de acordo com o presente invento, caracterizado por

1) um composto de fórmula 2 de acordo com a página das fórmulas, na qual K, L, R_1 e R_2 têm o mesmo significado que acima, ser reagido com o produto de reacção de um composto de fórmula 3 de acordo com a página das fórmulas, na qual R_2 , R_3 e R_4 têm o mesmo significado que acima, com a condição de que R_4 não seja um grupo possuindo a fórmula 4 de acordo com a página das fórmulas de um composto de fórmula 5 de acordo com a página das fórmulas, na qual R_2 e R_6 têm o mesmo significado que acima, e o produto assim obtido ser desprotegido substituindo R_6 por um átomo de hidrogénio e por

2) o produto obtido no passo 1) ser reagido com o produto de reacção de um composto de fórmula 3 com um composto de fórmula 5 de acordo com a página das fórmulas, sendo o

produto assim obtido desprotegido substituindo R_6 por um átomo de hidrogénio e por este procedimento ser repetido m-3 vezes como produto obtido, e por

- 3) o produto obtido no passo 1) ou 2) ser reagido com um composto de fórmula 6 de acordo com a página das fórmulas, na qual n, q, R_2 , R_3 e R_7 têm os mesmos significados que anteriormente, e por
- 4) no produto assim obtido, o grupo protector permanente R_1 ou R_7 , se presente e se desejado, ser substituído por X ou Y desde que X ou Y não seja hidrogénio, e por
- 5) o composto obtido no passo 3) ou 4) ser desprotegido por substituição dos grupos protectores permanentes por um átomo de hidrogénio.

R_1 Pode ser um grupo protector permanente ou se X no oligosacárido desejado não for hidrogénio, pode ser igual a X, com a condição de que a função reactiva esteja prevista com um grupo protector permanente em consequência do qual a função reactiva não entra em nenhuma reacção durante a formação do esqueleto do oligossacárido. Uma vez que X na fórmula 1 é de preferência hidrogénio, R_1 é de preferência um grupo protector permanente.

R_2 é um grupo protector permanente.

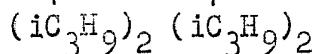
R_3 na fórmula 3 é um grupo reactivo e, R_4 é um grupo reactivo ou um grupo de fórmula 4. Uma vez que Y é de preferência diferente de hidrogénio, R_5 na fórmula 4 é de preferência um grupo que não é um grupo protector permanente. Uma vez que k, L, n e q são preferivelmente zero, R_4 é, de preferência um grupo reactivo e, em consequência, não é um grupo de fórmula 4.

Pelo termo "grupo protector permanente" significa-se grupos que durante todo o decurso da preparação dos oligossacáridos de acordo com o invento exercem a sua influência protectora sobre os - de outro modo - grupos reactivos. Só após a síntese ter sido completamente efectuada, são removidos os grupos protectores permanentes substituindo-os por um átomo de hidrogénio. Tais grupos protectores são conhecidos na química dos nucleótidos e dos açúcares.

Os grupos R_2 na fórmula 2, 3, 4, 5 e 6 podem ser grupos iguais ou diferentes, escolhidos, de preferência do conjunto de

grupos seguintes: benzoílo, benzilo, benziloximetilo, 2-clorofenil, benziloxicarbonilo, terc.-butildifenilsilílico, alquilo com 10-20 átomos de carbono, tetra-hidropiranilo, terc.-butildimethylsilílico e tritilo. De preferência, R₂ nas unidades ribitol é benzilo. Se R₁ ou R₅ são ou contêm grupos protectores permanentes, os referidos grupos podem ser apropriadamente escolhidos do conjunto anteriormente mencionado. O mesmo se aplica a R₂ na fórmula 3 que é, preferivelmente 2-clorofenilo.

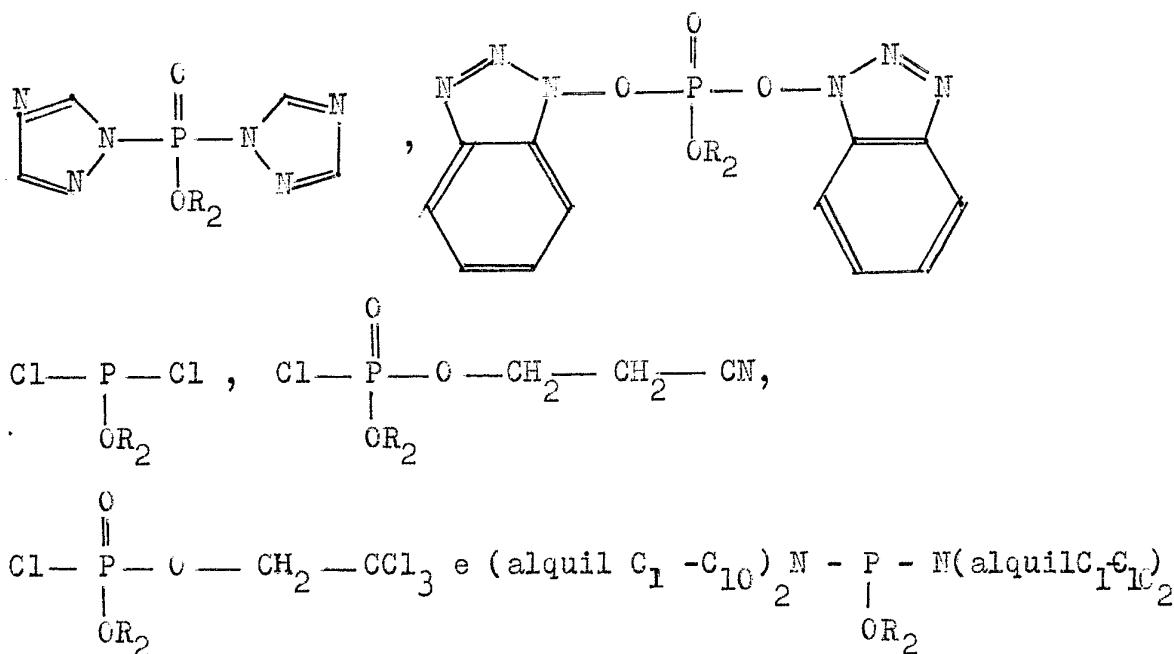
De preferência, R₁ na fórmula 2 juntamente com R₂ na posição 5' da unidade ribose, forma um grupo -Si - O - Si-



(neste caso, K e L são iguais a zero) ou R₂, na posição 5' da unidade ribose, e R₁ são benzilo.

De preferência, R₂ na posição 2' da unidade ribose é benzilo, benziloximetilo, tetra-hidropiranilo ou terc.-butildimethylsilílico preferindo-se benzilo e benziloximetilo, e R₂ na posição 5' da unidade ribose na fórmula 4, 5 e 6 é benzilo, benziloximetilo, tetra-hidropiranilo, tritilo ou terc.-butildifenilsilílico, preferindo-se benzilo e terc.-butildifenilsilílico.

Os grupos reactivos R₃ e R₄ na fórmula 3 podem ser grupos que são capazes, em conjunto, de efectuar uma ligação entre os grupos OH livres em compostos de fórmula 5 e 2. São compostos adequados de fórmula 3:



-19-

A reacção entre compostos de fórmula 2 e 3 tem lugar, habitualmente à pressão atmosférica e a uma temperatura entre zero e 60°C centígrados durante 20 minutos - 3 horas.

Em seguida, o produto assim obtido é reagido com um composto de fórmula 5 na qual R_2 é um grupo protector permanente e R_6 é um grupo protector temporário.

Em relação a R_2 aplica-se o que já foi focado anteriormente sobre a fórmula 2. Um grupo protector temporário, significa neste contexto que se utiliza um grupo que exerce a sua função protectora durante uma parte da construção do esqueleto do oligossacárido, de modo a, subsequentemente, antes da construção estar completada, ser removido selectivamente, i.e. sem que os grupos protectores permanentes sejam removidos. Tais grupos são conhecidos na química dos nucleótidos e dos açúcares. Grupos adequados são: alilo, 1-propenilo, dimetoxitritilo, cloroacetilo, bromoacetilo, levulinoílo e aliloxicarbonilo. A maior preferência para R_6 é para alilo e 1-propenilo.

A reacção com o composto possuindo a fórmula 5 efectua-se geralmente à pressão atmosférica e a uma temperatura entre 0 e 60°C durante 20 min - 3 horas.

Após reacção com o composto de fórmula 5, o grupo R_6 é selectivamente removido, geralmente à pressão atmosférica e a uma temperatura de 0 a 60°C durante 10-60 min, e é substituído por um átomo de hidrogénio.

Depois, se desejado, a reacção com um composto de acordo com a fórmula 3, desde que R_4 seja um grupo reactivo, a reacção com um composto de acordo com a fórmula 5 e a substituição de R_6 por um átomo de hidrogénio podem ser repetidas $m-2$ vezes. As condições sob as quais estes passos são efectuados são as mesmas do que para os passos equivalentes já descritos anteriormente.

