

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6784841号
(P6784841)

(45) 発行日 令和2年11月11日(2020.11.11)

(24) 登録日 令和2年10月27日(2020.10.27)

(51) Int. Cl.	F 1
C07H 15/04 (2006.01)	C07H 15/04 C S P D
A61K 31/7004 (2006.01)	A61K 31/7004
A61P 31/04 (2006.01)	A61P 31/04
A61P 25/00 (2006.01)	A61P 25/00
A61P 11/00 (2006.01)	A61P 11/00

請求項の数 16 (全 163 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-526376 (P2019-526376)
(86) (22) 出願日	平成29年7月28日 (2017.7.28)
(65) 公表番号	特表2019-527243 (P2019-527243A)
(43) 公表日	令和1年9月26日 (2019.9.26)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2017/069254
(87) 國際公開番号	W02018/020046
(87) 國際公開日	平成30年2月1日 (2018.2.1)
審査請求日	令和1年6月25日 (2019.6.25)
(31) 優先権主張番号	16181659.0
(32) 優先日	平成28年7月28日 (2016.7.28)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁 (EP)
(31) 優先権主張番号	PCT/EP2017/062725
(32) 優先日	平成29年5月26日 (2017.5.26)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者	501497655 マックス プランク ゲゼルシャフト ツ ゥアー フェデルウン デル ヴィッセン シャフテン エー フォー ドイツ連邦共和国 80539 ミュンヘン 、 ホフガーテンシュトラーゼ 8
(74) 代理人	110000578 名古屋国際特許業務法人
(72) 発明者	ゼーベルガー ペーター ハー。 ドイツ連邦共和国 14532 クライン マハナー ルドルフーブライトシャイトー シュトラーゼ 46
(72) 発明者	ペレイラ クラニー レベブ ドイツ連邦共和国 12203 ベルリン ホルテンジーンシュトラーゼ 66
	最終頁に続く

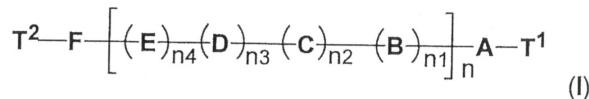
(54) 【発明の名称】ヘモフィルス属インフルエンザ菌b型に対するワクチンとしての安定した加水分解耐性合成ポリリボシリリビトールホスフェート誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 (I) の糖類

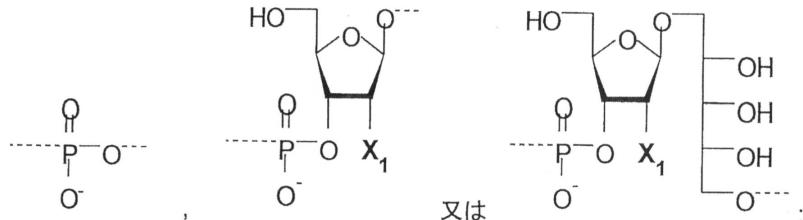
【化 1】



式中

A は

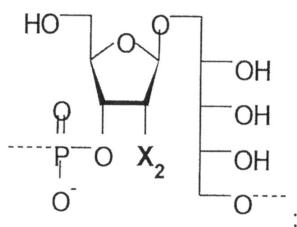
【化 2】



であり；

B は

【化 3】

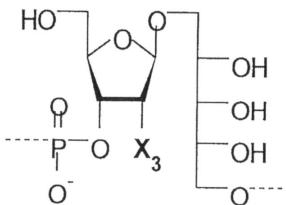


10

であり；

C は

【化 4】

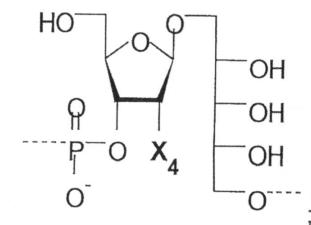


20

であり；

D は

【化 5】

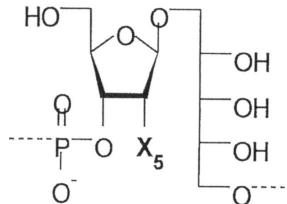


30

であり；

E は

【化 6】

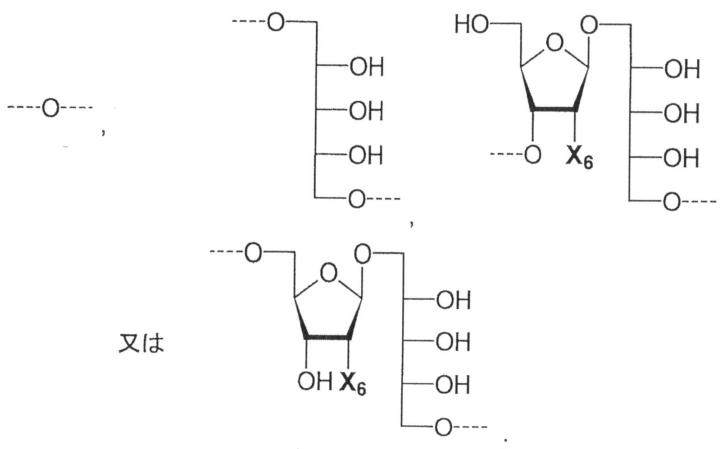


40

であり；

F は

【化7】



10

であり、

T^1 及び T^2 は $-H$ 、 $-L-NH_2$ を表し、 T^1 が $-L-NH_2$ の場合、 T^2 は $-H$ であ
り、 T^1 が $-H$ の場合、 T^2 は $-L-NH_2$ であり、

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、及び X_6 は、互いに独立して、 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-F$ 、
 $-CH_3$ 、 $-C_2H_5$ 、 $-CN$ 、 $-OCH_3$ 、 $-OC_2H_5$ 、 $-OCH(CH_3)_2$ 、 $-OCH_2F$ 、
 $-OCF_3$ 、 $-OCO-N(CH_3)_2$ 、 $-O-C_2H_4-O-CH_3$ 、 $-O-C_2H_2-CF_3$ を表し、

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、及び X_6 のうちの 1 つだけが存在する場合には、前記
 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、又は X_6 は $-OH$ ではなく、

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、及び X_6 のうちの 2 つ以上が存在する場合には、前記
 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、及び X_6 の少なくとも 2 つは $-OH$ ではなく、

n は 1、2、3 又は 4 から選択される整数であり、

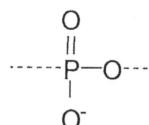
n_1 、 n_2 、 n_3 及び n_4 は互いに独立して 0 及び 1 から選択され、

$n_1 + n_2 + n_3 + n_4 = 1$ である、

ただし、 $\frac{(i)}{i} n_1 + n_2 + n_3 + n_4 = 1$ の場合、 $\frac{(ii)}{ii} n = 1$ の場合、及び $\frac{(iii)}{iii}$

A が

【化8】

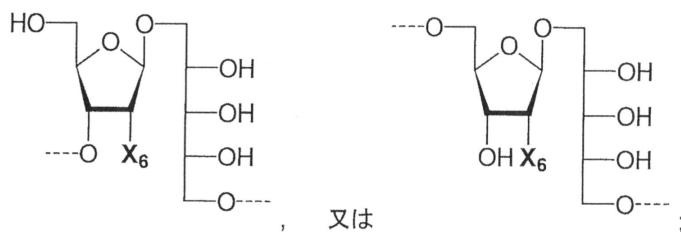


である場合の (i) 、 (ii) 及び (iii) の 3 条件を具備するときには、

40

F は

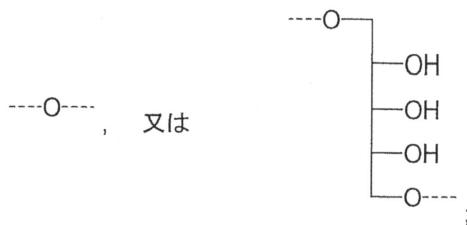
【化9】



50

であり、また、

ただし、(i)_{n1} + (i)_{n2} + (i)_{n3} + (i)_{n4} = 1 の場合、(i i)_n = 1 の場合、及び
(i i i)_F が
【化 10】

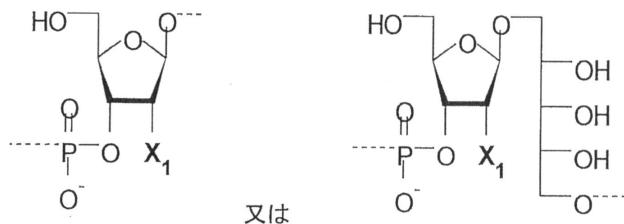


10

である場合の(i)、(i i)及び(i i i)の3条件を具備するときには、

A は

【化 11】



20

であり、また、

L はリンカーであり、L は、-L^a-、-L^a-L^e-、-L^a-L^b-L^e-、-L^a-L^d-L^e-から選択され、

式中、-L^a-は、-(CH₂)_o-、-(CH₂-CH₂-O)-、-C₂H₄-、-(CH₂-CH₂-O)-CH₂-から選択され、

-L^b-は-O-又は-O-P(O)(OH)-O-を表し、

-L^d-は-(CH₂)_q-、-(CF₂)_q-、-(CH₂-CH₂-O)_q-C₂H₄-、及び-(CH₂-CH₂-O)_q-CH₂-から選択され、

-L^e-は-(CH₂)_{p1}-、-(CF₂)_{p1}-、-C₂H₄-(O-CH₂-CH₂)_{p1}-、-CH₂-(O-CH₂-CH₂)_{p1}-及び-(CH₂)_{p1}-O-(CH₂)_{p2}-から選択され、

o、q、p₁及びp₂は、互いに独立して、1、2、3、4、5、及び6から選択される整数である。

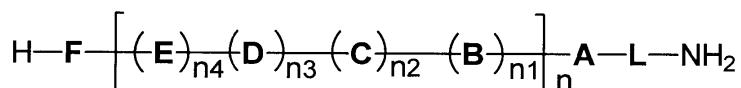
前記糖類、その糖類のエナンチオマー、ジアステレオマー、エナンチオマーの混合物、ジアステレオマーの混合物、アノマー、水和物、溶媒和物、及びそれらの薬学的に許容される塩。

【請求項 2】

40

前記糖類は、式 (II-1) で表され、

【化 12】

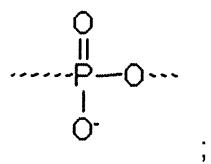


(II-1)

式中

A は

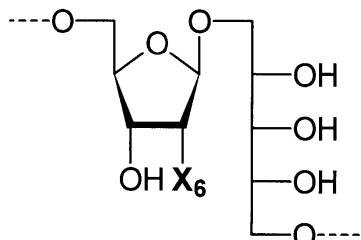
【化13】



であり；

Fは

【化14】



10

であり、

B、C、D、E、L、n1、n2、n3及びn4は請求項1に定義された意味を有し、
nは1又は2であり、

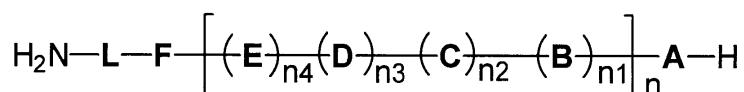
X₂ - X₆は、-H、-F、又は-OCH₃である、
請求項1に記載の糖類。

20

【請求項3】

前記糖類は、式(II-2)で表され、

【化15】



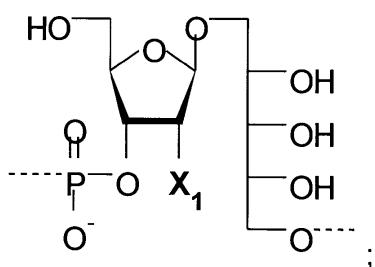
(II-2)

式中

30

Aは

【化16】

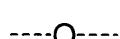


40

であり；

Fは

【化17】



であり、B、C、D、E、L、n1、n2、n3及びn4は請求項1に定義された意味を有し、

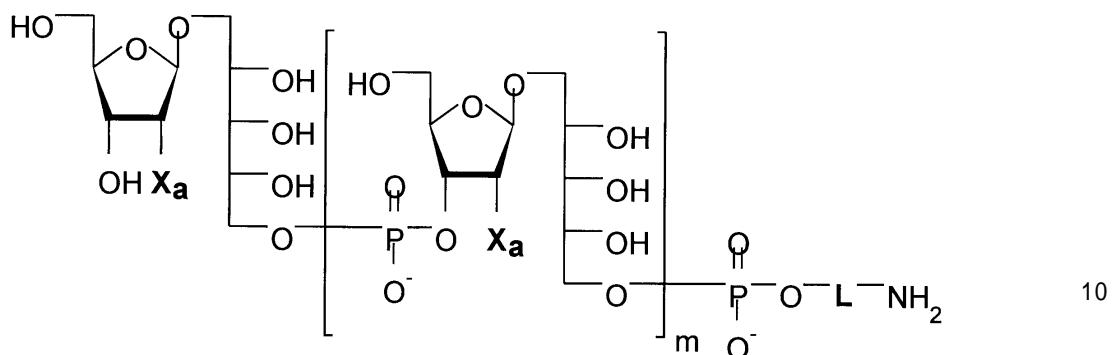
nは1又は2であり、

X₁ - X₅は、-H、-F、又は-OCH₃である、請求項1に記載の糖類。

【請求項4】

50

前記糖類は、式（III-1）で表され、
【化18】



(III-1)

式中

L は請求項 1 に定義の通りの意味を有し、

m は 1 ~ 9 から選択される整数であり、

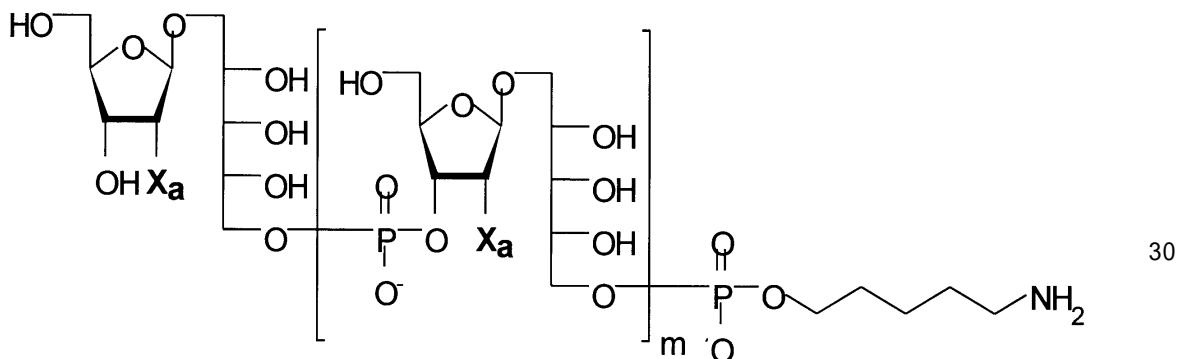
Xaは、-H、-F、又は-OCH₃である、請求項1に記載の糖類。

20

【請求項5】

前記糖類は式 (IV-1) で表され、

【化 1 9】



(IV-1)

式中

m は 1 ~ 9 から選択される整数であり、

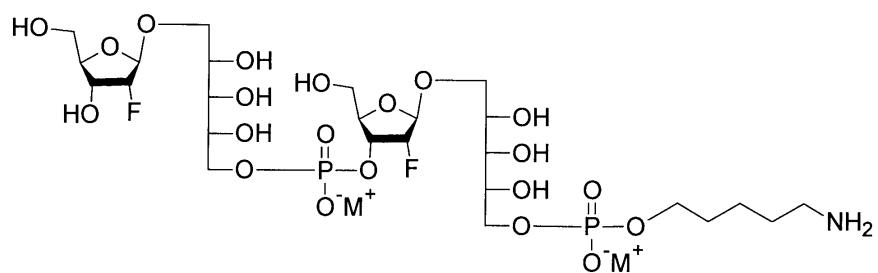
X a は、 - H、 - F、又は - OCH₃ である、請求項 1 に記載の糖類。

【請求項 6】

40

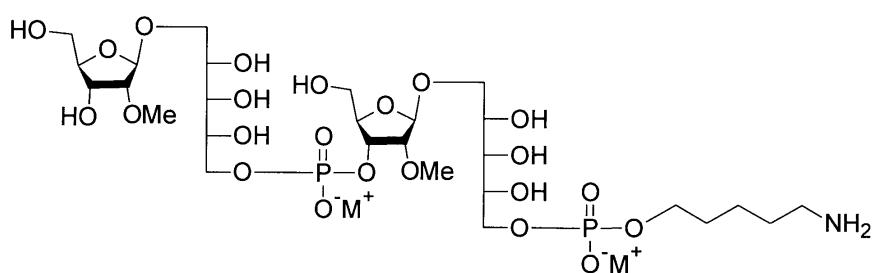
以下からなる群から選択される、請求項 1 に記載の糖類：

【化 2 0】



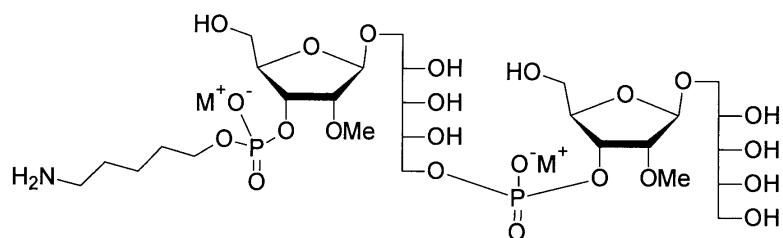
(2a),

10



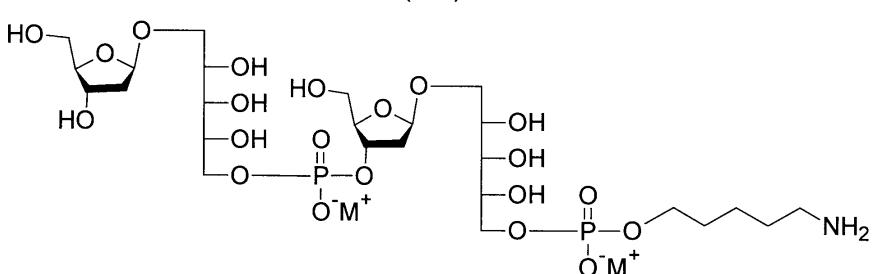
(2b),

20

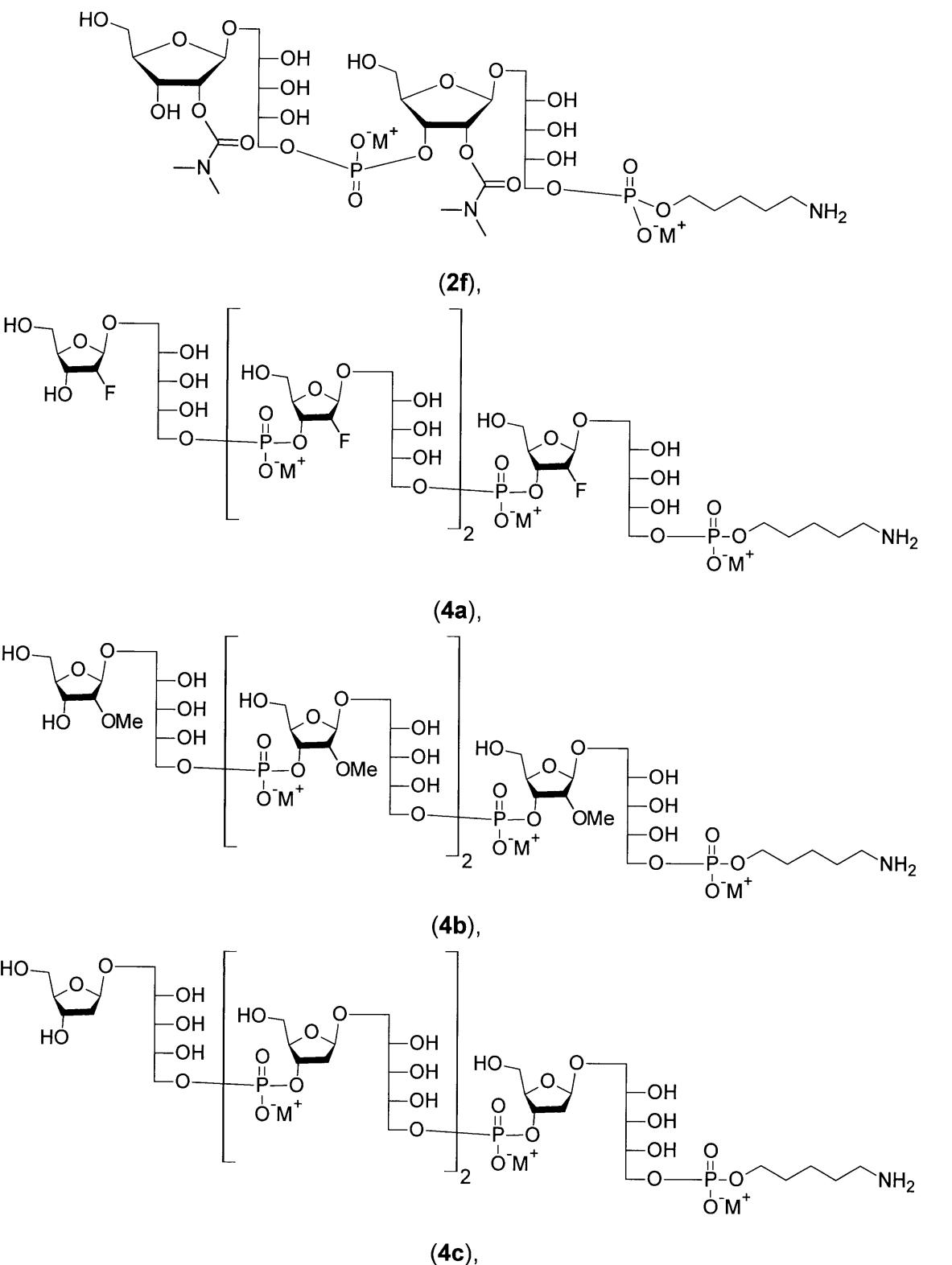


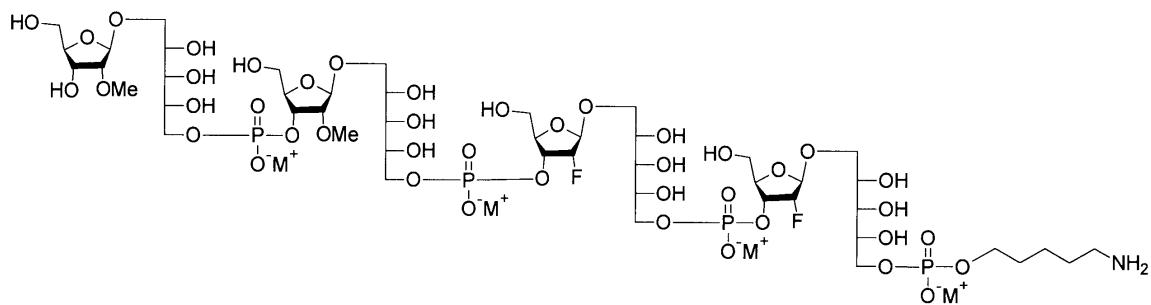
(2b'),

30



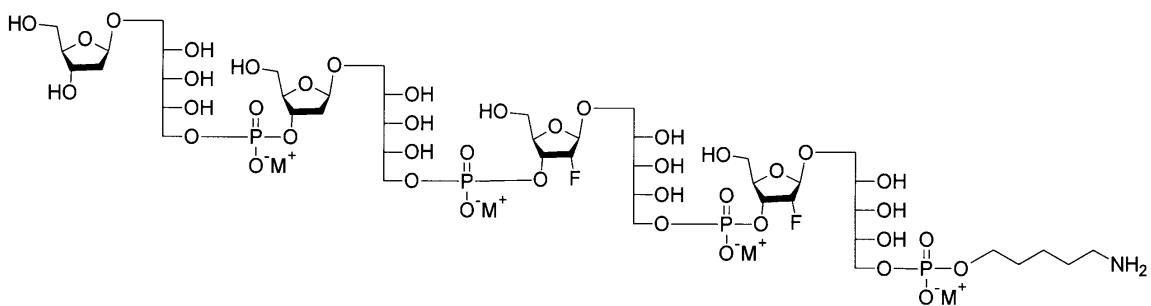
(2c),





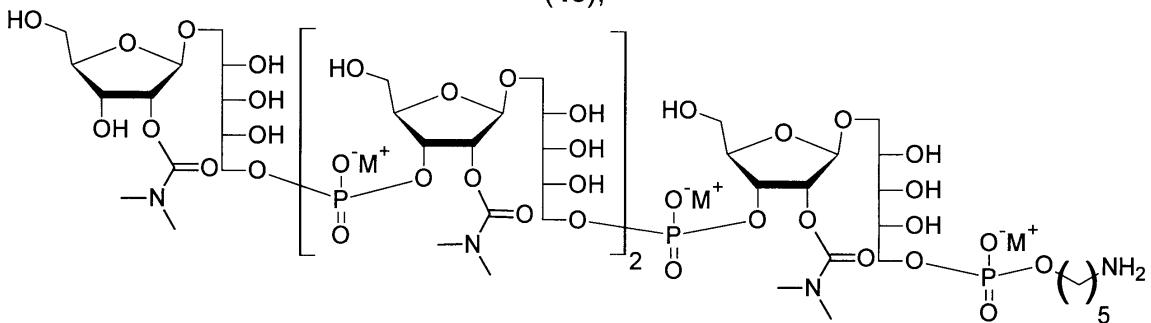
(4d),

10



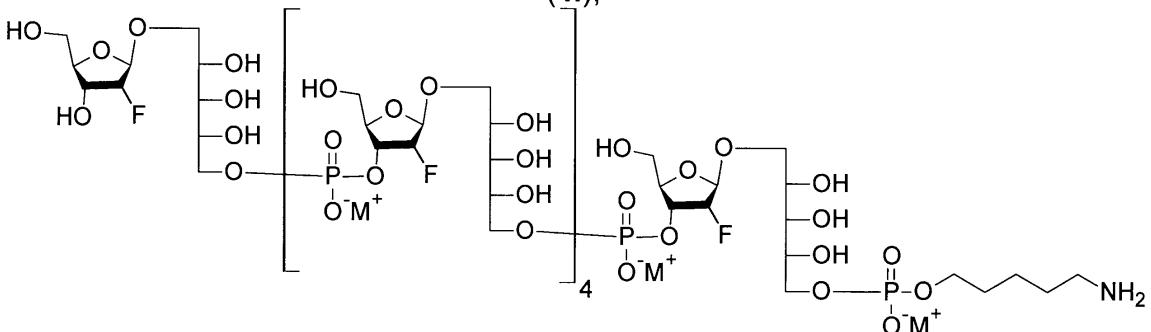
(4e),

20

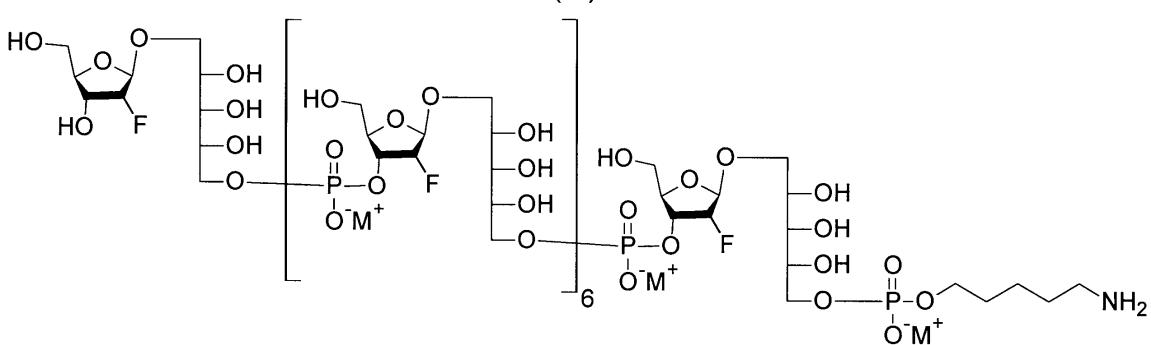
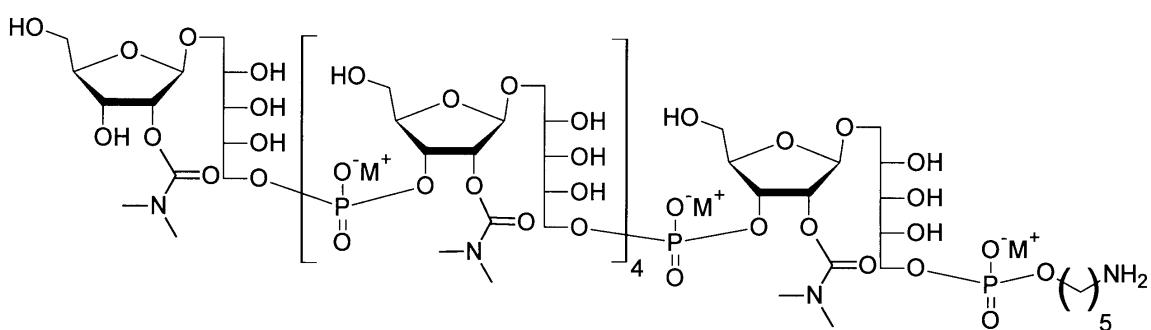
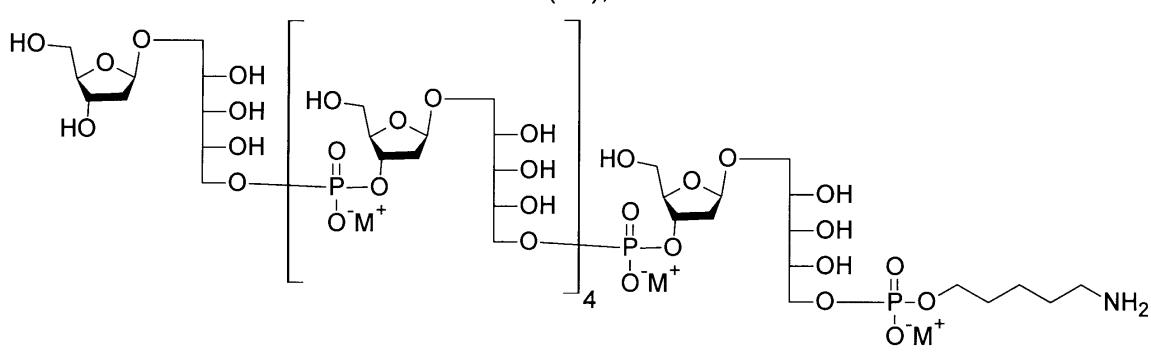
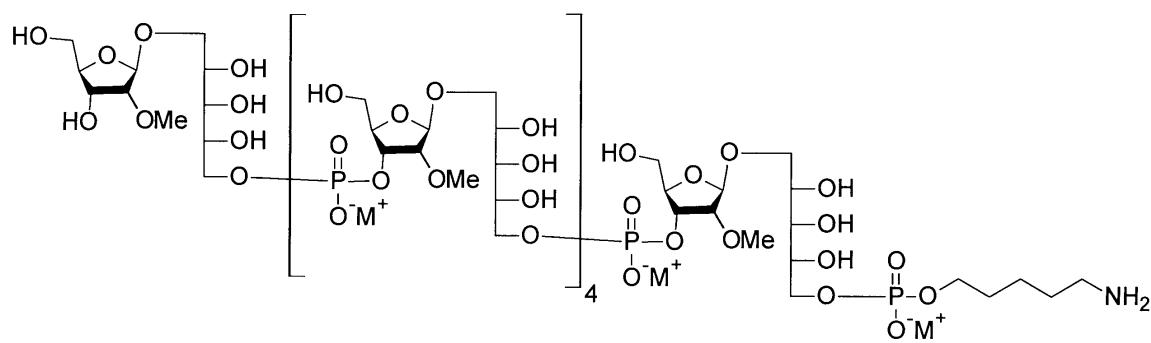


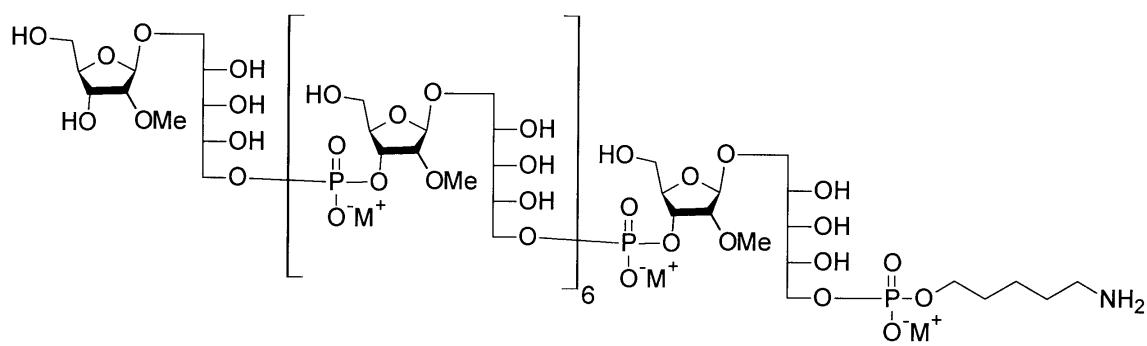
(4f),

30



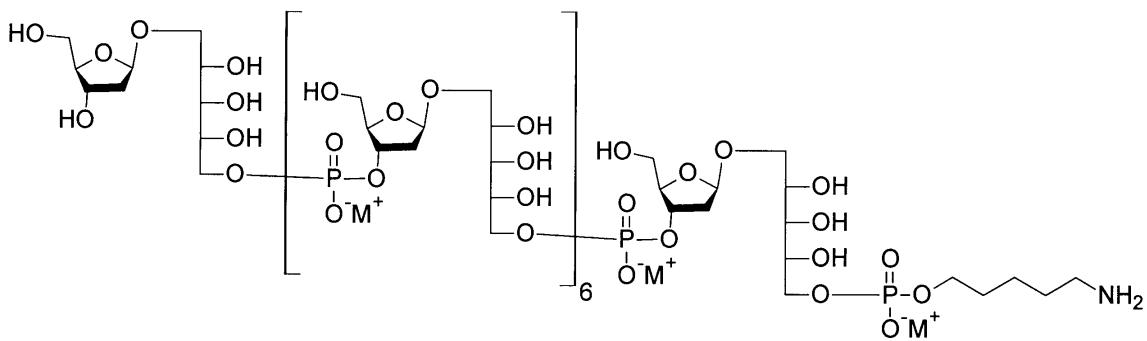
(6a),





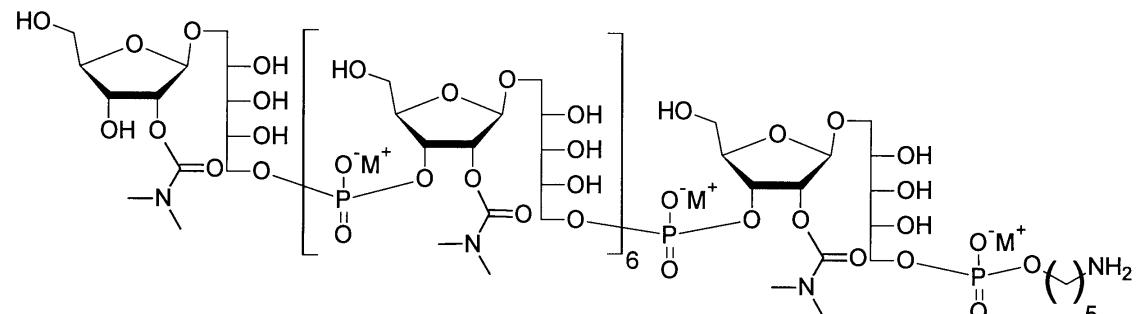
10

(8b),



20

(8c), 及び



30

(8f).

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の一般式 (I) の糖類と、前記多糖類と - O - L - NH₂ 基の窒素原子を介してコンジュゲートしている免疫原性担体とを有するコンジュゲート。

【請求項 8】

医薬における医薬活性剤として使用するための、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の糖類。

【請求項 9】

ヒト及び / 又は動物の宿主において防御免疫応答を惹起するのに使用するための、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の糖類。

【請求項 10】

ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型に関連する疾患の予防及び / 又は治療に使用するための、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の糖類。

【請求項 11】

前記ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型に関連する疾患が、髄膜炎、肺炎、及び喉頭蓋炎 (epiglottitis) から選択される、請求項 10 に記載の糖類。

【請求項 12】

少なくとも 1 つの薬学的に許容されるアジュバント、担体、凍結防止剤、凍結保護剤、

40

50

賦形剤及び／又は希釈剤と共に、請求項1～11のいずれかに記載の糖類を含むワクチン組成物。

【請求項13】

ヘモフィルス属インフルエンザ菌b型に関連する疾患に対する免疫化における使用のための、請求項12に記載のワクチン組成物。

【請求項14】

ジフテリア抗原、破傷風抗原、百日咳抗原、B型肝炎抗原、不活化ポリオワクチン及び不活化ロタウイルスワクチンのうちの少なくとも1つをさらに含む、請求項12又は13に記載のワクチン組成物。

【請求項15】

ヘモフィルス属インフルエンザ菌B型によって引き起こされる疾患の診断のための免疫学的アッセイにおけるマーカーとして使用するための、請求項1～6のいずれか一項に記載の糖類。

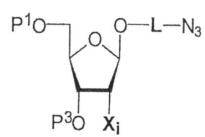
【請求項16】

式(I)の糖類を合成するための中間化合物であって、前記中間化合物は、

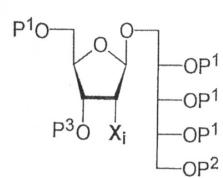
A1^{*}-2、A1^{*}-3、A1^{*}-4、A1^{*}-5、A1^{*}-5'、A1^{*}-5''、A1^{*}-6、A1^{*}-7、A1^{*}-8、B1^{*}-1、B1^{*}-2、B1^{*}-3、B1^{*}-4、B1^{*}-5、B1^{*}-6、C1^{*}-2、C1^{*}-3、C1^{*}-3'、C1^{*}-3''、A2^{*}-1、A2^{*}-2、A2^{*}-3、A2^{*}-4、B2^{*}-1、B2^{*}-2、B2^{*}-3、B2^{*}-4、C2^{*}-1、C2^{*}-2、C2^{*}-3、C2^{*}-4、A2^{*}-1'、A2^{*}-2'、A2^{*}-3'、A2^{*}-4'、B2^{*}-1'、B2^{*}-2'、B2^{*}-3'、B2^{*}-4'、C2^{*}-1'、C2^{*}-2'、C2^{*}-3'及びC2^{*}-4'からなる群から選択され、

【化 2 1】

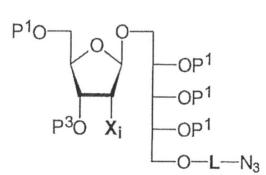
A1*-2



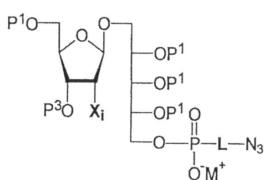
A1*-3



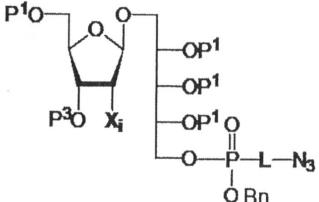
A1*-4



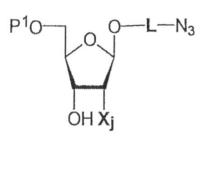
A1*-5



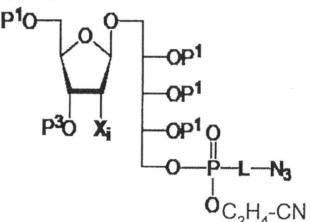
A1*-5'



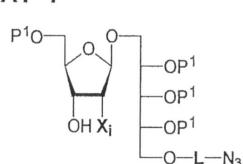
A1*-6



A1*-5"

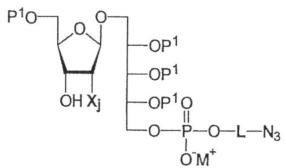


A1*-7

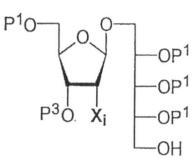


10

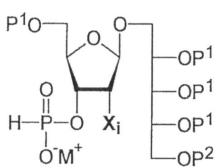
A1*-8



B1*-1

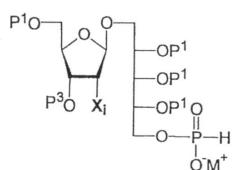


B1*-2

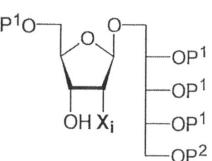


20

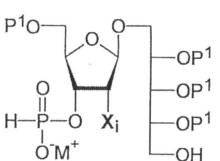
B1*-3



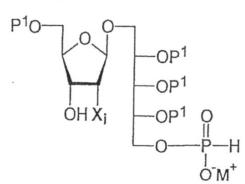
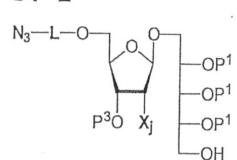
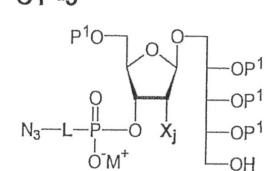
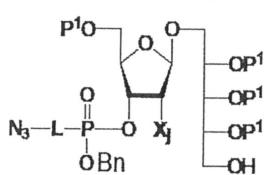
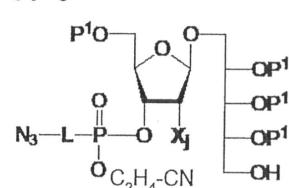
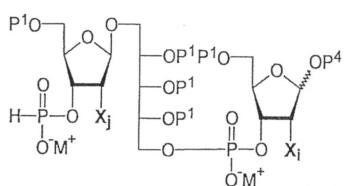
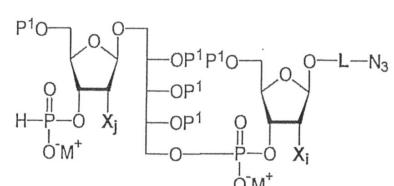
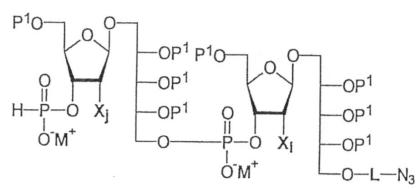
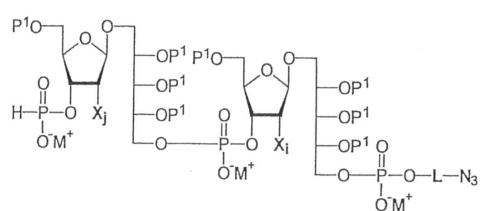
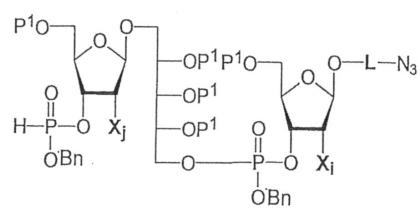
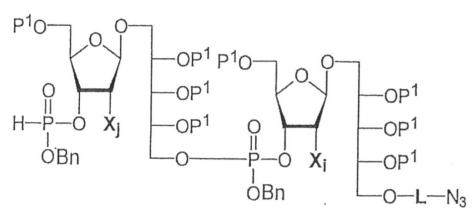
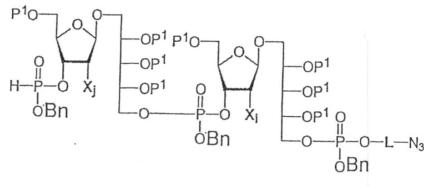
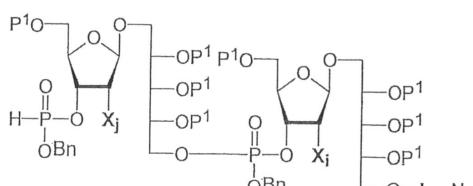
B1*-4



B1*-5



30

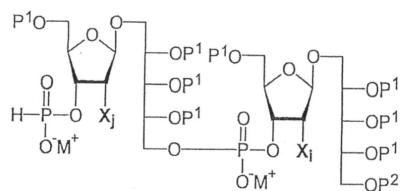
B1*-6**C1*-2****C1*-3****C1*-3'****C1*-3''****A2*-1****A2*-2****A2*-3****A2*-4****A2*-2''****A2*-3''****A2*-4''****B2*-4''**

10

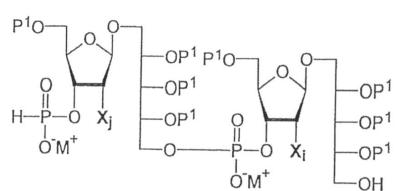
20

30

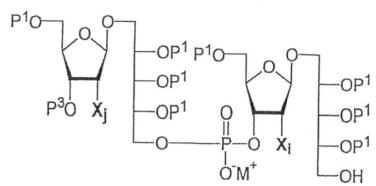
B2*-1



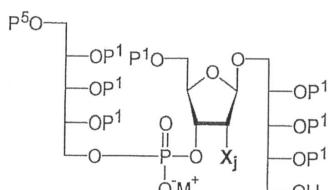
B2*-2



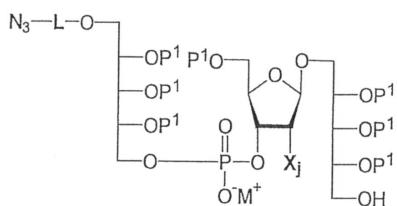
B2*-3



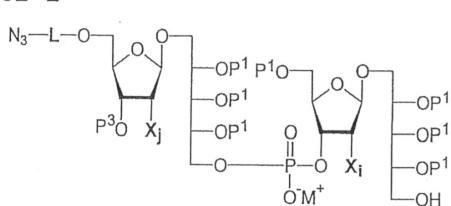
B2*-4



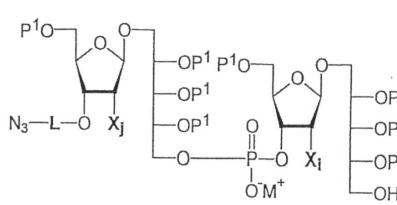
C2*-1



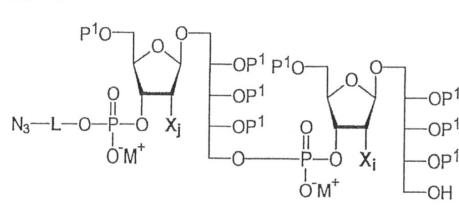
C2*-2



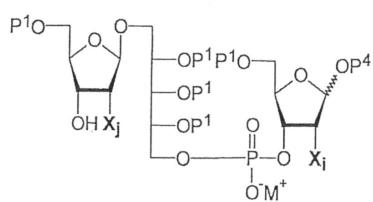
C2*-3



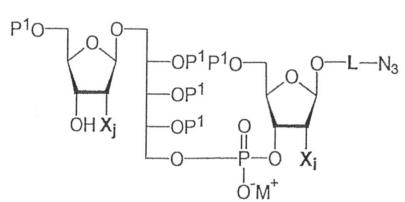
C2*-4



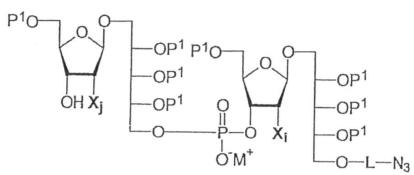
A2*-1'



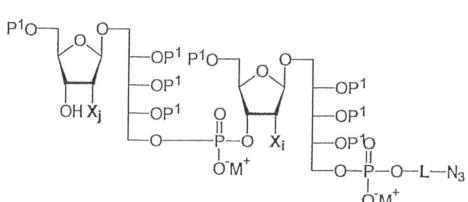
A2*-2'



A2*-3'



A2*-4'

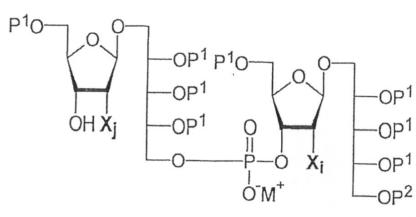


10

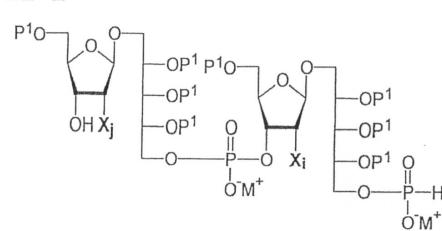
20

30

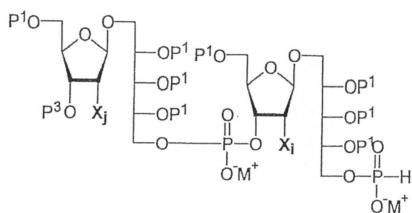
B2*-1'



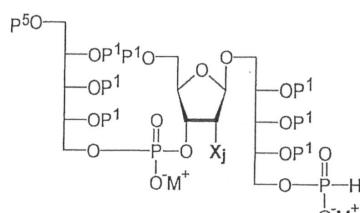
B2*-2'



B2*-3'

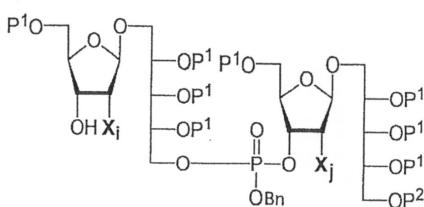


B2*-4'

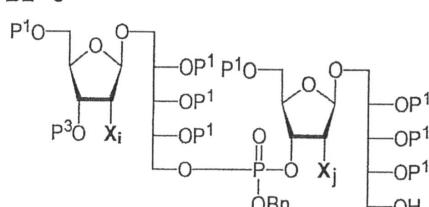


10

B2*-1''

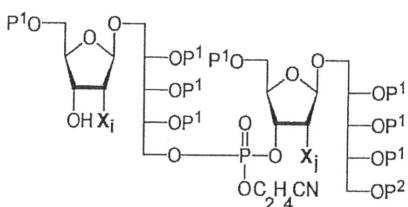


B2*-3''

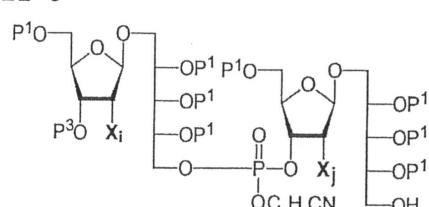


20

B2*-1'''

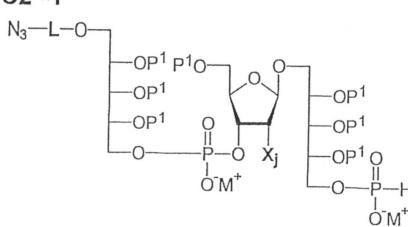


B2*-3'''

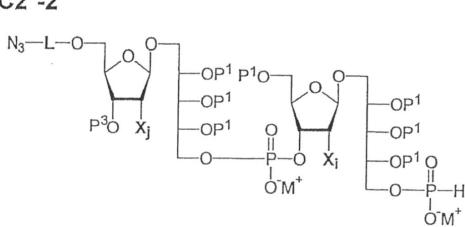


30

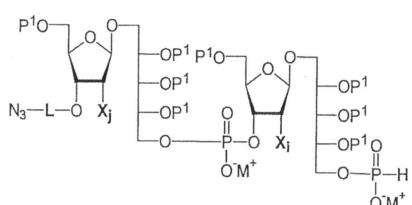
C2*-1'



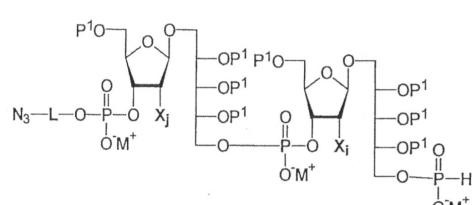
C2*-2'



C2*-3'



C2*-4'



40

式中、 P^1 、 P^2 、 P^3 、 P^4 、 及び P^5 は、 - O - に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基を表し、

X_i 及び X_j は、互いに独立に、 - H、 - OH、 - F、 - CH₃、 - C₂H₅、 - CN、 - OCH₃、 - OC₂H₅、 - OCH(CH₃)₂、 - OCH₂F、 - OCF₃、 - OC

O - N (CH₃)₂、 - O - C₂H₄ - O - CH₃、 - O - CH₂ - CF₃ を表し、

基 X_i 又は X_j が 1 つだけ存在する場合、 X_i 又は X_j は - OH にはできず、

50

基 X_i と X_j の両方が存在する場合、 X_i と X_j とは同時に - OH になることはできず、
L はリンカーであり、L は、 - L^a - 、 - L^a - L^e - 、 - L^a - L^b - L^e - 、 - L^a - L^d - L^e - から選択され、

式中、 - L^a - は、 - (CH₂)₀ - 、 - (CH₂ - CH₂ - O) - C₂H₄ - 、 - (CH₂ - CH₂ - O) - CH₂ - から選択され、

- L^b - は - O - 又は - O - P(O)(OH) - O - を表し、

- L^d - は - (CH₂)_q - 、 - (CF₂)_q - 、 - (CH₂ - CH₂ - O)_q - C₂H₄ - 、及び - (CH₂ - CH₂ - O)_q - CH₂ - から選択され、

- L^e - は - (CH₂)_{p1} - 、 - (CF₂)_{p1} - 、 - C₂H₄ - (O - CH₂ - CH₂)_{p1} - 、 - CH₂ - (O - CH₂ - CH₂)_{p1} - 及び - (CH₂)_{p1} - O - (CH₂)_{p2} - から選択され、

o、q、p₁ 及び p₂ は、互いに独立して、1、2、3、4、5、及び6から選択される整数であり、

M⁺ は、Na⁺、K⁺、NH₄⁺、又はHNEt₃⁺を表す、

式(I)の糖類を合成するための中間化合物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、Hi b ポリリボシルリビトール - ホスフェート (PRP) 誘導体及びそのコンジュゲートの安定した合成糖類を提供する。該糖類、該コンジュゲート及びそれらの医薬組成物は、加水分解耐性、長期安定性があり、ヘモフィルス属インフルエンザ菌に関連する疾患、及びより具体的にはヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型に関連する疾患の予防及び/又は治療に有用である。

【背景技術】

【0002】

ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型 (Hi b) は世界的に深刻なヒトの健康問題であり、髄膜炎、肺炎、喉頭蓋炎 (epiglottitis)、及び特に5歳未満の小児の気道の他の疾患を含む様々な疾患の原因である。疾患の生存者の30%が続いて聴覚障害から精神遅滞までの範囲を示す。

30

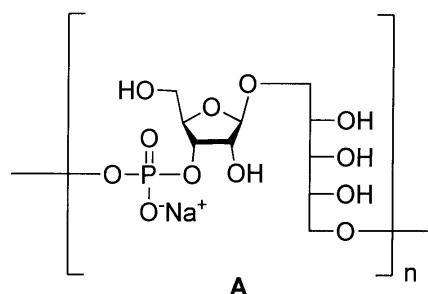
【0003】

ヘモフィルス属インフルエンザ菌の精製莢膜多糖類は、成人において防御免疫を誘導することができる。しかし、小児の免疫応答は非常に乏しく、2歳未満の乳児では事実上存在しない。Hi b 細菌から単離された莢膜多糖類は、リボシルリビトールホスフェート反復単位を提示する。

【0004】

【化1】

40



【0005】

Hi b の感染を予防するための様々なワクチンが開発されており、それらは、合成ポリリボシルリビトールホスフェート (PRP) 又は担体タンパク質にコンジュゲートされた

50

異なる長さの合成PRPの混合物からなる(WO 9210936A1、EP 0276516A2、EP 0320942A2、WO 0116146A1)。最近いくつかのワクチンが米国や他の地域で小児用に認可されている。

Hibオリゴ糖類の合成は、細菌からのHib PRPの費用がかかり面倒な単離の有用な代替法であると報告されている(IN 2013/DEL/02989、US 6,765,091、WO 2016044164及びEP 0320942)。Journal of Carbohydrate Chemistry 1992, 11, 265には、Hibオリゴ糖類の固相合成が記載されている。アセチル化及びメチル化Hib二糖類が、Carbohydrate Research 1979, 73, 59において質量分析によって調べられた。

10

【0006】

上記のように、ポリリボシルリビトールホスフェート(PR P)は、ヘモフィルス属インフルエンザ菌b型(Hib)によって引き起こされる疾患の予防に成功したことが証明されている様々なワクチンの活性成分である。

【0007】

Hibワクチンの長期安定性は該ワクチンの免疫原性を維持するために必要であり、これはPRPポリマー中のホスホジエステル結合の加水分解開裂に対する潜在的な感受性を考えると、Hib-コンジュゲートワクチンにとっての課題であり得る。通常、ワクチンの莢膜多糖類の代謝によりワクチンの免疫原性が低下する。アジュバントとして使用される酸化アルミニウムはPRPの加水分解を促進し、PRPの解重合はHibワクチンの不安定性及びHibワクチンの免疫原性の低下を早めている(Vaccine 19, 1999, p1169-1178)。

20

【0008】

結果として、その市販の認可されたHibワクチンは2~8で保存する必要があり、通常これらの条件下ではわずか24~36ヶ月間しか安定しない。さらに、液体Hibワクチン製剤は、液体製剤に存在するアルミニウム塩により引き起こされると考えられる凍結によって、損傷を受ける傾向がある。凍結を防ぐためには氷の使用を避けなければならないため、凍結損傷に対する感度により、冷却しなければならない液体Hibワクチンの保存及び輸送が妨げられている。

【0009】

30

市販のワクチンに含まれる細菌細胞壁の精製天然多糖類成分が、b受容体の阻害に関与している可能性があることも報告されている。それは気管支収縮の増加をもたらす。さらに、Hibワクチンが3歳未満の乳児において発作の症状のリスクを高めることはよく知られている。したがって、投与量がより少なく、副作用が低減した投与をすることによって免疫原性が増強された新しいHibワクチンが要求されている。

【0010】

本発明の目的は、液体製剤で代謝安定性、加水分解耐性及び保存安定性を有するはずである、Hibポリリボシルリビトールホスフェート(PR P)誘導体及びそのコンジュゲートの合成糖類を提供することである。該糖類、該コンジュゲート及びその医薬組成物は免疫原性が増強されており、したがってヘモフィルス属インフルエンザ菌に関連する疾患、より具体的にはヘモフィルス属インフルエンザ菌b型に関連する疾患の予防及び/又は治療に特に有用であるはずである。

40

【0011】

本発明の目的は、独立請求項の教示によって解決される。本発明のさらなる有利な特徴、態様、及び詳細は、従属請求項、説明、図面、及び本願の実施例から明らかである。

【発明の概要】

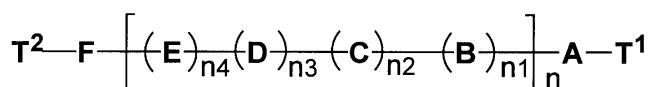
【0012】

本発明の目的は、一般式(I)の糖類、その糖類のエナンチオマー、ジアステレオマー、エナンチオマーの混合物、ジアステレオマーの混合物、アノマー、水和物、溶媒和物及びそれらの薬学的に許容される塩を提供することであり、

50

【0013】

【化2】



(I)

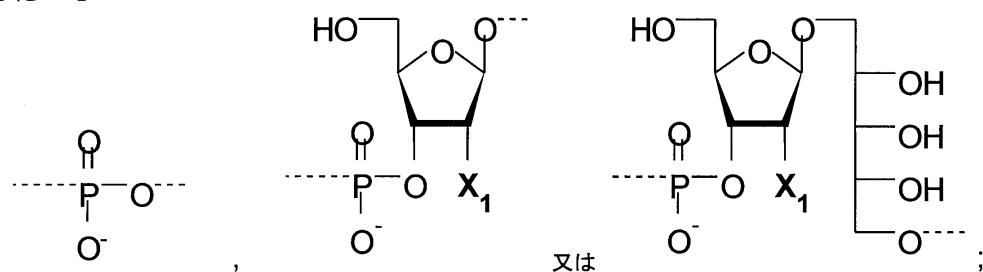
【0014】

式中

Aは、

【0015】

【化3】



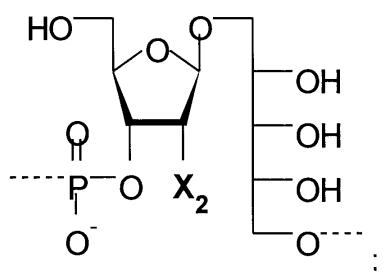
【0016】

であり、

Bは、

【0017】

【化4】



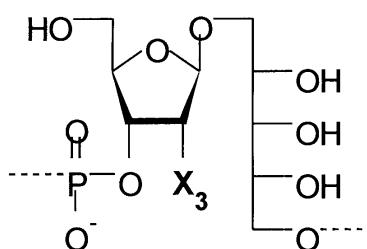
【0018】

であり、

Cは、

【0019】

【化5】



【0020】

であり、

Dは、

【0021】

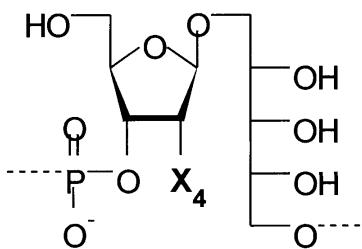
10

20

30

40

【化6】



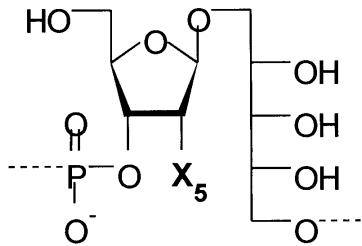
【0022】

であり、

Eは、

【0023】

【化7】



10

20

【0024】

であり、

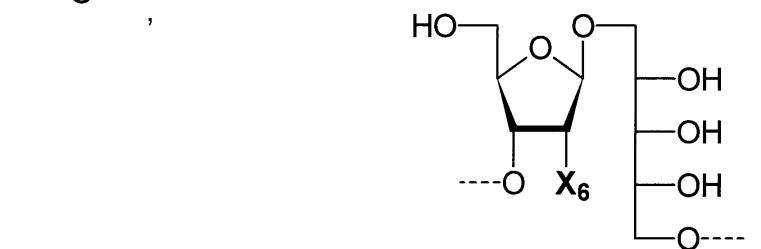
Fは、

【0025】

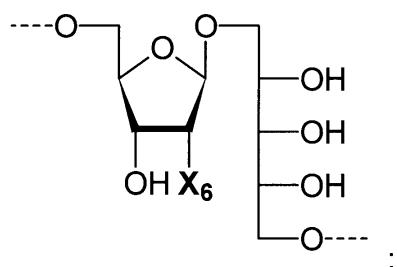
【化8】



30



又は



40

【0026】

であり、

T¹及びT²は-H、-L-NH₂又は-L-COOHを表し、T¹が-L-NH₂又は

50

- L - COOH の場合、T² は - H であり、T¹ が - H の場合、T² は - L - NH₂ 又は - L - COOH であり、又は T¹ 及び T² の一方が - H を表し、T¹ 及び T² の他方が - L - NH₂ 又は - L - COOH を表し、

X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、及び X₆ は、互いに独立して、- H、- OH、- F、- Cl、- CH₃、- C₂H₅、- CN、- OCH₃、- OC₂H₅、- OCH(CH₃)₂、- OCH₂F、- OCF₃、- OCO-N(CH₃)₂、- O-C₂H₄-O-CH₃、- O-CH₂-CF₃ を表し、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、及び X₆ の少なくとも 1 つは - OH ではなく、好ましくは、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、及び X₆ の少なくとも 50% が - OH ではなく、より好ましくは X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、及び X₆ の少なくとも 2 つは - OH ではなく、最も好ましくは X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、及び X₆ のすべてが - OH ではなく、

n は 1、2、3 又は 4 から選択される整数であり、

n₁、n₂、n₃ 及び n₄ は互いに独立して 0 及び 1 から選択され、

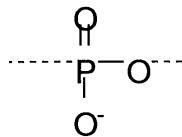
n₁ + n₂ + n₃ + n₄ = 1 であり、

ただし、n₁ + n₂ + n₃ + n₄ = 1 の場合、n = 1 の場合、及び

A は、

【0027】

【化9】



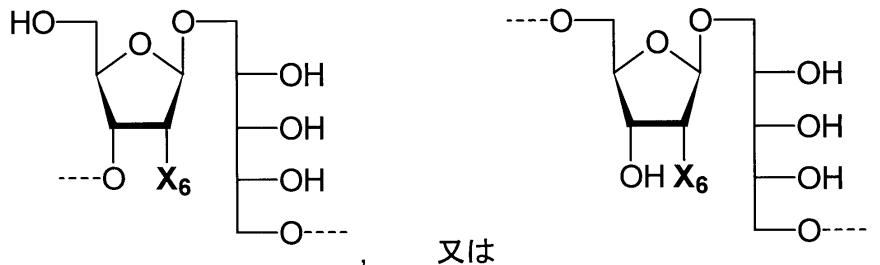
【0028】

である場合、

F は、

【0029】

【化10】



【0030】

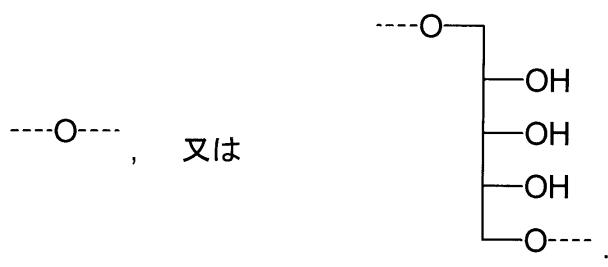
であり、また、

ただし、n₁ + n₂ + n₃ + n₄ = 1 の場合、n = 1 の場合、及び

F は

【0031】

【化11】



【0032】

10

20

30

40

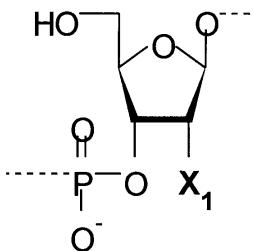
50

である場合、

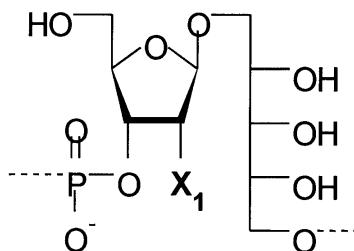
A は、

【0033】

【化12】



又は



10

【0034】

であり、また

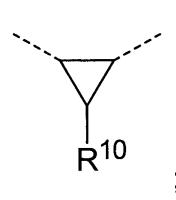
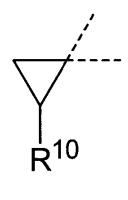
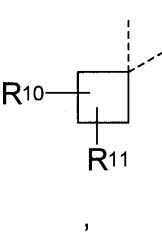
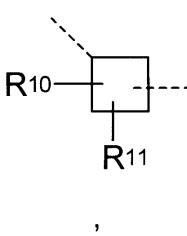
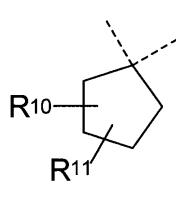
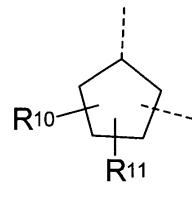
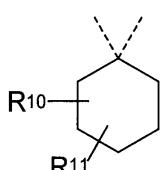
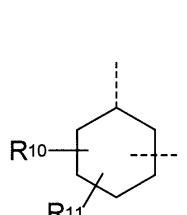
L は、 - L^a - 、 - L^a - L^e - 、 - L^a - L^b - L^e - 、 - L^a - L^b - L^d - L^c - L^e - 、 - L^a - L^d - L^e - から選択され、

式中、 - L^a - は、 - (C₂H₄)_a - 、 - (C₂F₄)_a - 、 - (C₂H₂ - C₂H₂ - O)_a - C₂H₄ - 、 - (C₂H₂ - C₂H₂ - O)_a - C₂H₂ - 、 - (C_R¹0 R¹1)_a -

【0035】

【化13】

20



30

【0036】

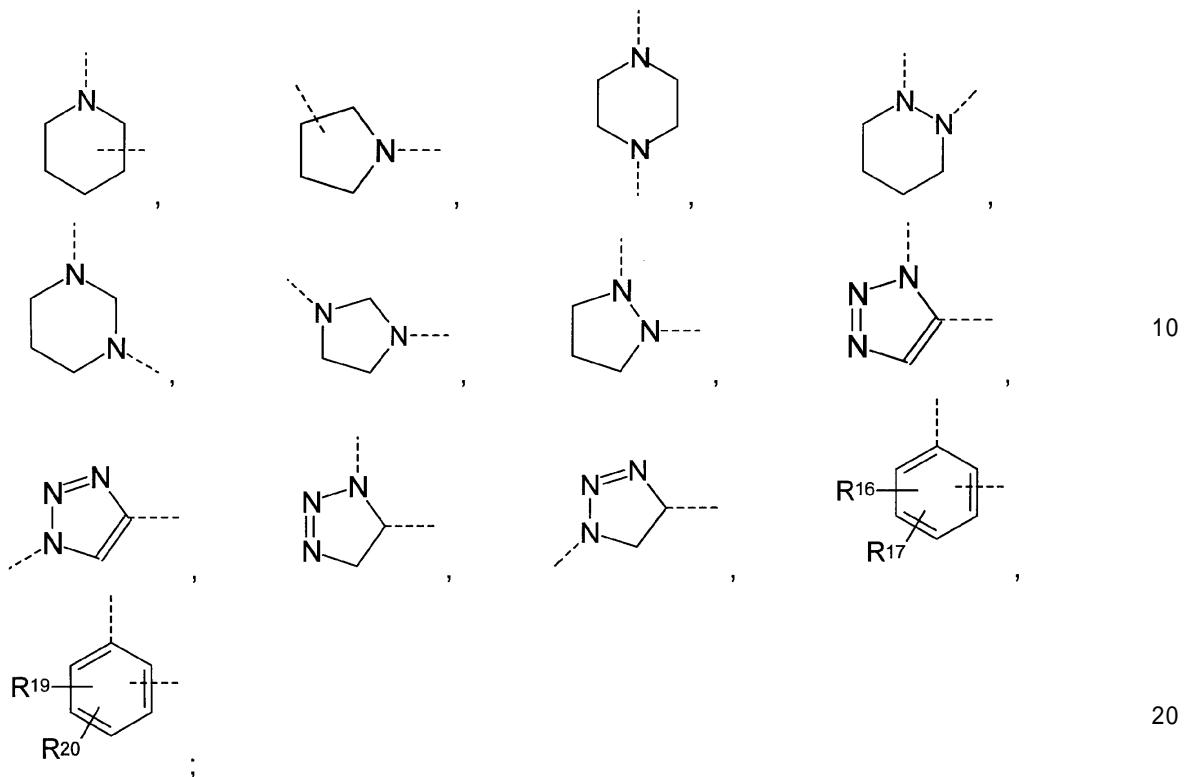
から選択され、

- L^b - と - L^c - は、互いに独立して、 - O - 、 - S - 、 - NH - C(O) - NH - 、 - NH - C(S) - NH - 、 - NH - C(O) - 、 - C(O) - NH - 、 - S - S - 、 - NH - C(O) - O - 、 - NR⁹ - 、 - NR¹8 - 、 - SO₂ - 、 - OP(O)(OH) - O -

【0037】

40

【化14】



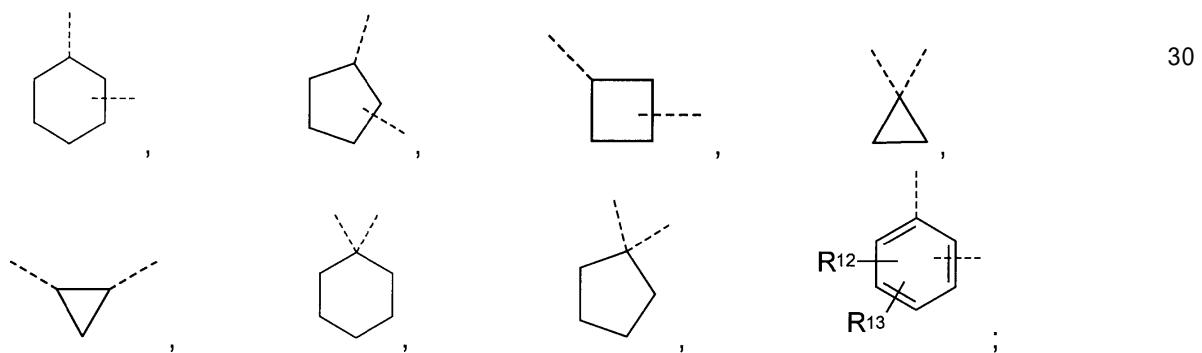
【0038】

から選択され、

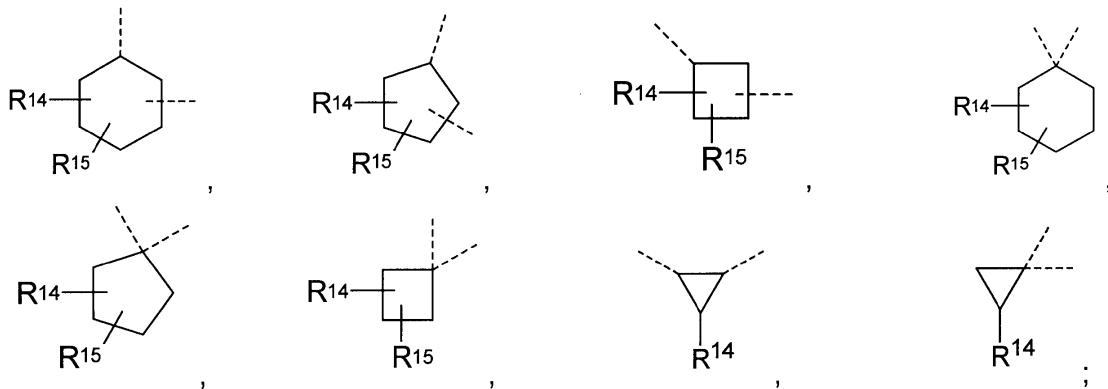
- L^d - は、 - (C H₂)_d - 、 - (C F₂)_d - 、 - (C R¹ ² R¹ ³)_d - 、 - (C H₂ - C H₂ - O)_d - C₂ H₄ - 、 - (C H₂ - C H₂ - O)_d - C H₂ -

【0039】

【化15】



【化16】



10

【0042】

から選択され、

R^9 と R^{18} は、互いに独立して、 $-CH_3$ 、 $-C_2H_5$ 、 $-C_3H_7$ 、及び $-C(O)CH_3$ から選択され、

R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 R^{16} 、 R^{17} 、 R^{19} 、 R^{20} 、

R^{21} 及び R^{22} は、互いに独立して、 $-H$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-CH_3$ 、 $-C_2H_5$ 、 $-$

C_3H_7 、 $-C_5H_9$ 、 $-C_6H_{13}$ 、 $-OCH_3$ 、 $-OC_2H_5$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH$

F_2 、 $-CF_3$ 、 $-C(O)-NH_2$ 、 $-SCH_3$ 、 $-SC_2H_5$ 、 $-NHCO(O)CH$

3 、 $-N(CH_3)_2$ 、及び $-N(C_2H_5)_2$ から選択され、

a、d、e1 及び e2 は互いに独立して 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及び 10 から選択される整数である。

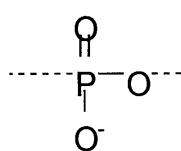
【0043】

式(I)で特許請求される最小の糖類は二糖類であり、ただし、 $n_1 + n_2 + n_3 + n_4 = 1$ の場合、及び $n = 1$ の場合、及び

A は

【0044】

【化17】



30

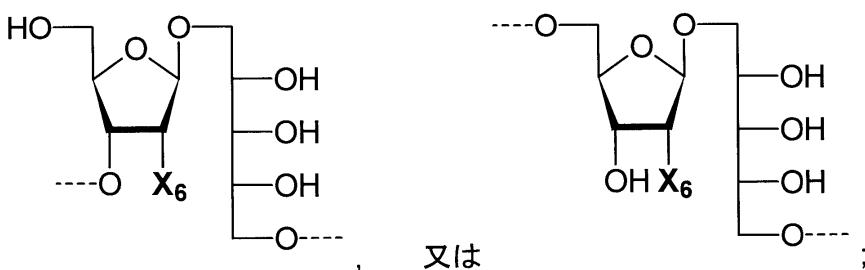
【0045】

である場合、

F は、

【0046】

【化18】



40

【0047】

であり、 $n_1 + n_2 + n_3 + n_4 = 1$ の場合、及び $n = 1$ の場合、及び

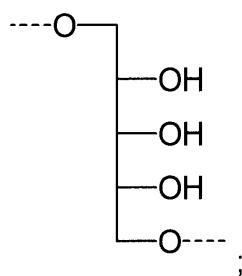
F は、

【0048】

50

【化 1 9】

-----O----- , 又は



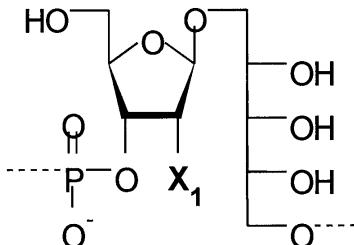
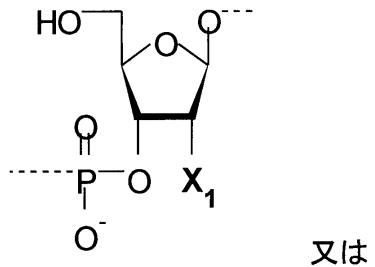
【 0 0 4 9 】

である場合；

A は、

【 0 0 5 0 】

【化 2 0 】



【 0 0 5 1 】

であり、

「一般式 (I) の糖類は少なくとも二糖類である」という条件で置き換えることができる。

【 0 0 5 2 】

或いは、前述の限定は、

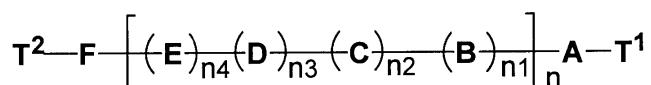
$n_1 + n_2 + n_3 + n_4 = 1$ である場合、 $n_1 = 1$ (n は 1 とは異なる) であり、 及び $n = 1$ である場合、 $n_1 + n_2 + n_3 + n_4 = 1$ ($n_1 + n_2 + n_3 + n_4$ は 1 とは異なる) である
という条件に置き換えられる。

〔 0 0 5 3 〕

かくして、代わりに好ましいのは一般式（I）の糖類、その糖類のエナンチオマー、ジアステレオマー、エナンチオマーの混合物、ジアステレオマーの混合物、アノマー、水和物、溶媒和物及びそれらの薬学的に許容される塩であり、

〔 0 0 5 4 〕

【化 2 1】



(1)

【 0 0 5 5 】

式中

A は

【 0 0 5 6 】

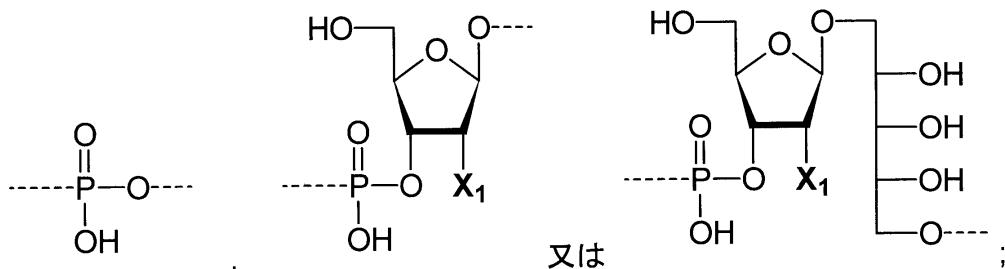
10

20

30

40

【化22】



【0057】

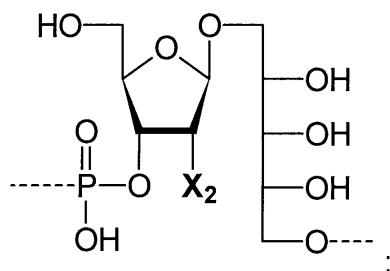
10

であり、

B は

【0058】

【化23】



20

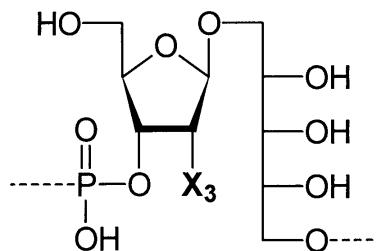
【0059】

であり、

C は、

【0060】

【化24】



30

【0061】

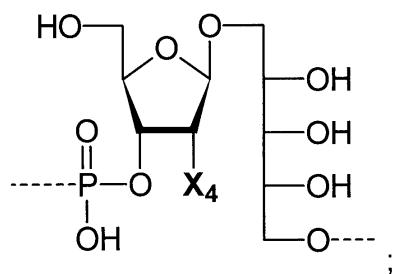
であり、

D は、

【0062】

【化25】

40



【0063】

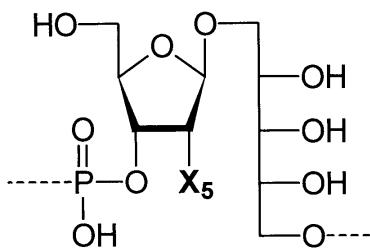
であり、

50

E は、

【0064】

【化26】



10

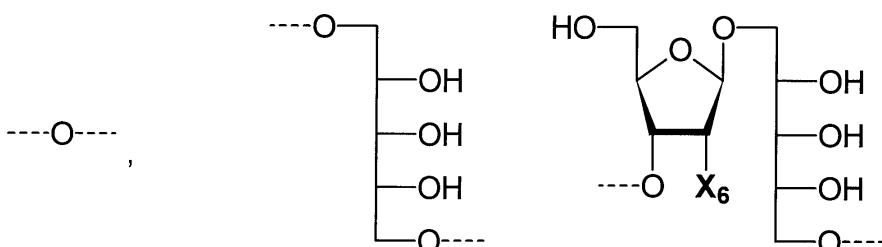
【0065】

であり、

F は、

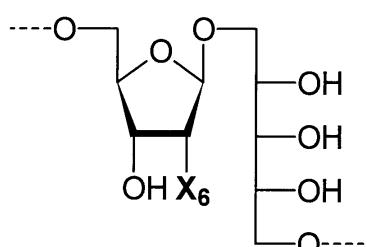
【0066】

【化27】



20

又は



30

【0067】

であり、

T¹ 及び T² は - H、 - L - NH₂ 又は - L - COOH を表し、 T¹ が - L - NH₂ 又は - L - COOH の場合、 T² は - H であり、 T¹ が - H の場合、 T² は - L - NH₂ 又は - L - COOH であり、 又は T¹ 及び T² の一方が - H を表し、 T¹ 及び T² の他方が - L - NH₂ 又は - L - COOH を表し、

X₁、 X₂、 X₃、 X₄、 X₅、 及び X₆ は、 互いに独立して、 - H、 - OH、 - F、 - Cl、 - CH₃、 - C₂H₅、 - CN、 - OCH₃、 - OC₂H₅、 - OCH(CH₃)₂、 - OCH₂F、 - OCF₃、 - OCO-N(CH₃)₂、 - O-C₂H₄-O-CH₃、 - O-CH₂-CF₃ を表し、 X₁、 X₂、 X₃、 X₄、 X₅、 及び X₆ の少なくとも 1 つは - OH ではなく、 好ましくは、 X₁、 X₂、 X₃、 X₄、 X₅、 及び X₆ の少なくとも 50% が - OH ではなく、 より好ましくは X₁、 X₂、 X₃、 X₄、 X₅、 及び X₆ の 80% は、 - OH ではなく、 最も好ましくは X₁、 X₂、 X₃、 X₄、 X₅、 及び X₆ のすべてが - OH ではなく、

n は 1、 2、 3 又は 4 から選択される整数であり、

n₁、 n₂、 n₃ 及び n₄ は互いに独立して 0 及び 1 から選択され、

n₁ + n₂ + n₃ + n₄ = 2 であり、

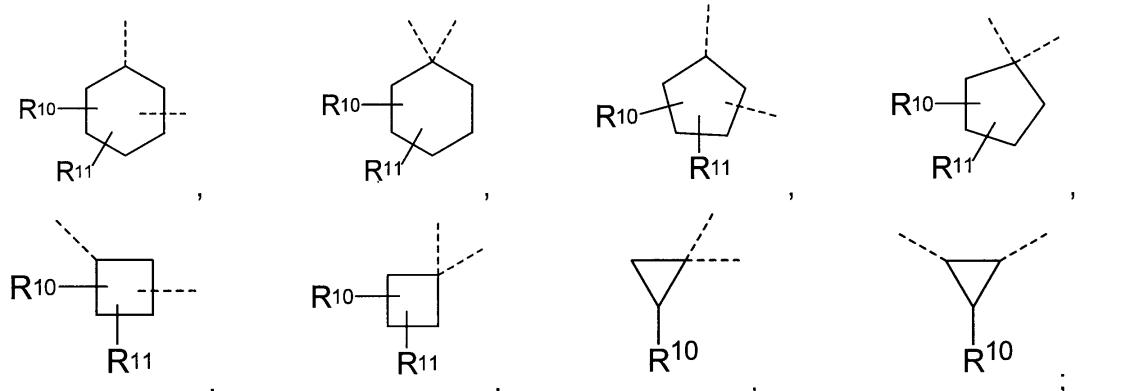
L は、 - L^a - 、 - L^a - L^e - 、 - L^a - L^b - L^e - 、 - L^a - L^b - L^d - L^c - L^e - 、 - L^a - L^d - L^e - から選択され、