Em seguida, o produto obtido é reagido com um composto de fórmula 6 de acordo com a página das fórmulas. Em relação a R_2 e R_3 , aplica-se o que já foi focado anteriormente em relação a R_2 e R_3 nas fórmulas 2 e 3. De preferência n e q são iguais a zero. R_7 tem o mesmo significado que R_1 ; isto não significa que R_1 e R_7 sejam necessariamente idênticos. Como Y no oligossacá-

rido desejado de preferência não é hidrogénio, R_7 é de preferência igual a Y ($Y \neq H$), com a condição de que a função reactiva é provida com um grupo protector permanente. Os grupos que podem ser usados adequadamente para este fim são os grupos protectores permanentes já mencionados; é dada maior preferência ao grupo benziloxicarbonilo.

As condições sob as quais a reacção com um composto de acordo com a fórmula 6 é geralmente efectuada, são as seguintes: temperatura $10\text{--}60^{\circ}\text{C}$ à pressão atmosférica, tempo 15 mn - 6 horas.

A construção do esqueleto do oligossacárido está assim completa. Se desejado, R_1 ou R_7 , desde que R_1 ou R_7 seja um grupo protector permanente, podem agora ser substituídos por X ou Y desde que X ou Y $\neq H$. Nos oligossacáridos de acordo com o presente invento, X é de preferência hidrogénio; nesse caso, R_1 é, de preferência, um grupo protector permanente. Como Y é de preferência diferente de hidrogénio, R_7 é, de preferência igual a Y ($Y \neq H$) com um grupo protector permanente. Nesse caso, nem R_1 nem R_7 precisam de ser substituídos por X ou Y desde que X ou Y $\neq H$. De preferência, este passo não é, portanto, efectuado.

Finalmente, os grupos protectores permanentes são substituídos por um átomo de hidrogénio. Da mesma forma que o uso e a introdução de grupos protectores permanentes é conhecido na química do açúcar e de nucleótidos, a desprotecção é também conhecida.

Contudo, a preparação de oligossacáridos de acordo com o presente invento, nos quais K, L, n e q = 0, é efectuada, de preferência, deixando um composto de fórmula 2 reagir com o produto de reacção de um composto de acordo com a fórmula 3 e de acordo com a fórmula 5. Após desprotecção do produto obtido removendo R_6 , o esqueleto/oligossacárido pode ser ainda aumentado por reacção com o produto de um composto de fórmula 3 e de fórmula 5 e desprotegendo o produto obtido removendo novamente R_6 . Isto pode ser repetido tantas vezes quantas desejado tendo em conta o comprimento desejado do esqueleto do oligossacárido. A construção do esqueleto do cligossacárido é completada pela reacção com um composto de fórmula 6. A vantagem desta abordagem é que o número de passos pode ser reduzido porque o produto,

obtido reagindo um composto de fórmula 3 e 5 só necessita de ser preparado uma vez. Uma segunda vantagem é o facto de que um composto de fórmula 3 reage mais selectivamente com um composto de fórmula 5 que com um composto de fórmula 2. Em ambos os casos, o composto de fórmula 3 serve para ligar só um composto de fórmula 2 ou 5, enquanto o outro grupo reactivo do composto possuindo a fórmula 3 permanece intacto. No caso de reacção com um composto de fórmula 2, ocorre mais formação de dímero indesejável.

A reacção entre um composto de fórmula 3 e 5 é efectuada a uma temperatura entre 10 e 60°C e à pressão atmosférica e estará geralmente completa dentro de 10-60 mn. O produto assim formado é também reagido a 10 - 60°C e à pressão atmosférica com um composto de fórmula 2. Esta reacção estará geralmente completa ao fim de 0,5-3 horas e é efectuada de preferência na presença de um catalisador, tal como N-metilimidazol ou tetrazol, ou após activação com, ou na presença de um reagente activador, tal como 1-(2,4,6-triisopropilbenzeno-2'-sulfonil)-3-nitro-1,2,4,-triazol ou 1-(mesitileno-2'-sulfonil)-3-nitro-1,2,4,-triazol.

Os compostos de acordo com a fórmula 3 que podem ser adequados para serem usados são em princípio os mesmos que os compostos já acima mencionados.

Os oligossacáridos de acordo com o presente invento podem também ser preparados partindo de um composto de fórmula 6 de acordo com a página das fórmulas.

Este composto é reagido com um composto possuindo a fórmula 5 na qual H é substituído por R₆ e R₆ por H. A desprotecção é então efectuada substituindo R₆ por H e reagindo o produto obtido com um composto de fórmula 3 e de fórmula 2, consecutivamente. Outra possibilidade consiste em reagir um composto de fórmula 6 com o produto obtido pela reacção de um composto de fórmula 3 com um composto de fórmula 5 na qual H é substituído por R₆ e R₆ por H e reagindo o composto obtido com um composto de fórmula 2. Os passos intermediários podem novamente ser repetidos m-2 vezes.

Em vez de compostos de fórmula 3 de acordo com a página das fórmulas, podem também ser usados outros compostos de fósforo

-22-

para a preparação dos oligossacáridos de acordo com o invento. Isto aplica-se tanto aos processos já descritos e aos processos de preparação adiante. Assim, os compostos de fósforo tendo três grupos reactivos, tal como PCl_3 ou salicilclorofosfina, podem ser reagidos com o composto 2 ou 5 de acordo com a página das fórmulas, depois o produto obtido é hidrolisado para o fosfonato correspondente o qual, após activação com um reagente activador, tal como cloreto de pivaloílo, é reagido com o composto 5 ou 2 de acordo com a página das fórmulas.

Após reacção de um composto de fórmula 3 de acordo com a página das fórmulas com o composto 2 ou 5 de acordo com a página das fórmulas, o produto assim formado pode também ser hidrolisado - com remoção do grupo reactivo livre que resta e o grupo protector permanente (que é neste caso um grupo protector temporário) - para o fosfonato correspondente o qual após activação com um reagente activador, é reagido com o composto 5 ou 2 de acordo com a página de fórmulas.

Se A na fórmula 3 for nata e o composto de fósforo tiver assim um par de electrões livres ou se durante a preparação dos oligossacáridos de acordo com o invento se formarem compostos de fósforo que não estão completamente oxidados, deve-se efectuar uma oxidação, por exemplo com I_2 /piridina ou terc.-butilperóxido de forma a obter o fosfato correspondente.

Outro processo de preparação de oligossacáridos de acordo com o invento é através da chamada síntese de bloco. Neste caso, fragmentos relativamente grandes do oligossacárido desejado são preparados separadamente e depois ligados entre si. Ainda outro processo consiste em preparar um fragmento relativamente grande e desproteger uma parte do fragmento obtido num local diferente da outra parte, tendo como resultado que ambas as partes podem ser ligadas entre si. O invento de acordo com o presente pedido refere-se, portanto, também, em particular, a um processo para a preparação de oligossacáridos de acordo com o presente invento caracterizado pelo facto de

- 1) um composto de fórmula 2 de acordo com a página das fórmulas ser reagido com o produto de reacção de um composto de fórmula 3 e fórmula 5 de acordo com a página das fórmulas

mulas em cujas fórmulas K, L, A, R₁, R₂, R₃ e R₆ têm os mesmos significados que já descritos e R₄ é um grupo reactivo, e pelo facto do produto assim obtido ser desprotegido substituindo R₆ por um átomo de hidrogénio, e pelo facto de

- 2) o passo 1) ser repetido tantas vezes quantas as desejadas com o produto obtido no passo 1) em vez do composto de acordo com a fórmula 2 e pelo facto de
- 3) o passo 1) e se desejado o passo 2) serem repetidos partindo de um composto de fórmula 2) na qual K=0, L=1 e R₁ ser um grupo protector temporário, e sendo R₁ substituído por um átomo de hidrogénio no último passo em vez de R₆, e pelo facto de
- 4) o produto obtido no passo 1) ou 2) e o produto obtido no passo 3) serem reagidos entre si e no produto assim formado R₆ ser substituído por um átomo de hidrogénio e pelo facto de
- 5) o produto obtido no passo 4) ser reagido com um composto de fórmula 6) de acordo com a página das fórmulas na qual R₂, R₃, R₇, n e q têm os significados já descritos e pelo facto de
- 6) o grupo protector permanente R₁ ou R₇ se presente e se desejado, no produto assim obtido ser substituído por X ou Y desde que X ou Y não sejam hidrogénio, e pelo facto de
- 7) o composto obtido no passo 5) ou 6) ser desprotegido substituindo os grupos protectores permanentes por um átomo de hidrogénio.

Este processo de preparação pode ser também efectuado usando um composto de fórmula 6 no passo 3) em vez de um composto de fórmula 2, utilizando o produto de reacção de um composto de fórmula 3 e de fórmula 5.

Este processo de preparação pode também ser efectuado a partir de um composto de fórmula 6 de forma análoga à já descrita.