式中、 - L^a - は、 - (CH₂)_a - 、 - (CF₂)_a - 、 - (CH₂-CH₂-O)_a 50

- C₂H₄ - 、 - (C₂H₂ - C₂H₂ - O) - a - C₂H₂ - 、 - (C₂R¹0R¹1) - a -

【0068】

【化28】



【0069】

から選択され、

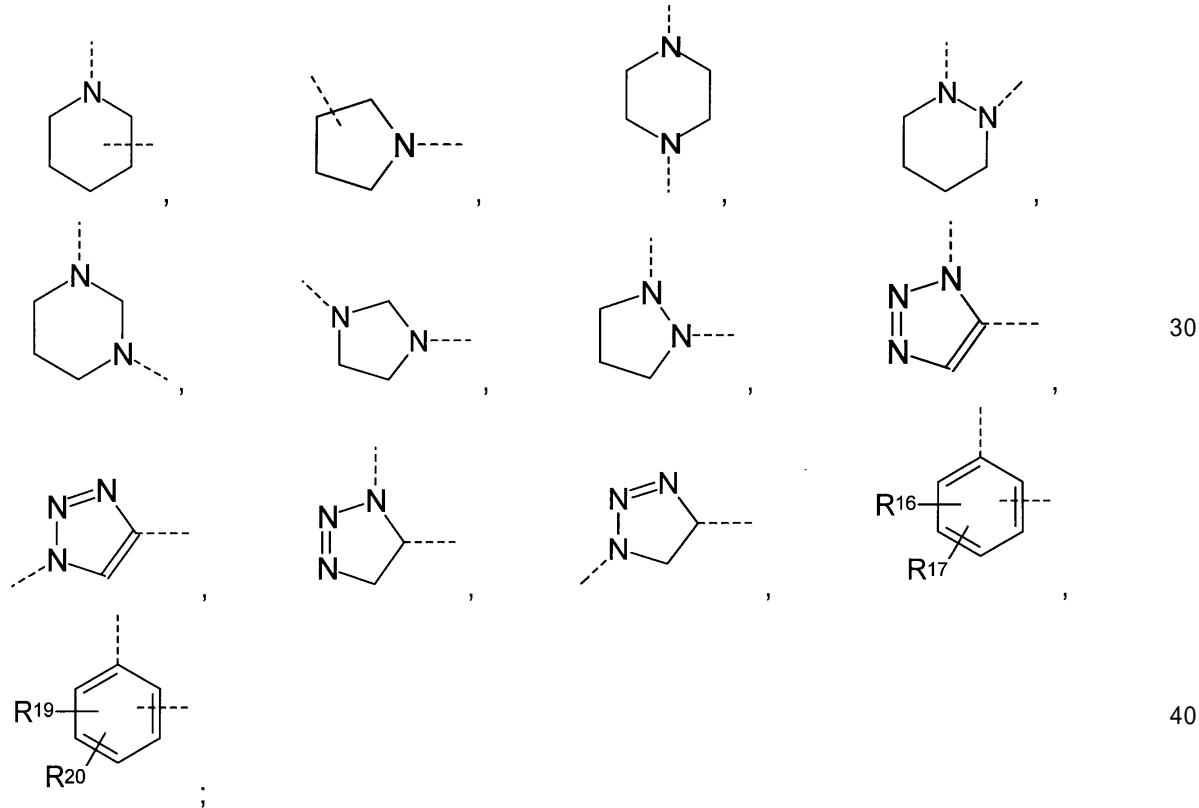
- L^b - と - L^c - は、互いに独立して、 - O - 、 - S - 、 - NH - C(O) - NH - 、

- NH - C(S) - NH - 、 - NH - C(O) - 、 - C(O) - NH - 、 - S - S - 、 -

NH - C(O) - O - 、 - NR⁹ - 、 - NR¹8 - 、 - SO₂ -

【0070】

【化29】



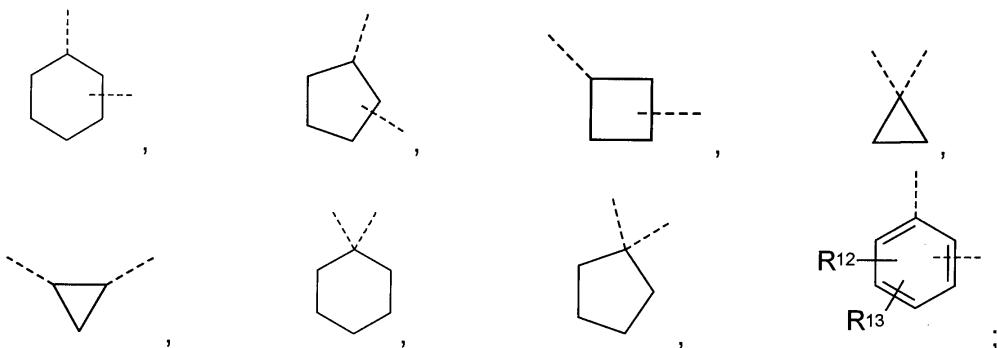
【0071】

から選択され、

- L^d - は、 - (C₂H₂)_d - 、 - (C₂F₂)_d - 、 - (C₂R¹2R¹3)_d - 、 - (C₂H₂ - C₂H₂ - O)_d - C₂H₄ - 、 - (C₂H₂ - C₂H₂ - O)_d - C₂H₂ -

【0072】

【化30】



10

【0073】

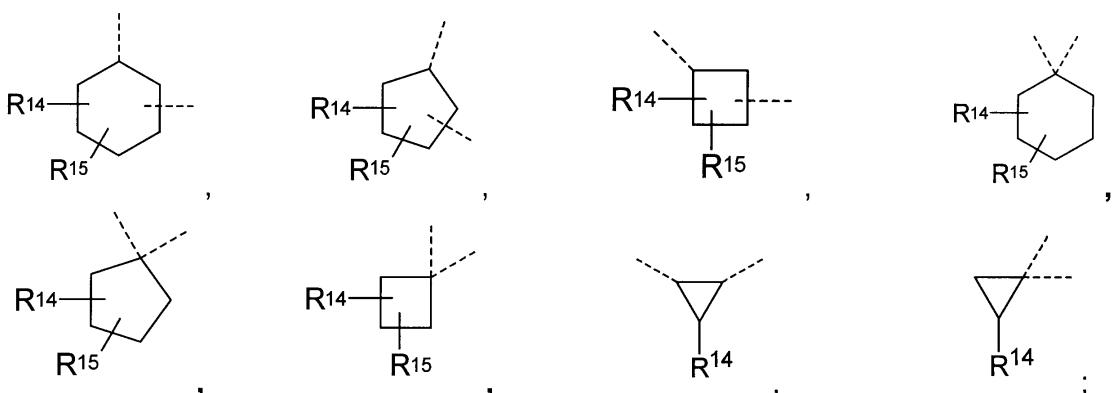
を表し、

- L^e - は - (C₂H₅)_{e1} - 、 - (CF₃)_{e1} - 、 - C₂H₄ - (O - CH₂ - CH₂)_{e2} - 、 - CH₂ - (O - CH₂ - CH₂)_{e2} - 、 - (CH₂)_{e1} - S - (CH₂)_{e2} - 、 - (CR¹₄R¹₅)_{e1} - 、 - (CR¹₄R¹₅)_{e1} - O - (CR²₁R²₂)_{e2} - 、 - (CR¹₄R¹₅)_{e1} - S - (CR²₁R²₂)_{e2} - 、

【0074】

【化31】

20



30

【0075】

から選択され、

R⁹ と R¹₈ は、互いに独立して、 - CH₃、 - C₂H₅、 - C₃H₇、 及び - C(O)CH₃ から選択され、

R¹₀、R¹₁、R¹₂、R¹₃、R¹₄、R¹₅、R¹₆、R¹₇、R¹₉、R²₀、R²₁ 及び R²₂ は、互いに独立して、 - H、 - F、 - Cl、 - CH₃、 - C₂H₅、 - C₃H₇、 - C₅H₉、 - C₆H₁₃、 - OCH₃、 - OC₂H₅、 - CH₂F、 - CHF₂、 - CF₃、 - C(O) - NH₂、 - SCH₃、 - SC₂H₅、 - NHCOCH₃、 - N(CH₃)₂、 及び - N(C₂H₅)₂ から選択されて、

a、d、e₁ 及び e₂ は互いに独立して 1、2、3、4、5、6、7、8、9 及び 10 から選択される整数である。

40

【0076】

より好ましくは、 X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、 及び X₆ は、互いに独立して、 - H、 - F、 - CH₃、 - C₂H₅、 - CN、 - OCH₃、 - OC₂H₅、 - OCH(C₂H₅)₂、 - OCH₂F、 - OCF₃、 - OCO - N(CH₃)₂、 - O - C₂H₄ - O - CH₃、 - O - CH₂ - CF₃、 さらにより好ましくは - H、 - F、 - CH₃、 - CN、 - OCH₃、 - OC₂H₅、 - OCH₂F、 - OCF₃、 - OCO - N(CH₃)₂ を表す。

【0077】

50

式(Ⅰ)の糖類は少なくとも二糖類であり、一方で少なくとも三糖類が好ましく、より好ましいのは一般式(Ⅰ)の糖類が少なくとも四糖類であることである。

本発明の糖類は塩基性及び/又は酸性基を有し、それらは有機又は無機の酸又は塩基と塩を形成してもよい。そのような酸付加塩形成に適した酸の例は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、酢酸、クエン酸、シュウ酸、マロン酸、サリチル酸、p-アミノサリチル酸、リンゴ酸、フマル酸、コハク酸、アスコルビン酸、マレイン酸、スルホン酸、ホスホン酸、過塩素酸、硝酸、ギ酸、プロピオン酸、グルコン酸、乳酸、酒石酸、ヒドロキシマレイン酸、ピルビン酸、フェニル酢酸、安息香酸、p-アミノ安息香酸酸、p-ヒドロキシ安息香酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、亜硝酸、ヒドロキシエタンスルホン酸、エチレンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ナフチルスルホン酸、スルファニル酸、カンファースルホン酸、キナ酸、マンデル酸、o-メチルマンデル酸、水素-ベンゼンスルホン酸酸、ピクリン酸、アジピン酸、d-o-トリル酒石酸、タルトロン酸、(o, m, p)-トルイル酸、ナフチルアミンスルホン酸、及び当業者に周知の他の鉱物又はカルボン酸である。塩は、慣用の方法で遊離の形態の塩基を十分な量の所望の酸と接触させて塩を製造することにより調製する。

【0078】

適切な無機又は有機塩基の例は、例えば、NaOH、KOH、NH₄OH、トリアルキルアミン、トリエチルアミン、テトラアルキルアンモニウムヒドロキシド、リシン又はアルギニンなどである。塩は、当技術分野で周知の方法を用いて、例えば、一般式(Ⅰ)の糖類の溶液を上記の群から選択される塩基の溶液で処理することによる、従来の方法で調製することができる。

最も好ましくは、一般式(Ⅰ)の糖類のリン酸基は、ナトリウム又はトリエチルアンモニウムカチオンを有する塩又は双性イオン形態を構築する。

【0079】

無機カチオンとの塩が好ましく、Li⁺、Na⁺、及びK⁺などの単一の陽電荷を有する無機カチオンとの塩がより好ましい。最も好ましいのはNa⁺塩である。

驚くべきことに、一般式(Ⅰ)の糖類は塩基性水性媒体ならびにリン酸アルミニウム又は水酸化アルミニウムを含有する懸濁液、例えば一般に使用されるアジュバントA1hydrogel中で安定していることが見出された。天然のHib PRRは塩基性水性媒体中又はアルミニウム塩の存在下で1日以内に加水分解するが、一般式(Ⅰ)の糖類及びそれらのコンジュゲートは、高温でも数日間にわたって安定している。安定性が増大することは、ヘモフィルス属インフルエンザ菌に対するワクチンでそれらを使用するのに特に有利である。したがって、一般式(Ⅰ)の糖類及びそのコンジュゲートは、ヘモフィルス属インフルエンザ菌に対する保存安定性の液体ワクチンに特に有用であり、それは周囲温度で保存することができ、例えば輸送の間に生じ得る凍結乾燥によって、損傷を受けにくい。

【0080】

驚くべきことに、免疫原性担体にコンジュゲートした一般式(Ⅰ)の糖類は、ヒト及び/又は動物宿主においてヘモフィルス属インフルエンザ菌に対する防御的な免疫応答を付与することができることも見出された。さらに、免疫原性担体にコンジュゲートした一般式(Ⅰ)の糖類は、対応する市販のHib PRRコンジュゲートワクチンと速度論及びIgG産生に関して匹敵する、実質的なIgM及びIgG応答をウサギにおいて誘発することができる。免疫原性担体にコンジュゲートした一般式(Ⅰ)の糖類によって誘発された抗体は、天然のHib PRRと交差反応し、かくしてこれらの抗体がヘモフィルス属インフルエンザ菌に結合し、ヘモフィルス属インフルエンザ菌感染に対する防御を与える能力を示している。

式(II-1)の糖類、その糖類のエナンチオマー、ジアステレオマー、エナンチオマーの混合物、ジアステレオマーの混合物、アノマー、水和物、溶媒和物及びそれらの薬学的に許容される塩が好ましい。

【0081】

10

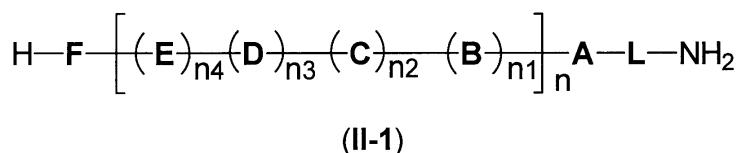
20

30

40

50

【化32】



【0082】

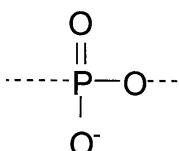
式中

Aは

【0083】

【化33】

10



【0084】

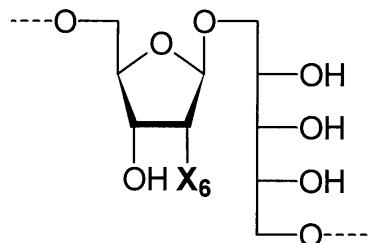
であり、

Fは

【0085】

【化34】

20



【0086】

であり、B、C、D、E、L、n1、n2、n3及びn4は上で定義した通りの意味を有し、

30

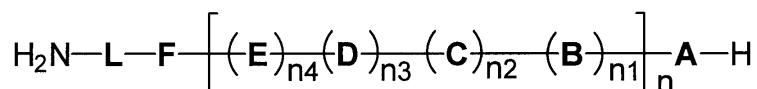
nは1又は2であり、

X₂ - X₆は、-H、-F、又は-OCH₃である。

式(II-2)の糖類、その糖類のエナンチオマー、ジアステレオマー、エナンチオマーの混合物、ジアステレオマーの混合物、アノマー、水和物、溶媒和物及びそれらの薬学的に許容される塩もまた好ましく、

【0087】

【化35】



40

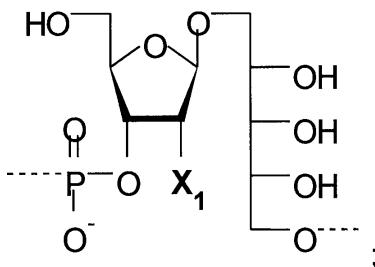
【0088】

式中

Aは

【0089】

【化36】



【0090】

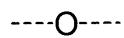
10

であり、

Fは、

【0091】

【化37】



【0092】

であり、B、C、D、E、L、n1、n2、n3及びn4は上で定義した通りの意味を有し、

nは1又は2であり、

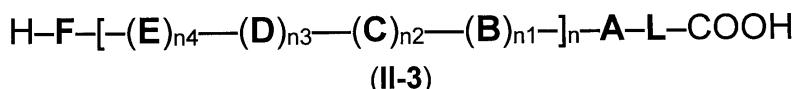
20

X₁ - X₅は、-H、-F、又は-OCH₃である。

式(I I - 3)の糖類、その糖類のエナンチオマー、ジアステレオマー、エナンチオマーの混合物、ジアステレオマーの混合物、アノマー、水和物、溶媒和物及びそれらの薬学的に許容される塩もまた好ましい。

【0093】

【化38】



【0094】

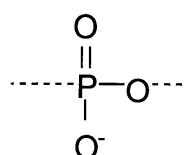
30

式中

Aは

【0095】

【化39】



【0096】

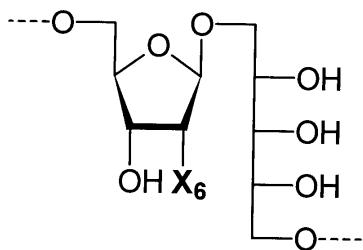
40

であり、

Fは、

【0097】

【化40】



【0098】

であり、

B、C、D、E、L、n1、n2、n3及びn4は上で定義した通りの意味を有し、
nは1又は2であり、

X₂ - X₆は、-H、-F、又は-OCH₃である。。

式(I I - 4)の糖類、その糖類のエナンチオマー、ジアステレオマー、エナンチオマーの混合物、ジアステレオマーの混合物、アノマー、水和物、溶媒和物及びそれらの薬学的に許容される塩もまた好ましい。

【0099】

【化41】



10

20

(II-4)

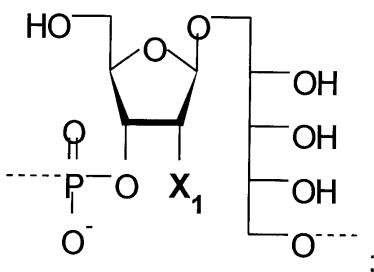
【0100】

式中

Aは、

【0101】

【化42】



30

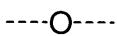
【0102】

であり、

Fは、

【0103】

【化43】



40

【0104】

であり、

B、C、D、E、L、n1、n2、n3及びn4は上で定義した通りの意味を有し、
nは1又は2であり、

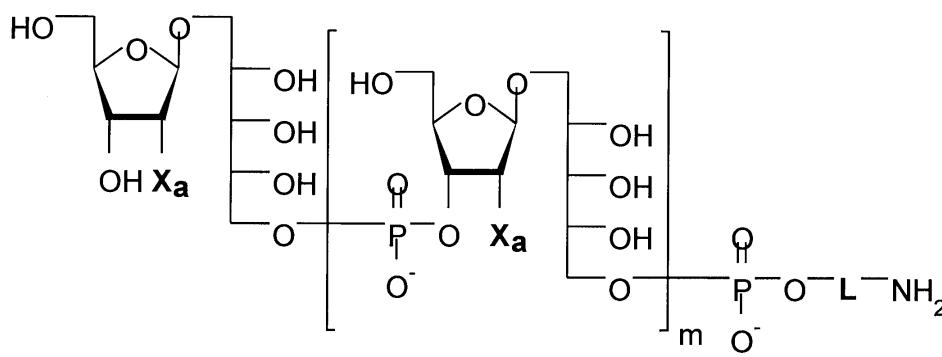
X₁ - X₅は、-H、-F、又は-OCH₃である。

式(I I I - 1)の糖類がさらに好ましい。

【0105】

50

【化44】



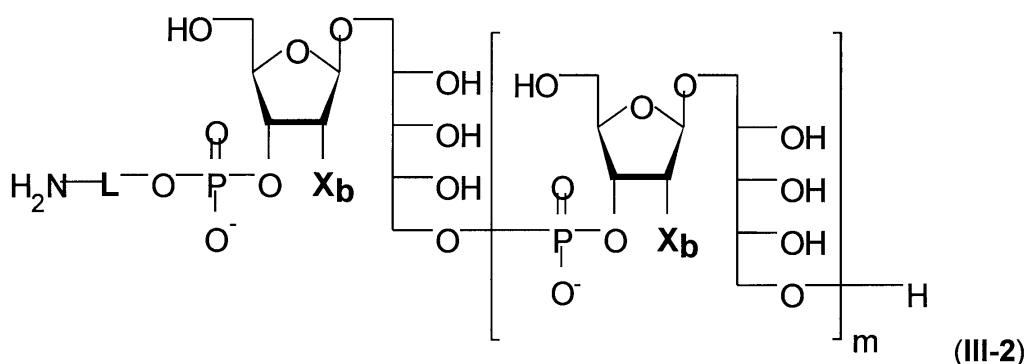
【0106】

式中

Lは上で定義した通りの意味を有し、
 mは1～9から選択される整数であり、
 Xaは、-H、-F、又は-OCH₃である。
 さらに好ましいのは、式(III-2)の糖類である。

【0107】

【化45】



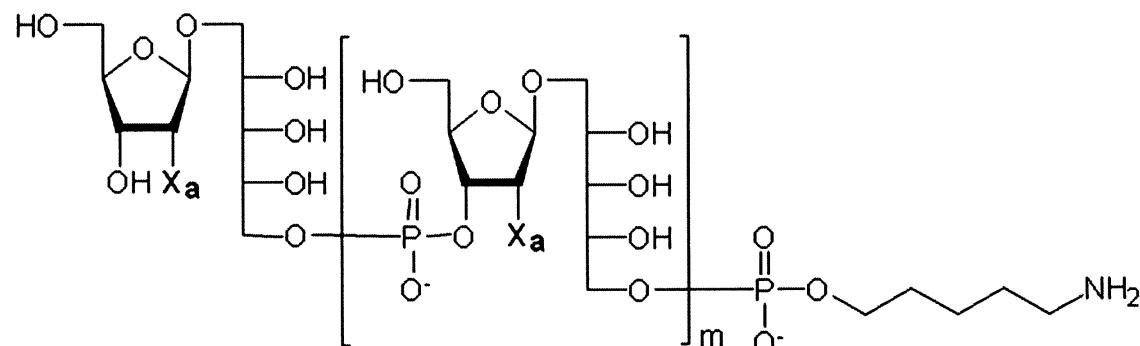
【0108】

式中

Lは上で定義した通りの意味を有し、
 mは1～9から選択される整数であり、
 Xbは、-H、-F、又は-OCH₃である。
 より好ましいのは式(IV-1)の糖類である。

【0109】

【化46】



【0110】

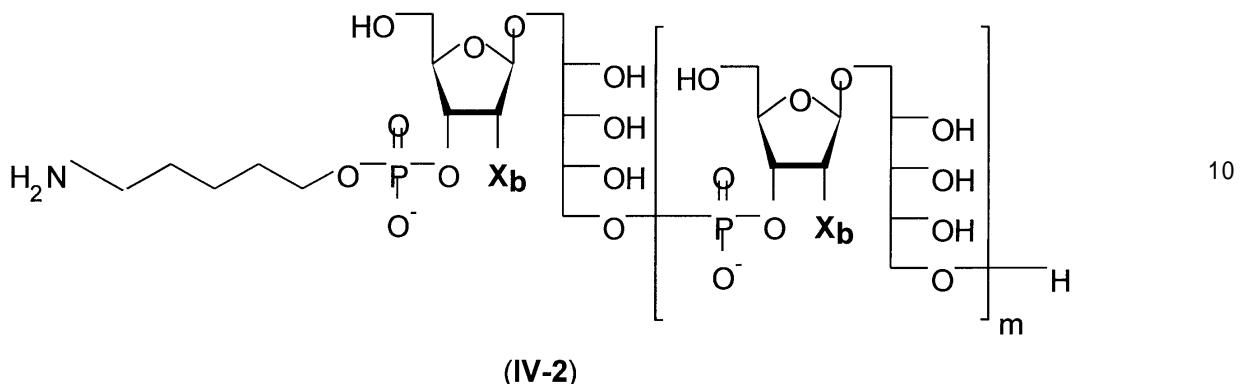
式中

50

m は 1 ~ 9 から選択される整数であり、
 X_a は、 - H、 - F、 又は - OCH₃ である。
 さらにより好ましいのは式 (IV-2) の糖類である。

【0111】

【化47】



【0112】

式中

m は 1 ~ 9 から選択される整数であり、
 X_b は - H、 - F、 又は - OCH₃ である。

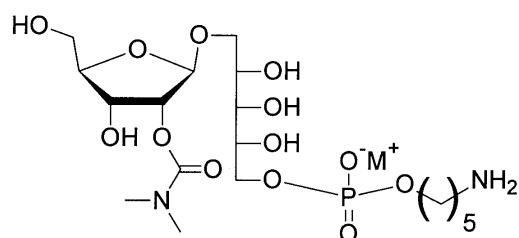
最も好ましいのは、以下からなる群から選択される糖類である。

【0113】

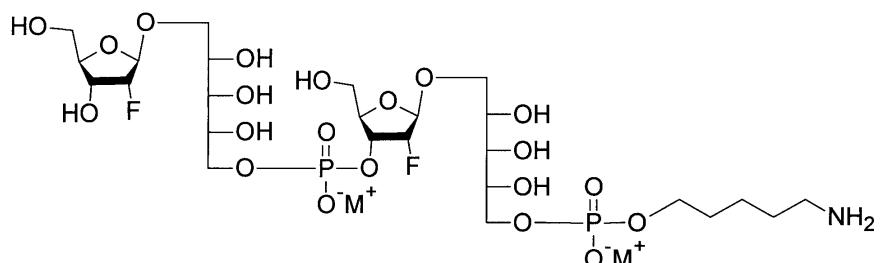
20

【化 4 8】

化合物 1f

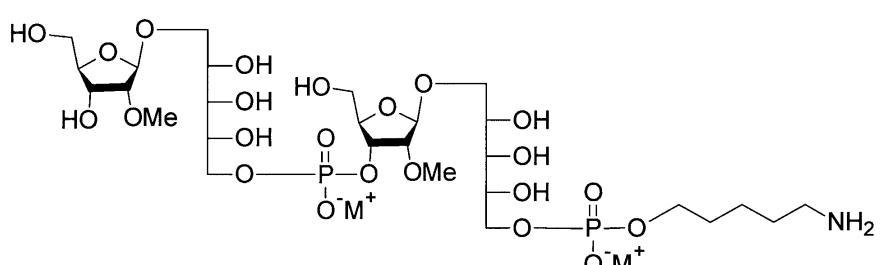


化合物 2a :



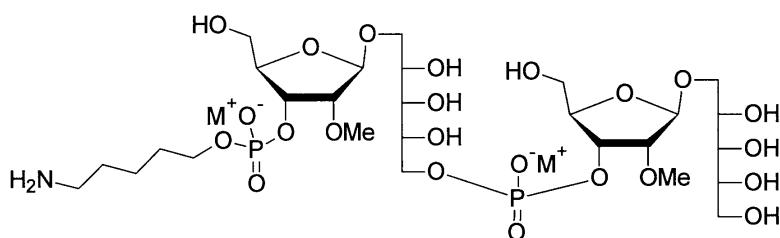
10

化合物 2b :



20

化合物 2b'

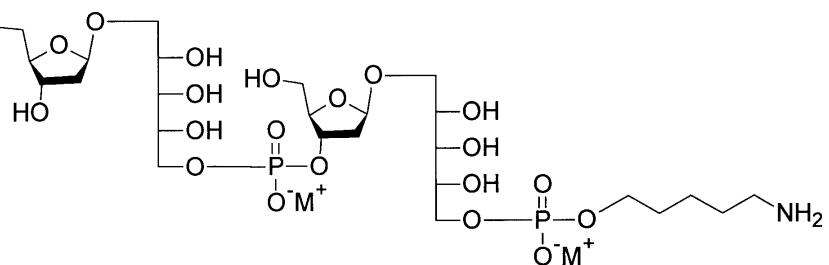


【 0 1 1 4 】

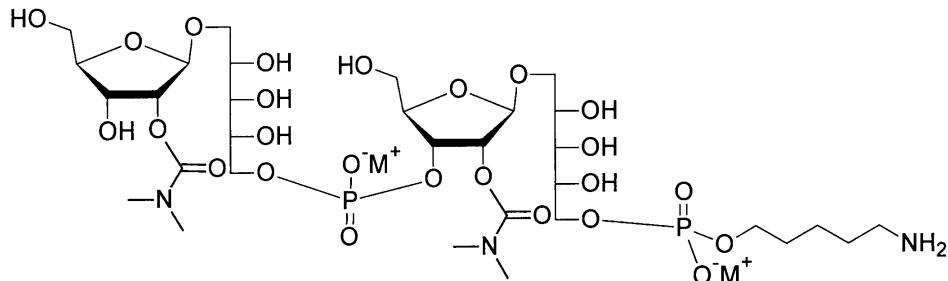
30

【化49】

化合物 2c:

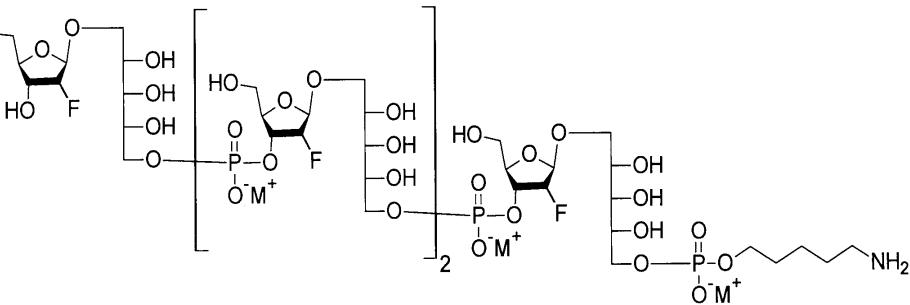


化合物 2f:



10

化合物 4a:

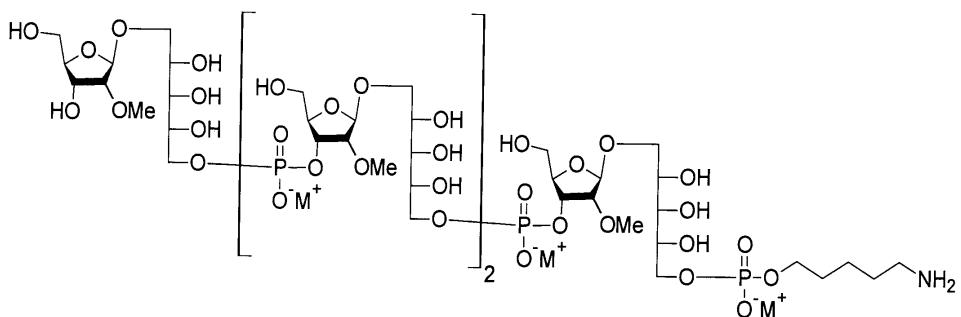


20

【0115】

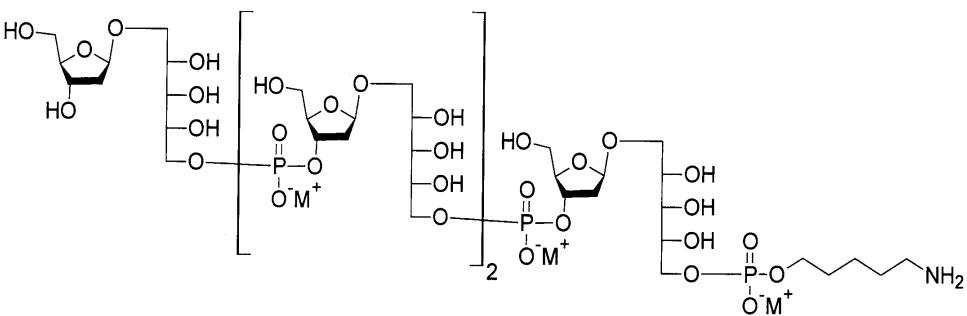
【化 5 0 】

化合物 4b :

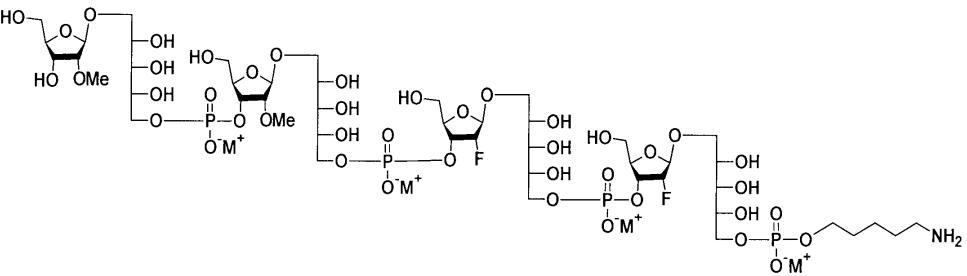


10

化合物 4c :



化合物 4d :

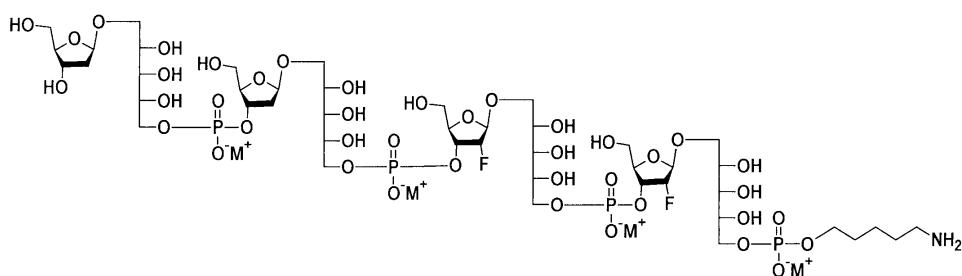


20

【 0 1 1 6 】

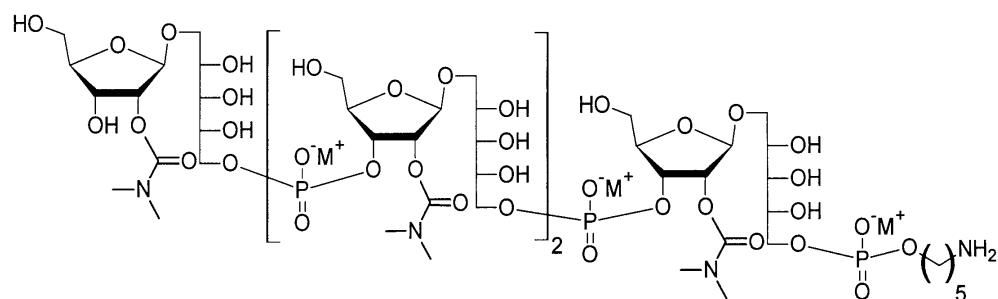
【化 5 1】

化合物 4e :



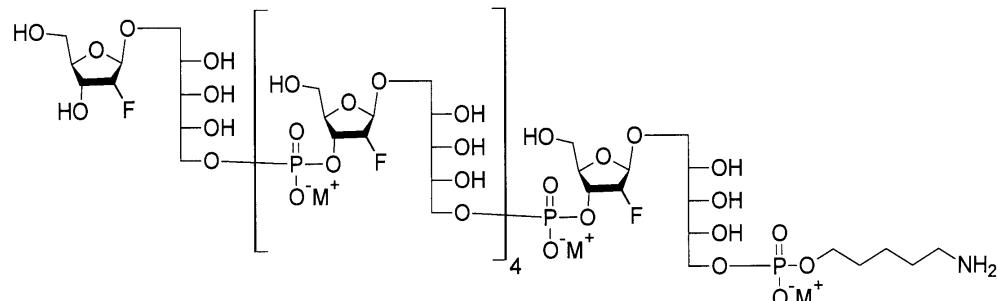
10

化合物 4f:



20

化合物 6a :

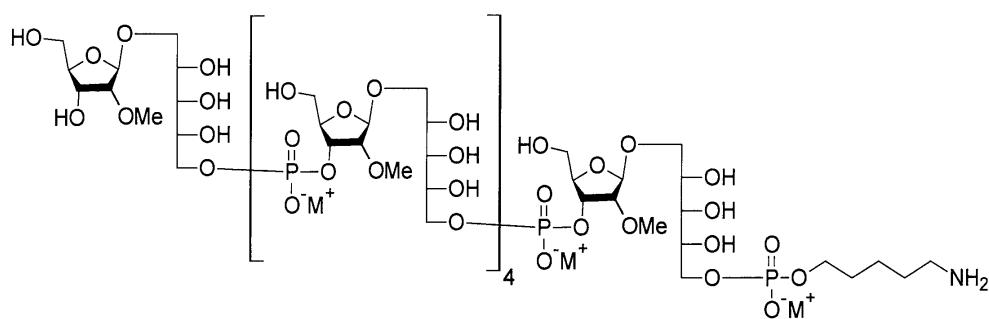


30

【 0 1 1 7 】

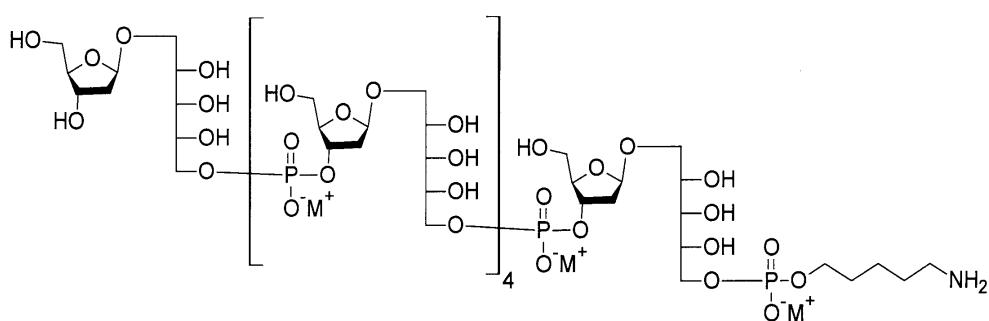
【化 5 2】

化合物 6b :

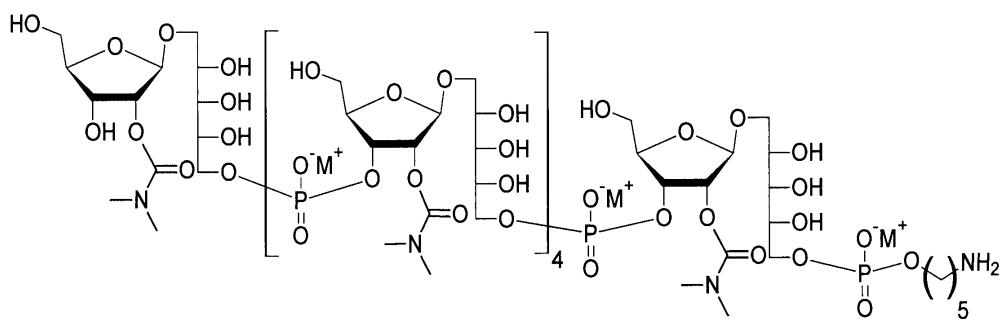


10

化合物 6c :



化合物 6f:

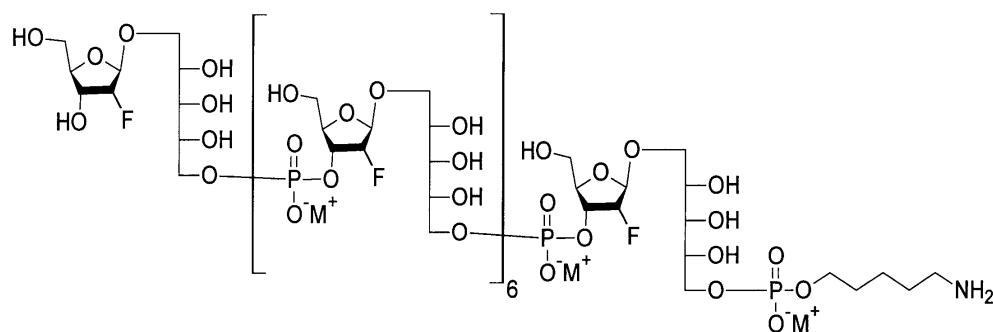


20

【 0 1 1 8 】

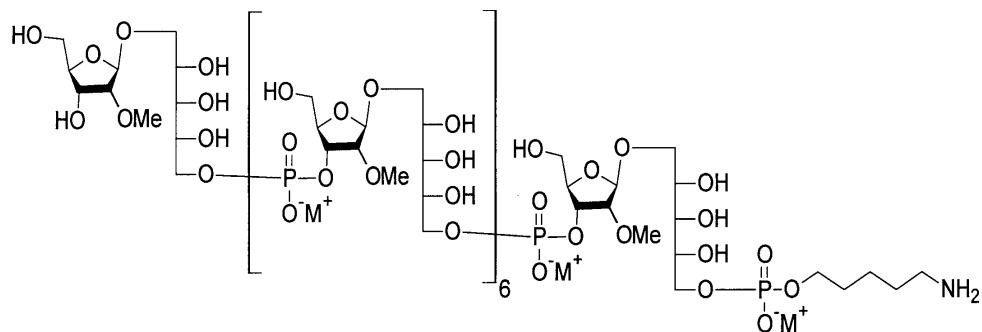
【化53】

化合物8a:

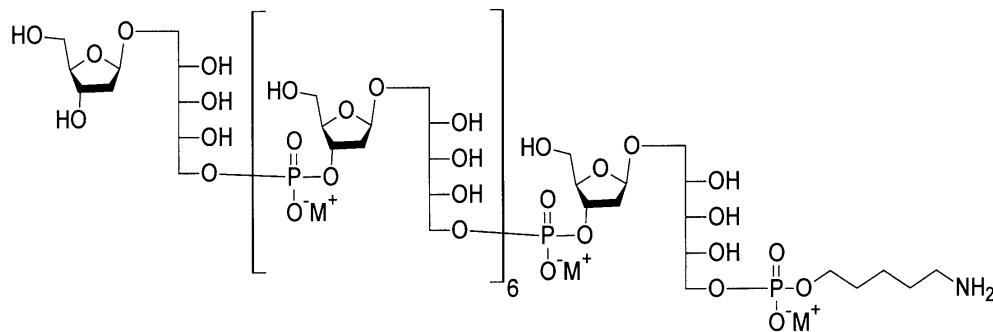


10

化合物8b:



化合物8c:



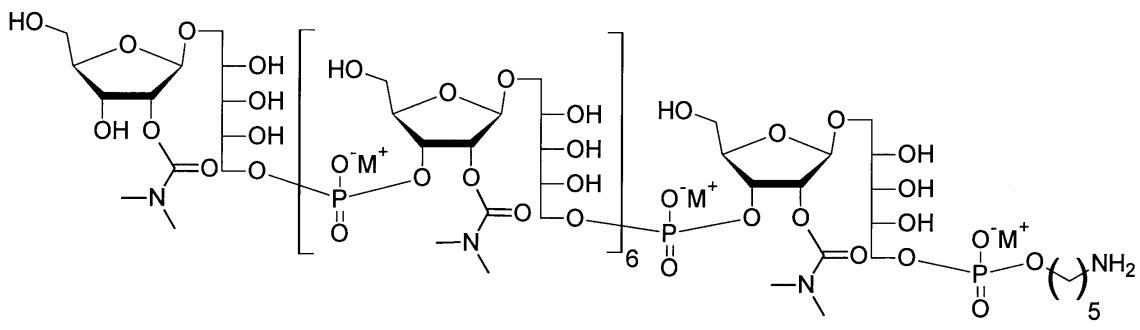
20

【0119】

【化54】

30

化合物8f:



40

【0120】

合成的なアプローチ

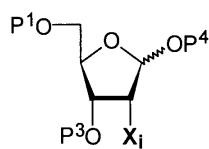
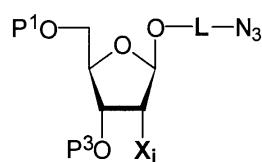
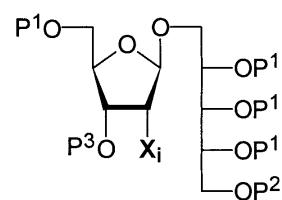
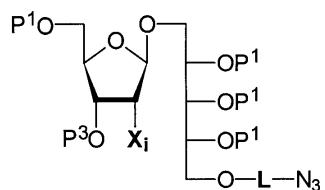
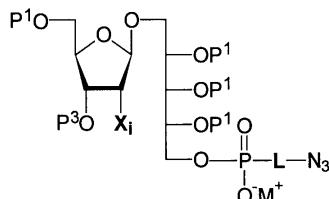
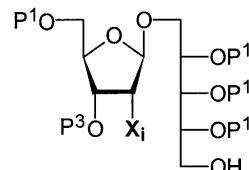
1. 本発明の糖類の段階的合成

適切な保護基 A₁^{*} - 3 ~ A₁^{*} - 5、B₁^{*} - 1 ~ B₁^{*} - 6、C₁^{*} - 1 ~ C₁^{*} - 3 で保護されたリボシルリビトール骨格を有する二糖類反復単位、リボース又はリビトール骨格を有する半反復単位 A₁^{*} - 1、A₁^{*} - 2、C₁^{*} - 1、C₁^{*} - 2、及びリンカーリンカルを含む末端単位、又は T₁^{*} ~ T₃^{*} は、本発明の糖類の様々な合成経路に適用することができる。A₁^{*} - 1 ~ A₁^{*} - 5、B₁^{*} - 1 ~ B₁^{*} - 6、C₁^{*} - 1 ~ C₁^{*} - 3 及び T₁^{*} ~ T₃^{*} は以下の構造を有する。

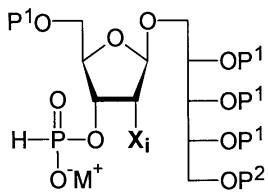
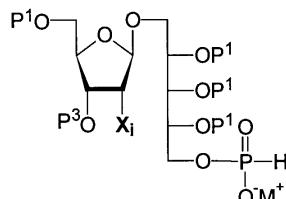
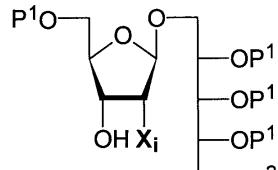
【0121】

50

【化55】

A1*-1**A1*-2****A1*-3****A1*-4****A1*-5****B1*-1**

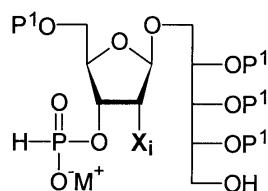
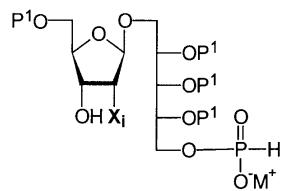
10

B1*-2**B1*-3****B1*-4**

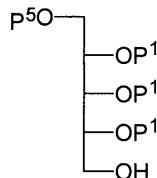
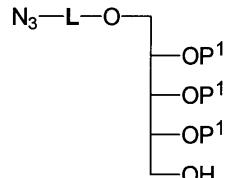
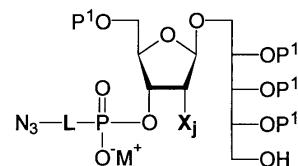
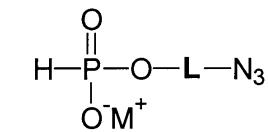
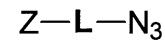
20

【0122】

【化56】

B1*-5**B1*-6**

30

C1*-1**C1*-2****C1*-3****T1*****T2*****T3***

40

$Z = -\text{Br}, -\text{Cl}, -\text{I}, -\text{OTf},$
 $-\text{OMs}, \text{ or } -\text{OTs}$

【0123】

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、
 P^1 、 P^2 、 P^3 、 P^4 及び P^5 は、-O-に結合したときに X_i 及び / 又は X_j と同一
 ではあり得ない保護基を表し、

L は上で定義した通りの意味を有し、

M^+ は、 Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 H^+ 又は Et_3NH^+ を表す。

50

【0124】

当業者は、一般式(Ⅰ)、(Ⅱ-1)、(Ⅱ-2)、(Ⅲ-1)、(Ⅲ-2)、(Ⅳ-1)及び(Ⅳ-2)の本発明の糖類、ならびにそれらの免疫原性担体とのコンジュゲートの合成に用いられる保護基P¹～P⁵は、酸素原子に結合している場合、X_i及び/又はX_jと同一ではあり得ないことを想定できる。

【0125】

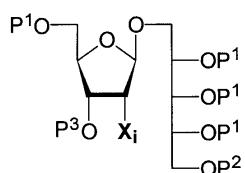
有用な合成経路のいくつかは、上記の構成要素の組み合わせによって利用可能である。

本発明の実施形態では、以下の構成要素A1*-3、B1*-1及びT1*又はT3*を本発明の糖類の合成に使用することができる(スキーム1)。

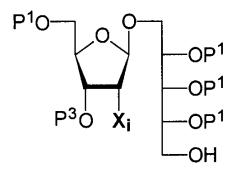
【0126】

【化57】

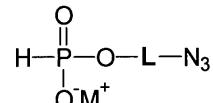
A1*-3



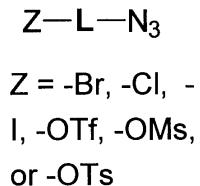
B1*-1



T1*



T3*



【0127】

20

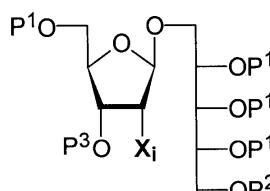
出発構成要素として、A1*-3を使用することができる。

合成方法Aは以下の工程を含む:

i) 出発構成要素A1*-3を準備する、

【0128】

【化58】



A1*-3

【0129】

式中、X_iはX₁、X₂、X₃、X₄、X₅又はX₆を表し、P¹、P²及びP³は、-O-に結合したときにX_iと同一ではない保護基である、

i i) A1*-3からP³基を除去する、

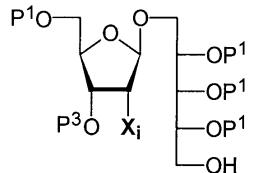
i i i) 工程i i)の後に、得られた化合物のリボースのC-3位にリン酸水素基(hydrogen phosphonate group)を導入する、

i v) 工程i i i)の後に、得られた化合物を構成要素B1*-1とカップリングさせる、

【0130】

40

【化59】



B1*-1

【0131】

式中、X_iはX₁、X₂、X₃、X₄、X₅又はX₆を表し、P¹及びP³は、-O-に結合したときにX_iと同一ではない保護基である、

50

v) 工程 i) の出発構成要素 A 1 * - 3 の代わりに工程 i v) の後に得られる化合物を使用することにより工程 i) ~ i v) を t 回任意に繰り返し、t は 0 ~ 20 の整数である、
 v i) 工程 v) の後、得られた化合物から P 2 保護基を除去する、
 v i i) 工程 v i) の後に得られた化合物を化合物 T 1 * とカップリングさせる、
 v i i i) 式 (I) の化合物を得るために、P 1 及び P 3 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換する。

【 0 1 3 2 】

上記合成法 A において、工程 v i i) の T 1 * の代わりに化合物 T 3 * を使用することもできる。工程 v i i i) において、P 1 及び P 3 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換することは、段階的に実施することができるが、同じ反応条件下で同時に行うのが好ましい。

10

【 0 1 3 3 】

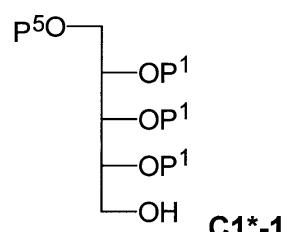
上述の合成方法 A において、出発構成要素 A 1 * - 3 の代わりに半反復単位 A 1 * - 1 が²⁰出発構成要素として使用される場合、工程 v) の後、以下の工程 v i ') 及び v i i ') を、工程 v i) ~ v i i i) の代わりに行い得る：
 v i ') 工程 v) の後に得られた化合物を T 2 * とカップリングさせる
 v i i ') 式 (I) の化合物を得るために、保護基 P 1 及び P 3 を除去し、アジド基をアミン基に変換する。

【 0 1 3 4 】

半反復単位 C 1 * - 1 は、上記合成方法 A における工程 v) の後に終了構成要素として²⁰使用することができ、次いで、工程 v i) ~ v i i i) の代わりに以下の工程 v i ' ') - x i ' ') を実施することができる：
 v i ' ') 工程 v) の後、得られた化合物から P 3 保護基を除去する
 v i i ' ') 工程 v i ') の後、得られた化合物のリボースの C - 3 位にリン酸水素基を導入する
 v i i i ' ') 工程 v i i ' ') の後に得られた化合物を C 1 * - 1 とカップリングする

【 0 1 3 5 】

【 化 6 0 】



30

【 0 1 3 6 】

式中、P 1 及び P 5 は保護基である、
 i x ' ') 工程 v i i i ' ') の後、得られた化合物から P 2 保護基を除去する
 x ' ') 工程 i x ' ') の後に得られた化合物を化合物 T 1 * とカップリングさせる
 x i ' ') 式 (I) の化合物を得るために、P 1 及び P 5 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換する。

40

【 0 1 3 7 】

合成方法 A の工程 i i i) 及び v i i ' ') において、工程 i i) 又は工程 v i ' ') の後に得られる化合物のリボースの C - 3 位にリン酸水素基の代わりにホスホルアミダイト基を導入することもできる。その後、T 1 * はビス (ジイソプロピルアミノ) ベンジルオキシホスフィンと H O - L - N 3 に置き換えられる。

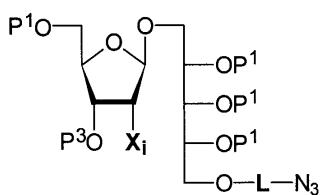
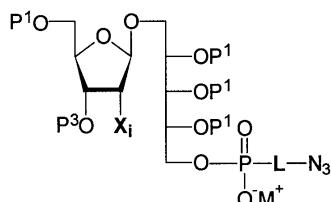
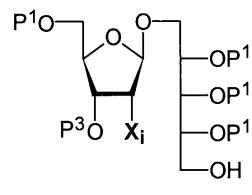
【 0 1 3 8 】

本発明の別の実施形態では、以下の構成要素 A 1 * - 4 又は A 1 * - 5 、及び B 1 * - 1 を、本発明の糖類の合成に使用することができる (スキーム 2)。

【 0 1 3 9 】

50

【化61】

A1*-4**A1*-5****B1*-1**

【0140】

10

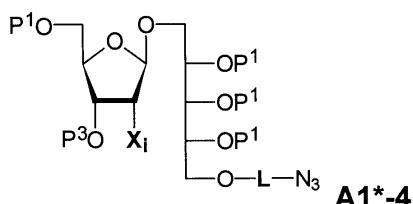
出発構成要素として、A1*-4又はA1*-5を使用することができる。

合成方法Bは以下の工程を含む：

i) 出発構成要素A1*-4又はA1*-5を準備する

【0141】

【化62】



20

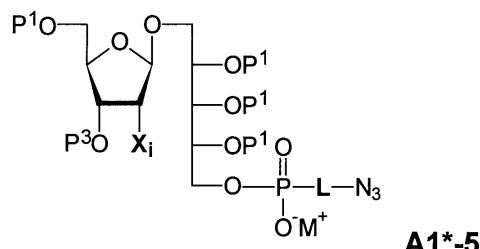
【0142】

式中、Lはリンカーであり、上記と同義であり、

X_iはX₁、X₂、X₃、X₄、X₅又はX₆を表し、P¹及びP³は、-O-に結合したときにX_iと同一ではない保護基である、

【0143】

【化63】



30

【0144】

式中、Lはリンカーであり、上記と同義であり、

X_iはX₁、X₂、X₃、X₄、X₅又はX₆を表し、P¹及びP³は、-O-に結合したときにX_iと同一ではない保護基である、

i i) A1*-4又はA1*-5からP³基を除去する

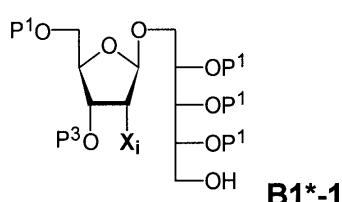
i i i) 工程i i) の後に、得られた化合物のリボースのC-3位にリン酸水素基を導入する

40

i v) 工程i i i) の後に得られた化合物を構成要素B1*-1とカップリングさせる

【0145】

【化64】



50

【 0 1 4 6 】

式中、 X_i は X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^3 は、-O- に結合したときに X_i と同一ではない保護基である

v) 工程 i^* の出発構成要素 $A_1^* - 4$ 又は $A_1^* - 5$ の代わりに工程 i^v) の後に得られる化合物を使用することにより工程 i^* ~ i^v) を t 回任意に繰り返し、式中 t は 0 ~ 20 の整数である、

v i) 式 (I) の化合物を得るために、P¹ 及び P³ 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換する。

〔 0 1 4 7 〕

工程 v i)において、P¹ 及び P³ 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換することは、段階的に実施することができるが、同じ反応条件下で同時にを行うのが好ましい。

半反復単位 $C_1^{*} - 1$ は、上記合成方法 B における工程 v_j の後に終了構成要素として使用することができ、次いで、工程 v_i の代わりに以下の工程 $v_{i+1} \dots v_{i+x}$ を実施することができる：

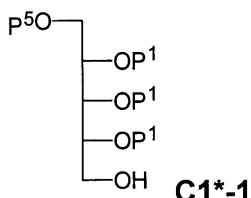
v i ') 工程 v) の後、得られた化合物から P^{31} 保護基を除去する、

v i i ' ') 工程 v i ' ') の後、得られた化合物のリボースの C - 3 位にリン酸水素基を導入する、

工程の後に得られた化食物を $C_1 \cdots 1$ とカップリングする

[0 1 4 8]

【化 6 5】



【 0 1 4 9 】

式中、 P^1 及び P^5 は保護基である、

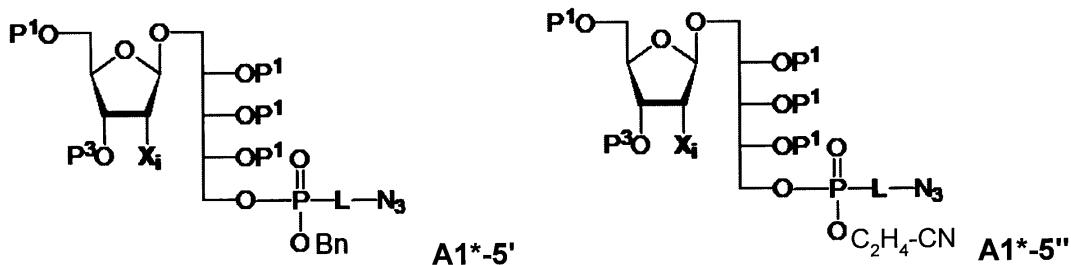
式(Ⅰ)の化合物を得るために、P¹及びP⁵保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換する。

[0 1 5 0]

合成方法Bの工程*i* (i) 及び*v* (i')において、工程*i* (i) 又は工程*v* (i')の後に得られる化合物のリボースのC-3位にリン酸水素基の代わりにホスホルアミダイト基を導入することもできる。出発構成要素A1^{*}-5はその後A1^{*}-5'又はA1^{*}-5'に置き換えられる。

(0 1 5 1)

【化 6.6】

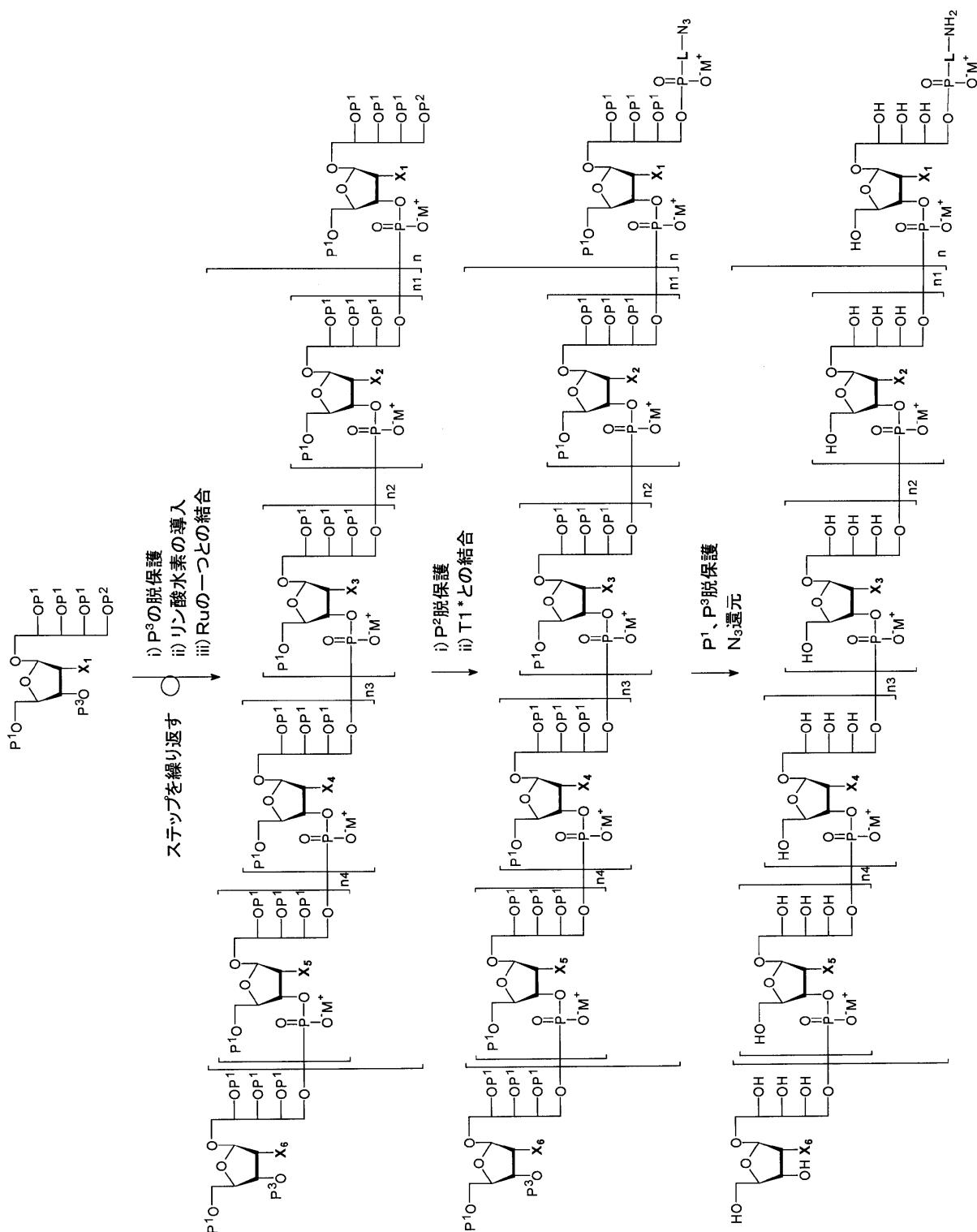


【 0 1 5 2 】

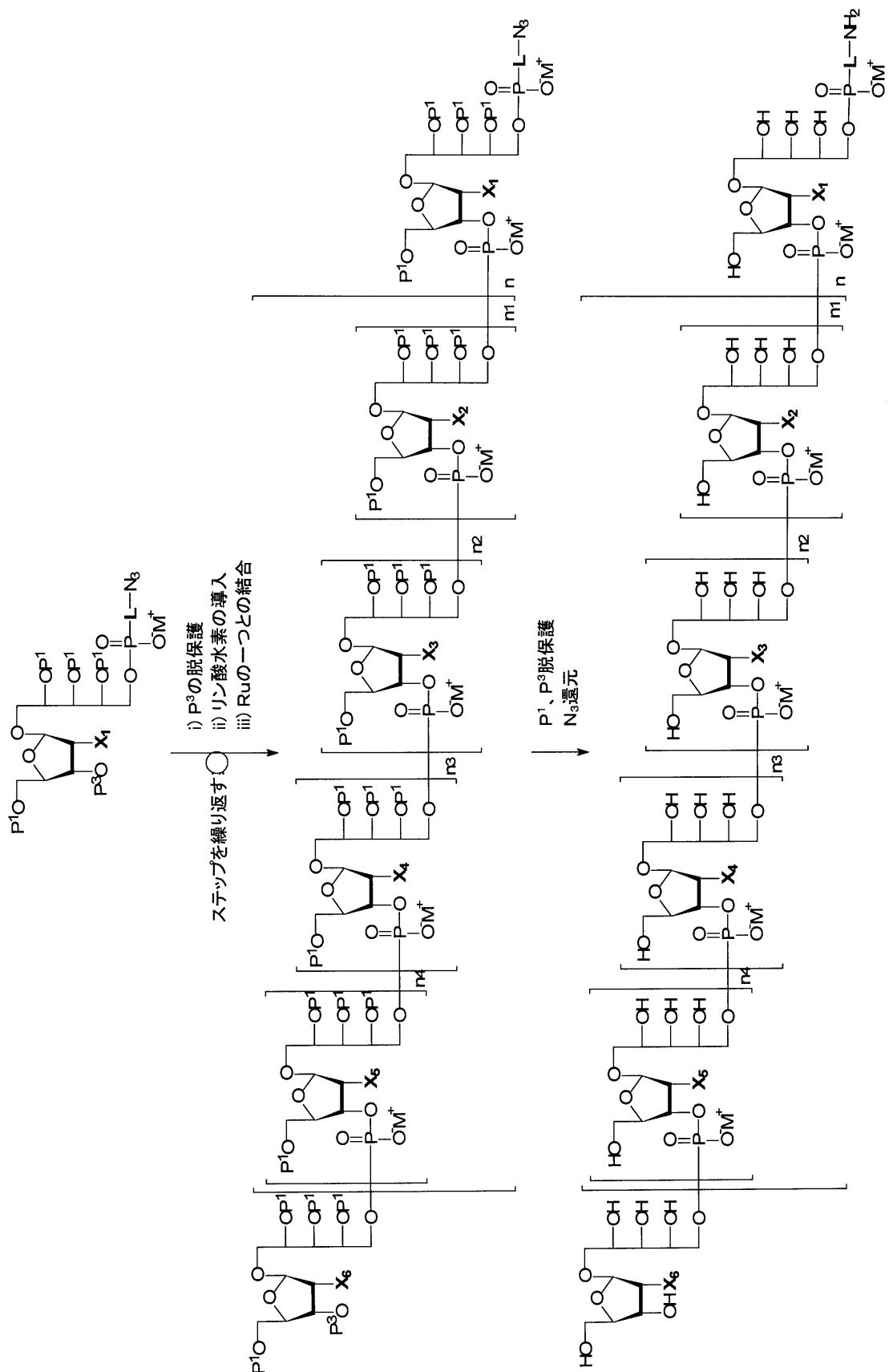
スキーム 1 . 合成方法 A による H i b 荧膜オリゴ糖類誘導体の合成

【 0 1 5 3 】

【化 6 7】



【化 6 8】

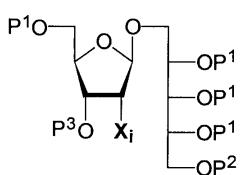
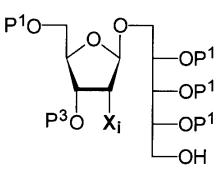
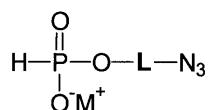
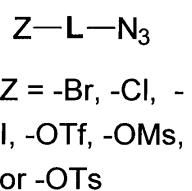


【0156】

本発明の実施形態では、以下の構成要素 A₁^{*} - 3、B₁^{*} - 1 及び T₁^{*} 又は T₃^{*} を本発明の糖類の合成に使用することができる（スキーム 1）。

【0157】

【化69】

A1*-3**B1*-1****T1*****T3***

【0158】

出発構成要素として、A1*-3を使用することができる。

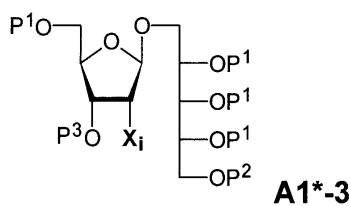
10

合成方法Cは以下の工程を含む：

i) 出発構成要素A1*-3を準備する

【0159】

【化70】



20

【0160】

式中、 X_i は X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 、 P^2 及び P^3 は、-O-に結合したときに X_i と同一ではない保護基である。i i) A1*-3から P^3 基を除去する、

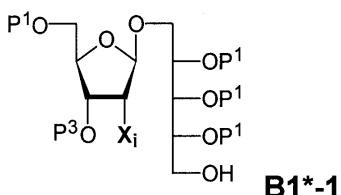
i i i) 工程i i)の後に、得られた化合物のリボースのC-3位にリン酸水素基を導入する、

i v) 工程i i i)の後に、得られた化合物を構成要素B1*-1とカップリングさせる、

【0161】

【化71】

30



【0162】

式中、 X_i は X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^3 は、-O-に結合したときに X_i と同一ではない保護基である。

v) 工程i)の出発構成要素A1*-3の代わりに工程i v)の後に得られる化合物を使用することにより工程i)~i v)をt回任意に繰り返し、式中tは0~20の整数である、

v i) 工程v)の後、得られた化合物から P^3 保護基を除去する、

v i i) 工程v i)の後に得られた化合物を化合物T1*又はT3*とカップリングさせる、

v i i i) 式(I)の化合物を得るために、 P^1 及び P^2 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換する。

【0163】

工程v i i i)において、 P^1 及び P^3 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換することは、段階的に実施することができるが、同じ反応条件下で同時に進行るのが好ましい

40

50

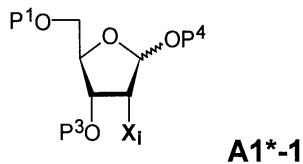
。

【0164】

半反復単位 $A1^* - 1$ は出発構成要素として使用することができる。

【0165】

【化72】



10

【0166】

上記合成方法Cにおける工程i)の $A1^* - 3$ の代わりに、次いで P^4 保護基を除去する工程が工程viii)に加えられる。

半反復単位 $C1^* - 1$ は、上記合成方法Cにおける工程v)の後に終了構成要素として使用することができ、次いで、工程vii) ~ viii)の代わりに以下の工程viii') - xii')を実施することができる：

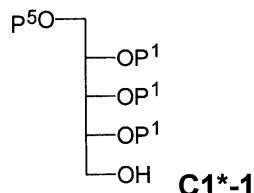
viii')工程v)の後、得られた化合物から P^3 保護基を除去する、

viii')工程vii')の後、得られた化合物のリボースのC-3位にリン酸水素基を導入する、

vii')工程vii')の後に得られた化合物を $C1^* - 1$ とカップリングする、

【0167】

【化73】



【0168】

式中、 P^1 及び P^5 は保護基である、

30

xii')工程viii')の後、得られた化合物から P^5 保護基を除去する、

xii')工程xi')の後、得られた化合物を化合物T1*又はT3*カップリングさせる、

xii')式(I)の化合物を得るために、 P^1 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換する。

【0169】

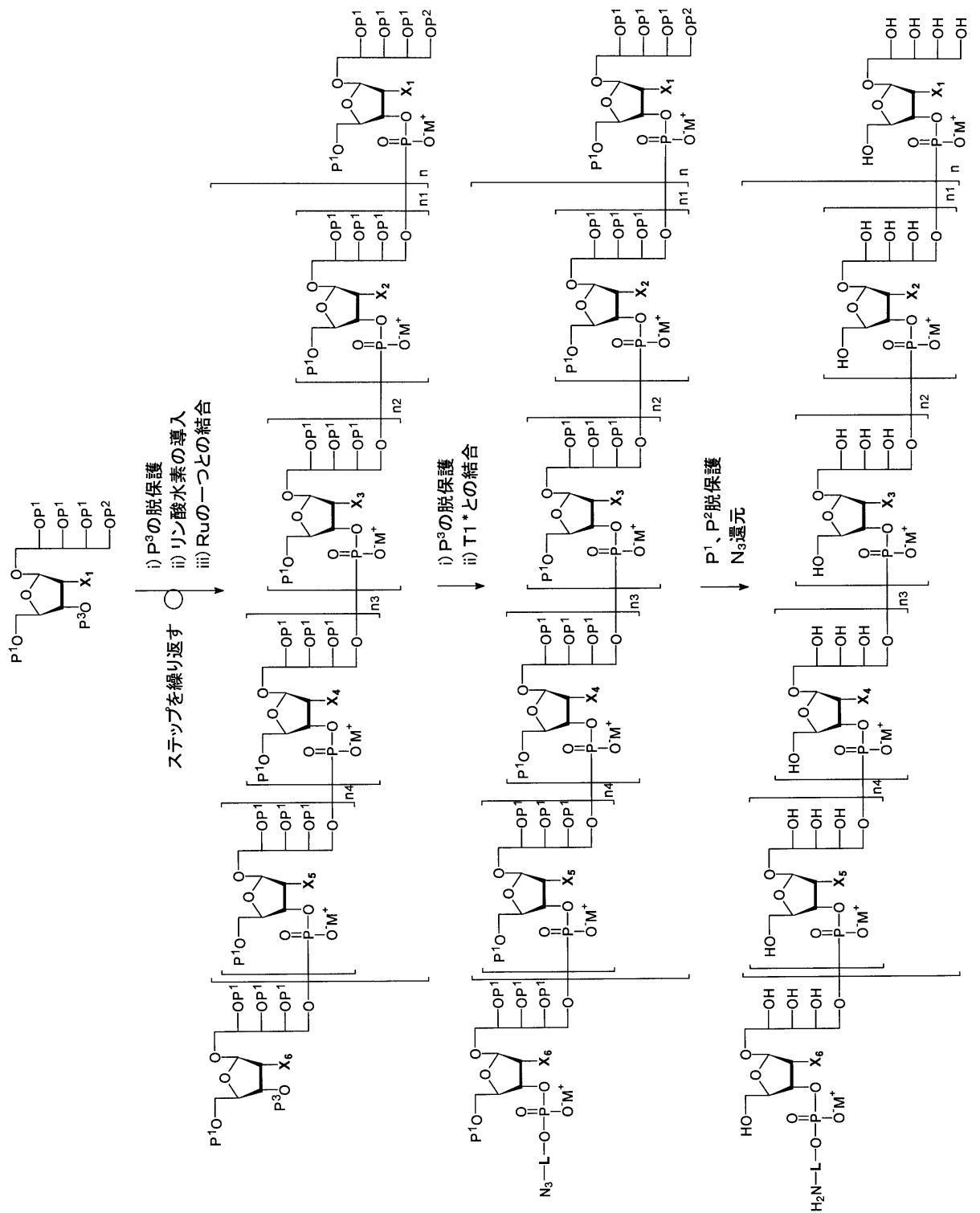
合成方法Cの工程viii)及びvii')において、工程ii)又は工程viii')の後に得られる化合物のリボースのC-3位にリン酸水素基の代わりにホスホルアミダイト基を導入することもできる。その後、T1*は、ビス(ジイソプロピルアミノ)ベンジルオキシホスフィンとHO-L-N3に置き換えられる。

40

スキーム3. 合成方法CによるHib荧膜オリゴ糖類誘導体の合成

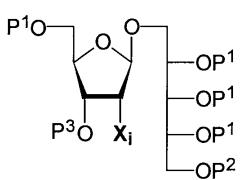
【0170】

【化74】

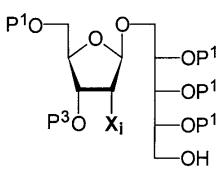


【化75】

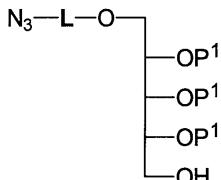
A1*-3



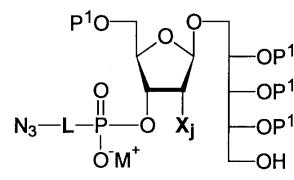
B1*-1



C1*-2



C1*-3



【0173】

出発構成要素として、A1*-3を使用することができる。

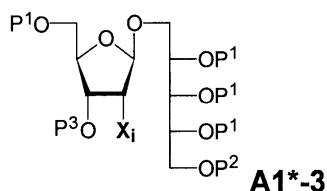
10

合成方法Dは以下の工程を含む：

i) 出発構成要素A1*-3を準備する、

【0174】

【化76】



20

【0175】

式中、Lはリンカーであり、上記と同義であり、

X_iはX₁、X₂、X₃、X₄、X₅又はX₆を表し、P¹、P²及びP³は、-O-に結合したときにX_iと同一ではない保護基である、

i i) A1*-3からP³基を除去する、

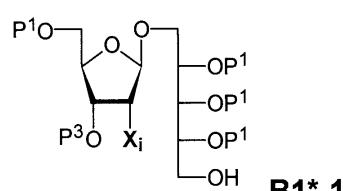
i i i) 工程i i)の後に、得られた化合物のリボースのC-3位にリン酸水素基を導入する、

i v) 工程i i i)の後に、得られた化合物を構成要素B1*-1とカップリングさせる、

30

【0176】

【化77】



【0177】

式中、X_iはX₁、X₂、X₃、X₄、X₅又はX₆を表し、P¹及びP³は、-O-に結合したときにX_iと同一ではない保護基である

40

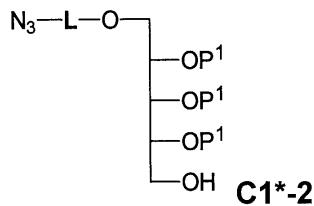
v) 工程i)の出発構成要素A1*-3の代わりに工程i v)の後に得られる化合物を使用することにより工程i)～i v)をt回任意に繰り返し、式中tは0～20の整数である、

v i) 工程v)の後に得られた化合物からP³基を除去する

v i i) 工程v i)の後に得られた化合物を構成要素C1*-2又はC1*-3とカップリングさせる

【0178】

【化 7 8】

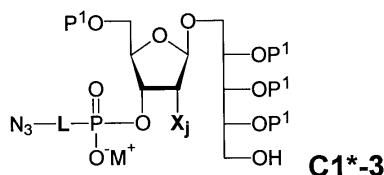


【 0 1 7 9 】

式中、 P^1 は保護基である、

【 0 1 8 0 】

【化 7 9 】



【 0 1 8 1 】

式中、 X_j は、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 は、-O- に結合したときに X_j と同一ではない保護基である。

v i i i) 式 (I) の化合物を得るために、P¹ 及び P² 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換する。 20

〔 0 1 8 2 〕

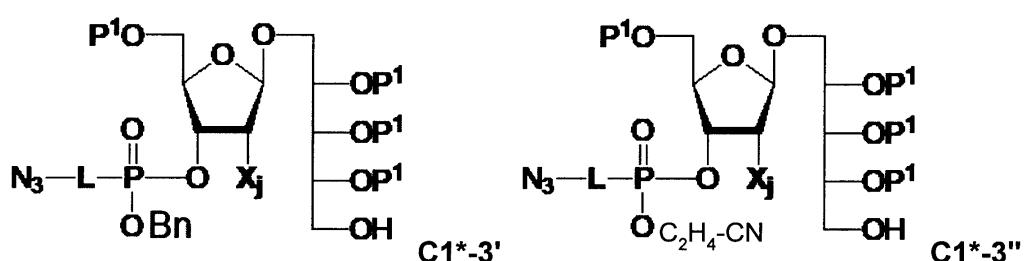
工程 v i i i)において、P¹ 及び P² 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換することは、段階的に実施することができるが、同じ反応条件下で同時に行うのが好ましい。

[0 1 8 3]

工程 i i i) では、工程 i i) の後に、得られた化合物のリボースの C - 3 位にリン酸水素基の代わりにホスホルアミダイト基を導入することもできる。開始構成要素 C 1 * - 3 は次いで C 1 * - 3 ' 又は C 1 * - 3 ' ' で置き換える。

【 0 1 8 4 】

【化 8 0 】

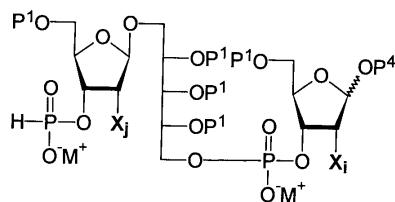


〔 0 1 8 5 〕

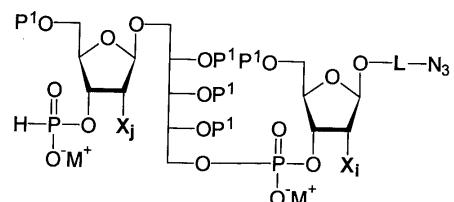
本発明の一実施形態において、2つの繰り返し単位からなる以下の構成要素は、[2 + 40
2]合成アプローチによる本発明の糖類の合成に有用である。

〔 0 1 8 6 〕

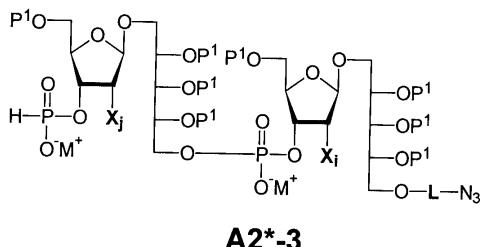
【化 8 1】



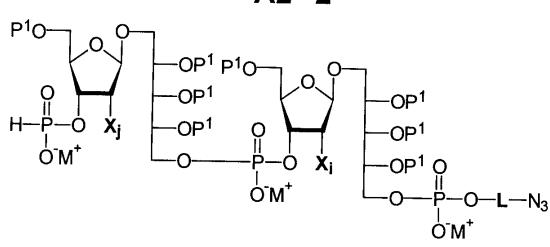
A2*-1



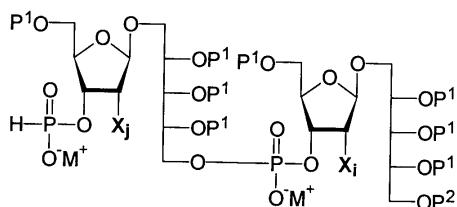
A2*-2



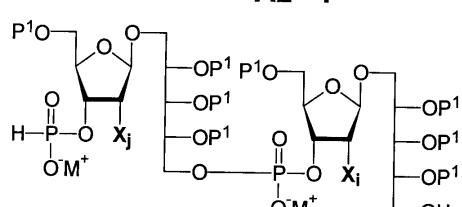
A2*-3



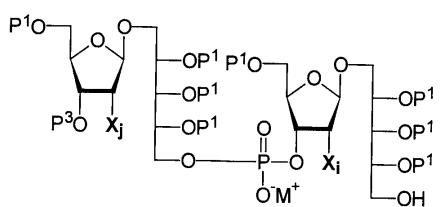
A2*-4



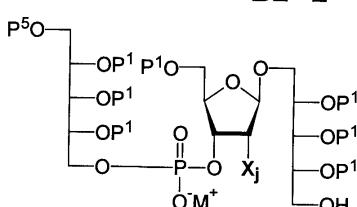
B2*-1



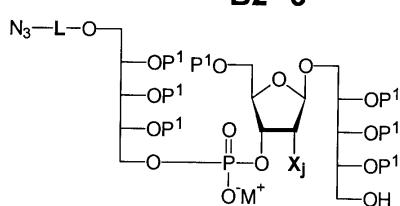
B2*-2



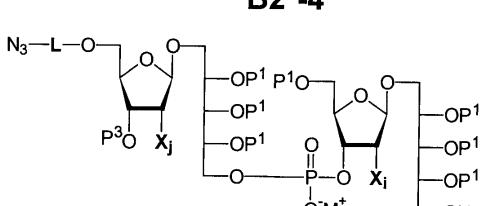
B2*-3



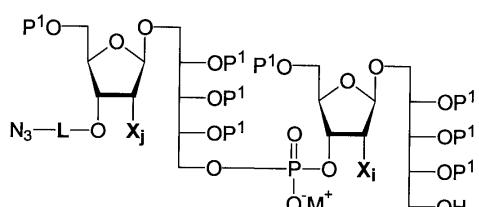
B2*-4



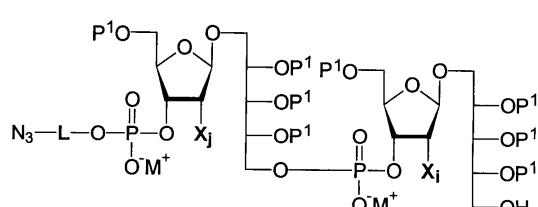
C2*-1



C2*-2



C2*-3



C2*-4

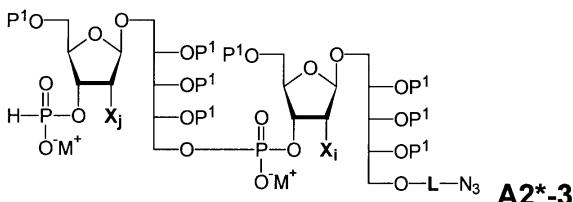
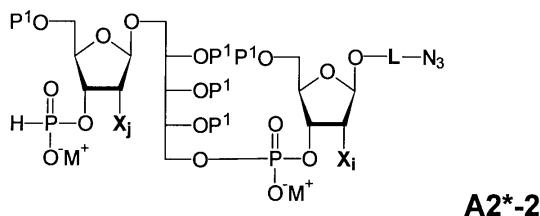
【0187】

合成方法 E - 1 は以下の工程を含む (スキーム 4) :

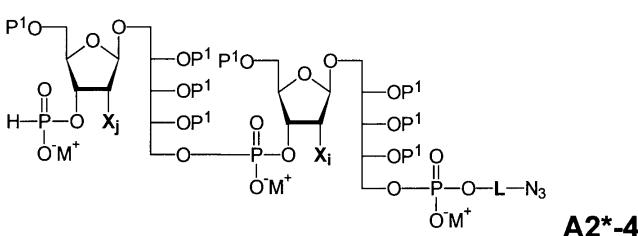
i) A2*-2、A2*-3、又は A2*-4 から選択された出発構成要素を準備する