O invento refere-se também a um processo de preparação de oligossacáridos de acordo com o presente invento caracterizado

pelo facto de

- 1) um composto de fórmula 2 de acordo com a página das fórmulas ser reagido com o produto de reacção de um composto de fórmula 3 e de fórmula 5 de acordo com a página das fórmulas, na qual A, R₂, R₃ e R₆ têm o significado já descrito e R₄ é um grupo reactivo, K=0, L=0 e R₁ é um grupo protector, e o produto assim obtido ser desprotegido substituindo R₆ por um átomo de hidrogénio, e pelo facto de
- 2) o passo 1) ser repetido tantas vezes quantas as desejadas com o produto obtido no passo 1) em vez do composto de fórmula 2, e pelo facto de
- 3) uma parte do produto obtido no passo 2) ser desprotegido substituindo R₁ por um átomo de hidrogénio em vez de R₆, e pelo facto de
- 4) os produtos nos quais R₁ e R₆ foram substituídos serem reagidos entre si após um dos referidos produtos ter sido reagido com um composto de fórmula 3, e pelo facto de
- 5) R₆ no produto obtido ser substituído por um átomo de hidrogénio, e pelo facto de
- 6) o produto no passo 5) ser reagido com um composto de fórmula 6 de acordo com a página das fórmulas na qual n, q, R₂, R₃, e R₇ têm o significado já descrito e pelo facto de
- 7) o grupo protector permanente R₁ ou R₇, se presente e se desejado, no produto assim obtido ser substituído por X ou Y não sejam hidrogénio e pelo facto de
- 8) o composto obtido no passo 6) ou 7) ser desprotegido substituindo os grupos protectores permanentes por um átomo de hidrogénio.

Este processo de preparação pode ser também efectuado em sequência inversa, i.e., partindo de um composto de fórmula 6 e terminando com a incorporação necessária para obter um composto de fórmula 2.

Uma outra variante desta síntese em bloco é aquela em que, antes dos dois blocos serem ligados, a incorporação do grupo terminal (por reacção com um composto de fórmula 6 ou de fórmula

2) ser efectuada num dos blocos. A síntese em blocos é particularmente vantajosa se se preparam oligossacáridos relativamente grandes. Desta forma podem ser consideravelmente reduzidos o número de passos de reacção. As condições sob as quais os blocos são ligados entre si não são em princípio diferentes das acima já discutidas para os outros processos. Os processos de preparação descritos podem ser efectuados, de forma adequada, em parte ou na totalidade, numa fase sólida.

O invento é explicado com referência aos seguintes exemplos:

EXEMPLOS

1. Preparação de um composto de fórmula 2 de acordo com a página das fórmulas

Partindo da D-ribonolactona, preparou-se 1-O-/-2-benzilo-ximetil-3,5-O-(tetra-isopropildisiloxano-1,3-diil)- β -D-ribofuranosil/-2,3,4-tri-O-benzil-D-ribitol (composto 15 no esquema 1) através de 13 produtos intermediários.

O composto 2 no esquema 1 foi preparado a partir do composto 1 como descrito na Canadian J. Chem. 36 (1958) 1720.

4,5 ml de clorocformato de alilo em 10 ml de acetonitrilo seco foram adicionados gota a gota, enquanto se agitou, a 4 g de composto 2 e 3,5 ml de piridina seca em 10 ml de acetonitrilo seco a 0°C. A agitação foi então continuada durante 1 hora a 0°C.

O excesso de clorocformato foi destruído adicionando gelo. A mistura de reacção foi diluída com 100 ml de éter e lavada 3 vezes com 50 ml de água. A camada orgânica foi seca com MgSO₄ e concentrada sob vácuo. O resíduo foi dissolvido em 10 ml de diclorometano e filtrado através de uma pequena coluna que foi enchida com 6 g de silica gel 60. A coluna foi lavada com 40 ml de diclorometano. O filtrado e o líquido de lavagem foram combinados e concentrados sob vácuo. O composto 3 foi cristalizado a partir disto com éter/diisopropil éter.

5 g de composto 3 em 20 ml de dioxano foram colocados sob uma atmosfera de hélio. Depois de se adicionarem 15 mg de te-

traquis (trifenilfosfina) paládio, a solução foi mantida durante 15 min. sob condições de refluxo e a mistura de reacção com o composto 4 foi concentrada.

8,6 g de composto 4, 3,5 g de borohidreto de sódio e 150 ml de tetra-hidrofurano seco foram aquecidos para 55°C. Adicionearam-se 30 ml de metanol em 45 min. enquanto se agitou. A agitação foi então efectuada durante 1 hora a 55°C.

Após arrefecimento, a mistura de reacção foi concentrada sob vácuo. O resíduo foi co-evaporado com metanol seco ($3 \times 50\text{ml}$) recuperado com 100 ml de diclorometano e lavado com 100 ml de uma solução saturada a 90% de cloreto de amónio em água. A camada aquosa foi extraída com diclorometano ($2 \times 100\text{ ml}$). As camadas orgânicas combinadas foram secas (MgSO_4) e concentradas sob vácuo. O resíduo foi purificado por cromatografia (eluição com diclorometano/metanol 100/0 → 95/5). As fracções adequadas contêm compostos 5. 6,2 g de composto 5 foram dissolvidos em 100 ml de ácido acético, após o qual se adicionaram 40 ml de água. A solução foi agitada durante 4 horas a 50°C. A mistura de reacção foi concentrada sob vácuo. O resíduo foi co-evaporado com tolueno seco ($3 \times 25\text{ ml}$) e piridina seca ($3 \times 25\text{ ml}$) e redissolvido em 40 ml de piridina. Depois de se adicionarem 7,5 g de cloreto de tritilo, a solução foi agitada durante 12 horas à temperatura ambiente. Após se adicionarem 5 ml de metanol, a mistura de reacção foi concentrada sob vácuo.

O resíduo foi co-evaporado com tolueno ($3 \times 25\text{ ml}$) e recuperado em 150 ml de diclorometano e lavado com 150 ml de solução de bicarbonato de sódio 1 M e com 150 ml de água. A camada orgânica foi seca (MgSO_4) e concentrada sob vácuo. Após cromatografia de purificação efectuada como no passo anterior, obteve-se o composto 6. 7,3 g de composto 6 foram dissolvidos em 40 ml de N,N-dimetilformamida seca, após o qual se adicionaram em pequenas porções 2 g de hidreto de sódio. A mistura de reacção agitada foi arrefecida para 0°C e adicionaram-se gota a gota durante 30 min., 6,2 ml de brometo de benzilo em 10 ml de N,N-dimetilformamida seca. Continuou-se a agitação durante mais 30 min a 0°C e depois durante 12 horas à temperatura ambiente. Depois, adicionaram-se lentamente 10 ml de metanol e a mistura de reac-

ção foi concentrada sob vácuo. O resíduo foi recuperado em 150 ml de éter e lavado três vezes com 50 ml de H_2O . A camada orgânica foi seca ($MgSO_4$) e concentrada sob vácuo. A purificação cromatográfica do concentrado (eluição com hexano/diclorometano 2/1 (400 ml) e 1/1 (400 ml) seguida de diclorometano) e a evaporação das fracções correctas deu o composto 7. 8,5 g de composto 7 foram dissolvidos em 135 ml de ácido acético e 15 ml de água e aquecidos durante 90 min a 80°C. A solução foi concentrada sob vácuo. O resíduo foi recuperado em éter e lavado com água (50 ml) e solução de bicarbonato de sódio 1M (2×50 ml).

A camada orgânica foi seca ($MgSO_4$) e concentrada sob vácuo. 10 ml de diclorometano/hexano 1/1 foram adicionados ao resíduo e efectuou-se filtração. O filtrado foi purificado cromatograficamente (eluição com 400 ml de clorofórmio (hexano 1/1; 400 ml de diclorometano e diclorometano/metanol 98/2), após o que se obteve o composto 8. 3,4 g de composto 9, que foi comprado, e 3,1 g de composto 8 foram secos por co-evaporação com dioxano (3×50 ml) e depois dissolvidos em 50 ml de 1,2-dicloroetano seco. Adicionaram-se peneiros moleculares (4 Å, 10 g de pelotas activadas) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 90 min. sob uma corrente de azoto. Depois 3×30 µl de sulfonato de trimetilsililo trifluorometano foram adicionados a intervalos de 1 hora. 1 hora após a última adição, adicionaram-se 100 µl de trietilamina; os peneiros moleculares foram removidos por filtração e lavados com clorofórmio e tolueno. O filtrado e o líquido de lavagem foram combinados e concentrados sob vácuo. O resíduo foi purificado cromatograficamente (eluição com tolueno/acetona 100/0 → 98/2). O composto 10 foi obtido a partir das fracções correctas. 5 g dele foram dissolvidos em 25 ml de dioxano seco; depois 25 ml de metanol seco e 1,25 ml de metóxido de sódio 1M em metanol foram adicionados. A mistura de reacção foi agitada durante 4 horas à temperatura ambiente. Depois de 0,25 ml de metóxido de sódio 1M em metanol ter sido adicionado, efectuou-se agitação durante mais uma hora. Depois, 1,25 g de Dowex 50 Wx4 (forma H^+) foram adicionados e removidos após 30 min. por filtração e lavados com metanol e clorofórmio. O filtrado e o líquido de lavagem foram combinados e concentrados.