【0188】

【化 8 2】



10



20

【0 1 8 9】

式中、Lはリンカーであり、上記と同義であり、

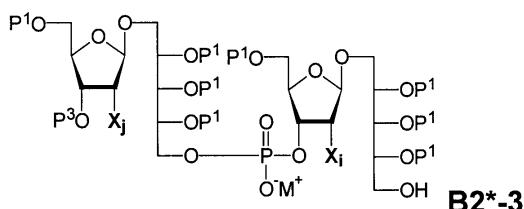
X_i及びX_jは互いに独立してX₁、X₂、X₃、X₄、X₅又はX₆を表し、P¹は、

-O-に結合したときにX_i及びX_jと同一ではない保護基を表し、

i i)構成要素B2*-3をA2*-2、A2*-3、又はA2*-4から選択される出発構成要素とカップリングさせる、

【0 1 9 0】

【化 8 3】



30

【0 1 9 1】

式中、X_i及びX_jは互いに独立してX₁、X₂、X₃、X₄、X₅又はX₆を表し、P¹及びP³は、-O-に結合したときにX_i及びX_jと同一ではない保護基であり、

i i i)工程i i i)の後に得られた化合物からP³基を除去する、

i v)工程i i i)の後、得られた化合物のリボースのC-3位にリン酸水素を導入する、

40

v)工程i)の出発構成要素の代わりに工程i v)の後に得られる化合物を使用することにより工程i)～i v)をt回任意に繰り返し、式中tは0～10の整数である、

v i)工程v)の後に得られた化合物からP¹及びP³保護基を除去し、式(I)の化合物を得るためにアジド基をアミン基に変換する。

【0 1 9 2】

工程v i)において、P¹及びP³保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換することは、段階的に実施することができるが、同じ反応条件下で同時にを行うのが好ましい。

合成方法E-1の工程v)の後、さらなる構成要素B2*-4を、工程v)の後に得ら

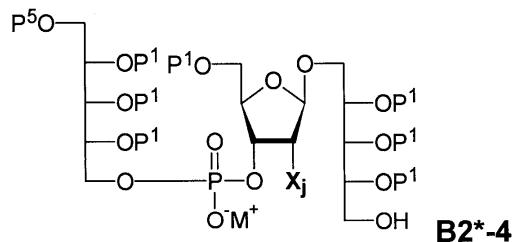
50

れた化合物と代替でカップリングさせることができる。この場合、合成方法 E - 1 は、工程 v i) の代わりに以下の工程を含む：

v i ') 工程 v) の後に得られた化合物を構成要素 B 2 * - 4 とカップリングさせる、

【 0 1 9 3 】

【 化 8 4 】



10

【 0 1 9 4 】

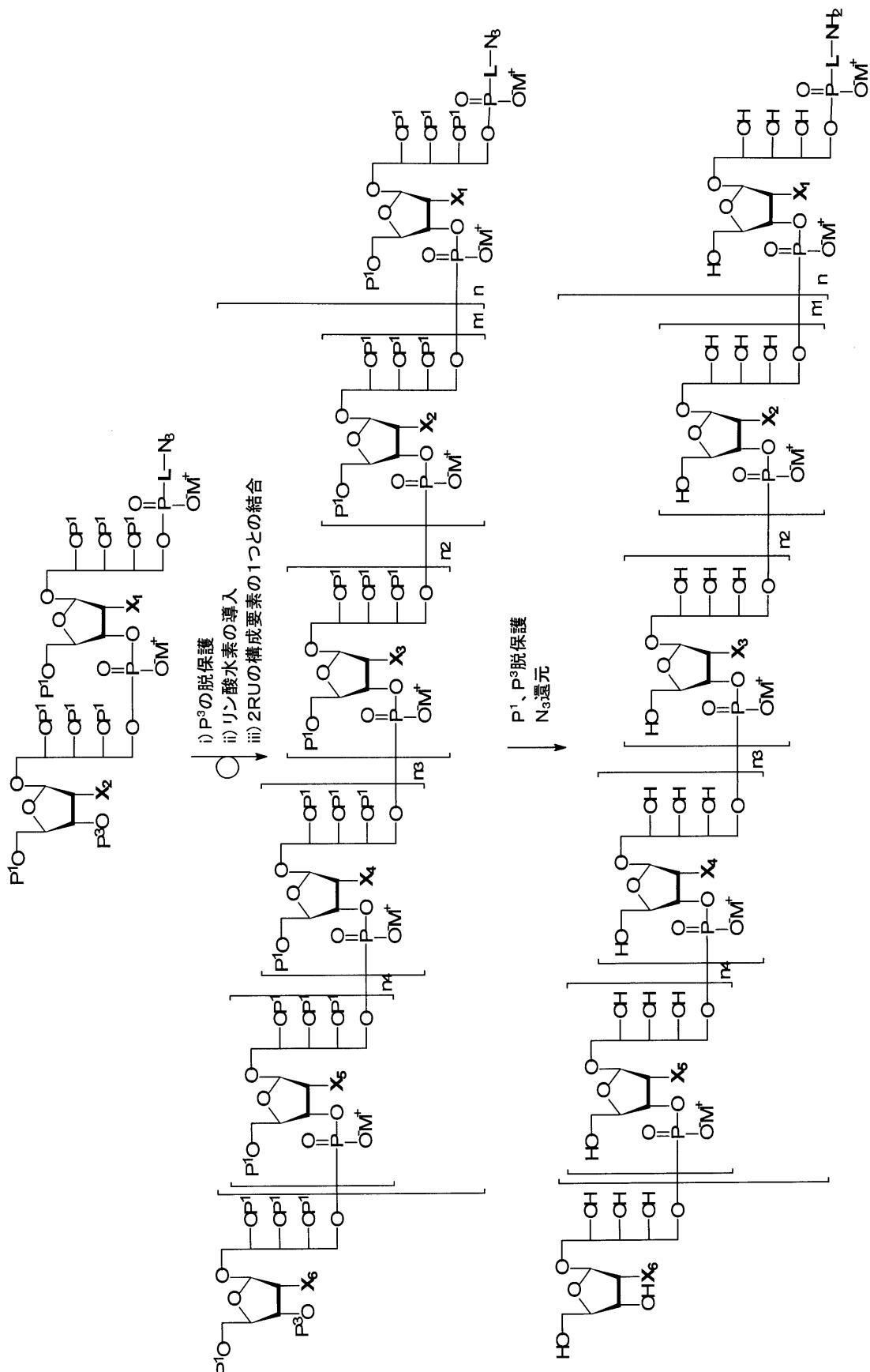
式中、 X_j は、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^5 は、-O- に結合したときに X_j と同一ではない保護基である、

v i i ') 工程 v i ') の後に得られた化合物から P^1 及び P^5 保護基を除去し、式 (I) の化合物を得るためにアジド基をアミン基に変換する。

スキーム 4 . 方法 E - 1 による Hib 苺膜オリゴ糖類誘導体の合成

【 0 1 9 5 】

【化 8 5】



【0196】

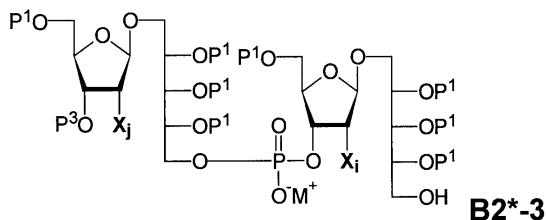
もちろん、B2*-3又はB2*-4を出発構成要素として使用することができる。この場合、代替合成方法E-2は以下の工程を含む：

i) B2*-3又はB2*-4から選択される出発構成要素を準備する、

50

【0197】

【化86】

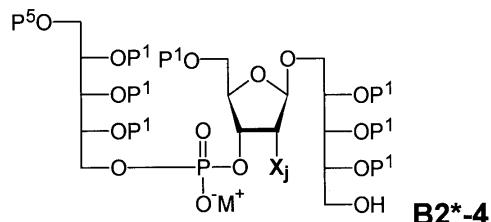


【0198】

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^3 は、-O- に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基であり、

【0199】

【化87】



20

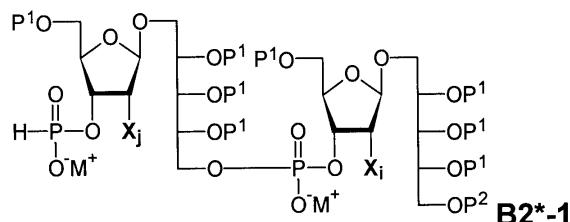
【0200】

式中、 X_j は X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^5 は、-O- に結合したときに X_j と同一ではない保護基である、

i i) 構成要素 B2*-1 を B2*-3 又は B2*-4 から選択される出発構成要素とカップリングさせる、

【0201】

【化88】



30

【0202】

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^2 は、-O- に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基であり、

i i i) 工程 i i) の後に、得られた化合物から P^2 保護基を除去する、

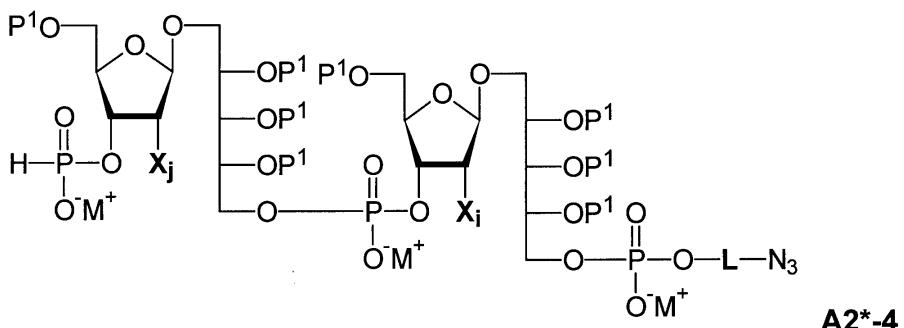
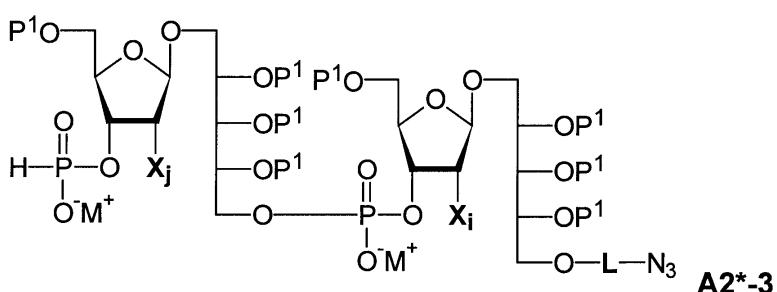
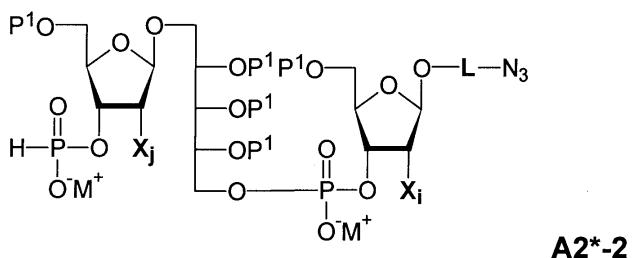
i v) 工程 i) の出発構成要素の代わりに工程 i i i) の後に得られる化合物を使用することにより工程 i) ~ i i i) を t 回任意に繰り返し、式中 t は 0 ~ 10 の整数である、

v) 工程 i v) の後に得られた化合物を、A2*-2、A2*-3、又は A2*-4 から選択される構成要素とカップリングさせる、

【0203】

40

【化 8 9】



【0204】

式中、Lはリンカーであり、上記と同義であり、

X_i及びX_jは互いに独立してX₁、X₂、X₃、X₄、X₅又はX₆を表し、P¹は、-O-に結合したときにX_i及び/又はX_jと同一ではない保護基を表す、
v i) 工程v i) の後に得られた化合物からP¹、P³及びP⁵保護基を除去し、式(I)の化合物を得るためにアジド基をアミン基に変換する。

【0205】

工程v i)において、P¹、P³及びP⁵保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換することは、段階的に実施することができるが、同じ反応条件下で同時にを行うのが好ましい。

【0206】

代替合成方法E-3は、ホスホネート化学現象の代わりにホスホルアミダイトが使用されるという点で合成方法E-1とは異なる。したがって、合成方法E-3は以下の工程を含む：

i) A2*-2'、A2*-3'、又はA2*-4'から選択された出発構成要素を準備する、

【0207】

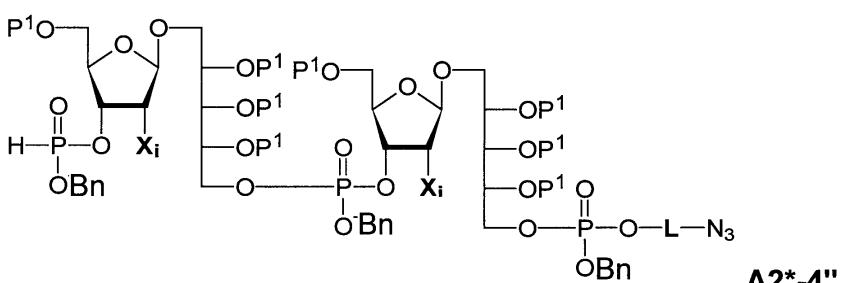
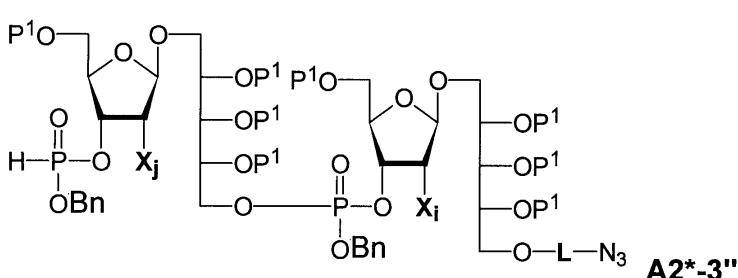
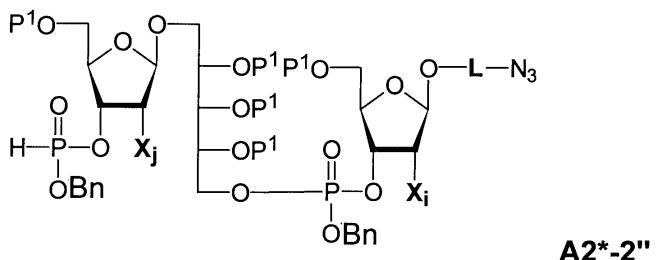
10

20

30

40

【化90】

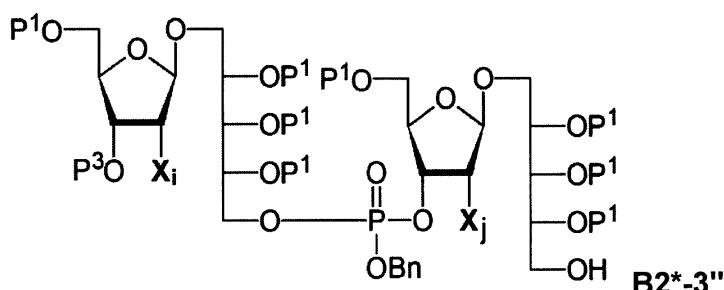


【0208】

式中、Lはリンカーであり、上記と同義であり、
 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 は、
 $-O-$ に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基を表し、
i i)構成要素B2*-3'をA2*-2'、A2*-3'、又はA2*-4'から選択される出発構成要素とカップリングさせる、

【0209】

【化91】



【0210】

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^3 は、 $-O-$ に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基であり、
i i i)工程i i i)の後に得られた化合物から P^3 基を除去する、
i v)工程i i i)の後、得られた化合物のリボースのC-3位にホスホアミダイト基を導入する、
v)工程i)の出発構成要素の代わりに工程i v)の後に得られる化合物を使用することにより工程i)～i v)をt回任意に繰り返し、式中tは0～10の整数である、

10

20

30

40

50

v i) 工程 v) の後に得られた化合物から P¹ 及び P³ 保護基を除去し、式 (I) の化合物を得るためにアジド基をアミン基に変換する。

【 0 2 1 1 】

工程 v i) において、P¹ 及び P³ 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換することは、段階的に実施することができるが、同じ反応条件下で同時にを行うのが好ましい。

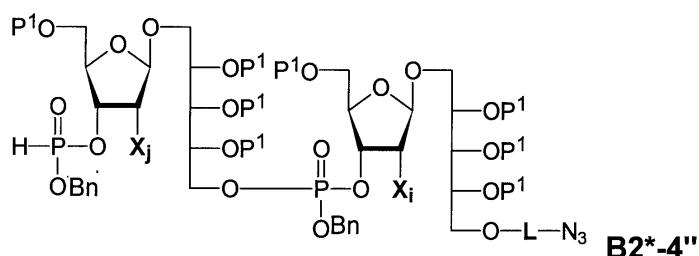
合成方法 E - 3 の工程 v) の後、さらなる構成要素 B 2^{*} - 4^{''} を、工程 v) の後に得られた化合物と代替でカップリングさせることができる。この場合、合成方法 E - 3 は、工程 v i) の代わりに以下の工程を含む：

v i ') 工程 v) の後に得られた化合物を構成要素 B 2^{*} - 4^{''} とカップリングさせる、

10

【 0 2 1 2 】

【 化 9 2 】



20

【 0 2 1 3 】

式中、X_j は、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅ 又は X₆ を表し、P¹ 及び P⁵ は、-O- に結合したときに X_j と同一ではない保護基である、

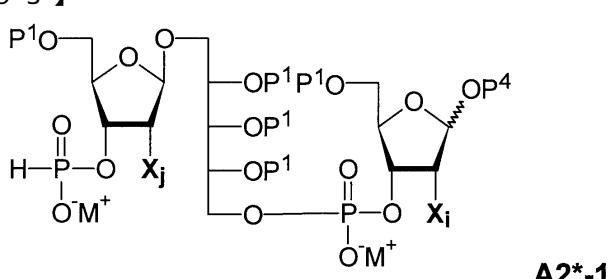
v i i ') 工程 v i ') の後に得られた化合物から P¹ 及び P⁵ 保護基を除去し、式 (I) の化合物を得るためにアジド基をアミン基に変換する。

合成方法 F - 1 は以下の工程を含む (スキーム 5) :

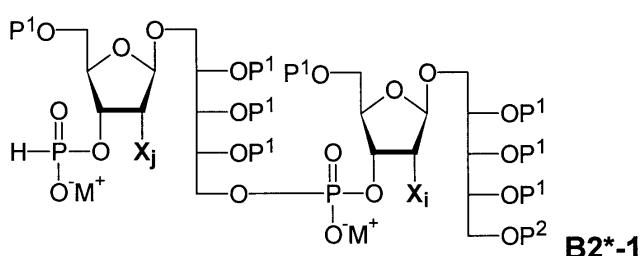
i) A 2^{*} - 1 又は B 2^{*} - 1 から選択された出発構成要素を準備する、

【 0 2 1 4 】

【 化 9 3 】



30



40

【 0 2 1 5 】

式中、X_i 及び X_j は互いに独立して X₁、X₂、X₃、X₄、X₅ 又は X₆ を表し、P¹、P² 及び P⁴ は、-O- に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基を表し、

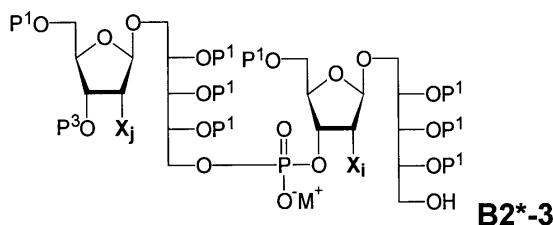
i i) 構成要素 B 2^{*} - 3 を A 2^{*} - 1 又は B 2^{*} - 1 から選択される出発構成要素と力

50

ツプリングさせる、

【0216】

【化94】



10

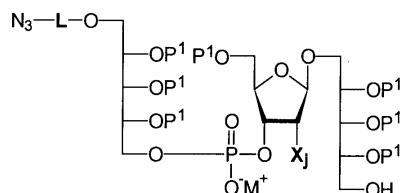
【0217】

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^3 は、-O- に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基であり、
 i i i) 工程 i i) の後に得られた化合物から P^3 基を除去する、
 i v) 工程 i i i) の後、得られた化合物のリボースの C - 3 位にリン酸水素を導入する、
 v) 工程 i) の出発構成要素の代わりに工程 i i i) の後に得られる化合物を使用することにより工程 i) ~ i v) を t 回任意に繰り返し、式中 t は 0 ~ 10 の整数である、
 v i) $C2^* - 1$ 、 $C2^* - 2$ 、 $C2^* - 3$ 又は $C2^* - 4$ から選択される構成要素を結合し、

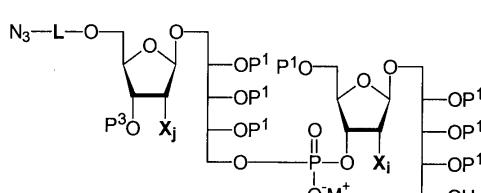
20

【0218】

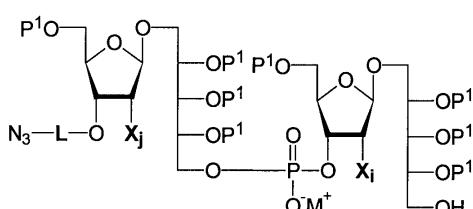
【化95】



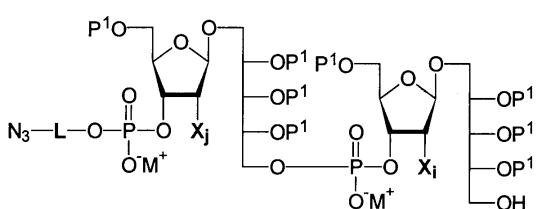
C2*-1



C2*-2



C2*-3



C2*-4

30

【0219】

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^3 は、-O- に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基である、
 v i i) 工程 v i) の後に得られた化合物から P^1 、 P^2 、 P^3 及び P^4 保護基を除去し、式 (I) の化合物を得るためにアジド基をアミン基に変換する。

40

【0220】

工程 v i i) において、 P^1 、 P^2 、 P^3 及び P^4 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換することは、段階的に実施することができるが、同じ反応条件下で同時に進行のが好ましい。

【0221】

もちろん、 $C2^* - 1$ 、 $C2^* - 2$ 、 $C2^* - 3$ 、又は $C2^* - 4$ を出発構成要素として使用できる。この場合、代替合成方法 F - 2 は以下の工程を含む：

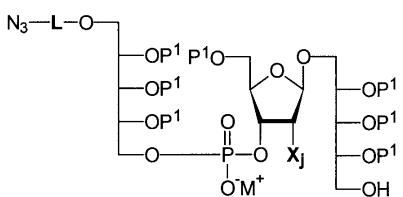
i) $C2^* - 1$ 、 $C2^* - 2$ 、 $C2^* - 3$ 、又は $C2^* - 4$ から選択された出発構成要素

50

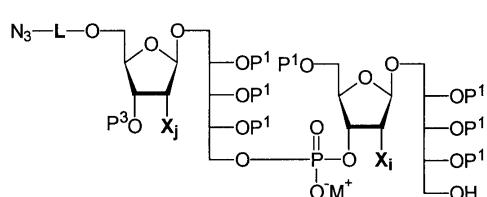
を準備する、

【0222】

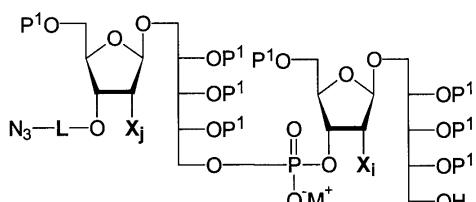
【化96】



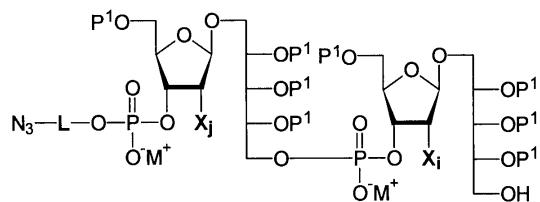
C2*-1



C2*-2



C2*-3



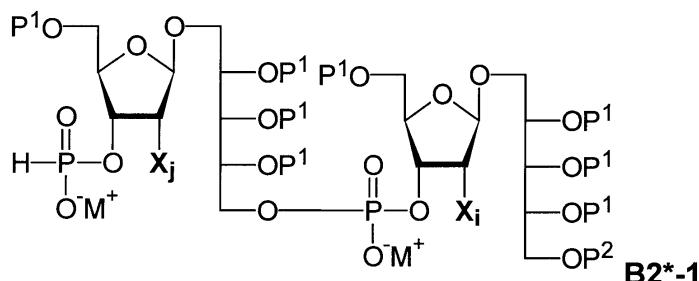
C2*-4

【0223】

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^3 は、-O- に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基であり、
i i) 構成要素 B2*-1 を C2*-1、C2*-2、C2*-3、又は C2*-4 から選択される出発構成要素とカップリングさせる、

【0224】

【化97】



【0225】

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^2 は、-O- に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基であり、
i i i) 工程 i i) の後に、得られた化合物から P^2 保護基を除去する、
i v) 工程 i) の出発構成要素の代わりに工程 i i i) の後に得られる化合物を使用することにより工程 i) ~ i i i) を t 回任意に繰り返し、式中 t は 0 ~ 10 の整数である、
v) A2*-1 又は B2*-1 から選択される出発構成要素とカップリングさせる、

【0226】

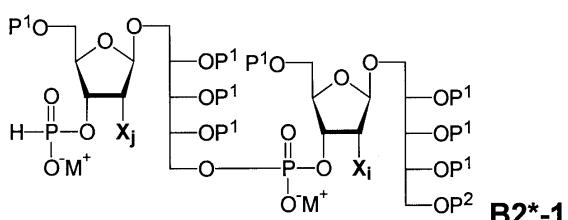
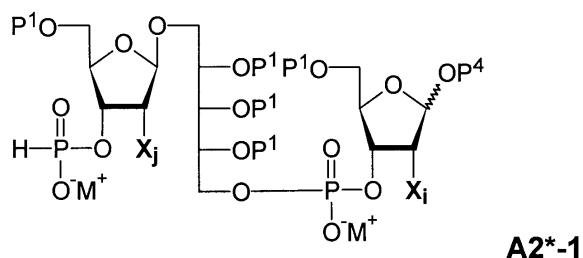
10

20

30

40

【化98】



10

【0227】

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 、 P^2 及び P^4 は、-O- に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基を表す、

20

v i) 工程 v) の後に得られた化合物から P^1 、 P^2 、 P^3 及び P^4 保護基を除去し、式 (I) の化合物を得るためにアジド基をアミン基に変換する。

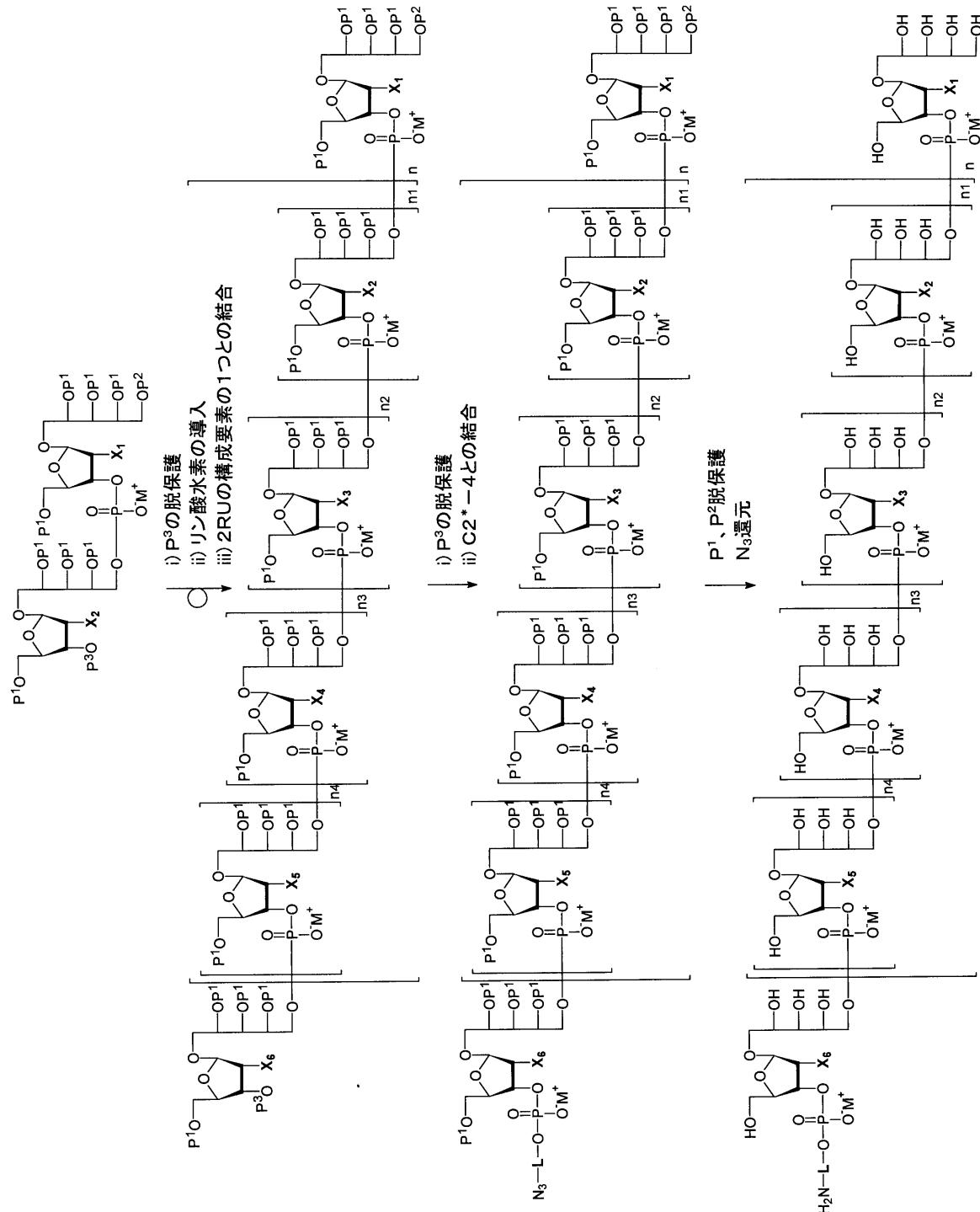
【0228】

工程 v i) において、 P^1 、 P^2 、 P^3 及び P^4 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換することは、段階的に実施することができるが、同じ反応条件下で同時にを行うのが好ましい。

スキーム5. 方法F-1によるHib 英膜オリゴ糖類誘導体の合成

【0229】

【化99】

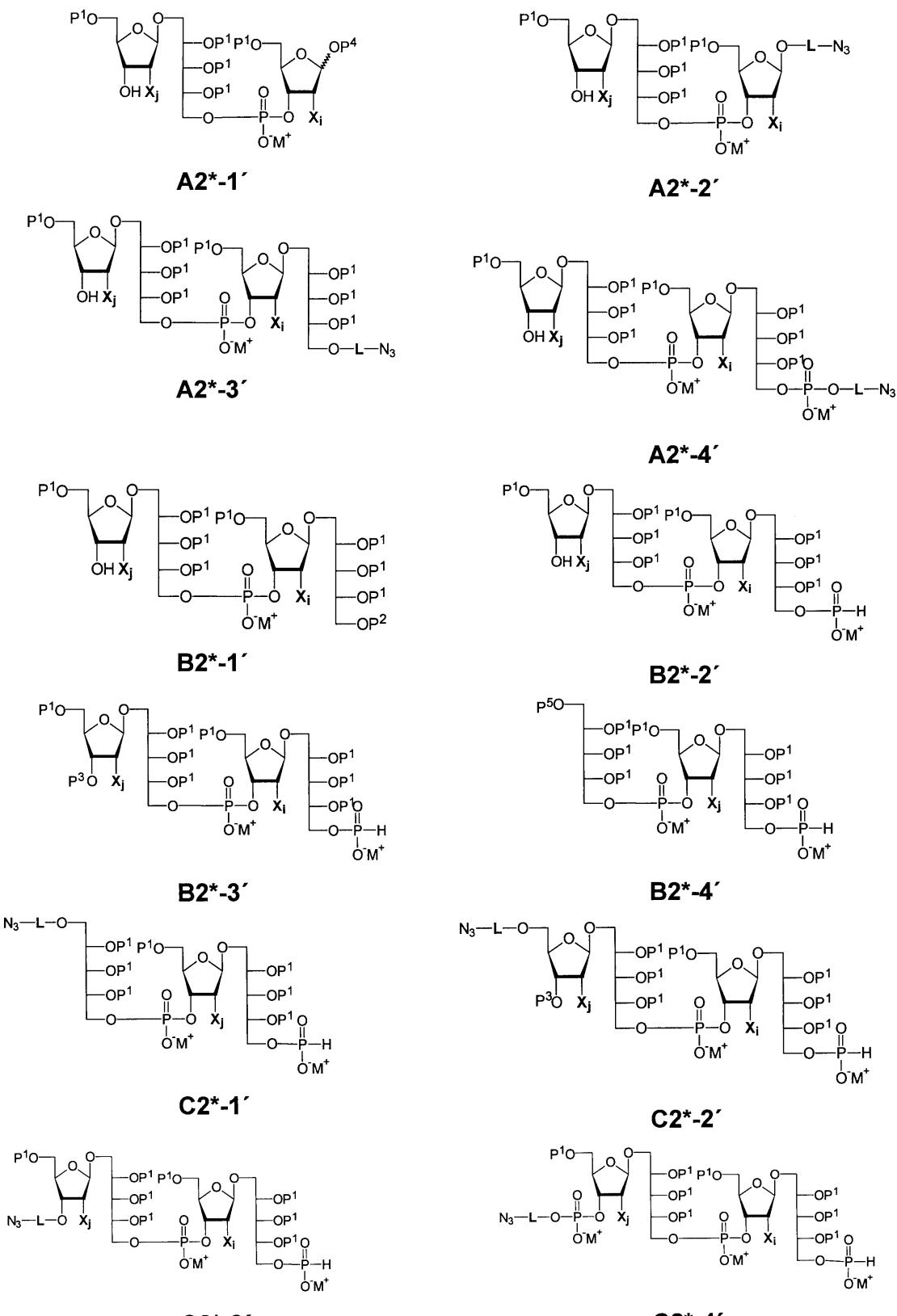


【0230】

さらに、2つの繰り返し単位からなる以下の構成要素は、[2+2]合成アプローチによる本発明の糖類の合成に有用である。

【0231】

【化100】



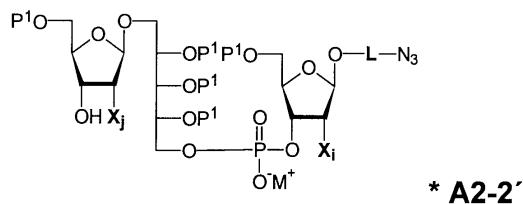
【0232】

合成方法G-1は以下の工程を含む：

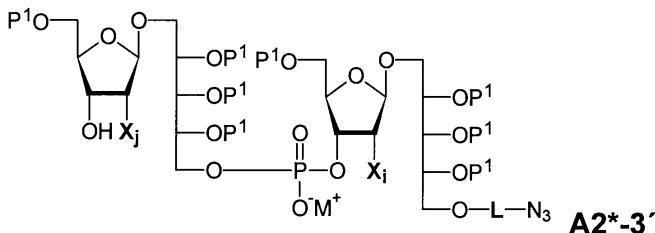
i) A2*-2'、A2*-3'、又はA2*-4'から選択された出発構成要素を準備する。

【0233】

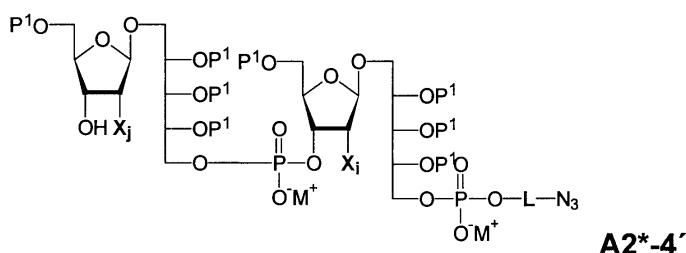
【化 1 0 1 】



* A2-2



10



20

【 0 2 3 4 】

式中、 \sqsubset はリンカーであり、上記と同義であり、

X_i 及び X_j は互いに独立して X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 又は X_6 を表し、 P^1 は、

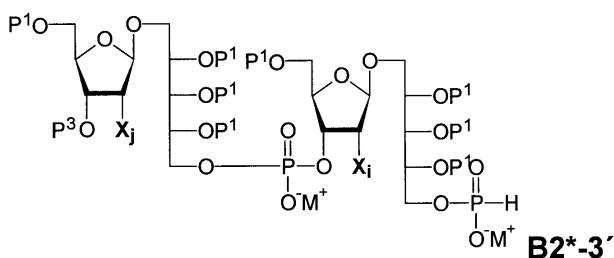
- O - に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基を表し、

i i) 構成要素 B 2 * - 3 ' を A 2 * - 2 ' 、 A 2 * - 3 ' 、又は A 2 * - 4 ' から選択される出発構成要素とカップリングさせる、

【 0 2 3 5 】

30

【化 1 0 2 】



[0 2 3 6]

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^3 は、-O- に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基であり、

i i i) 工程 i i) の後に、得られた化合物から P^3 基を除去する、

i v) 工程 i) の出発構成要素の代わりに工程 i i i) の後に得られる化合物を使用する

ことにより工程 i) ~ i i i) を t 回任意に繰り返し、式中 t は 0 ~ 10 の整数である、 v) 工程 i v) の後に得られた化合物から P¹ 及び P³ 保護基を除去し、式 (I) の化合物を得るためにアジド基をアミン基に変換する。

【 0 2 3 7 】

工程 v)において、P¹ 及び P³ 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換することは、段階的に実施することができるが、同じ反応条件下で同時に行うのが好ましい。

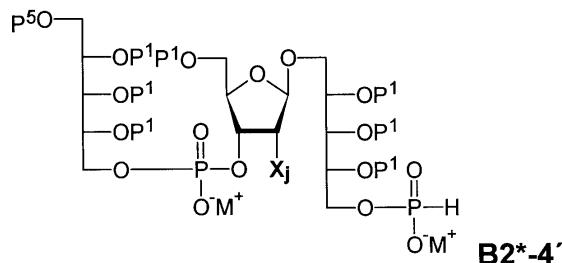
合成方法 G - 1 の工程 $i \leq v$) の後、さらなる構成要素 $B_2 \dots B_4$ を、工程 v) の後に

得られた化合物と代替でカップリングさせることができる。この場合、合成方法 G - 1 は、工程 v i) の代わりに以下の工程を含む：

v ') 工程 v i) の後に得られた化合物を構成要素 B 2 * - 4 ' とカップリングさせる

【 0 2 3 8 】

【 化 1 0 3 】



10

【 0 2 3 9 】

式中、X_j は、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅ 又はX₆ を表し、P¹ 及びP⁵ は、-O- に結合したときにX_j と同一ではない保護基である、

v i ') 工程 v ') の後に得られた化合物からP¹ 及びP⁵ 保護基を除去し、式 (I) の化合物を得るためにアジド基をアミン基に変換する。

【 0 2 4 0 】

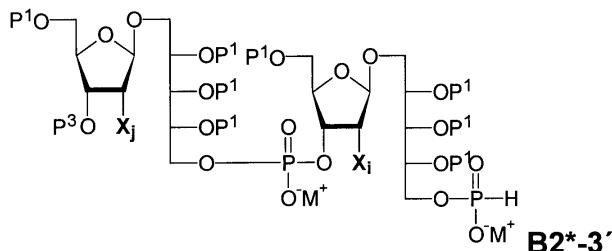
もちろん、B 2 * - 3 ' 又はB 2 * - 4 ' は出発構成要素として使用できる。この場合、代替合成方法 G - 2 は以下の工程を含む：

20

i) B 2 * - 3 ' 又はB 2 * - 4 ' から選択される出発構成要素を準備する、

【 0 2 4 1 】

【 化 1 0 4 】



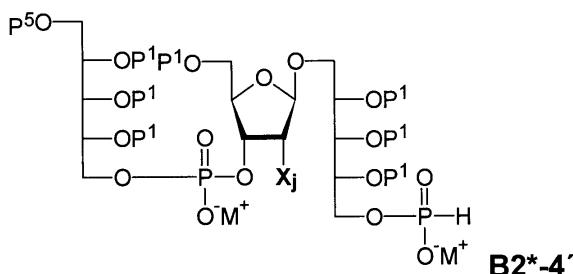
30

【 0 2 4 2 】

式中、X_i 及びX_j は互いに独立してX₁、X₂、X₃、X₄、X₅ 又はX₆ を表し、P¹ 及びP³ は、-O- に結合したときにX_i 及びX_j と同一ではない保護基であり、

【 0 2 4 3 】

【 化 1 0 5 】



40

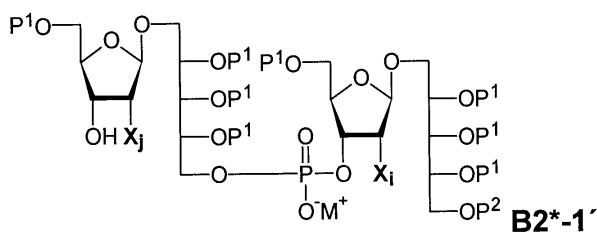
【 0 2 4 4 】

式中、X_j はX₁、X₂、X₃、X₄、X₅ 又はX₆ を表し、P¹ 及びP⁵ は、-O- に結合したときにX_j と同一ではない保護基である、

i i) 構成要素 B 2 * - 1 ' をB 2 * - 3 又はB 2 * - 4 から選択される出発構成要素とカップリングさせる、

【 0 2 4 5 】

【化106】



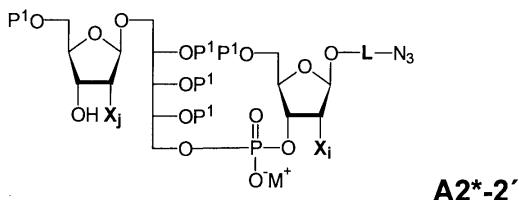
【0246】

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^2 は、-O- に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基であり、
 (i) 工程 (ii) の後に、得られた化合物から P^2 保護基を除去する、
 (iv) 工程 (iii) の後に、得られた化合物のリビトールの C-5 位にリン酸水素を導入する