dos sob vácuo. A purificação cromatográfica (eluição com diclorometano/metanol 100/0 → 95/5) deu o composto 11, do qual 2,4 g foram concentrados duas vezes em 20 ml de piridina seca. Depois adicionaram-se 20 ml de piridina seca. A solução obtida foi agitada sob uma atmosfera de azoto a 0°C e 1,4 ml de 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetra-isopropildisiloxano foram adicionados gota a gota em 15 min. Depois a agitação foi efectuada durante 1 hora à temperatura ambiente. A mistura de reacção foi concentrada sob vácuo e co-evaporada com tolueno (3×20 ml). O resíduo foi recuperado em 75 ml de dietil-éter e lavado com KH_2PO_4 1M (3×50 ml) e NaHCO_3 1M (3×50 ml). A camada orgânica foi seca (MgSO_4) e concentrada sob vácuo. Após purificação cromatográfica (eluição com diclorometano/acetona 100/0 → 98/2), obteve-se o composto 12, do qual 1,49 g foram concentrados duas vezes a partir de 5 ml de acetnitrilo. Depois 4,5 ml de acetonitrilo foram adicionados. A solução foi agitada sob uma atmosfera de azoto a 50°C e 1,35 ml de N,N-diisopropiletilamina seca e 0,5 ml de cloreto de benzilximeto foram adicionados em sucessão. Duas horas depois, adicionaram-se 0,25 ml de cloreto de benziloximetilo e depois a agitação foi efectuada durante mais uma hora. Depois adicionaram-se 2 ml de metanol seco a 50°C. Após arrefecimento, a mistura de reacção foi concentrada sob vácuo. O resíduo foi recuperado em 40 ml de dietiléter e lavado com KH_2PO_4 1M (3×20 ml) e NaHCO_3 1M (20 ml). A camada orgânica foi seca (MgSO_4) e concentrada sob vácuo. Após purificação cromatográfica (eluição com hexano / acetato de etilo 10/0 → 9/1), obteve-se o composto 13. O composto 13 (1,32 g) foi dissolvido em 4 ml de tetrahidrofurano. A solução foi desgaseada 3 vezes e colocada sob hélio. Adicionaram-se hexafluorofosfato de 1,5-ciclooctadieno-bis(metildifenilfosfina)-irídio (2-3 mg), após o qual a solução foi novamente desgaseada 3 vezes e colocada sob hélio. Uma corrente de H_2 foi passada sobre a solução durante 2 min., após o qual foi novamente desgaseada e colocada sob hélio. Após 4 horas a mistura de reacção foi concentrada sob vácuo. O composto 14 assim obtido foi dissolvido em acetona e água (1,2 g em 15 ml e 1 ml respectivamente). Depois adicionaram-se 300 mg de HgO e 375 mg de HgCl_2 e a suspensão foi agitada durante 30 min à tem-

peratura ambiente. O HgO foi removido por filtração e lavado. O filtrado e o líquido de lavagem foram combinados e concentrados sob vácuo. O resíduo foi recuperado em 75 ml de dietil-éter e lavado com 40 ml de uma solução de KI saturada a 50% (3x), 40 ml de uma solução de NaHSC₃ a 1% e 40 ml de NaHCO₃ 1M. A camada orgânica foi seca (MgSO₄) e concentrada sob vácuo.

Após purificação cromatográfica (eluição com hexano/acetato de etilo 9/1 → 7/3), obtiveram-se 0,97 g de composto 15 puro; Rf = 0,34 (hexano/acetato de etilo 7/3), $\Delta\alpha_D^{20} = +39^\circ$ (c 1,0 -CHCl₃).

2. Preparação do composto de fórmula 5 de acordo com a página das fórmulas

Partindo do composto 14 do esquema 1, preparou-se o composto 17 de acordo com o esquema 2.

O composto 14 (425 mg) foi concentrado a partir de 2 ml de dioxano seco (2x) e dissolvido em 2,2 ml de fluoreto de tetra-n-butilamônio 0,5 M em dioxano. Depois de repousar durante 30 minutos à temperatura ambiente, evaporou-se o solvente sob vácuo. Adicionaram-se 25 ml de NaHCO₃ 1M ao resíduo e a mistura foi extraída com 25 ml de diclorometano (3x). Os extractos combinados foram secos (MgSO₄) e concentrados sob vácuo. Após purificação cromatográfica (eluição com diclorometano/metanol 100/0 → → 98/2) e concentração sob vácuo das frações correctas, obtiveram-se 239 mg de um produto que continha 200 mg de composto 16. Este produto foi concentrado duas vezes a partir de 2,5 ml de piridina seca e depois dissolvido em 2,5 ml de diclorometano. Depois de se adicionarem 65 µl de N,N-diisopropiletilamina e 90 µl de cloreto de terc.-butilaifenilsílico, a mistura de reacção foi agitada durante 12 horas à temperatura ambiente. Apesar de terem sido adicionados 65 µl de N,N-diisopropiletilamina e 90 µl de cloreto de terc.-butilaifenilsílico, efectuou-se agitação durante mais 24 horas. Adicionaram-se então 0,5 ml de metanol e a concentração foi então efectuada sob vácuo. O resíduo foi recuperado em dietil-éter (25 ml) e lavado com KH₂PO₄ 1M (3 × 10ml) e NaHCO₃ 1M (10 ml). A camada orgânica foi seca (MgSO₄) e concentrada sob vácuo. A purificação cromatográfica (eluição com

-30-

hexano/acetato de etilo 10/0 → 7/3) deu 254 mg de composto 17;
 $R_f = 0,41$ (hexano/acetato de etilo 7/3) e $\lceil \alpha \rceil_D^{20} = -24,8^\circ$
(C = 1,0 - CHCl_3).

3. Preparação de um composto de fórmula 3 de acordo com a página das fórmulas

Preparou-se fosfato de 2-clorofenil-0-bis(1-benzotriazolil) de acordo com I.R.L. Press, Oxford, U.K. (1984) 153-183. Este composto é daqui em diante denominado composto 18.

4. Preparação de um composto de fórmula 1 de acordo com a página das fórmulas

Preparou-se de acordo com o esquema 3, um oligossacárido de acordo com o presente invento.

229 mg de composto 15 e 254 mg de composto 17 foram concentrados separadamente a partir de 2,5 ml de piridina ($3 \times$, a última vez para um volume de 1 ml). Depois adicionaram-se ao composto 17, 1,46 ml de uma solução 0,2 M de composto 18, após a qual a solução foi agitada durante 30 minutos à temperatura ambiente. Esta solução foi adicionada a uma mistura de composto 15 e 50 μl de N-metilimidazol sob condições anidrícias. Após ter sido agitada durante 2 horas à temperatura ambiente, a solução foi diluída com 50 ml de dietil-éter e lavada com bicarbonato de trietilamônio 1 M ($2 \times 25 \text{ ml}$), KH_2PO_4 1 M (25 ml) e bicarbonato de trietilamônio 1 M (25 ml). A camada orgânica foi seca (MgSO_4) e concentrada sob vácuo. A purificação cromatográfica (eluição com hexano/acetato de etilo 10/0 → 8/2) deu 368 mg de composto 19 ($n = 1$), o qual foi então tratado com HgO/HgCl_2 como descrito para a preparação do composto 15. Após separação cromatográfica (eluição com hexano/acetato de etilo 9/1 → 7/3) obteve-se o composto 20 ($n = 1$).

O composto 21 (0,22 mmole), preparado por reacção do éster de pentaclorofenil de benziloxicarbonilglicina e 3-amino-1-propanol em dioxano (temperatura ambiente, 1 hora) foi fosforilado com o composto 18 (1,1 ml de uma solução em dioxano 0,2 M).

A solução foi adicionada a uma mistura de 296 mg de compos-

-31-

to 20 ($n = 1$) e 20 μl de N-metilimidazol. Após agitação durante 2 horas à temperatura ambiente, uma solução obtida fosforilando 0,30 mmole de composto 21 com 1,5 ml de uma solução 0,2 M de composto 18 em dioxano (30 minutos), foi novamente adicionada à mistura de reacção. Após 2 horas, obteve-se o composto 22 ($n = 1$) por meio de um processo de lavagem como descrito na preparação do composto 19 ($n = 1$) e por meio de uma purificação cromatográfica (eluição com clorofórmio/acetona 100/0 → 95/5).