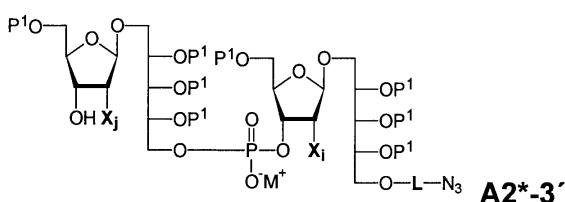
v) 工程 i) の出発構成要素の代わりに工程 iv) の後に得られる化合物を使用することにより工程 i) ~ iv) を t 回任意に繰り返し、式中 t は 0 ~ 10 の整数である、
 vi) 工程 v) の後に得られた化合物を、A2*-2'、A2*-3'、又は A2*-4' から選択される構成要素とカップリングさせる、

【0247】

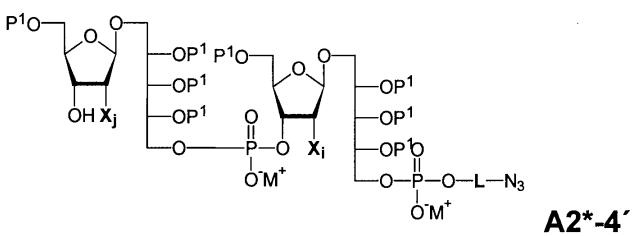
【化107】



20



30



40

【0248】

式中、L はリンカーアジド基であり、上記と同義であり、
 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 は、-O- に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基を表す、
 vi) 工程 vi) の後に得られた化合物から P^1 、 P^3 及び P^5 保護基を除去し、式(I)の化合物を得るためにアジド基をアミン基に変換する。

【0249】

工程 vi) において、 P^1 、 P^3 及び P^5 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換することは、段階的に実施することができるが、同じ反応条件下で同時に進行するのが好ましい。

50

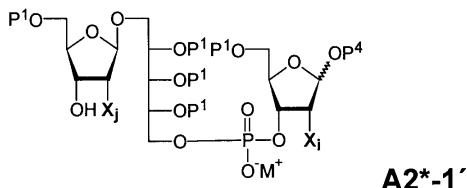
【0250】

合成方法 H - 1 は以下の工程を含む:

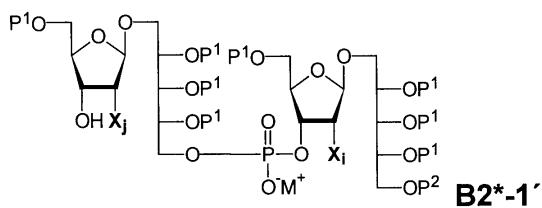
i) A2* - 1' 又は B2* - 1' から選択された出発構成要素を準備する、

【0251】

【化108】



10



【0252】

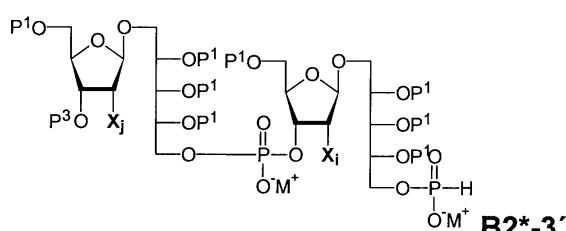
式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 、 P^2 及び P^4 は保護基を表す、

20

i i) 構成要素 B2* - 3' を A2* - 1' 又は B2* - 1' から選択される出発構成要素とカップリングさせる

【0253】

【化109】



30

【0254】

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^3 は保護基である、

i i i) 工程 i i) の後に得られた化合物から P^3 基を除去する、

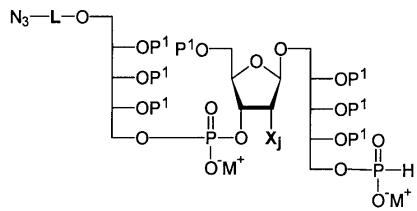
i v) 工程 i) の出発構成要素の代わりに工程 i i i) の後に得られる化合物を使用することにより工程 i) ~ i i i) を t 回任意に繰り返し、式中 t は 0 ~ 10 の整数である、

v) 工程 i v) の後に得られた化合物を C2* - 1'、C2* - 2'、C2* - 3'、又は C2* - 4' から選択される構成要素とカップリングさせる、

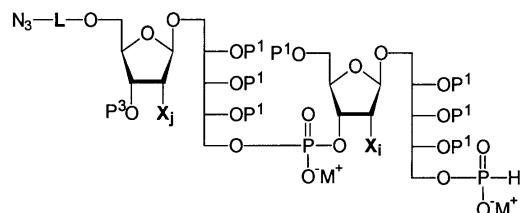
【0255】

40

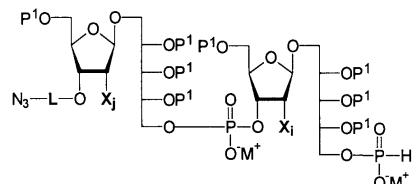
【化110】



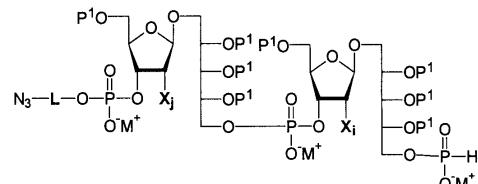
C2*-1'



C2*-2'



C2*-3'



C2*-4'

10

【0256】

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^3 は保護基である、

v i) 工程 v) の後に得られた化合物から P^1 、 P^2 、 P^3 及び P^4 保護基を除去し、式 (I) の化合物を得るためにアジド基をアミン基に変換する。

20

【0257】

工程 v i) において、 P^1 、 P^2 、 P^3 及び P^4 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換することは、段階的に実施することができるが、同じ反応条件下で同時に行うのが好ましい。

【0258】

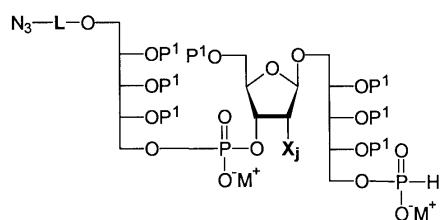
もちろん、C2*-1'、C2*-2'、C2*-3'、又はC2*-4'は出発構成要素として使用できる。この場合、代替合成方法 H - 2 は以下の工程を含む：

i) C2*-1'、C2*-2'、C2*-3'、又はC2*-4'から選択された出発構成要素を準備する、

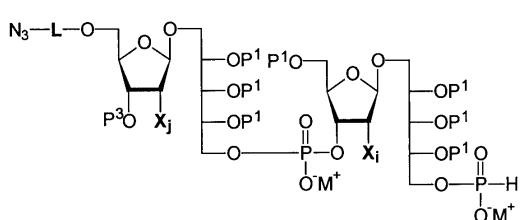
【0259】

30

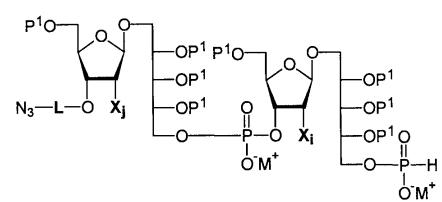
【化111】



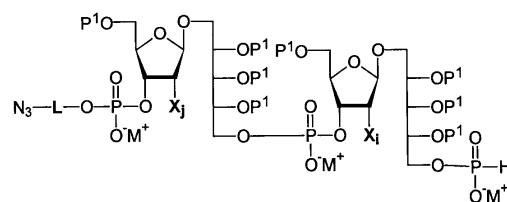
C2*-1'



C2*-2'



C2*-3'



C2*-4'

40

【0260】

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^3 は、-O-に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基であり、

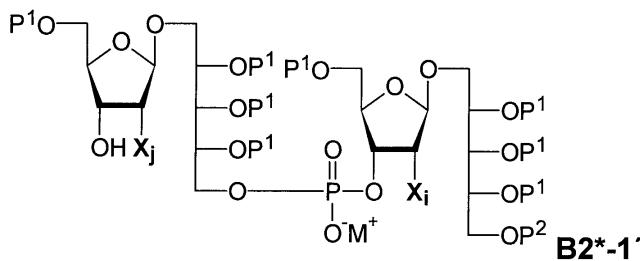
i i) 構成要素 B2*-1'をC2*-1'、C2*-2'、C2*-3'、又はC2*

50

- 4' から選択される出発構成要素とカップリングさせる、

【0261】

【化112】



【0262】

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^2 は、-O- に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基であり、
 i i i) 工程 i i i) の後に、得られた化合物から P^2 保護基を除去する、
 i v) 工程 i i i) の後に、得られた化合物のリビトールの C - 5 位にリン酸水素を導入する、

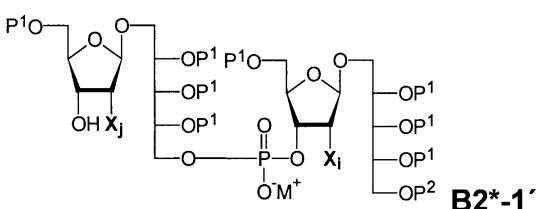
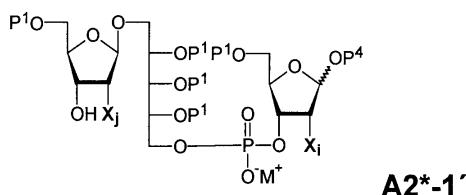
v) 工程 i) の出発構成要素の代わりに工程 i i i) の後に得られる化合物を使用することにより工程 i) ~ v i) を t 回任意に繰り返し、式中 t は 0 ~ 10 の整数である

v i) 工程 v) の後に得られた化合物を、A2*-1' 又は B2*-1' から選択される構成要素とカップリングさせる、

20

【0263】

【化113】



30

【0264】

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 、 P^2 及び P^4 は、-O- に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基を表す、

v i i) 工程 v i) の後に得られた化合物から P^1 、 P^2 、 P^3 及び P^4 保護基を除去し、式 (I) の化合物を得るためにアジド基をアミン基に変換する。

40

【0265】

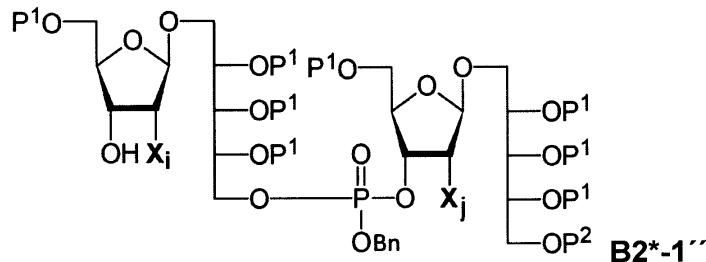
工程 v i i) において、 P^1 、 P^2 、 P^3 及び P^4 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換することは、段階的に実施することができるが、同じ反応条件下で同時に進行のが好ましい。

合成方法 J - 1 は以下の工程を含む：

i) 出発構成要素 B2*-1' を準備する、

【0266】

【化114】



【0267】

10

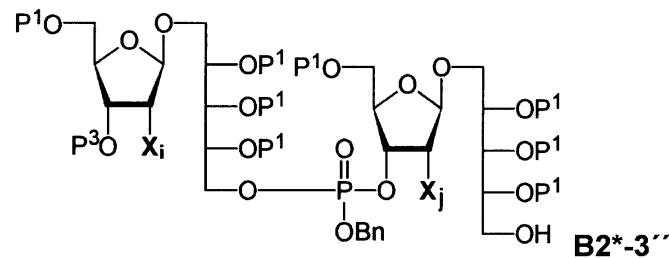
式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 、 P^2 及び P^3 は、-O- に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基を表す、

i i) 出発要素 $B2^*-1''$ のリボースの C-3 位にホスホルアミダイト基を導入する、

i i i) 工程 i i) の後に、得られた化合物を構成要素 $B2^*-3''$ とカップリングさせる、

【0268】

【化115】



20

【0269】

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^3 は、-O- に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基である、

i v) 工程 i i i) の後に得られた化合物から P^3 基を除去する、

30

v) 工程 i i i) の構成要素 $B2^*-3''$ の代わりに工程 i v) の後に得られる化合物を使用することにより工程 i) ~ i v) を t 回任意に繰り返し、式中 t は 0 ~ 10 の整数である、

v i) 工程 v) の後に得られた化合物を化合物 $H-O-L-N_3$ とカップリングさせる、

v i i) 式 (I) の化合物を得るために、 P^1 、 P^2 、及び P^3 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換する。

【0270】

工程 v i i) において、 P^1 、 P^2 、及び P^3 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換することは、段階的に、又は同じ反応条件下で同時にを行うことができる。

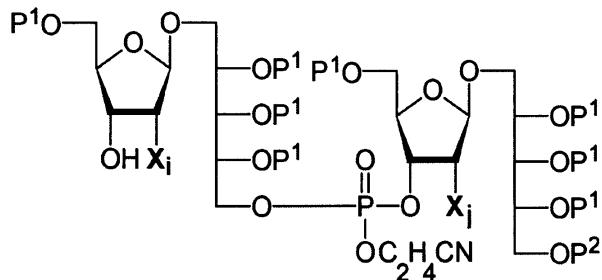
合成方法 J - 2 は以下の工程を含む：

40

i) 出発構成要素 $B2^*-1''$ を準備する、

【0271】

【化116】



B2*-1'''

10

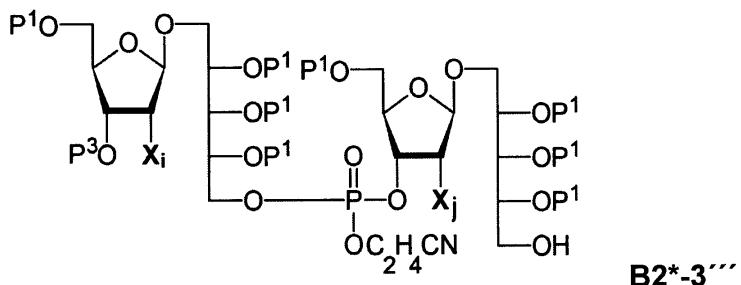
【0272】

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 、 P^2 及び P^3 は、-O- に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基を表す、
 i i) 出発要素 $B2^* - 1'''$ のリボースの C-3 位にホスホルアミダイト基を導入する、
 i i i) 工程 i i) の後に得られた化合物と構成要素 $B2^* - 3'''$ をカップリングする、

【0273】

【化117】

20



B2*-3'''

【0274】

30

式中、 X_i 及び X_j は互いに独立して X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 又は X_6 を表し、 P^1 及び P^3 は、-O- に結合したときに X_i 及び X_j と同一ではない保護基である、
 i v) 工程 i i i) の後、得られた化合物から P^3 基を除去する、

v) 工程 i i i) の構成要素 $B2^* - 3'''$ の代わりに工程 i v) の後に得られる化合物を使用することにより工程 i) ~ i v) を t 回任意に繰り返し、式中 t は 0 ~ 10 の整数である、

v i) 工程 v) の後に得られた化合物と化合物 $HO - L - N_3$ をカップリングさせる、
 v i i) 式 (I) の化合物を得るために、 P^1 、 P^2 及び P^3 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換する。

【0275】

40

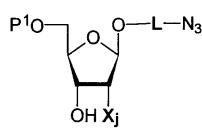
工程 v i i) において、 P^1 、 P^2 、及び P^3 保護基を除去し、アジド基をアミン基に変換することは、段階的に、又は同じ反応条件下で同時に行うことができる。

さらに、本発明の H i b 苺膜オリゴ糖類誘導体は、重縮合方法 I によって合成することができる。重縮合方法 I には、以下の構成要素が適している。

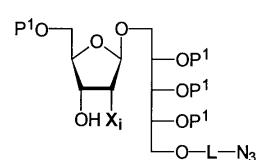
【0276】

【化118】

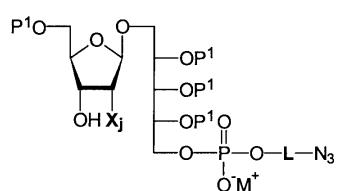
A1*-6



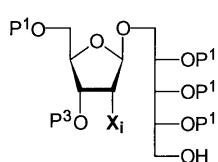
A1*-7



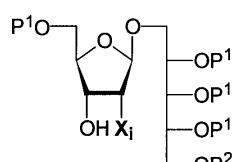
A1*-8



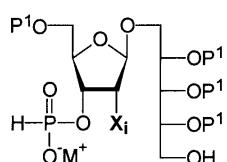
B1*-1



B1*-4

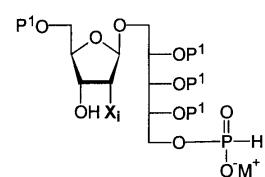


B1*-5

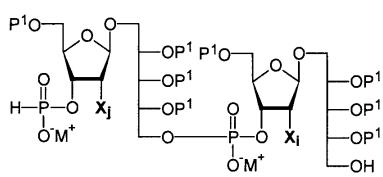


10

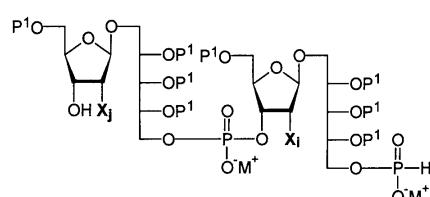
B1*-6



B2*-2

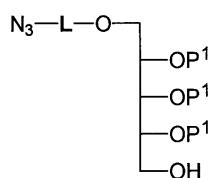


B2*-2'

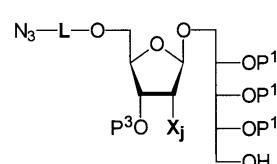


20

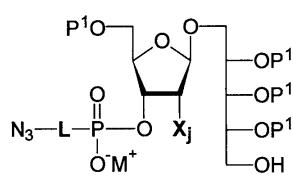
C1*-1



C1*-2



C1*-3



T2*



30

【0277】

式中、 X_i 、 X_j 、 P^1 、 P^2 、 P^3 、及び L は、上記と同じ意味を有する。

2つの官能基、すなわちリン酸水素又はホスホルアミダイト及びヒドロキシ基を有する反復単位が重縮合反応に適している。重縮合反応をクエンチするために、ヒドロキシル基を有するクエンチング構成要素を使用することができる。反復単位として、二糖類B1*-5、B1*-6及び四糖類B2*-2、B2*-3'が重縮合に適している。クエンチング構成要素として、T2*、A1*-6、A1*-7、A1*-8、B1*-1、B1*-4、C1*-1、C1*-2、及びC1*-3が使用し得る。

【0278】

B1*-5又はB2*-2が反復単位として使用されるとき、T2*、C1*-1、C1*-2及びC1*-3がクエンチング構成要素として使用され得る。B1*-6又はB2*-2'が反復単位として使用されるとき、T2*、A1*-6、A1*-7及びA1*-8がクエンチング構成要素として使用され得る。

【0279】

以下の工程を含む重縮合による合成方法I：

- 重縮合反応に適した少なくとも1つの反復単位を準備する、
- 少なくとも1つの反復単位の重縮合反応を実施する、
- クエンチング構成要素によって少なくとも1つの反復単位の重縮合反応をクエンチする、
- 式(I)の化合物又は式(I)の化合物の混合物を得るために、P保護基を除去し

40

50

、アジド基をアミン基に変換する、

式中、B 1 * - 5 又は B 2 * - 2 が反復単位として使用される場合、T 2 * 、 C 1 * - 1 、 C 1 * - 2 又は C 1 * - 3 がクエンチング構成要素として使用される、
B 1 * - 6 又は B 2 * - 2 ' が反復単位として使用されるとき、T 2 * 、 A 1 * - 6 、 A 1 * - 7 又は A 1 * - 8 がクエンチング構成要素として使用される。

【0280】

或いは、少なくとも 1 つの反復単位及びクエンチング構成要素を同時に準備してもよく、少なくとも 1 つの反復単位の重縮合反応及び重縮合反応のクエンチを、ワンポットシステムで自動的に実施する。

【0281】

少なくとも 1 つの反復単位の合計とクエンチング構成要素とのモル比は、オリゴ糖 (類) の長さ及び多様性に対して重要な役割を果たす。

反復単位とクエンチング構成要素とのモル比が 20 : 1 から 1 : 1 、好ましくは 20 : 1 から 3 : 1 、より好ましくは 15 : 1 から 4 : 1 、最も好ましくは 10 : 1 から 5 : 1 の範囲で少なくとも 1 つの反復単位とクエンチング構成が準備される。

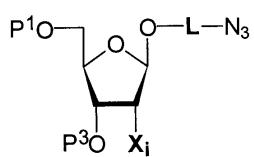
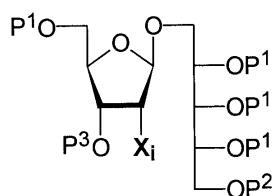
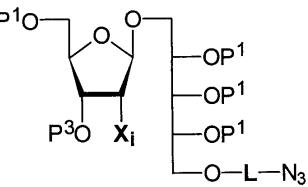
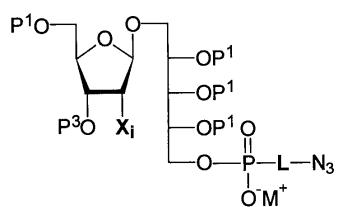
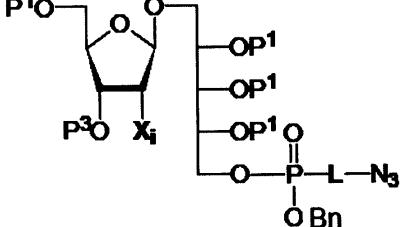
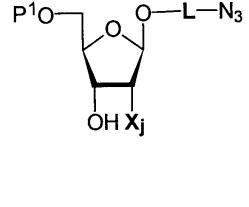
【0282】

したがって、本発明の一実施形態は、式 (I) の糖類を合成するための中間体化合物であり、

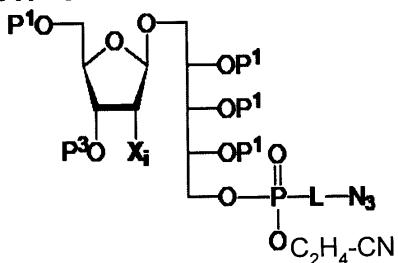
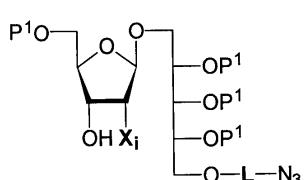
A 1 * - 2 、 A 1 * - 3 、 A 1 * - 4 、 A 1 * - 5 、 A 1 * - 5 ' 、 A 1 * - 5 '' 、 A 1 * - 6 、 A 1 * - 7 、 A 1 * - 8 、 B 1 * - 1 、 B 1 * - 2 、 B 1 * - 3 、 B 1 * - 4 、 B 1 * - 5 、 B 1 * - 6 、 C 1 * - 2 、 C 1 * - 3 、 C 1 * - 3 ' 、 C 1 * - 3 '' 、 A 2 * - 1 、 A 2 * - 2 、 A 2 * - 3 、 A 2 * - 4 、 B 2 * - 1 、 B 2 * - 2 、 B 2 * - 3 、 B 2 * - 4 、 C 2 * - 1 、 C 2 * - 2 、 C 2 * - 3 、 C 2 * - 4 、 A 2 * - 1 ' 、 A 2 * - 2 ' 、 A 2 * - 3 ' 、 A 2 * - 4 ' 、 B 2 * - 1 ' 、 B 2 * - 2 ' 、 B 2 * - 3 ' 、 B 2 * - 3 '' 、 B 2 * - 3 '' ' 、 B 2 * - 4 ' 、 C 2 * - 1 ' 、 C 2 * - 2 ' 、 C 2 * - 3 ' 及び C 2 * - 4 ' からなる群から選択され、

【0283】

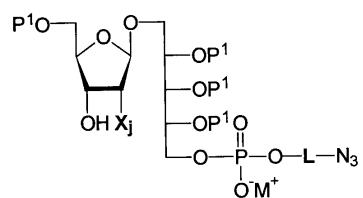
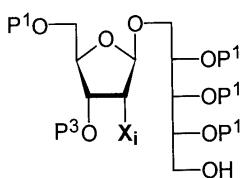
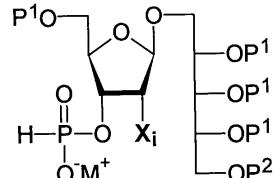
【化119】

A1*-2**A1*-3****A1*-4****A1*-5****A1*-5'****A1*-6**

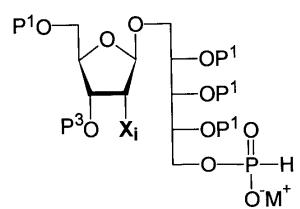
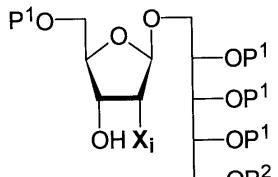
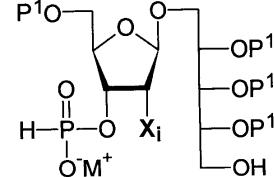
10

A1*-5''**A1*-7**

20

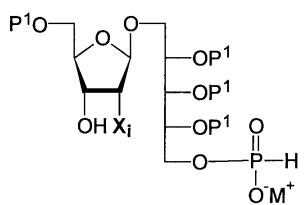
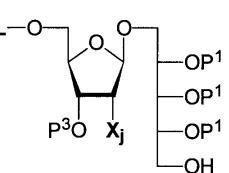
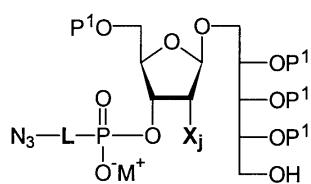
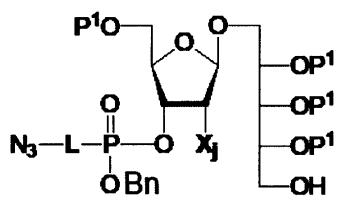
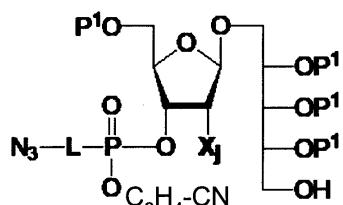
A1*-8**B1*-1****B1*-2**

30

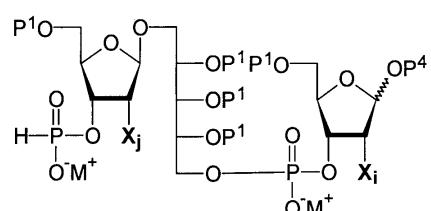
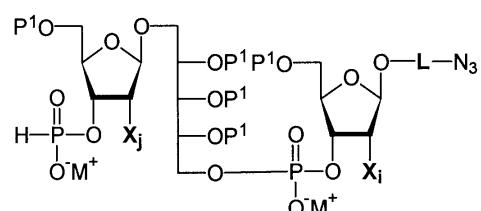
B1*-3**B1*-4****B1*-5**

40

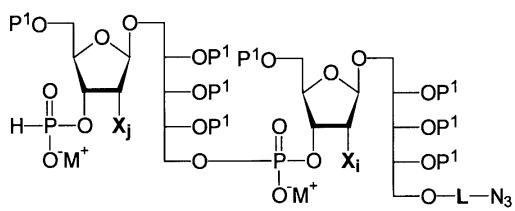
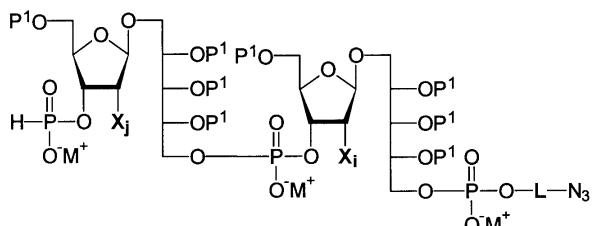
【0284】

B1*-6**C1*-2****C1*-3****C1*-3'****C1*-3''**

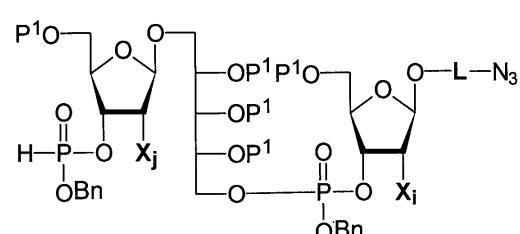
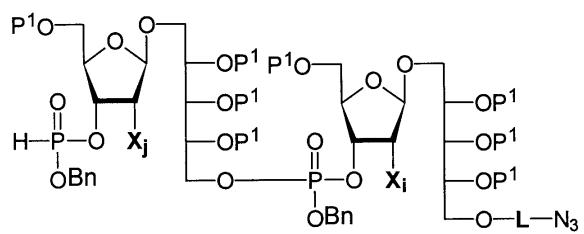
10

A2*-1**A2*-2**

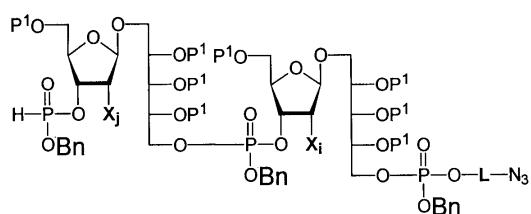
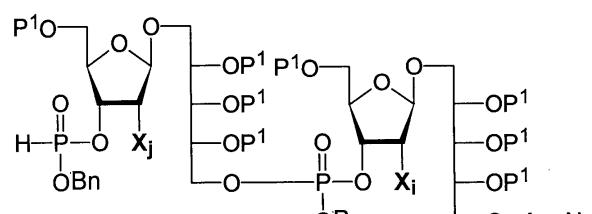
20

A2*-3**A2*-4**

30

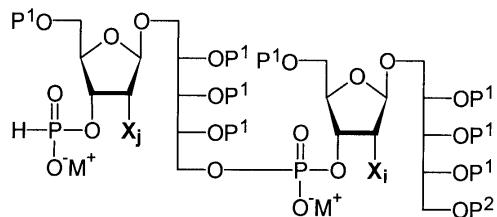
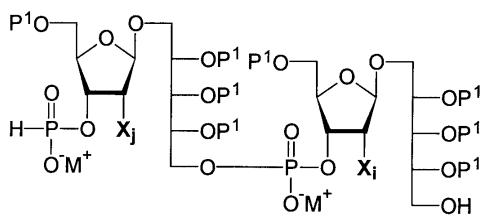
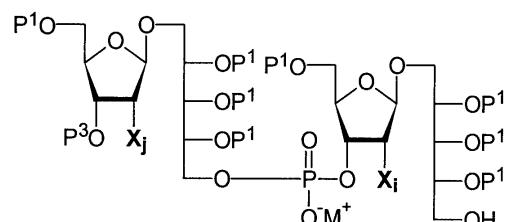
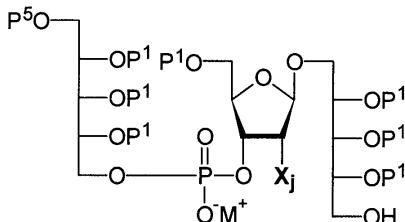
A2*-2''**A2*-3''**

30

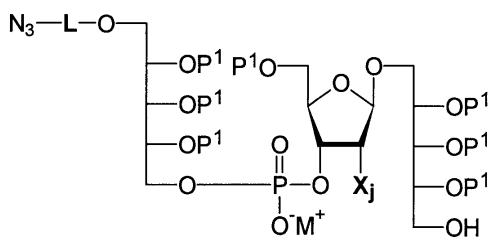
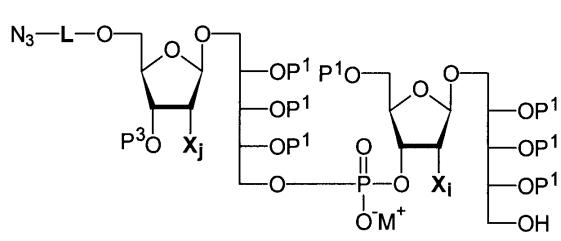
A2*-4''**B2*-4''**

40

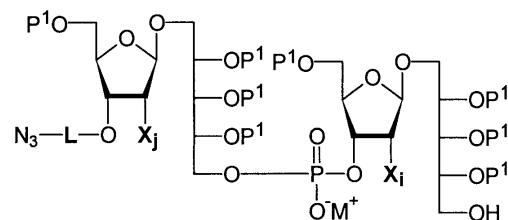
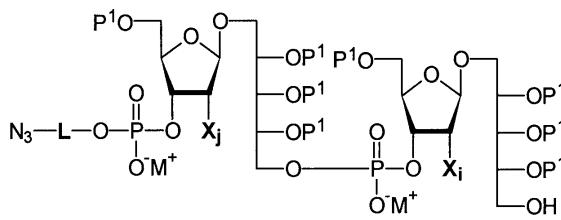
【 0 2 8 5 】

B2*-1**B2*-2****B2*-3****B2*-4**

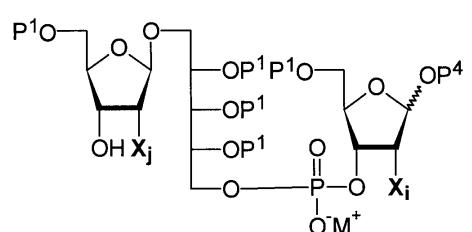
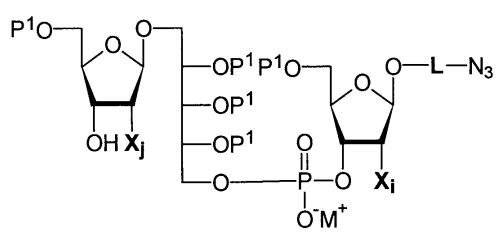
10

C2*-1**C2*-2**

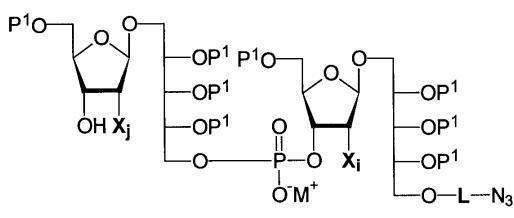
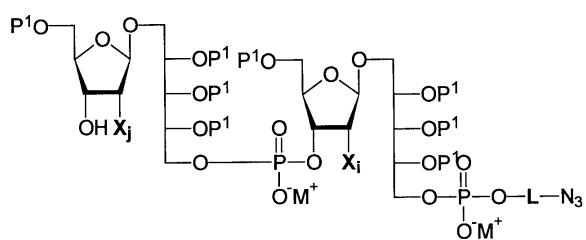
20

C2*-3**C2*-4**

30

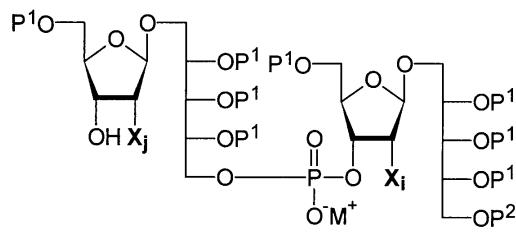
A2*-1'**A2*-2'**

40

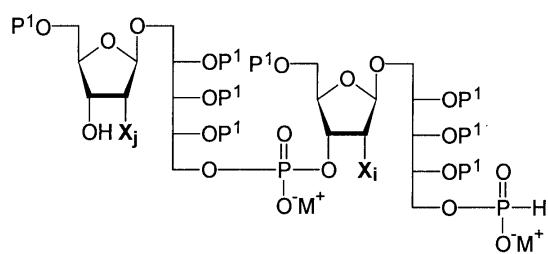
A2*-3'**A2*-4'**

【 0 2 8 6 】

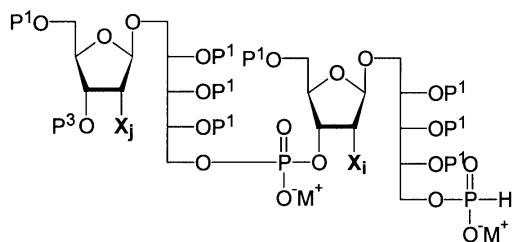
B2*-1'



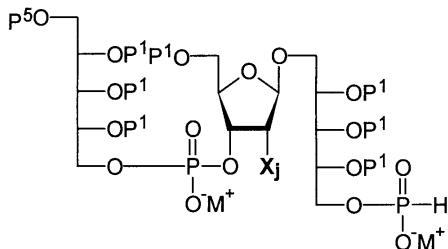
B2*-2'



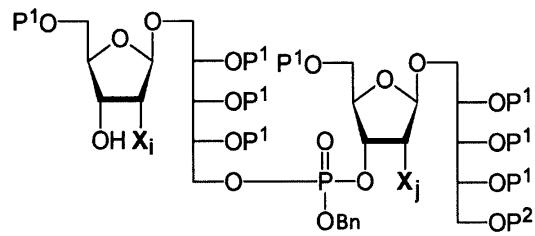
B2*-3'



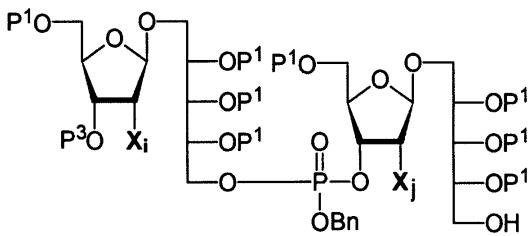
B2*-4'



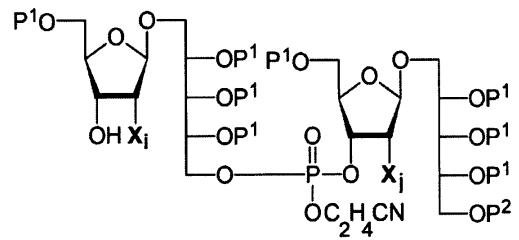
B2*-1''



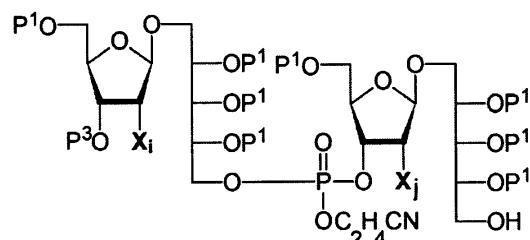
B2*-3''



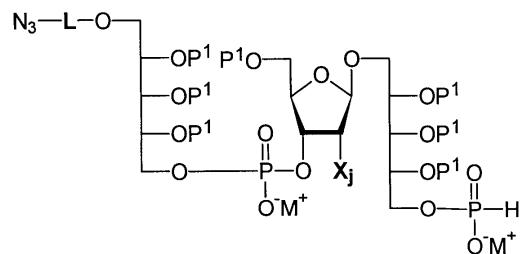
B2*-1'''



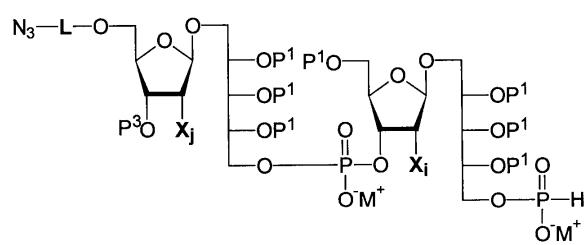
B2*-3'''



C2*-1

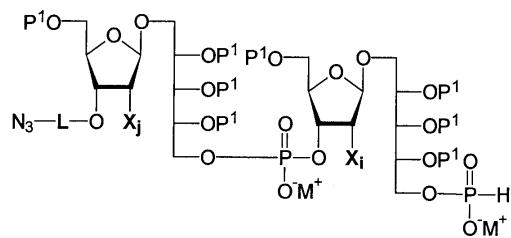


C2*-2'

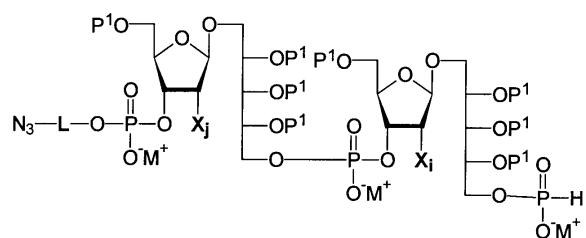


【 0 2 8 7 】

C2*-3'



C2*-4'



【0288】

式中、P¹、P²、P³、P⁴、及びP⁵は、-O-に結合したときにX_i及びX_jと同一ではない保護基を表し。 10

X_i及びX_jは、互いに独立に、-H、-OH、-F、-CH₃、-C₂H₅、-CN、-OCH₃、-OC₂H₅、-OCH(CH₃)₂、-OCH₂F、-OCF₃、-OCO-N(CH₃)₂、-O-C₂H₄-O-CH₃、-O-CH₂-CF₃を表し、基X_iかX_jが1つだけ存在する場合、X_i又はX_jは-OHにはできず、基X_iとX_jの両方が存在する場合、X_iとX_jは同時に-OHになることはできず、Lは上で定義された意味を有し、

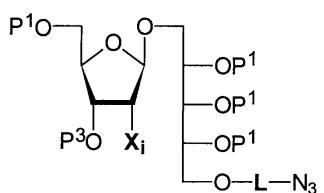
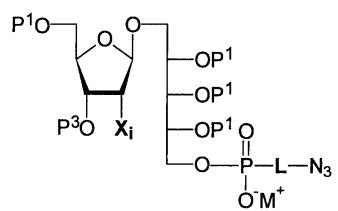
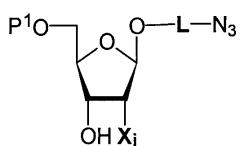
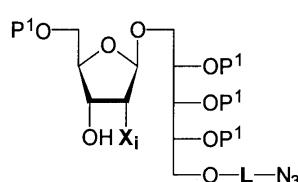
M⁺は、Na⁺、K⁺、NH₄⁺、又はHNEt₃⁺を表す：

或いは、本発明の実施形態は、式(I)の糖類を合成するための中間体化合物であり、

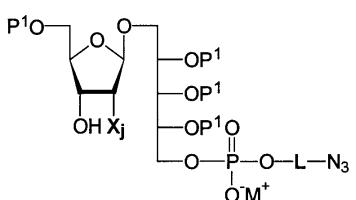
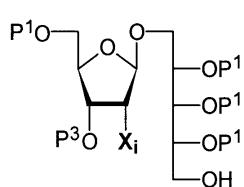
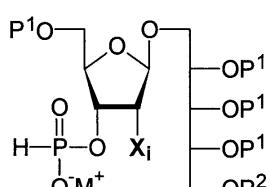
A1*-4、A1*-5、A1*-6、A1*-7、A1*-8、B1*-1、B1*-2、B1*-3、A2*-1、A2*-2、A2*-3、A2*-4、B1*-4、B1*-5、B1*-6、C1*-2、C1*-3、A2*-1、A2*-2、A2*-3、A2*-4、B2*-1、B2*-2、B2*-3、B2*-4、C2*-1、C2*-2、C2*-3、C2*-4、A2*-1'、A2*-2'、A2*-3'、A2*-4'、B2*-1'、B2*-2'、B2*-3'、B2*-4'、C2*-1'、C2*-2'、C2*-3'及びC2*-4'からなる群から選択され： 20

【0289】

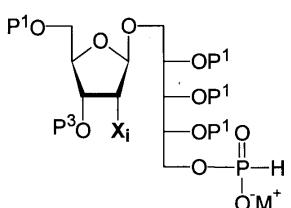
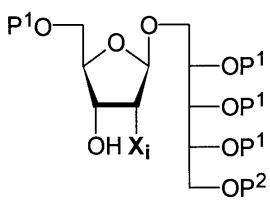
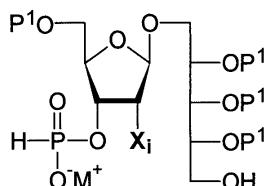
【化120】

A1*-4**A1*-5****A1*-6****A1*-7**

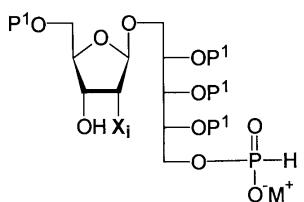
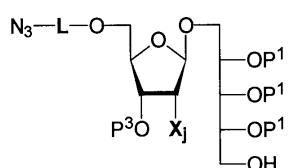
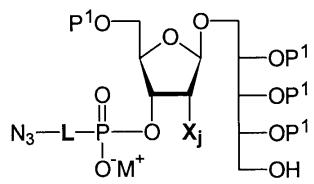
10

A1*-8**B1*-1****B1*-2**

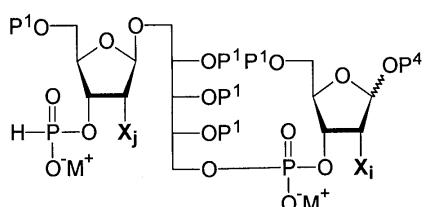
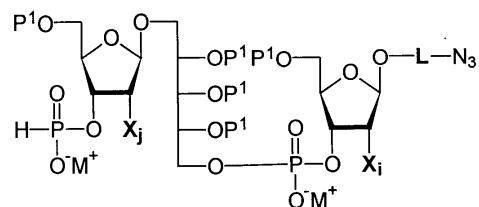
20

B1*-3**B1*-4****B1*-5**

30

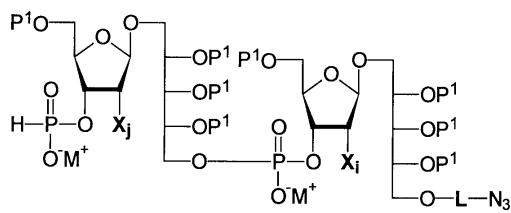
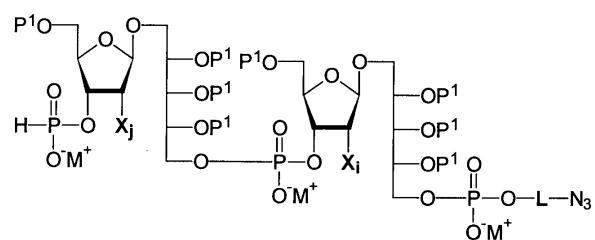
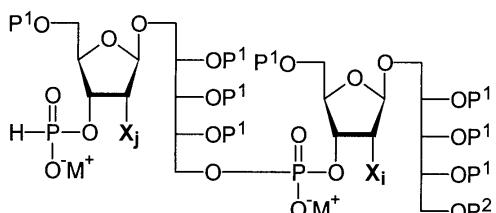
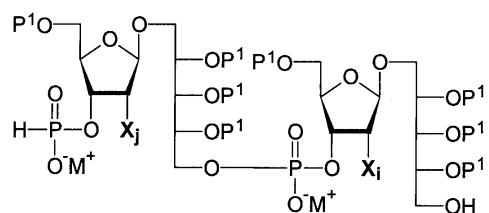
B1*-6**C1*-2****C1*-3**

30

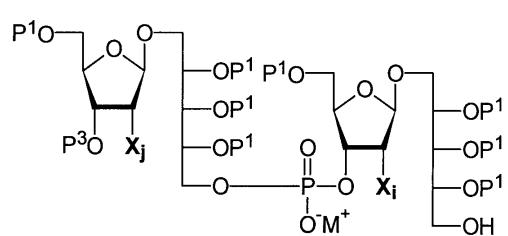
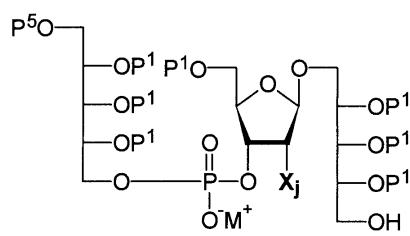
A2*-1**A2*-2**

40

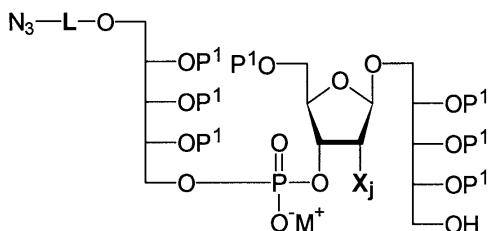
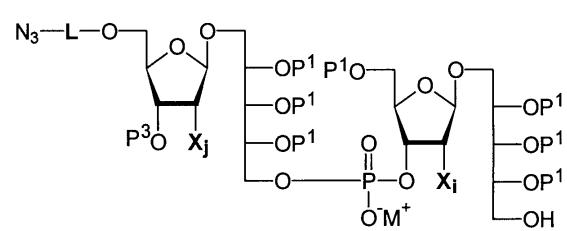
【0290】

A2*-3**A2*-4****B2*-1****B2*-2**

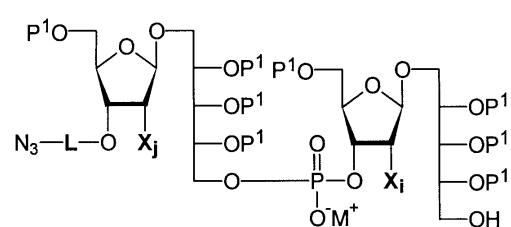
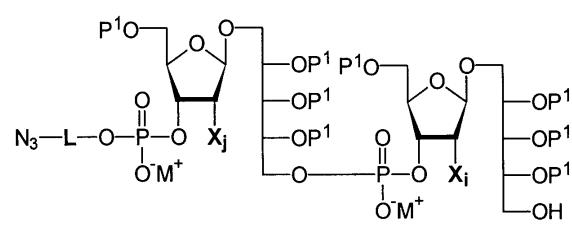
10

B2*-3**B2*-4**

20

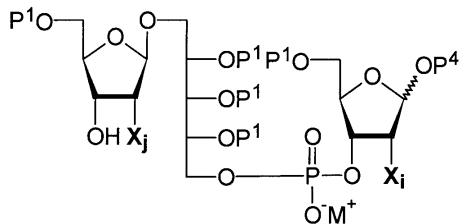
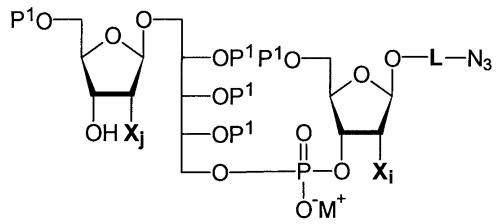
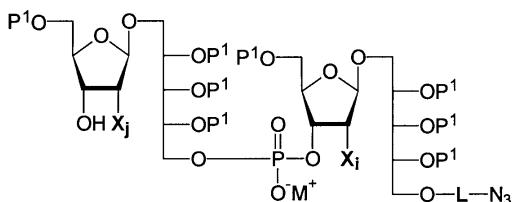
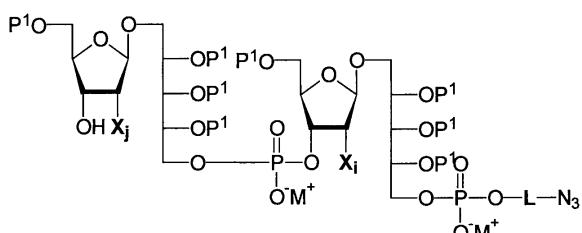
C2*-1**C2*-2**

30

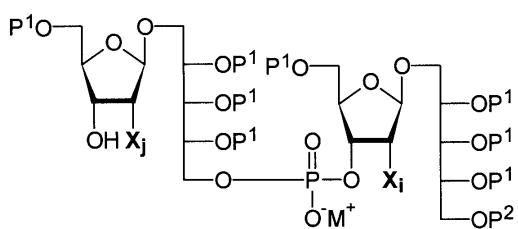
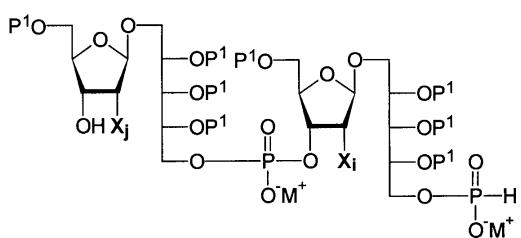
C2*-3**C2*-4**

40

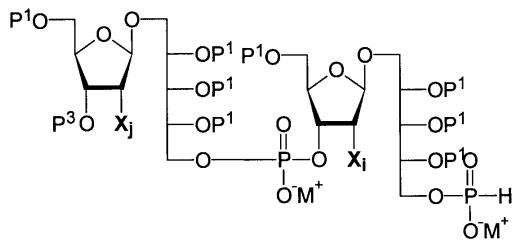
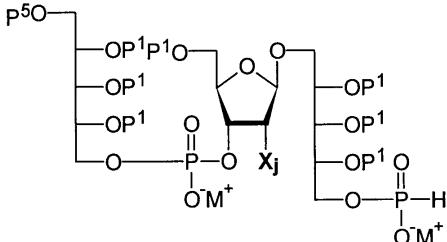
【 0 2 9 1 】

A2*-1'**A2*-2'****A2*-3'****A2*-4'**

10

B2*-1'**B2*-2'**

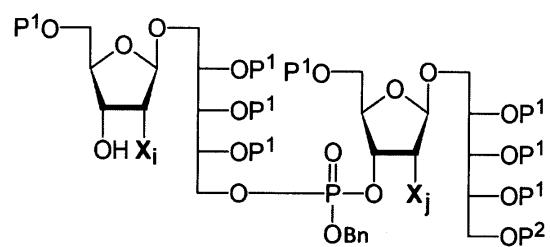
20

B2*-3'**B2*-4'**

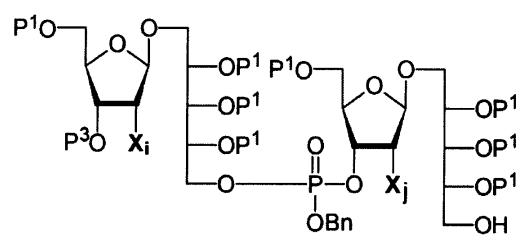
30

【 0 2 9 2 】

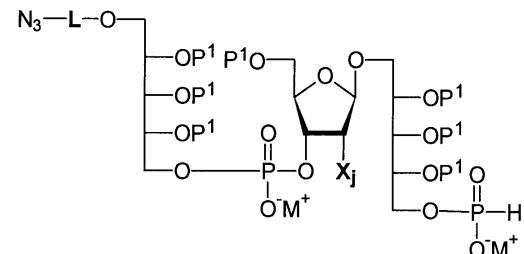
B2*-1''



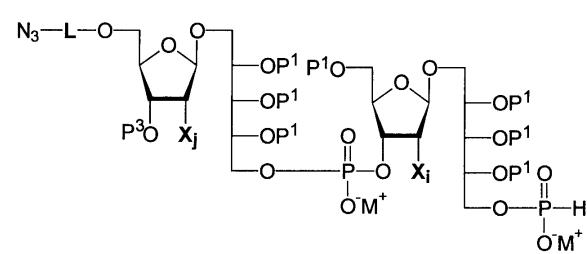
B2*-3''



C2*-1'

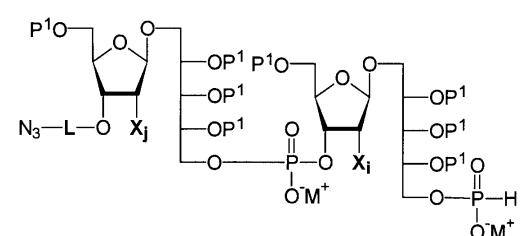


C2*-2'

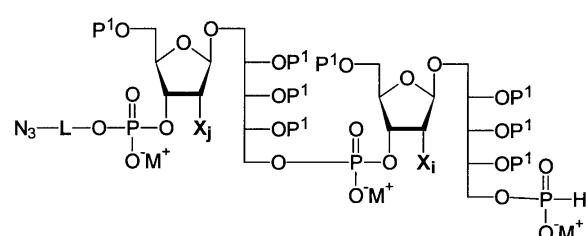


10

C2*-3'



C2*-4'



20

【 0 2 9 3 】

式中、P¹、P²、P³、P⁴、及びP⁵は保護基を表し、

X_i及びX_jは、互いに独立に、-H、-OH、-F、-CH₃、-C₂H₅、-CN、-OC₂H₅、-OC₂H(C₂H₅)₂、-OC₂H₂F、-OCF₃、-OCO-N(C₂H₅)₂、-O-C₂H₄-O-CH₃、-O-CH₂-CF₃を表し、

基X_iかX_jが1つだけ存在する場合、X_i又はX_jは-OHにはできず、

基X_iとX_jの両方が存在する場合、X_iとX_jは同時に-OHになることはできず、

Lは上で定義された意味を有し、

M⁺は、Na⁺、K⁺、NH₄⁺、又はHNEt₃⁺を表す：

本明細書で使用される「保護基」という用語は、有機合成において、好ましくはヒドロキシル基に対して一般的に使用される保護基を示す。

【 0 2 9 4 】

より具体的には、P¹、P²、P³、P⁴、P⁵及びP⁶は、好ましくはヒドロキシル基のための適切な保護基、さらに好ましくは適切な一連の脱保護反応によって順次互いに除去され得るヒドロキシル基のための異なる適切な保護基である。したがって、ヒドロキシル基のための保護基P¹、P²、P³、P⁴、P⁵及びP⁶は、アセチル、ベンジル、ベンゾイル、p-メトキシベンジル、p-メトキシフェニル、パラ-ブロモベンジル、o-ニトロフェニル、p-ニトロフェニル、アリル、メチル、イソプロピル、レブリニル、ジメトキシトリチル(DMT_r)、トリチル、2-ナフチルメチル(Nap)、ピバロイル、トリイソプロピルシリル、tert-ブチルジメチルシリル、tert-ブチルジフェニルシリル、tert-ブチルメトックスフェニルシリル(butylmethoxyphenylsilyl)、トリエチルシリル、トリメチルシリル、2-トリメチルシリルエトキシメチルからなる、又はそれらを含む群から選択することができる。

【 0 2 9 5 】

より具体的には、本発明の好ましい実施形態において、P¹、P⁵及びP⁶はベンジル又はp-メトキシベンジルであり得、P²はアリル、ジメトキシトリチル(DMT_r)、

30

40

50

2 - ナフチルメチル (N a p) 又はトリチルであり得、 P ³ はレブリニル (L e v) 又は 2 - ナフチルメチル (N a p) であり得、 P ⁴ はメチル又はアセチルであり得る。

【 0 2 9 6 】

特に好ましい実施形態において、 P ¹ はベンジルであり得、 P ² は 2 - ナフチル - メチルであり得、 P ³ はレブリニルであり得る。

トリクロロ酢酸で処理することにより P ² 保護基としての D M T r 基を除去すると、リビトールの C - 5 位に第一級アルコールが得られ、これはパートナー構成要素のリボースの C - 3 位にリン酸水素又はホスホルアミダイトとカップリングする。酢酸ヒドラジンでの処理による P ³ 保護基としてのレブリニル基の開裂は、リボースの C - 3 位で第二級アルコールをもたらし、これもまたパートナー構成要素のリビトールの C - 5 位でリン酸水素又はホスホルアミダイトと反応する。

10

【 0 2 9 7 】

P ¹ 保護基としてのベンジル基の脱保護は、 P d 触媒水素化反応によって好ましく行われる。同じ反応条件がアジド基からアミン基への変換にも当てはまる。

P ³ 又は P ² 保護基を脱保護した後、構成要素のリボースの C - 3 位又は構成要素のリビトールの C - 5 位又は得られる化合物にリン酸水素基を導入するためには、リボースの C - 3 位又はリビトールの C - 5 位のヒドロキシル基をイミダゾールの存在下でトリクロロホスフィン及びトリエチルアミンと反応させるのが好ましい。

【 0 2 9 8 】

P ³ 又は P ² 保護基を脱保護した後、構成要素のリボースの C - 3 位又は構成要素のリビトールの C - 5 位又は得られる化合物にホスホルアミダイト基を導入するためには、リボースの C - 3 位又はリビトールの C - 5 位のヒドロキシル基をジイソプロピルアンモニウムテトラゾリドの存在下でビス (ジイソプロピルアミノ) - ベンジルオキシホスフィンと反応させるのが好ましい。

20

【 0 2 9 9 】

塩化ピバロイルは、一対の構成要素をカップリングするためのカップリング試薬又は縮合試薬として使用される。上述したように、カップリング反応において、一方のカップリングのパートナーはヒドロキシル基を有し、他方のカップリングのパートナーはリン酸水素基を有する。

【 0 3 0 0 】

30

重縮合反応では、構成要素は 2 つの官能基、すなわちヒドロキシル基とリン酸水素基を有する。

リンカー

したがって、本発明は、 - O - L - N H ₂ 基の窒素原子を介した免疫原性担体とのコンジュゲートに適した - O - L - N H ₂ 基を含む、一般式 (I) 、 (I I - 1) 、 (I I - 2) 、 (I I - 3) 、 (I I - 4) 、 (I I I - 1) 、 (I I I - 2) 、 (I V - 1) 及び (I V - 2) のいずれかの糖類に関する。本発明はまた、 - O - L - C O O H 基のカルボン酸を介した免疫原性担体とのコンジュゲートに適した - O - L - C O O H 基を含有する、一般式のいずれかの糖類に関する。リンカーレは、上で定義したような任意の非免疫原性部分であり得る。したがって、リンカーレは、一般式 (I) 、 (I I - 1) 、 (I I - 2) 、 (I I - 3) 、 (I I - 4) 、 (I I I - 1) 、 (I I I - 2) 、 (I V - 1) 及び (I V - 2) のいずれかの糖類の一部、ならびに一般式 (I) 、 (I I - 1) 、 (I I - 2) 、 (I I I - 1) 、 (I I I - 2) 、 (I V - 1) 及び (I V - 2) のいずれかの糖類と免疫原性担体との任意のコンジュゲートであるが、一般式 (I) 、 (I I - 1) 、 (I I - 2) 、 (I I - 3) 、 (I I - 4) 、 (I I I - 1) 、 (I I I - 2) 、 (I V - 1) 及び (I V - 2) のいずれかの糖類、ならびに一般式 (I) 、 (I I - 1) 、 (I I - 2) 、 (I I - 3) 、 (I I - 4) 、 (I I I - 1) 、 (I I I - 2) 、 (I V - 1) 及び (I V - 2) のいずれかの糖類と免疫原性担体との任意のコンジュゲートの免疫原性に影響を及ぼさない。

40

【 0 3 0 1 】

50

式 $\text{HO} - \text{L} - \text{NH}_2$ 又は $\text{HO} - \text{L} - \text{COOH}$ の任意の二官能性リンカーは、一般式 (I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、及び(III-2)のいずれかの本発明の糖類、ならびに免疫原性担体とのそれらのコンジュゲートに使用できる。一般式 (I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、及び(III-2)のいずれかの糖類である本発明の一実施形態では、リンカー - L - は、- L^a -、- $\text{L}^a - \text{L}^e$ -、- $\text{L}^a - \text{L}^b - \text{L}^e$ -、- $\text{L}^a - \text{L}^d - \text{L}^e$ - から選択され、

式中、- L^a - は、- $(\text{CH}_2)_o$ -、- $(\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O})_o$ - C_2H_4 -、- $(\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O})_o$ - CH_2 - から選択され、

- L^b - は - O - 又は - O - P (O) (OH) - O - を表し、10

- L^d - は - $(\text{CH}_2)_q$ -、- $(\text{CF}_2)_q$ -、- $(\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O})_q$ - C_2H_4 -、及び - $(\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O})_q$ - CH_2 - から選択され、

- L^e - は - $(\text{CH}_2)_{p1}$ -、- $(\text{CF}_2)_{p1}$ -、- C_2H_4 - $(\text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2)_{p1}$ - 及び - $(\text{CH}_2)_{p1}$ - $\text{O} - (\text{CH}_2)_{p2}$ - から選択され、

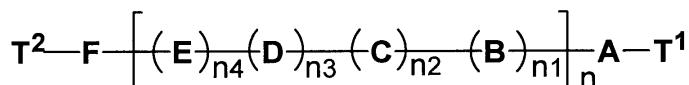
o、q、p1及びp2は、互いに独立して、1、2、3、4、5、及び6から選択される整数である。

【0302】

したがって、本発明はまた、一般式 (I) の糖類、その糖類のエナンチオマー、ジアステレオマー、エナンチオマーの混合物、ジアステレオマーの混合物、アノマー、水和物、溶媒和物、及びそれらの薬学的に許容される塩を対象とする。20

【0303】

【化121】



(I)

【0304】

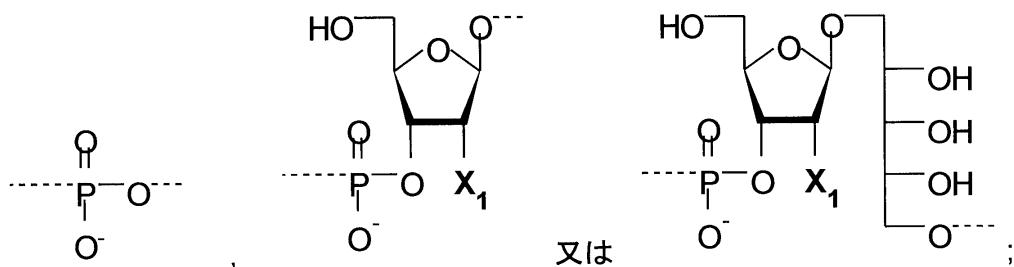
式中

30

A は

【0305】

【化122】



【0306】

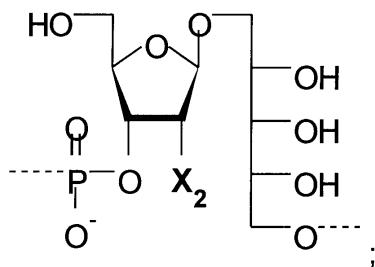
であり、

B は、

【0307】

40

【化123】



【0308】

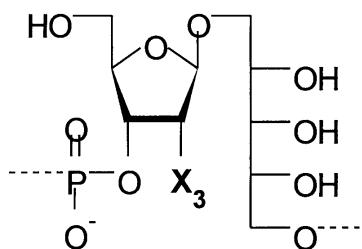
10

であり、

Cは、

【0309】

【化124】



20

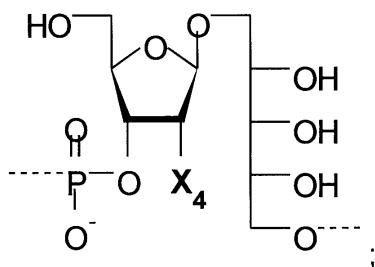
【0310】

であり、

Dは、

【0311】

【化125】



30

【0312】

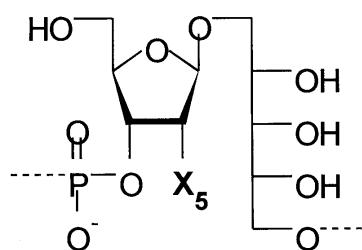
であり、

Eは、

【0313】

【化126】

40



【0314】

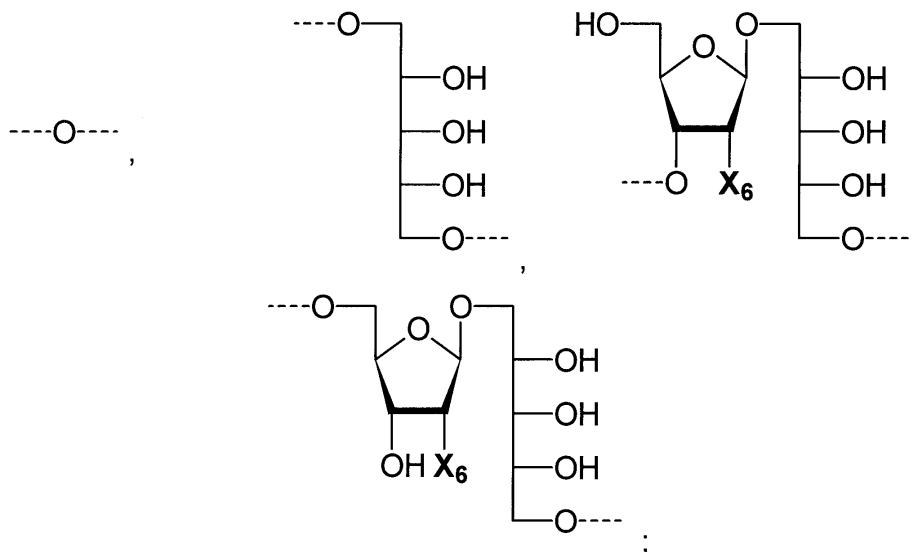
であり、

50

F は、

【0315】

【化127】



10

又は

【0316】

であり、

T^1 及び T^2 は $-H$ 、 $-L-NH_2$ を表し、 T^1 が $-L-NH_2$ の場合、 T^2 は $-H$ であり、 T^1 が $-H$ の場合、 T^2 は $-L-NH_2$ 又は $-L-COOH$ であり、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、及び X_6 は、互いに独立して $-H$ 、 $-OH$ 、 $-F$ 、 $-CH_3$ 、 $-C_2H_5$ 、 $-CN$ 、 $-OCH_3$ 、 $-OC_2H_5$ 、 $-OCH(CH_3)_2$ 、 $-OC_2H_5F$ 、 $-OC_2H_5$ 、 $-OCO-N(CH_3)_2$ 、 $-O-C_2H_4-O-CH_3$ 、 $-O-CH_2-CF_3$ を表し、

X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、及び X_6 の少なくとも 2 つは $-OH$ ではなく、 n は 1、2、3 又は 4 から選択される整数であり、

n_1 、 n_2 、 n_3 及び n_4 は互いに独立して 0 及び 1 から選択され、

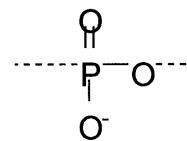
$n_1 + n_2 + n_3 + n_4 = 1$ である、

ただし、 $n_1 + n_2 + n_3 + n_4 = 1$ の場合、 $n = 1$ の場合、及び

A は

【0317】

【化128】



【0318】

である場合、

F は

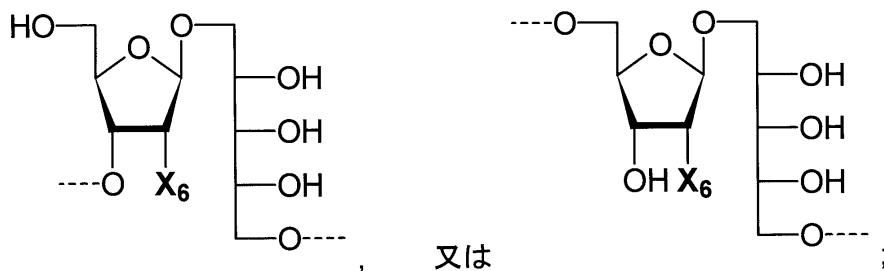
【0319】

20

30

40

【化129】



【0320】

10

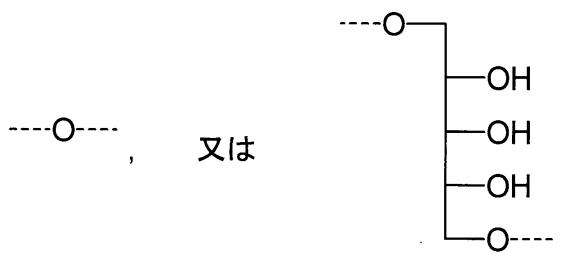
であり、また、

ただし、 $n_1 + n_2 + n_3 + n_4 = 1$ の場合、 $n = 1$ の場合、及び

F は

【0321】

【化130】



20

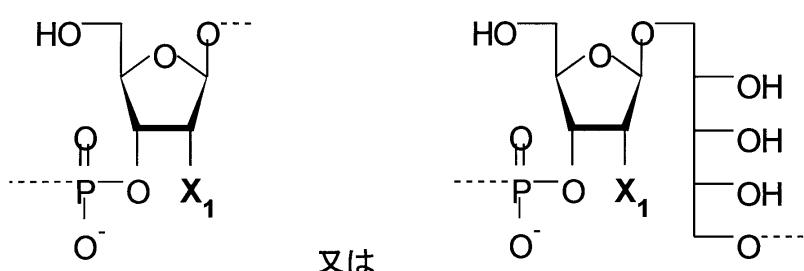
【0322】

である場合、

A は

【0323】

【化131】



30

【0324】

であり、

L はリンカーであり、L は、-L^a-、-L^a-L^e-、-L^a-L^b-L^e-、-L^a-L^d-L^e-から選択され、

40

式中、-L^a-は、-(CH₂)₀-、-(CH₂-CH₂-O)₀-CH₂H₄-、-(CH₂-CH₂-O)₀-CH₂-から選択され、-L^b-は-O-又は-O-P(O)(OH)-O-を表し、-L^d-は-(CH₂)_q-、-(CF₂)_q-、-(CH₂-CH₂-O)_q-CH₂H₄-、及び-(CH₂-CH₂-O)_q-CH₂-から選択し、-L^e-は-(CH₂)_{p1}-、-(CF₂)_{p1}-、-C₂H₄-(O-CH₂-CH₂)_{p1}-及び-(CH₂)_{p1}-O-(CH₂)_{p2}-から選択し、

o、q、p1及びp2は、互いに独立して、1、2、3、4、5、及び6から選択される整数である。

50

【0325】

また、一般式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、及び(III-2)のいずれかの本発明の糖類が、-L^a-L^e-である
リンカー-L-を有することが好ましく、

式中-L^a-は、-(CH₂)_o-、-(CH₂-CH₂-O)_o-C₂H₄-、-(CH₂-CH₂-O)_o-CH₂-から選択され、

-L^e-は、-C₂H₄- (O-CH₂-CH₂)_{p1}-、-CH₂- (O-CH₂-CH₂)_{p1}-、-(CH₂)_{p1}-、及び-(CH₂)_{p1}-O-(CH₂)_{p2}-から選択し、

o、p1、p2は、互いに独立して、1、2、3、4、5、及び6から選択される整数である。 10

一実施形態において、一般式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、及び(III-2)のいずれかの糖類であって、リンカー-L-が-L^a-であり、

式中-L^a-は、-(CH₂)_{o1}-、-(CH₂-CH₂-O)_{o2}-C₂H₄-、-(CH₂-CH₂-O)_{o2}-CH₂-を表し、

o1は、2、3、4、5、及び6から選択される整数であり、

o2は、1、2、3、4、5、及び6から選択される整数である。

【0326】

複合糖質 20

本発明の別の態様は、-O-L-NH₂基の窒素原子を介して免疫原性担体とコンジュゲートしている、一般式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(IV-2)のいずれかの糖類に関する。該糖類はまた、免疫原性担体と、一般式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(IV-2)のいずれかの糖類とを反応させることによって得られる複合糖質と定義する。したがって、-O-L-NH₂基の窒素原子を介して免疫原性担体とコンジュゲートした一般式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(IV-2)のいずれかの該糖類、及び、一般式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(IV-2)のいずれかの糖類を免疫原性担体と反応させることによって得られる該複合糖質は、同じ意味を持つ。 30

【0327】

該複合糖質は、細菌に関連する疾患に対する免疫のためのワクチンとして有効であることが証明された。

糖類は、一般にTI-2(T細胞非依存性-2)抗原及び弱い免疫原として当業者に知られている。TI-2抗原は抗原であるが、表面に露出した免疫グロブリン受容体の架橋を介して成熟B細胞によってのみ認識される。T細胞の助けがなければ、免疫学的記憶は生じず、IgMから他のIgGサブクラスへのアイソタイプ転換も、B細胞親和性の成熟も起こらない。さらに、糖類は、ヒト糖脂質及び糖タンパク質に対する構造的相同性のために、ヒトにおいて免疫原が乏しいことが知られている。糖類は、それらの乏しい免疫原性特性のために、B細胞による抗体産生、ならびにメモリー細胞の形成の両方をあまりもたらすことができないことを示している。それらは、強力なワクチンの産生に不可欠であるという特徴である。 40

【0328】

したがって、糖類に基づく強力なワクチンを産生するために、一般式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(IV-2)の糖類を免疫原性担体にコンジュゲートして複合糖質を産生する。これは糖類と比較して免疫原性が増加したことを示すものである。

【0329】

50

糖類 - タンパク質コンジュゲートは、一般式 (I) の少なくとも 1 つの合成糖類と、少なくとも 1 つの糖類 (I) が共有結合している免疫原性担体とからなる。

本稿の文脈では、「免疫原性担体」という用語は、糖類とコンジュゲートして糖類それ自体と比較して高い免疫性を示す複合糖質を形成する構造と定義する。したがって、一般式 (I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1) 及び (IV-2) の糖類の免疫原性担体に対するコンジュゲートは、該免疫原性担体に対する免疫応答を誘導することのない、一般式 (I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1) 及び (IV-2) の糖類に対する免疫応答の刺激として効果がある。

【0330】

好ましい免疫原性担体は担体タンパク質である。当業者にとって、担体タンパク質は、ジフテリアトキソイド、変異型ジフテリアトキソイド、修飾型ジフテリアトキソイド、変異修飾型ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、修飾型破傷風トキソイド、変異型破傷風トキソイド、外膜タンパク質 (OMP)、ウシ血清アルブミン (BSA)、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) 又はコレラトキソイド (CT) を含む又はそれらからなる群から選択されるタンパク質である。本明細書で使用される「トキソイド」という用語は、他の特性、典型的には免疫原性を維持しながら、その毒性が化学物質 (ホルマリン) 又は熱処理のいずれかによって不活性化又は抑制された細菌毒素 (通常は外毒素) を示す。本明細書中で使用される場合、変異型トキソイドは、野生型アミノ酸配列を修正することによって、より毒性が低く、又は無毒性でさえあるように修正されている組換え細菌毒素である。そのような突然変異は、1 つ以上のアミノ酸の置換であり得る。そのような変異型トキソイドは、その表面に、相互接続分子の官能基 Y と反応して修飾型トキソイドを提供することができる官能基を提示する。

【0331】

本発明の実施形態は、-O-L-NH₂-基の窒素原子を介して免疫原性担体に共有結合している糖類 (I) である。-O-L-NH₂-基の-L-は、共有結合 (免疫原性担体に直接又は間接的に結合したO-L-NH₂-基の酸素原子) の形又は-L-NH-の形で、免疫原性担体に結合しており、それにおいて窒素原子が担体タンパク質に直接又は間接的に結合している。

【0332】

直接結合するとは、免疫原性担体の官能基又は側鎖に、間接結合するとは、免疫原性担体及び / 又は -O-L-NH₂-基の窒素と一緒になる追加の官能基を介する結合を意味する。

【0333】

担体タンパク質が免疫原性担体として使用される場合、糖類を担体タンパク質にカップリングするためには、糖類の、時にはタンパク質の化学的活性化が必要である。タンパク質へ糖類をコンジュゲーションする方法の選択は、タンパク質の pH 及び温度感受性、及びほとんどの有機溶媒でそれらの溶解性が限られていることに起因して、制限されている。この手順は、タンパク質の変性及び糖類の分解を防ぐために温和な条件下で行われなければならない。したがって、コンジュゲーションの反応は緩衝液中で中性又はほぼ中性の pH で行われる。今まで、炭水化物をタンパク質に共有結合させるための数多くのプロトコルが報告してきた。以下の結合方法は、合成糖類 (I) を担体タンパク質に結合するため使用することができる。

【0334】

還元的アミノ化は、タンパク質中のリシン残基の -アミノ基へ還元末端を介して遊離オリゴ糖類を結合するための最も一般的な複合糖質化法の 1 つである。本発明では、合成糖類 (I) のアミノ基は、アルデヒド官能基、例えば、グルタルアルデヒドを用いてさらに官能化することができ、アルデヒドで官能化された合成糖類とリシン残基を有する担体タンパク質との間の複合糖質化は、還元的アミノ化によって形成することができる。

【0335】

10

20

30

40

50

安定した結合をもたらすためのマレイミドとチオールとの不可逆的反応としてのマレイミド - チオールコンジュゲーションもまた、複合糖質の調製のために頻繁に使用されてきた。例えば、マレイミドは、還元末端にアミンリンカーを有する合成糖類（I）から調製することができる。次いで、糖類 - マレイミド構築物は、担体タンパク質のシステイン中のチオール側鎖と反応でき、安定した複合糖質を生じる。逆に、担体タンパク質をマレイミドで活性化し、合成糖類（I）をチオール官能基でさらに官能基化することができる。

【0336】

スクアリン酸エステルを用いた複合糖質化法を適用することができる。最初に、合成糖類（I）のスクアリン酸アミドエステルは、アミン基とスクアリン酸エステルとのカップリングによって調製することができる。合成糖類（I）のスクアリン酸アミドエステルは、担体タンパク質のリシン残基の - アミノ基とさらにカップリングすることができ、スクアリン酸ジアミドが形成される。

【0337】

ジ（N - スクシンイミジル）アジペート、ジ（N - スクシンイミジル）グルタレート（D S G）、N - (- マレイミドブチリルオキシ)スルホスクシンイミドエステル（スルホ - G M B S）、スクシンイミジル（4 - ヨードアセチル）アミノベンゾエート（スルホ - S I A B）、スクシンイミジル - 3 - (プロモアセトアミド)プロピオネート（S B A P）、2 - ピリジルジチオール - テトラオキサテトラデカン - N - ヒドロキシスクシンイミド（P E G - 4 - S P D P）を含む活性化エステルを適用することができる（図1を参照）。好ましくは、ジ（N - スクシンイミジル）アジペートを、複合糖質の調製に使用することができる。

【0338】

カルボジイミドを用いたゼロレンジス架橋法では、ほとんどすべてのE D C（1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド）を使用することができる。N - 置換カルボジイミドは、担体タンパク質のカルボン酸と反応して、高度に反応性のO - アシルイソ尿素誘導体を形成することができる。この活性種は、次に合成糖類（I）の第一級アミンと反応してアミド結合を形成することができる。

【0339】

さらなるコンジュゲートの方法としてクリックケミストリーを使用することができる。クリックケミストリーはアルキンとアジドの [3 + 2] 環状付加である。好ましくは、歪み促進型アジド - アルキン付加環化（S P A A C）を複合糖質化に適用することができる。シクロオクチンのような歪んだアルキンは、無毒の反応条件のためにバイオコンジュゲーションに有利である。担体タンパク質は、アジド含有アミノ酸で簡単に標識され、アルキンで官能化された合成糖類（I）とコンジュゲートすることができる。逆に、アジドで官能化された合成糖類（I）は、アルキンで標識された担体タンパク質とコンジュゲートすることができる。

【0340】

天然の化学的連結（N C L）は、複合糖質化に使用できる。この方法を複合糖質化に適用するためには、合成糖類（I）をチオエステル、例えばベンジルチオエステル、エチルチオエステル、又はフェニルチオエステルでさらに官能化するべきである。天然の化学的連結において、担体タンパク質のN末端システイン残基のチオレート基は官能化合成糖類（I）のチオエステルを攻撃する。この可逆的なトランスチオエステル化工程は、化学選択的及び位置選択的であり、チオエステル中間体を形成し、この中間体は分子内S、N - アシルシフトによって再配列し、それが連結部位での天然アミド結合の形成をもたらす。結果として、合成糖類（I）及び担体タンパク質はアミド結合とコンジュゲートしている。

【0341】

痕跡のないシュタウディングーライゲーションもまた、複合糖質化に使用できる。この反応において、ホスフィンはチオエステル求電子剤を担持する。アジドとの反応後、生成物はアミド及び脱離ホスフィンオキシドである。シュタウディングーライゲーションは、

10

20

30

40

50

アジドとホスフィンの関連濃度での非毒性が証明されているため、インピトロでも、生細胞でも、生きた動物でも、アジド含有タンパク質を標識するのに理想的であることが証明してきた。複合糖質化での適用のために、合成糖類（I）は、チオエステル担持ホスフィンで官能化され、アジド基は、その後のホスフィンプローブ導入のためにいくつかの方法で目的の担体タンパク質に導入される。通常、タンパク質のメチオニンの代わりにアジドホモアラニンを統合することができる。アジドホモアラニンで修飾された担体タンパク質は、シュタウディンガーライゲーションによって合成糖類（I）と効果的かつ特異的にコンジュゲートすることができる。

【0342】

光架橋は分子生物学の分野における重要な化学的方法である。最近、リガンド結合領域の同定にこの方法を応用することに、多大な注目が集まっている。光架橋法は、複合糖質化に応用することができる。光親和性標識には、光化学的に活性化して反応性の高い中間体、通常はニトレン又はカルベンを生成することができる官能基が必要である。官能基としては、ベンゾフェノン、アリールアジド、アリール-、又はアルキルジアジリンが適用される。最近、好ましいことに、アルキル-又はアリールジアジリンが光親和性標識に使用されている（M. R. Bond et al. *Nature Protocols* 2009, 4 (7), 1044-1063; M. R. Bond et al. *Bioconjugate Chemistry* 2011, 22 (9), 1811-1823）。合成糖類（I）と担体タンパク質とのコンジュゲーションのために、合成糖類（I）をアルキル-又はアリールジアジリン、例えば3-トリフルオロメチル-3-フェニルジアジリンで官能化することができる。UV照射後、アリールジアジリンで官能化された合成糖類（I）から反応性カルベンが生成され、このカルベンはC-C共有結合によって担体タンパク質とカップリングしている。

【0343】

一般式（I）の糖類及び/又は好ましくは糖類2a、2b、2c、4a、4b、4c、4d、4e、6a、6b、6c、8a、8b及び8cが、官能基としてリシン残基の第一級アミン官能基を提供する、無毒性の変異型ジフテリア毒素CRM₁₉₇にコンジュゲートしていることが特に好ましい。

【0344】

野生型ジフテリア毒素のようなCRM₁₉₇は、グリシンに対するグルタミン酸の単一アミノ酸置換を有するジスルフィド架橋によって連結された2つのサブユニットからなる、535アミノ酸（58kD）の単一ポリペプチド鎖である。それは、肺炎球菌による細菌感染症のような疾患のための多くの承認されたコンジュゲートワクチン（例えば、Prevnar）の担体タンパク質として利用されている。

【0345】

好ましくは、ジ（N-スクシンイミジル）アジペートは、第一級アミノ基を有する合成糖類（I）に最初に結合される。続いて活性化糖類（I）をCRM₁₉₇などの担体タンパク質と縮合させて複合糖質を得る。また、関連するジスクシンイミジルグルタレートの使用も適用することができる（図2（A））。