O composto 22 ($n = 1$) (285 mg) foi desprotegido através dos seguintes passos em sucessão:

- remoção de grupos 2-clorofenil por reacção com sínspiridina-2-carboxaldoxima e $\text{N}^1, \text{N}^1, \text{N}^3, \text{N}^3$ -tetrametilguanidina em tetra-hidrofurano durante 48 horas à temperatura ambiente;
- remoção do 1,1,3,3-tetra-isopropildisiloxano-1,3-diil e do grupo terc-butildifenilsilílico por reacção em dioxano com fluoreto de tetra-n-butilamônio durante 16 horas à temperatura ambiente;
- remoção dos grupos benziloxicarbonil, benziloximetil e benzilo, por hidrogenólise em terc.-butanol/água (24 horas) e água (24 horas), sucessivamente na presença de Pd/C a 10% (600 mg) e glicinamida.

Após remoção do catalisador por filtração, lavagem do filtrado (3 ×) com clorofórmio, evaporação do clorofórmio, liofilização, filtração em gel sobre Sephadex G-25 (eluição com bicarbonato de trietilamônio 0,01 M, pH7), liofilização das frações açúcar-positivas, o material obtido foi passado através de uma coluna Dowex 50 W × 4 (forma Na^+) em água. Após liofilização, obtiveram-se 51 mg do composto 23 sólido ($n = 2$). ^{31}P NMR:

δ 1,54 e 0,74 ^1H NMR (ref. D₂O, 4,65 ppm): δ 4,90 (s, 1H); 4,86 (s, 1H); 4,5-4,4 (m, 8 linhas, 1H); 3,21 (t, -NH-CH₂-CH₂-CH₂, espaçador); 1,71 (t, -CH₂-CH₂-CH₂, espaçador).

^{13}C NMR (cloreto de tetrametilamônio de referência externa δ 56,2): δ 167,8 (s), 107,7 (s, C-1 Ribf), 107,5 (s, C-1 Ribf), 83,5 (s, CH), 82,8 (d, CH, J_{CP} 5,8 Hz), 75,2 (s, CH), 75,1 (d,

CH, J_{CP} 3,4 Hz), 74,6 (br s, CH, J_{CP} não dissociado), 72,3 (s, 2 × CH), 71,8 (d, 2 × CH, J_{CP} 8,8 Hz), 71,4 (s, CH), 71,0 (s, 2 × CH), 6,95 (s, CH_2), 69,3 (s, CH_2), 67,5 (d, CH_2 , J_{CP} 4,4 Hz) 67,3 (d, CH_2 , J_{CP} 4,4 Hz), 64,4 (d, CH_2 , J_{CP} 5,9 Hz), 63,4 (s, CH_2), 63,2 (s, CH_2), 41,3 (s, CH_2 Gly), 37,2 (s, CH_2), 30,0 (d, CH_2 , J_{CP} 7,3 Hz).

FAB MS (espectrometria em massa de bombardeamento atómico rápido) revelou m/z 823 [Δ composto 23, n = 2, - Na] $^+$ como o sinal mais abundante na região de massa elevada.

5. Preparação do composto 23 (n = 3)

O composto 20 (n = 1) (0,46 mmole) foi adicionado a uma solução obtida fosforilando 0,56 mmole do composto 17 com 3 ml de uma solução 0,2 M do composto 18 em dioxano/piridina durante 30 minutos. Após 3 horas, obtiveram-se 0,36 mmole de composto 19 (n = 2). De forma análoga ao processo já descrito acima, foram então preparados 0,30 mmole de composto 20 (n = 2) e, partindo de 0,15 mmole de composto 20 (n = 2), obtiveram-se 478 mg de composto 22 (n = 2). A partir deste composto, 45 μ mole foram desprotegidos para o composto 23 (n = 3). Produção 22 mg; ^{31}P

^{31}P NMR: δ 1,66 e 0,85 (dcis sinais sobrepostos); 1H NMR em D_2O (ref. H_2O , δ 4,65): 4,92 (s, 2H); 4,88 (s, 1H); 4,55-4,42 (m, 2H); 3,25 (t, 2H, espaçador $-NH-CH_2-CH_2-$); 1,74 (t, 2H, espaçador $-CH_2-CH_2-CH_2-$); $\Delta\alpha_D^{20} = -30,1^\circ$ ($c = 1,0$, H_2O).

6. Preparação de imunogénios

Prepararam-se imunogénios ligando o composto 23 (n = 2) e composto 23 (n = 3) (ver esquema 3), a toxóide tetânico (TT) e à proteína da membrana externa (MP) do Haemophilus influenzae tipo b de acordo com o esquema 4.

Em primeiro lugar os oligossacáridos 23 (n = 2 e 3) foram modificados reagindo o grupo amina terminal com mercaptoacetato de N-succinimidil-S-acetilo, que produziu o composto 24 (n = 2 ou 3). Introduziram-se grupos 2-piridilditio (PDP) nas proteínas reagindo os grupos $\epsilon-NH_2$ das lisinas com 2-piridilditiopropio-

nato de N-succinimidilo (SPDP). Os compostos 24 e 25 foram adicionados num tampão (pH 6,1). O grupo S-acetilo do componente oligossacárido foi cindido adicionando hidroxilamina, sendo produzido um grupo livre -SH. O tiol 26 reage então com um grupo PDP na proteína para formar o composto 27. A extensão de incorporação do oligossacárido foi determinada por uma medição diferencial com U.V. da quantidade de 2-tiopiridona libertada ($\Delta\epsilon$ 343 = 8.000 M⁻¹).

Materiais

Soluções de toxóide tetânico (10 mg/ml) e de proteína da membrana externa do *H. Influenzae* (2,5 mg/ml em NaCl 0,14 M + 0,1% Zwittergent 3-14). Preparou-se mercaptoacetato de N-succinimidil S-acetilo de acordo com Anal. Biochem. 132 (1983) 68-73. Obteve-se SPDP a partir de Pierce Chemical Company e Zwittergent 3-14 (sulfonato de N-tetradecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propano) de Calbiochem. N-etilmorfolino e dimetilacetamida foram destilados a partir de fluorodinitrobenzeno.

Tampão A: N-etilmorfolino 2M/HCl pH 8,5;

Tampão B: bicarbonato de trietilamônio 0,01 M, pH 7,0;

Tampão C: fosfato de sódio 0,1 M + EDTA 0,005 M (di-hidrato de dissódio de tetraacetato de etilenodiamina) pH 6,1;

Tampão D: fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,8;

Coluna PD-10: coluna descartável Pharmacia Sephadex G-25 M pré-embalada (volume 9,1 ml, altura 5 cm).

Coluna G=25: 100 × 10 cm Pharmacia Sephadex G-25 (superfino)

Preparação do composto 24

19,8 mg (21,4 µmole) da forma trietilamônio do composto 23 (n = 2) foram dissolvidos em 0,21 ml de tampão A, após o que se adicionaram 25 mg de mercaptoacetato de N-succinimidil S-acetilo em 0,85 ml de dimetilacetamida. A mistura de reacção homogénea foi mantida durante 1 hora à temperatura ambiente. Depois efectuou-se acidificação adicionando ácido acético (100µl). O material de açúcar foi precipitado adicionando 5 ml de acetona. O precipitado xaroposo foi centrifugado, dissolvido num pe-

queno volume de tampão B e purificado através de uma coluna G-25 usando este tampão como eluente. As fracções contendo açúcar foram combinadas e liofilizadas. O produto obtido foi liofilizado mais duas vezes a partir de água e depois dissolvido em 0,50 ml de tampão C. O produto continha 11,5 μ mole de composto 24 ($n = 2$).

11 mg de composto 23 ($n = 3$) foram convertidos em composto 24 ($n = 3$) de forma idêntica. O produto continha 4,2 μ mole de composto 24 ($n = 3$)

Preparação do composto 25

Uma coluna PD-10 foi equilibrada com 25 ml de tampão D. Depois foram introduzidos 1,50 ml (15 mg, aproximadamente 100 nmole, peso molecular aproximadamente de 150.000) de uma solução TT e eluída com tampão D. Adicionaram-se 4,5 mg de SPDP em 0,45 ml de etanol à solução de TT em tampão D (volume de eluição 2,5-6,0 ml) assim obtido. Após reagir durante 1 hora à temperatura ambiente, a mistura de reacção foi introduzida na coluna G-25 e eluída com tampão C. As fracções contendo proteína foram combinadas e diluídas para 20 ml (concentração de proteína de cerca de 5 nmole/ml) com tampão C no qual uma pitada de azida de sódio tinha sido dissolvida. 3,0 ml desta solução foram tratados sob hélio com 1,0 μ mole de ditiotreitol. Após deixar repousar durante 24 horas à temperatura ambiente, $\Delta\varepsilon_{343}$ era = = 1,648 (referência: PEP-TT não tratado). Como $\Delta\varepsilon_{\text{M}} = 8.000$, o conteúdo em 2-tiopiridona é de 206 nmole/ml. A incorporação foi de 41 PEP/TT.

15 mg de TT foram tratados com 1,0 μ mole de SPDP de forma idêntica. A fracção G-25 foi diluída para 15 ml. Incorporação 4,5 PDP/TT.

De forma análoga, 3,75 mg (aprox. 95 nmole, peso molecular de aprox. 40.000) de MP foram transferidos duas vezes para 3,5ml de tampão D. A proteína foi tratada respectivamente com 14,4 e 0,4 μ mole de SPDP.

Após filtração em gel através de G-25, a fracção proteica foi diluída para 15 ml (concentração proteica de aprox. 5,25nmole/

/ml). Como o MP é muito hidrofóbico, adicionou-se neste caso 0,1% de Zwittergent 3-14 aos tampões C e D. Incorporação: aprox 4,9 e aprx. 1,3 de PDP/MP.

Preparação do composto 27

43 μ l (1,0 μ mole) da solução obtida anteriormente do composto 24 ($n = 2$) em tampão C foram adicionados a 3,0 ml (1 mg/ml) de 4,5 PDP/TT, 4,5 ml (0,75 mg/ml) de 41 PDP/TT, 4,5 ml (0,25 mg/ml) de 1,3 PDP/MP e 4,5 ml de PDP/MP (fracção G-25 em tampão C, ver acima). As soluções foram desarejadas com hélio. Depois 10 μ l de hidroxilamina 0,2 M pH 6,5, foram adicionados. Após reacção de um dia para o outro à temperatura ambiente, determinou-se a quantidade de 2-tiopiridona formada. A quantidade esperada de tiopiridona foi dividida das proteínas 4,5 PDP/TT, 1,3 PDP/MP e 4,9 PDP/MP e formou-se portanto uma quantidade correspondente de composto 27. Cerca de 20 moléculas de composto 26 foram ligadas ao 41 PDP/TT. Depois de se adicionar uma quantidade adicional de composto 24 ($n = 2$), o grau de incorporação de sacarídeo manteve-se inalterado. A um conjugado análogo que, após um tempo de reacção mais curto, continha 17 moléculas de dímero, adicionou-se 1, μ mole de cisteína. A quantidade total de tiopiridona esperada foi então rapidamente formada.

O composto 24 ($n = 3$) foi usado de forma análoga para a preparação de conjugados trímero-proteína de acordo com o composto 27.

Em resumo foram feitos os seguintes conjugados:

1,3 e 4,9 dímero e trímero/MP

4,5 dímero e trímero/TT

20 dímero/TT (sem grupos PDP residuais 21)

17 dímero/TT (Sem grupos PDP residuais como resultado de pós-tratamento com cisteína)

13 trímero/TT (28 grupos PDP residuais)

A antigenicidade destes conjugados foi medida e comparada com a de polissacáridos nativos de Hib (Sal-Ca), vacina polissacárida humana e o antigénio homólogo (= polissacárido/MP) a qual produz os anticorpos de rato. As substâncias a serem tes-

tadas foram misturadas numa série de diluições duplas com uma quantidade fixa de anti-soro. Após incubação durante 1 hora à temperatura ambiente, o título de anticorpos livres residuais foi determinado num teste de inibição ELISA directo.

Os resultados são os seguintes:

| Conjugado | Concentração (μ g/ml) | % de inibição |
|---|-------------------------------|---------------|
| 1,3 dímero/MP | 10 | 45 |
| 1,3 trímero/MP | 10 | 86 |
| 4,9 dímero/MP | 10 | 49 |
| 4,9 trímero/MP | 10 | 81 |
| 4,5 dímero/TT | 10 | 21 |
| 4,5 trímero/TT | 10 | 56 |
| 20 dímero/TT | 10 | 19 |
| 17 dímero/TT | 10 | 20 |
| 13 trímero/TT | 10 | 53 |
| polissacárido nativo (Ca-Sal) | 10 | 91 |
| vacina de polissacárido humano | 10 | 90 |
| antigénio homólogo (polissacárido tiraminado) | 10 | 12 |

Como se torna evidente, os conjugados dímero apresentam uma ligação considerável aos anticorpos, embora tal ligação seja marcadamente inferior à do polissacárido nativo. A capacidade do polissacárido nativo para se ligar aos anticorpos pode ser quase igualada pelos conjugados trimeros.

7. Preparação da vacina

Um trímero-oligossacárido (composto 23, n = 3) foi ligado a toxóide tetânico com glutaraldeído misturando um excesso de 10-100 vezes (numa base molar) do trímero com toxóide tetânico e adicionando 3 x dialdeído glutárico em excesso em relação ao ligante a intervalos de 1 hora. Após deixar repousar a mistura



de reacção durante 5 horas à temperatura ambiente, usou-se 20 vezes glicina em excesso (em relação ao ligante). Após 1 hora à temperatura ambiente adicionou-se NaCNBH₃. Após 5 horas à temperatura ambiente a mistura de reacção foi dialisada. Partindo de 2,4 mmoles de trímero, obtiveram-se 120 µmoles de conjugado, sendo 3 trímeros incorporados por cada toxóide tetânico (3 trímeros/TT), sendo a razão de peso trímero/TT de 0,1:3.

Injectaram-se ratos com um conjugado de polissacárido de Haemophilus influenzae tipo b e proteína da membrana externa de Haemophilus influenzae tipo b ligado por meio de adipina-di-hidrazida (PS-MP). A razão de peso de proteína e polissacárido no conjugado era de 1 : 1. A dose por injeção foi de 5 µg de conjugado. A injeção foi repetida 3 e 5 semanas após a primeira injeção. Após 6 semanas determinou-se o título de IgG e foi ajustado para 100.

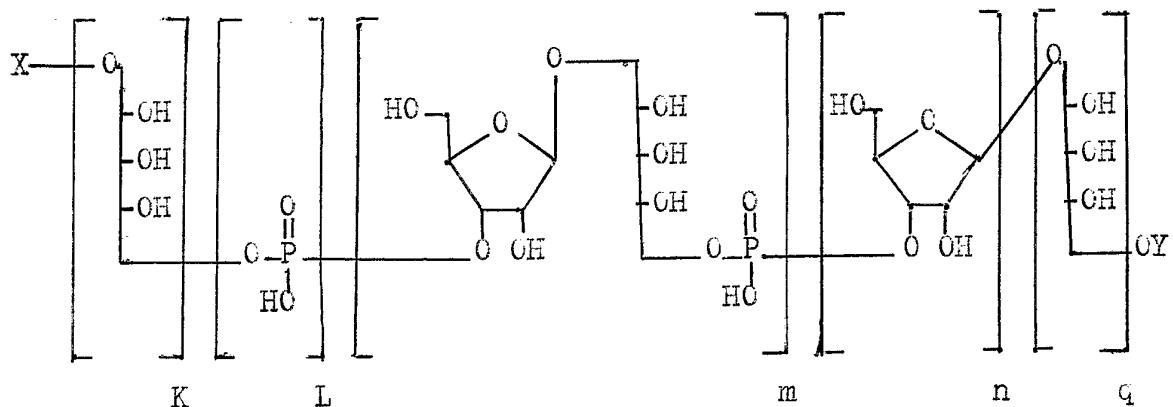
Outros ratos foram injectados com 3,12 µg do conjugado 3-trímero/TT. Após 4 semanas esta injeção foi repetida e após 6 semanas foi determinado o título de IgG, o qual era de 36 em relação ao título de PS-MP ajustado para 100.

A forte imunogenicidade do conjugado 3 trímero/TT pode ser evidente a partir do facto de que aproximadamente 1/3 do título de IgG obtido injectando 7,5 µg de polissacárido ter sido conseguido só com 0,25 µg de oligossacárido. Com 1/30 do peso, obteve-se 1/3 do efeito. Em adição, a injeção com o trímero foi repetida somente uma vez enquanto que a com o polissacárido foi repetida duas vezes.

- REIVINDICAÇÕES -

1ª. - Processo para a preparação de um oligossacarídeo caracterizado por se substituirem os grupos protectores de um oligossacarídeo por um átomo de hidrogénio compreendendo o referido oligossacarídeo a estrutura $(D\text{-ribose-D\text{-ribitol-fosfato})}_m$, $(D\text{-ribitol-fosfato-D\text{-ribose})}_m$ ou $(fosfato-D\text{-ribose-D\text{-ribitol})}_m$, onde $m = 2,3,4\dots 19$ ou 20 e no qual o átomo de hidrogénio nos grupos hidroxilo livres foi substituído por um grupo protector.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto do oligossacarídeo ter a seguinte fórmula:



na qual

$K = 0$ cu $l = 1$,

$K = 0$ se $L = 0$,

$L = 0$ ou 1 ,

$m = 2,3 \dots 19$ ou 20 com a condição de que m possa ser 1 se K ,

$L = n = 1$ ou se $L = 0$, $n = q = 1$,

$n = 0$ cu $l = 1$,

$q = 0$ cu $l = 1$ se $n = 1$,

$q = 0$ se $n = 0$,

$X =$ hidrogénio, um grupo reactivo que é capaz, directa ou indirectamente, de formar uma ligação com um transportador, ou um grupo contendo uma cadeia hidrofóbica na extremidade não ligada, ou o grupo terminal $XO-$ é substituído pelo grupo reactivo H_2N- ou $HS-$, e

$Y =$ hidrogénio, um grupo reactivo que é capaz directa ou indi-



-39-

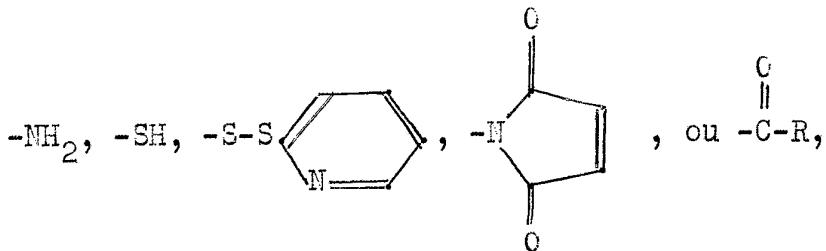
rectamente, de formar uma ligação com um transportador, cu um grupo contendo uma cadeia hidrofóbica na extremidade não ligada ou o grupo terminal -CY é substituído pelo grupo reactivo -NH₂ ou -SH, com a condição de que Y = hidrogénio se X ≠ de hidrogénio e de que X = hidrogénio se Y ≠ hidrogénio, e dos seus sais.

3^a. - Processo de acordo com a reivindicação 1-2, caracterizado pelo facto de m = 2,3,4,5 ou 6.

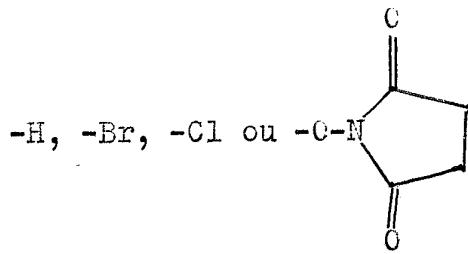
4^a. - Processo, de acordo com a reivindicação 1-3, caracterizado pelo facto de X = hidrogénio e Y ≠ de hidrogénio.

5^a. - Processo, de acordo com as reivindicações 1-3, caracterizado pelo facto de Y = hidrogénio e X ≠ de hidrogénio.

6^a. - Processo, de acordo com as reivindicações 1-5, caracterizado pelo facto do grupo reactivo ser um grupo que contém uma das seguintes funções reactivas:



na qual R = -OH, -N₃, -O-alquilo (C₁₋₁₂), -OC₆F₅,



7^a. - Processo, de acordo com as reivindicações 1-5, caracterizado pelo facto de X ou Y ser um grupo com um grupo alquilo contendo 12-24 átomos de carbono na extremidade não ligada.

8^a. - Processo, de acordo com as reivindicações 1-7, caracterizado pelo facto do oligossacarídeo ser puro.

9^a. - Processo de preparação de um imunogénio caracterizado por se associar um oligossacarídeo preparado de acordo com as

-40-

reivindicações anteriores, com um transportador, ou por se formar/^{uma} associação de várias moléculas de um oligossacarídeo preparado de acordo com as reivindicações anteriores.

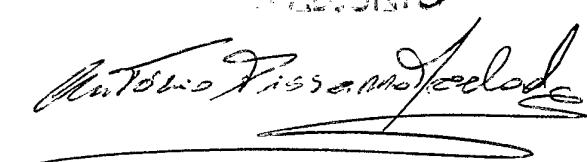
10^a. - Processo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo facto do transportador ser uma proteína.

11^a. - Processo, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo facto da proteína ser a proteína de superfície do Haemophilus influenzae tipo b.

12^a. - Processo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo facto do transportador ser uma micela, uma vesícula ou um lipossoma.

13^a. - Processo de preparação de uma vacina caracterizado pelo facto de se fazer uma solução, emulsão ou suspensão aquosas do imunogénio preparado de acordo com as reivindicações 9-12 e facultativamente se adicionar adjuvantes, estabilizantes, ou tampões, adequados, e outros imunogénios.

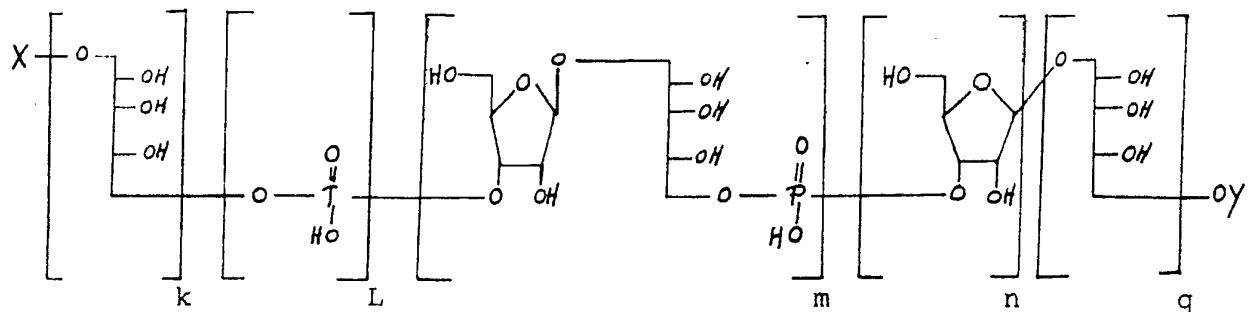
30. XII. 1987
Lisboa, Por STAAT DER NEDERLANDEN representado pelo DEPUTY
DIRECTOR-GENERAL do RIVM de BILTHOVEN
QX - O AGENTE OFICIAL -


Antonio Pissando Melo

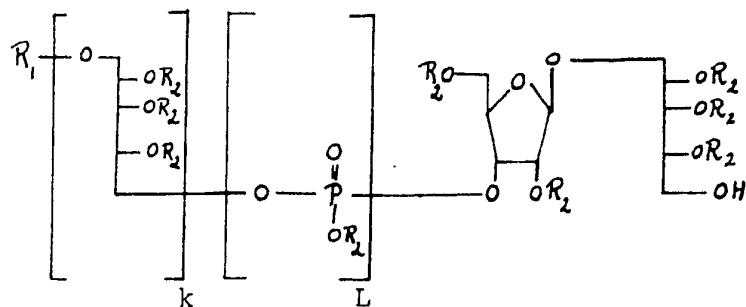


PÁGINA DE FÓRMULAS

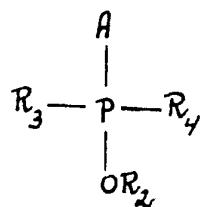
Formula 1:



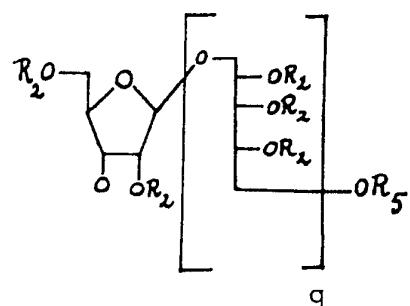
Formula 2:



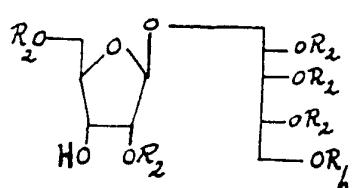
Formula 3:



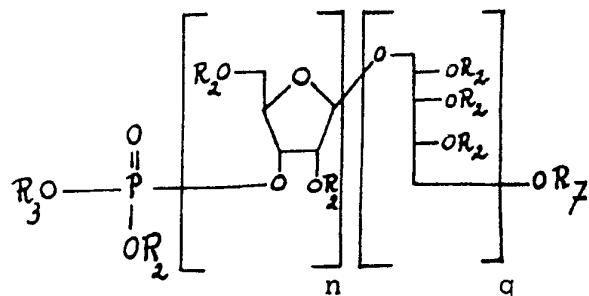
Formula 4:



Formula 5:

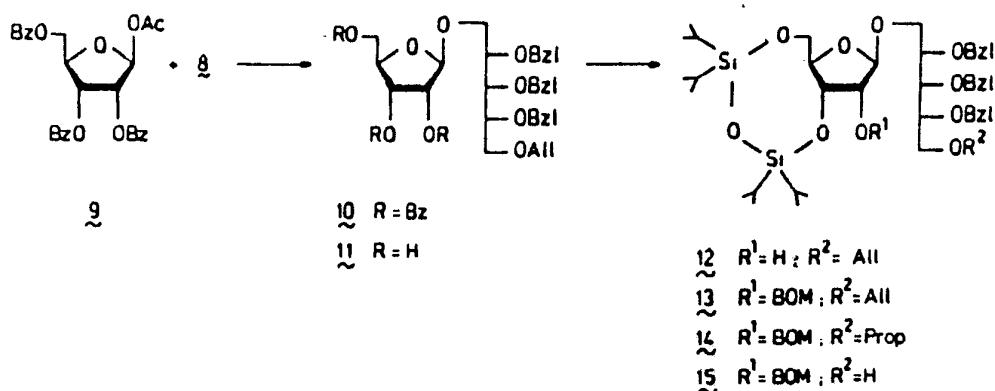
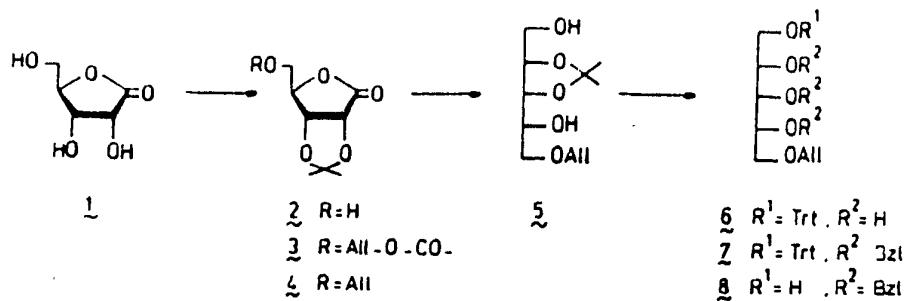
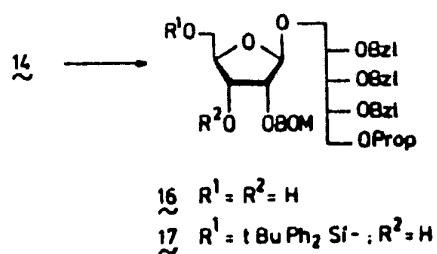


Formula 6:



DE STAAT DER NEDERLANDEN Representante pelo DEPUTY DIRECTOR -
GENERAL do RIVM de BILTHOVEN

2/4

ESQUEMA 1:ESQUEMA 2:

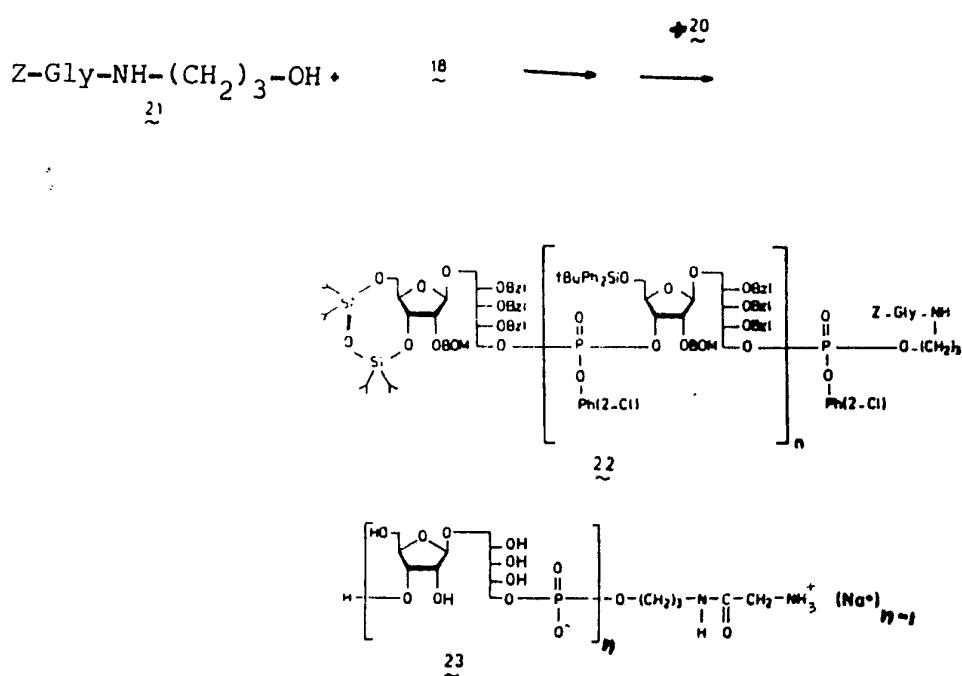
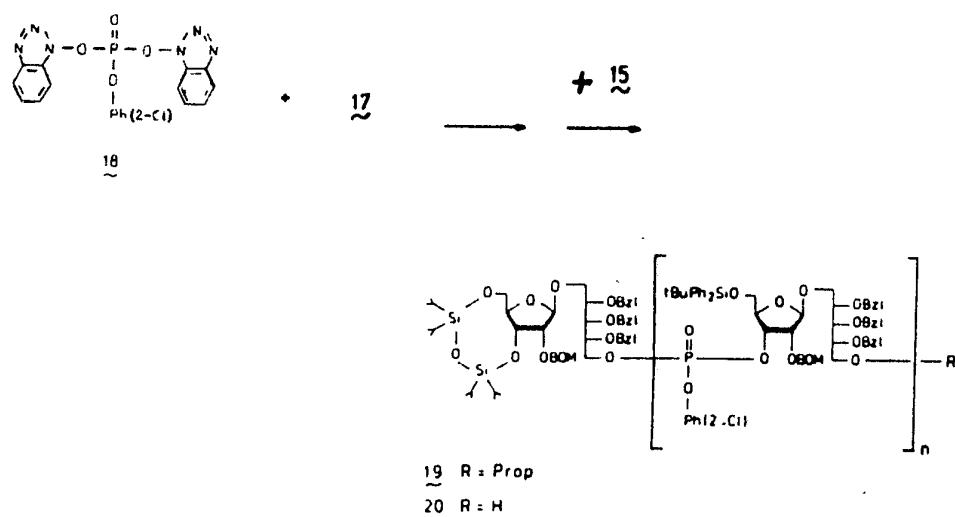
All = alilo; Trt = trifenilmetilo; Bzl = benzilo; Bz = benzoilo; Ac = acetilo; BOM = benziloximetilo; Prop = propeno-1-ilo; tBuPh₂Si- = t-butildifenilsililo.

DE STAAT DER NEDERLANDEN Representado pelo DEPUTY DIRECTOR-
GENERAL do RIVM de BILTHOVEN

3/4



ESQUEMA 3

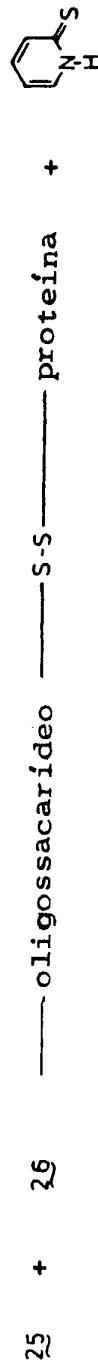
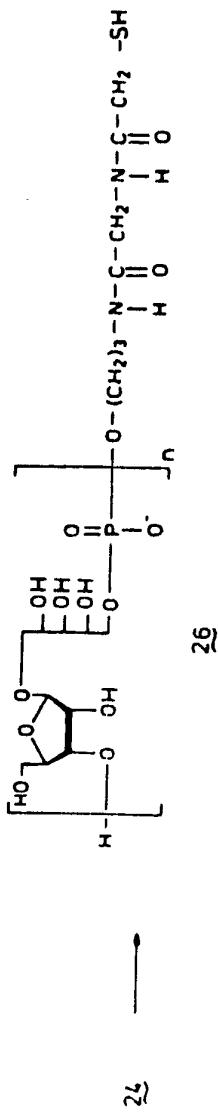
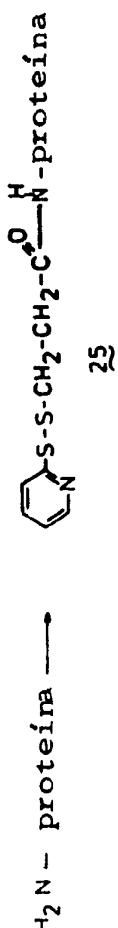
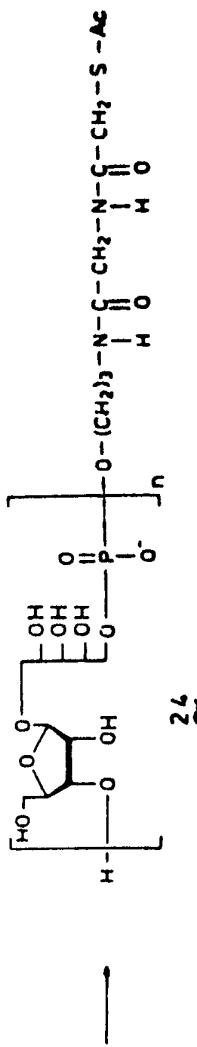


Ph(2-Cl) = 2-clorofenilo; Z = benziloxicarbonilo; Gly = glicina
 e as outras abreviaturas têm o mesmo significado que nos Esquemas 1 e 2.

DE STAAT DER NEDERLANDEN Representado pelo DEPUTY DIRECTOR-
 -GENERAL do RIVM de BILTHOVEN

14

ESQUEMA 4: (Ac = acetilo)



DE STAAT DER NEDERLANDEN representado pelo DEPUTY DIRECTOR-
- GENERAL do RIVM de BILTHOVEN