【0346】

担体タンパク質とコンジュゲートした該糖類は、好ましくは95%以上、好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、さらにより好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の純度を有する。

【0347】

本発明の別の態様は、本発明の糖類及びそれらの複合糖質の薬物としての、すなわち医薬に適用可能な医薬活性剤としての使用に関する。

一般式（I）、（II-1）、（II-2）、（II-3）、（II-4）、（III-1）、（III-2）、（IV-1）及び（IV-2）の糖類、ならびに一般式（I）、（II-1）、（II-2）、（III-1）、（III-2）、（IV-1）及び（IV-2）の糖類を免疫原性担体と反応させることによって得られる該複合糖質は、医薬

10

20

30

40

50

における医薬活性剤に適していることが見出された。該糖類及び該複合糖質は、動物において免疫応答を誘発するのに適しており、したがって、ヒト及び／又は動物宿主において防御的免疫応答を惹起するのに有用である。

【0348】

好ましくは、該糖類及び該複合糖質は、ヘモフィルス属インフルエンザ菌b型に関連する疾患、好ましくは髄膜炎、肺炎、及び喉頭蓋炎から選択される疾患の予防及び／又は治療に有用である。

【0349】

驚くべきことに、本発明の新規コンジュゲートはヒト及び／又は動物宿主において免疫応答を惹起するのにも適しており、したがってヘモフィルス属インフルエンザ菌b型に関連する疾患に対する防御にも適していることが見出された。したがって、本明細書に開示される本発明のコンジュゲートは、ヘモフィルス属インフルエンザ菌b型に関連する疾患の予防又は治療に有用である。そのような疾患には、髄膜炎、肺炎、喉頭蓋炎、及びその他の気道の疾患が含まれるがこれらに限定されない。さらに、本発明の新規のコンジュゲートを用いた動物の治療は、免疫グロブリンIgGアイソタイプの形成をもたらし、それは生物におけるメモリーB細胞の発達を証明することが見出された。メモリーB細胞の存在は、免疫記憶を実証している。したがって、本発明のコンジュゲートは、ヘモフィルス属インフルエンザ菌b型に対して、動物において長期防御を誘導することができることが示された。

したがって、本発明によるコンジュゲートは、特にヘモフィルス属インフルエンザ菌b型に起因又は関連する疾患に対するワクチン接種に使用するための、医薬に適用可能な医薬活性剤としての使用に適している。

【0350】

ワクチン組成

本発明の一態様は、医薬組成物、特に一般式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(V-2)のいずれか1つの少なくとも1つの糖類、それらの薬学的に許容される塩、それらの複合糖質を、少なくとも1つの薬学的に許容されるアジュバント、担体、凍結防止剤、凍結保護剤、賦形剤及び／又は希釈剤と共に含むワクチン組成物に関する。

【0351】

したがって、一般式(I)の合成糖類のための本発明の合成は、工程B)をさらに含み得る。

B)一般式(I)の糖類の塩を調製すること、又は一般式(I)の糖類又は一般式(I)の合成糖類の塩の凍結乾燥物を調製する。

【0352】

好ましい実施形態において、式(I)の糖類のための本発明の合成は、工程B)をさらに含み得る。

B)一般式(I)の糖類の塩を調製すること、又は式(I)の糖類又は式(I)の糖類の塩の凍結乾燥物を調製する。

【0353】

本発明による医薬組成物は、一般式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(V-2)のいずれか1つの少なくとも1つの糖類、それらの薬学的に許容される塩を含む。特に、本明細書に開示されている全化学合成に従って得られる糖類2a、2b、2c、4a、4b、4c、4d、4e、6a、6b、6c、8a、8b及び8cがこれらのワクチンにおいて使用される。一般式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(V-2)の糖類、ならびに本明細書に開示されている全化学合成によって得られる糖類2a、2b、2c、4a、4b、4c、4d、4e、6a、6b、6c、8a、8b及び8cは、少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、さらにより好ましくは少なくとも97%、さらによ

10

20

30

40

50

り好ましくは少なくとも 98%、最も好ましくは少なくとも 99% の純度を有する。

【0354】

本発明の糖類、ならびに一般式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(IV-2)のいずれか 1 つの少なくとも 1 つの糖類を含有する医薬組成物、及び特に糖類 2a、2b、2c、4a、4b、4c、4d、4e、6a、6b、6c、8a、8b 及び 8c を含有するワクチンは、ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型によって引き起こされる又は関連する疾患、好ましくは髄膜炎、肺炎及び喉頭蓋炎に対する免疫化におけるワクチンとしての使用に非常に有用である。

【0355】

本発明によれば、糖類 2a、2b、2c、4a、4b、4c、4d、4e、6a、6b、6c、8a、8b 及び 8c、ならびに本明細書に開示される他のいずれかの本発明の糖類は、上記疾患に対する免疫化のためのワクチンとして使用するための該医薬組成物の製造に有用である。

【0356】

ワクチンは懸濁液の形態で調製しても、凍結乾燥してもよい。懸濁形態は凍結保存することができる。凍結乾燥形態では、1 以上の安定剤を添加することが好ましい。予防接種はどの年齢でも実施できる。ワクチンは、多くの場合、皮下、スプレー、注射、経口、眼内、気管内、又は経鼻で投与される。ヒト又は動物に投与される本発明のワクチンの量及び投与レジメは、特定の抗原、アジュバント(存在する場合)、特定の動物又は患者の年齢、性、体重、種及び状態、ならびに投与経路などの要因を考慮して、製薬及び獣医学の当業者に周知の標準的な技術に従って決定することができる。

【0357】

対象においてヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型に対する免疫応答を誘導する方法は、本発明の糖類、それらの混合物、それらのコンジュゲート、又はそれらの医薬組成物を投与することを含む。対象においてヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型によって引き起こされる又は関連する疾患、好ましくは髄膜炎、肺炎、及び喉頭蓋炎を治療又は予防する方法は、少なくとも 1 つの本発明の合成糖類又はその混合物、そのコンジュゲート、又はその組成物又はワクチンを投与することを含む。

【0358】

本発明において、ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型に対するワクチン接種に有効な用量を提供する式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(IV-2)のいずれか 1 つの糖類の量は、体重 1 kg あたり 0.02 μg ~ 約 10 μg であり得る。好ましくは CRM₁₉₇ などの担体タンパク質である、免疫原性担体と任意にコンジュゲートされた、式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(IV-2)のいずれか 1 つの糖類は、単回投与として、又は一連で(すなわち、「ブースター」と共に)投与することができる。例えば、小児は、小児の疾患を予防するための他のワクチンについて現在推奨されているように、人生の早い時期に単回投与を受け、その後、10 年後まで追加免疫投与を投与されることができる。

【0359】

静脈内及び非経口投与が好ましい。そのような組成物は、滅菌水、生理食塩水、グルコースなどの適切な担体、希釈剤、又は賦形剤と混合してもよい。免疫原性担体と任意にコンジュゲートされた、本発明による式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(IV-2)のいずれか 1 つの組成物又は糖類もまた凍結乾燥することができる。

【0360】

本発明の凍結乾燥させた糖類は、最終的には液体成分で再構成されて、患者への投与に適した材料が得られる。再構成は通常、使用時に行われる。したがって、本発明の糖類及

10

20

30

40

50

び水中油型エマルジョンアジュバント又はアジュバントの緩衝液は、使用時に最終製剤化する準備ができている、包装された又は分配されたワクチンキットに、別々に保存してもよい。2つの容器を含むキットでは、一方は再構成用の液体を含み、第2の容器は凍結乾燥材料を含む。安定性の理由から、本発明の凍結乾燥成分は、ラクトース、スクロース及び／又はマンニトールのような安定剤、ならびにそれらの混合物を含み得る。スクロース／マンニトール混合物を使用すると、乾燥工程の速度を上げることができる。凍結乾燥成分は、塩化ナトリウムも含み得る。凍結乾燥材料の可溶性成分は再構成後に組成物に保持され、したがって最終的な液体ワクチンはラクトース及び／又はスクロースを含み得る。

【0361】

本発明のワクチンの処方は、当技術分野において公知の方法を用いて達成することができる。明らかに、適切な担体及び他の添加剤の選択は、正確な投与経路及び特定の剤形の性質に依存する。

【0362】

本発明のワクチン組成物は1つ以上のアジュバントを含み得る。本明細書で定義されるように、「アジュバント」は、免疫原性担体と任意にコンジュゲートされた、本発明による式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(IV-2)のいずれか1つの糖類の免疫原性を増強する働きをする物質である。免疫アジュバントは、単独で投与された場合に免疫原性が弱い抗原、例えば抗体価がまったくないか弱い抗体価、又は細胞性免疫応答を誘導する抗原に対する免疫応答を増強することができる。さらにアジュバントは、抗原に対する抗体価を増加させ、及び／又は個体において免疫応答を達成するのに有効な抗原の用量を低下させることができる。したがって、アジュバントは免疫応答を高めるために頻繁に投与され、当業者に周知である。有効性を増強するための適切なアジュバントとしては、限定ではなく例として、アルミニウムアジュバント(例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウム又はそれらの組み合わせなどのアルミニウム塩)、フロイントアジュバント(完全又は不完全)、BAY R 1005(N-(2-デオキシ-2-L-ロイシルアミノ- -D-グルコピラノシル)-N-オクタデシルドデカノイルアミドヒドロアセテート)、D C - コール(ジメチルアミノエタン) - カルバモイルコレステロール、PCPP(ポリ[ジ(カルボキシラトフェノキシ)ホスファゼン])、モノホスホリル脂質A、CpGオリゴヌクレオチド、QS-21(キラヤサボナリアサポニン(Q u i l l a j a s a p o n a r i a s a p o n i n)免疫アジュバント)、コレラ毒素、及びホルミルメチオニルペプチドが挙げられる。

【0363】

代替のアジュバントとしては、水中油型エマルジョン製剤、例えば、PCT公開番号WO 90/14837に記載のMF59が挙げられ、SAF-1(エマルジョンビヒクリル[5%スクアラン、2.5%Pluronics(登録商標)L121、0.2%ポリソルベート80、及びリン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)]中のSyntexアジュバント製剤トレオニル-MDP(0.05~1%))、及びモノホスホリル脂質(monophosphoryl lipid)A(MPL)、トレハロースジミコレート(TDM)、及び細胞壁骨格(CWS)、サポニンアジュバント、例えばStimulon TM(Camb ridge Bioscience、Worcester、マサチューセッツ州)からなる群からの1つ以上の細菌細胞壁成分が、使用され得る、又はそれから粒子が発生し得る。様々な水中油型エマルジョンアジュバントが知られており、それらは典型的には少なくとも1つの油及び少なくとも1つの界面活性剤を含み、油及び界面活性剤は生分解性(代謝性)及び生体適合性である。スクアレン、スクアレンの飽和類似体が、好ましい油である。他の好ましい油はトコフェロールである。油の混合物を使用することができる。界面活性剤は、その「HLB」(親水性/親油性バランス)によって分類することができる。本発明の好ましい界面活性剤は、少なくとも10、好ましくは少なくとも15、より好ましくは少なくとも16のHLBを有する。本発明は、以下のものを含むがこれらに限定されない界面活性剤と共に使用することができる:ポリオキシエチレンソルビタンエステル

10

20

30

40

50

界面活性剤（一般に *Tw e e n* と呼ばれる）；エチレンオキシド（EO）、プロピレンオキシド（PO）、及び／又はブチレンオキシド（BO）のコポリマー；オクトキシノール-9（*T r i t o n* X-100、又はトクチルフェノキシポリエトキシエタノール）などの反復エトキシ（オキシ-1,2-エタンジイル）基の数が異なり得るオクトキシノール；ホスファチジルコリン（レシチン）などのリン脂質；ラウリル、セチル、ステアリル及びオレイルアルコールから誘導されるポリオキシエチレン脂肪族エーテル（*B r i j* 界面活性剤として知られている）。エマルジョンに含めるための好ましい界面活性剤は、*Tw e e n* 80（ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート）、*S p a n* 85（ソルビタントリオレエート）、レシチン及び*T r i t o n* X-100である。

さらなるアジュバントは、サイトカイン、例えばインターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12など）、インターフェロン（例えば、ガンマインターフェロン）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、腫瘍壞死因子（TNF）であり得る。

【0364】

組成物は、投与経路及び所望の製剤に応じて、湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝剤、ゲル化剤又は粘度増強添加剤、保存剤、香味剤、着色剤などの補助物質を含有することができる。本発明の組成物は、特に複数回投与形式で包装されている場合、抗菌剤を含み得る。チオメルサール及び2-フェノキシエタノールのような抗菌剤は一般にワクチン中に見出されるが、無水銀保存剤を使用するか保存剤をまったく使用しないことが好ましい。

組成物は温度保護剤を含み得る。例としては、グリセリン、プロピレングリコール、及び／又はポリエチレングリコール（PEG）が挙げられる。

本発明のワクチン組成物は、ジフテリア抗原、破傷風抗原、百日咳抗原、B型肝炎抗原、不活化ポリオワクチン及び不活化ロタウイルスワクチンのうちの少なくとも1つをさらに含み得る。

【0365】

本明細書で使用される「ジフテリア抗原」という用語は、好ましくはジフテリアトキソイドである。ジフテリアトキソイドは、ジフテリアに対する活性免疫剤として使用される、コリネバクテリウムジフテリア（*Corynebacterium diphtheriae*）のホルムアルデヒド不活性化毒素である。ジフテリアトキソイドの調製は十分に文書化されている（例えば、Plotkin et al, Vaccines, 6th edition, 2012, Chapter 12）。任意の適切なジフテリアトキソイドが使用できる。ジフテリアトキソイドの濃度は、一般的に5～100Lf（凝集限界）/mLである。好ましい濃度は10～50Lf/mLの間である。より好ましい濃度は20～40Lf/mLの間である。最も好ましくは、濃度は約30Lf/mLである。

【0366】

本明細書で使用される「破傷風抗原」という用語は、好ましくは破傷風トキソイドである。破傷風トキソイドは当業者に周知である（例えば、Plotkin et al, Vaccines, 6th edition, 2012, Chapter 33）。任意の適切な破傷風トキソイドが使用できる。テンタウストキソイド（tentacul toxoid）の濃度は、一般的に1～50Lf/mLである。好ましい濃度は2～9Lf/mLである。より好ましい濃度は5～8Lf/mLの間である。最も好ましくは、濃度は約6.5Lf/mLである。

【0367】

本明細書で使用される「百日咳抗原」という用語は、細胞性（例えば全細胞）又は無細胞性であり得る。両タイプの抗原の調製は十分に文書化されている（例えば、Plotkin et al, Vaccines, 6th edition, 2012, Chapter 23）。細胞性百日咳抗原については、百日咳抗原の濃度は一般に5～500U/mLである。好ましい濃度は10～400U/mLの間である。より好ましい濃度は25～350U/mLの間である。最も好ましくは、濃度は約300U/mLである。無細胞性抗原が使用される場合、百日咳ホロトキシン（PT）及び纖維状赤血球凝集素（ FHA）

10

20

30

40

50

、より好ましくはペルタクチン（P R N 又は 6 9 k D a 抗原としても知られる）と組み合わせたもの、及び場合によっては凝集原（線毛としても知られる）2 及び 3 を使用することが好ましい。P T は毒性タンパク質であり、百日咳（pertussis）抗原に存在する場合、それは好ましくは解毒されている。解毒は化学的及び / 又は遺伝的手段によつてもよい。好ましい解毒変異体は 9 K / 1 2 9 G ドウルブ変異体（d o u l b m u t a n t ）である。

【 0 3 6 8 】

本明細書で使用される「B 型肝炎抗原」という用語は、B 型肝炎表面抗原であり得る。B 型肝炎表面抗原の調製は十分に文書化されている（例えば、Plotkin et al, Vaccines, 6th edition, 2012, Chapter 15 ）。 10

【 0 3 6 9 】

本明細書で使用される「不活性化ポリオワクチン（I P V ）」という用語は、好ましくは、ポリオウイルス I 型～ 3 型の 3 種すべての不活性化（死滅）ポリオウイルス株からなる。本発明において、ウイルス不活性化は、ウイルスの感染能力の除去を意味する。不活性化の 2 つの方法（化学的及び物理的）において、最も一般的に使用される化学物質はホルムアルデヒドとベタプロピオラクトンである。ジフテリアトキソイドの調製は十分に文書化されている（例えば、Plotkin et al, Vaccines, 6th edition, 2012, Chapter 27 ）。

【 0 3 7 0 】

本明細書で使用される「不活性化ロタウイルスワクチン」という用語は、好ましくは、ウシ（U K 株） / ヒト再集合体ワクチン、ヒト新生児 R V 3 株又はウシ / ヒト新生児 1 1 6 E 株であり得る。本発明において、ウイルス不活性化は、ウイルスの感染能力の除去を意味する。不活性化の 2 つの方法（化学的及び物理的）において、最も一般的に使用される化学物質はホルムアルデヒドとベタプロピオラクトンである。不活性化ロタウイルスワクチンの調製は十分に文書化されている（例えば、Plotkin et al, Vaccines, 6th edition, 2012, Chapter 30 ）。 20

【 0 3 7 1 】

本発明の組成物は、選択された pH に緩衝することができる液体調製物、例えば、等張水溶液、懸濁液、エマルジョン又は粘性組成物として好都合にも提供される。液体製剤のための薬学的に許容される担体は、水溶液又は非水溶液、懸濁液、エマルジョン又は油であり得る。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、及びオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルである。水性担体は、水、アルコール溶液、エマルジョン、又は懸濁液、例えば食塩水及び緩衝媒体を含む。 30

再構成後の組成物の pH は、好ましくは 6 ～ 8 、より好ましくは 6 . 5 ～ 7 . 5 （例えば約 7 ）である。本発明の組成物は、緩衝剤、例えば、トリス緩衝液、酢酸塩、グルタミン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、炭酸塩、グリシン酸塩、ヒスチジン、グリシン、コハク酸塩及びトリエタノールアミン緩衝液の使用により維持し得る。したがって、本発明の組成物は緩衝剤を含むのが好ましい。等張剤は、塩などのイオン性等張剤、又は炭水化物などの非イオン性等張剤であり得る。イオン性等張剤の例としては、N a C l 、C a C l ₂ 、K C l 及びM g C l ₂ が挙げられるが、これらに限定されない。非イオン性等張剤の例としては、ソルビトール及びグリセロールが挙げられるが、これらに限定されない。 40

【 0 3 7 2 】

本発明の好ましい実施形態では、ワクチン組成物は、保存剤を含む、又は含まない、無菌の液体で、発熱物質を含まない、リン酸緩衝生理食塩水として処方される。

薬学的に許容される保存剤を使用して、組成物の保存寿命を延ばすことができる。ベンジルアルコールが適切であり得るが、例えば、パラベン、チメロサール、クロロブタノール、又は塩化ベンザルコニウムを含む様々な保存剤も使用できる。保存剤の適切な濃度は、選択された薬剤に応じてかなりの変動があり得るが、総重量に基づいて 0 . 0 2 % ～ 2 % である。 50

【0373】

本発明の組成物は、単回投与用バイアル、複数回投与用バイアル、又はプレフィルドシリンジとして製剤化することができる。

【0374】

本発明の別の態様は、少なくとも1つの薬学的に許容されるアジュバント、担体、賦形剤、溶媒及び/又は希釈剤と共に、場合により免疫原性担体とコンジュゲートする一般式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(IV-2)のいずれか1つの少なくとも1つの糖類を含有する医薬製剤及び医薬組成物、又は活性成分としてのワクチンに関する。

【0375】

さらに好ましくは、医薬組成物は、凍結乾燥物又は液体緩衝液の形態で処方される。

ワクチン又は医薬組成物はまた、場合により実質的に無毒の薬学的に許容される担体、賦形剤、アジュバント又は希釈剤を用いてその医薬活性塩の形で投与することもできる。本発明のワクチン又は医薬組成物は、従来の固体又は液体の担体又は希釈剤、及び従来の薬学的に製造されたアジュバントで、適切な投与量レベルで公知の方法で調製される。好ましい調製及び製剤は、経口投与に適した投与可能な形態である。これらの投与可能な形態としては、例えば、丸剤、錠剤、フィルム錠、コーティング錠、カプセル剤、散剤及び沈殿物剤が挙げられる。経口投与の形態以外も可能である。本発明のワクチン又は医薬組成物は、吸入、注射(静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下)、上皮又は皮膚粘膜内層(口腔粘膜、直腸及び膣上皮の内層、鼻咽頭粘膜、腸粘膜)を介した吸収、経口、直腸性、経皮、局所的、皮内、胃内、皮内、膣内、脈管内、鼻腔内、頬内、経皮的、舌下、又は製薬業界で利用可能な他の任意の手段を含むがこれらに限定されない任意の適切な手段で投与できる。

【0376】

一般式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(IV-2)のいずれかの少なくとも1つの糖類を含有する本発明のワクチン又は医薬組成物、好ましくは2a、2b、2c、4a、4b、4c、4d、4e、6a、6b、6c、8a、8b及び8cである糖類又は活性成分としてのその薬学的に許容される塩は、典型的には、意図する投与形態に関して適切に選択された適切な担体材料、すなわち経口錠剤、カプセル(固体充填、半固体充填又は液体充填)、構成用粉末剤、経口ゲル剤、エリキシル剤、分散性顆粒剤、シロップ剤、懸濁剤などと混合して投与され、従来の薬務での慣習と一致する。例えば、錠剤又はカプセル剤の形態での経口投与のためには、活性成分を、ラクトース、デンプン、スクロース、セルロース、ステアリン酸マグネシウム、リン酸二カルシウム、硫酸カルシウム、タルク、マンニトール、エチルアルコール(液状)などといった任意の経口の無毒の薬学的に許容される不活性担体と組み合わせることができる。さらに、所望又は必要に応じて、適切な結合剤、潤滑剤、崩壊剤及び着色剤も混合物に組み入れることができる。散剤及び錠剤は、約5～約95パーセントの四糖類から構成されていてもよい。

【0377】

適切な結合剤としては、デンプン、ゼラチン、天然糖、コーン甘味料、アカシアなどの天然及び合成ゴム、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレングリコール及びワックスが挙げられる。これらの剤形に使用するために挙げができる潤滑剤の中には、ホウ酸、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウムなどがある。崩壊剤としては、デンプン、メチルセルロース、グアーガムなどが挙げられる。甘味剤及び香味剤ならびに保存剤もまた、適切な場合には含まれてもよい。上記の用語のいくつか、すなわち崩壊剤、希釈剤、潤滑剤、結合剤などは、以下により詳細に論じる。

【0378】

さらに、本発明のワクチン又は医薬組成物は、治療効果を最適化するために任意の1つ以上の成分又は活性成分の速度制御放出をもたらすために、徐放形式で処方してもよい。徐放のための適切な剤形には、活性成分を含浸させて錠剤又はカプセルの形態に成形した

10

20

30

40

50

様々な崩壊速度をもつ又は制御されて放出するポリマーマトリックスを含有する層状の錠剤が含まれ、当該ポリマーマトリックスには、活性成分が含浸又は封入された多孔質ポリマーマトリックスが含まれる。

【0379】

液状の形態の調製物は、液剤、懸濁剤及びエマルジョンを含む。例として、非経口注射用の水、又は水・プロピレングリコールの溶液、或いは経口用液剤、懸濁剤及びエマルジョン用の甘味剤及び乳白剤の添加を挙げることができる。液状形態の調製物はまた、鼻腔内投与用の溶液を含み得る。

【0380】

吸入に適したエアロゾル調製物は、溶液及び粉末の形態の固体を含み得、これらは、不活性圧縮ガス、例えば窒素などの薬学的に許容される担体と組み合わせてもよい。

10

坐剤を調製するために、カカオ脂などの脂肪酸グリセリドの混合物などの低融点ワックスを最初に溶融させ、活性成分を攪拌又は同様の混合をすることによって、その中に均質に分散させる。次いで、溶融した均質の混合物を、都合のよい大きさの型に注ぎ込み、冷却させ、それによって固化させる。

【0381】

使用直前に、経口投与又は非経口投与のいずれかのための液状の形態の調製物に変換されることが意図されている固体の形態の調製物も含まれる。そのような液状の形態は、溶液、懸濁液及びエマルジョンを含む。

【0382】

一般式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(IV-2)のいずれかの少なくとも1つの糖類、好ましくは糖類1f、2a、2b、2b'、2c、2f、4a、4b、4c、4d、4e、4f、6a、6b、6c、6f、8a、8b、8c及び8fを含有する本発明のワクチン又は医薬組成物はまた、経皮的に送達可能であってよい。経皮組成物は、クリーム、ローション、エアロゾル及び/又はエマルジョンの形態をとることができ、この目的のために当技術分野において慣例的であるように、マトリックス又はリザーバータイプの経皮パッチに含めることができる。

20

【0383】

カプセルという用語は、活性成分を含む組成物を保持又は含有するための、メチルセルロース、ポリビニルアルコール、又は変性ゼラチンもしくはデンプンで作られた特別な容器又はエンクロージャを示す。ハードシェルカプセルは典型的には比較的高いゲル強度の骨と豚皮のゼラチンの混合物から作られる。カプセル自体は、少量の染料、不透明の薬剤、可塑剤及び保存剤を含み得る。

30

【0384】

錠剤とは、活性成分を適切な希釈剤と共に含有する圧縮又は成形された固形剤形を意味する。錠剤は、湿式造粒、乾式造粒又は当業者に周知の圧縮によって得られた混合物又は顆粒を圧縮することによって調製することができる。

【0385】

経口ゲルは、親水性半固体マトリックスに分散又は可溶化された活性成分を示す。

40

構成用の粉末は、水又はジュースに懸濁することができる活性成分及び適切な希釈剤を含有する粉末混合物を示す。

【0386】

適切な希釈剤は、通常、組成物又は剤形の大部分を構成する物質である。適切な希釈剤としては、ラクトース、スクロース、マンニトール及びソルビトール、小麦、トウモロコシ、米、及びジャガイモ由来のデンプンなどの糖類、ならびに微結晶セルロースなどのセルロースが挙げられる。組成物中の希釈剤の量は、全組成物の約5～約95重量%、好ましくは約25～約75重量%、より好ましくは約30～約60重量%、最も好ましくは約40～約50重量%の範囲であり得る。

【0387】

50

崩壊剤という用語は、それが分解（崩壊）して、医薬を放出するのを補助するために、組成物に添加される物質を示す。適切な崩壊剤としては、デンプン；カルボキシメチルデンプンナトリウム等の「冷水可溶性」加工デンプン；イナゴマメ、カラヤ、グアー、トラガント、アガー等の天然及び合成ゴム；メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、微結晶セルロース等のセルロース誘導体；クロスカルメロースナトリウム等の架橋された微結晶性セルロース；アルギン酸、アルギン酸ナトリウム等のアルギン酸塩；ベントナイト等の粘土、及び発泡性混合物が挙げられる。組成物中の崩壊剤の量は、組成物の約1～約40重量%、好ましくは組成物の2～約30重量%、さらに好ましくは組成物の約3～20重量%、最も好ましくは約5～約10重量%の範囲であり得る。

【0388】

10

結合剤は、粉末を一緒に結合又は「接着」し、顆粒を形成することによってそれらを凝集性にし、したがって配合物中の「接着剤」として働く物質を特徴付ける。結合剤は、希釈剤又は增量剤においてすでに利用可能な凝集力を加える。適切な結合剤としては、スクロースなどの糖、小麦、トウモロコシ、米、及びジャガイモ由来のデンプン；アカシア、ゼラチン、トラガントなどの天然ゴム；アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、及びアルギン酸カルシウムアンモニウムなどの海藻の誘導体；メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロースなどのセルロース系材料；ポリビニルピロリドン；ケイ酸マグネシウムアルミニウムなどの無機物が挙げられる。組成物中の結合剤の量は、組成物の約1～30重量%、好ましくは組成物の約2～約20重量%、さらに好ましくは約3～約10重量%、さらにより好ましくは約3～約6重量%の範囲であり得る。

【0389】

20

潤滑剤は、錠剤、顆粒などが、圧縮された後に、摩擦又は磨耗を減少させることによって鋳型又はダイス型から放出することを可能にするために剤形に添加される物質を示す。適切な潤滑剤には、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム又はステアリン酸カリウムなどのステアリン酸金属塩；ステアリン酸；高融点ワックス；及び塩化ナトリウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、オレイン酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、及びD'L-ロイシンなどの水溶性潤滑剤が含まれる。潤滑剤は、顆粒の表面上及びそれらと打錠機の部品との間に存在しなければならないので、通常、圧縮前のまさに最後の工程で添加される。組成物中の潤滑剤の量は、組成物の約0.05～約15重量%、好ましくは組成物の0.2～約5重量%、より好ましくは約0.3～約3重量%、最も好ましくは組成物の約0.3～約1.5重量%の範囲であり得る。

【0390】

30

滑沢剤はケーリングを防止し、顆粒の流動特性を改善する物質であり、その結果流動は滑らかで均一になる。適切な滑沢剤は、二酸化ケイ素及びタルクを含む。組成物中の滑沢剤の量は、組成物の約0.01～10重量%、好ましくは全組成物の0.1～約7重量%、さらに好ましくは約0.2～5重量%、最も好ましくは約0.5～約2重量%の範囲であり得る。

【0391】

40

着色剤は、組成物又は剤形に着色をもたらす賦形剤である。そのような賦形剤は、粘土又は酸化アルミニウムなどの適切な吸着剤に吸着された食品用染料及び食品用染料を含むことができる。着色剤の量は、組成物の約0.01～10重量%、好ましくは約0.05～6重量%、より好ましくは組成物の約0.1～約4重量%、最も好ましくは約0.1～約1%で変化し得る。

【0392】

本発明のワクチンの処方及び投与のための技術は、‘‘Remington's Pharmaceutical Sciences’’ Mack Publishing Co., Easton PAに見出すことができる。一般式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(IV-2)のいずれか1つの少なくとも1つの糖類を含む適切なワクチン組成物

50

、好ましくは糖類 1 f、2 a、2 b、2 b'、2 c、2 f、4 a、4 b、4 c、4 d、4 e、4 f、6 a、6 b、6 c、6 f、8 a、8 b、8 c 及び 8 f、及び / 又はそれらの薬学的に許容される塩は、適切な液体医薬担体又は錠剤、丸剤、フィルム錠剤、コーティング錠、糖衣剤、カプセル剤、散剤及び沈殿物剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤、エマルジョンなどの他のいずれかの製剤における、そのような糖類の溶液であり得る。

【 0 3 9 3 】

一般式 (I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1) 及び (IV-2) のいずれか 1 つの糖類、好ましくは糖類 1 f、2 a、2 b、2 b'、2 c、2 f、4 a、4 b、4 c、4 d、4 e、4 f、6 a、6 b、6 c、6 f、8 a、8 b、8 c 及び 8 f の治療有効用量は、疾患に対する少なくとも部分的な免疫化をもたらす化合物の量を示す。そのような化合物の毒性及び治療効能は、細胞培養物又は実験動物における標準的な薬学的、薬理学的、及び毒性学的手順によって判定することができる。毒性作用と治療効果の間の用量比が治療指標である。投与される組成物の実際の量は、治療される対象、対象の体重、苦痛の重症度、投与方法及び処方する医師の判断に左右される。

【 0 3 9 4 】

言及されたワクチン製剤は、本発明の化合物のモジュール式構成により、室温で驚くべき安定性を示し、該ワクチン製剤は少なくとも 25 の温度で、再構成の前に、少なくとも 3 ヶ月の期間、維持され得る。本明細書に記載のワクチン製剤の温度安定性は、今までに記載されているヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型に対するワクチンを超える本発明の特定の利点を構成する。

本発明の好ましい実施形態において、該期間は 6 ヶ月又は少なくとも 12 ヶ月を含む。

【 0 3 9 5 】

抗体

本発明はまた、一般式 (I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)、及び (IV-2) の少なくとも 1 つの合成糖類に対する抗体について示す。抗体はモノクローナルハイブリドーマによって產生される。この抗体は、肺炎、髄膜炎、中耳炎、菌血症、慢性気管支炎の急性増悪、副鼻腔炎、関節炎、結膜炎の診断、予防、治療のためのものである。本発明の別の実施形態は、ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型によって引き起こされる髄膜炎、肺炎、及び喉頭蓋炎の診断、予防、及び治療用の医薬又は装置を製造するための抗体の使用である。

【 0 3 9 6 】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体調製物及びモノクローナル抗体調製物、ならびに親抗体分子の免疫学的結合特性を示すハイブリッド抗体、F(ab')₂ 断片、F(ab) 分子、單一ドメイン抗体及びその機能的断片を含む調製物を包含する。本発明による抗体は、ポリクローナル又はモノクローナルであり得る。

【 0 3 9 7 】

一般式 (I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1) 及び (IV-2) のいずれか 1 つの糖類、好ましくは糖類 1 f、2 a、2 b、2 b'、2 c、2 f、4 a、4 b、4 c、4 d、4 e、4 f、6 a、6 b、6 c、6 f、8 a、8 b、8 c 及び 8 f 又はそれらの抗体は、医薬組成物、特にヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型によって引き起こされる疾患の治療又は予防のためのワクチンの調製に使用することができる。本発明の糖類又はその抗体は、ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型に起因する疾患の治療又は予防に使用することができる。

【 0 3 9 8 】

さらに本発明は、ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型によって引き起こされる髄膜炎、肺炎、及び喉頭蓋炎の診断のための免疫学的アッセイにおける、本発明による一般式 (I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1) 及び (IV-2) の少なくとも 1 つの糖類、好ましくは糖

類 1 f、 2 a、 2 b、 2 b'、 2 c、 2 f、 4 a、 4 b、 4 c、 4 d、 4 e、 4 f、 6 a、 6 b、 6 c、 6 f、 8 a、 8 b、 8 c 及び 8 f、 又は本発明の少なくとも 1 つの糖類に対する少なくとも 1 つの抗体の使用に関する。

【 0 3 9 9 】

そのようなアッセイは、例えば、ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型によって引き起こされる疾患の診断に有用なマイクロアレイ及び E L I S A を含む。したがって、本発明の他の態様は、ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型に起因する疾患の診断のための、式 (I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)、及び(IV-2) の糖類、好ましくは、糖類 1 f、2 a、2 b、2 b'、2 c、2 f、4 a、4 b、4 c、4 d、4 e、4 f、6 a、6 b、6 c、6 f、8 a、8 b、8 c 及び 8 f のいずれか 1 つの使用に関する。 10

【 0 4 0 0 】

一般式 (I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)、及び(IV-2) の糖類、好ましくは糖類 1 f、2 a、2 b、2 b'、2 c、2 f、4 a、4 b、4 c、4 d、4 e、4 f、6 a、6 b、6 c、6 f、8 a、8 b、8 c 及び 8 f のいずれか 1 つ、又はそのような糖類の混合物をマイクロアレイ表面又は他の任意の表面に固定化し、ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型を検出するインピトロ法に使用することができる。ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型を同定する方法は、本発明の少なくとも 1 つの糖類の使用を含む。さらに、一般式 (I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)、及び(IV-2) の合成糖類、好ましくは、糖類 1 f、2 a、2 b、2 b'、2 c、2 f、4 a、4 b、4 c、4 d、4 e、4 f、6 a、6 b、6 c、6 f、8 a、8 b、8 c 及び 8 f、又はそのような糖類の混合物をイムノアッセイの分析基準として使用することができる。 20

【 0 4 0 1 】

診断装置

本発明の他の態様は、一般式 (I) の少なくとも 1 つの糖類、好ましくは、式 (II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4) の糖類、より好ましくは式 (III-1)、(III-2)、(IV-1)、及び(IV-2) の糖類、好ましくは糖類 1 f、2 a、2 b、2 b'、2 c、2 f、4 a、4 b、4 c、4 d、4 e、4 f、6 a、6 b、6 c、6 f、8 a、8 b、8 c 及び 8 f を含む固体支持体に関する。 30

【 0 4 0 2 】

この固体支持体は診断装置の一部であるのが好ましい。固体支持体及び診断装置は、ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型によって引き起こされる髄膜炎、肺炎、及び喉頭蓋炎の診断に使用され、一般式 (I) の少なくとも 1 つの糖類は、好ましくは共有結合によって該固体支持体に固定される。

【 0 4 0 3 】

本発明の他の態様は、固体支持体がガラススライド、ガラスプレート、マイクロタイタープレート、マイクロスフェア、又はビーズを含む群から選択される診断装置である。

本発明のさらに他の実施形態は、一般式 (I) の少なくとも 1 つの糖類が連結分子により共有結合している診断装置である。 40

【 0 4 0 4 】

さらに、本発明は、式 (I) による糖類が、ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型によって引き起こされる髄膜炎、肺炎及び喉頭蓋炎の免疫学的アッセイに使用できることを示す。

【 0 4 0 5 】

そのようなアッセイは、例えば、ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型によって引き起こされる髄膜炎、肺炎、及び喉頭蓋炎の診断に有用なマイクロアレイ及び E L I S A を含む。

【 0 4 0 6 】

したがって、本発明の別の態様は、ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型によって引き起こされる髄膜炎、肺炎、及び喉頭蓋炎の診断のための式 (I) の糖類の使用に関する。

本発明による糖類 (I) は、共有結合によって固体支持体に固定化されている。固体支持体に結合していないか又は固体支持体に固定化された少なくとも 1 つの合成糖類 (I) が、ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型によって引き起こされる髄膜炎、肺炎及び喉頭蓋炎の診断に使用される。

【 0 4 0 7 】

ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型によって引き起こされる髄膜炎、肺炎、及び喉頭蓋炎の診断のための糖類 (I) の使用は、一般式 (I) の少なくとも 1 つの糖類に特異的な抗体の存在の検出に基づく。したがって、一般式 (I) の少なくとも 1 つの糖類を含む診断装置は、ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型によって引き起こされる髄膜炎、肺炎、及び喉頭蓋炎の診断に使用される。

【 0 4 0 8 】

ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型によって引き起こされる髄膜炎、肺炎、及び喉頭蓋炎に使用される式 (I) の糖類は、実質的に純粋であり、純度が 95 % 以上、好ましくは 96 % 以上、より好ましくは 97 % 以上、さらに好ましくは 98 % 以上、最も好ましくは 99 % 以上であることが好ましい。

【 0 4 0 9 】

ヘモフィルス属インフルエンザ菌 b 型によって引き起こされる髄膜炎、肺炎、及び喉頭蓋炎の診断に式 (I) の糖類が使用されるアッセイシステムの選択には、様々な可能性がある。本発明による診断目的のために行われるアッセイは、固相酵素免疫測定法 (EIA) 、酵素結合免疫吸着法 (ELISA) 、特に「間接的」ELISA 又は放射免疫アッセイ (RIA) のような免疫測定法であり得る。そのようなアッセイにおいて式 (I) の糖類を使用するためには、式 (I) の糖類を固体支持体に固定化することが必要であり得る。

【 0 4 1 0 】

したがって、本発明の他の実施形態は、少なくとも 1 つの糖類 (I) がリンカー又はスペーサーを介した共有結合によって固定化されている固体支持体である。本発明のさらに他の実施形態は、-O-L-NH₂ 基の窒素原子を介して直接又は間接的に固体支持体に共有結合により固定化された糖類である (図 2 (B))。

【 0 4 1 1 】

それ故、式 (I) の糖類は、特に診断用途のために、固体支持体に固定化され得る。本発明の好ましい一実施形態は、共有結合によって固体支持体に固定化された一般式 (I) の糖類である。本発明の特に好ましい一実施形態は、直接又は間接的な共有結合により固体支持体に固定化された一般式 (I) の糖類である。それにより、直接的な共有結合が特に好ましい。

【 0 4 1 2 】

さらに好ましくは、固体支持体は、スライドガラス、マイクロタイタープレート、試験管、マイクロスフェア、ナノ粒子又はビーズを含むか又はそれらからなる群から選択される。

【 0 4 1 3 】

固体支持体がスライドガラス又はマイクロタイタープレートであることが特に好ましい。マイクロタイタープレート又はマイクロプレート又はマイクロウェルプレートは、小さな試験管として使用される複数の「ウェル」を有する平板である。典型的には、6、24、96、384 又は 1536 もの試料のウェルを有するマイクロタイタープレートを使用することができる。マイクロプレートは、PCR に使用されるマイクロタイタープレート用のポリカーボネートのように、多くの様々な材料から製造されている。最も一般的なものは、ほとんどの光学検出マイクロプレートに使用されているポリスチレンである。それは、吸光度又はルミネセンスの検出のために二酸化チタンを添加することによって白色に着色することができ、又は蛍光生物学的アッセイのために炭素を添加することによって黒

10

20

30

40

50

色に着色することができる。

【0414】

本明細書で使用される「直接的な共有結合」は、一般式(I)の糖類の官能基を、固体支持体が作られる材料の官能基と反応させることによる、一般式(I)の化合物の固定化を示す。一般式(I)の糖類の官能基は、-O-L-NH₂において上で定義されたようなアミンであることが好ましい。固体支持体の可能な反応性官能基は、フェニル基、アミノ基、ヒドロキシル基、チオール基、カルボニル基、カルボキシル基、ビニル基、フッ化物、塩化物、臭化物及びヨウ化物などのハロゲン化物、マレイミド、スクシンイミドエステルであり得る。

【0415】

本明細書で使用される「間接的な共有結合」は、固体支持体への一般式(I)の糖類の固定化を示し、一般式(I)の糖類は、固体支持体への固定化を媒介する第2の化合物に共有結合する。この第2の化合物は免疫応答を引き起こさないタンパク質であることが好ましい。偽陽性の結果を避けるために、第2の化合物それ自体が、おそらく患者の血液又は血清中に存在するいかなる抗体によっても結合されないことが重要である。さらに、第2の化合物は、共有結合又は非共有結合によって固体担体に固定化できるべきである。この第2の化合物は、ウシ血清アルブミン(BSA)、ヒト血清アルブミン(HAS)、ゼラチン又はカゼインを含むかそれらからなる群から選択されることが好ましい。したがって、間接的な共有結合を用いた固定化は、好ましくは第2の化合物としてのタンパク質への一般式(I)の糖類の共有結合(例えばタンパク質の遊離アミノ基を用いる)、及び固体支持体とタンパク質との間の共有結合又は非共有相互作用による後続のタンパク質の固体支持体への結合を示す。可能な非共有相互作用は、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力、及び疎水性相互作用である。ポリスチレン及びポリプロピレンのような多くのポリマーは事実上疎水性である。それにもかかわらず、異なる接着条件に対して最適化された特殊な表面を有する固体支持体を供給する製造業者もある。

【0416】

しかし、固定化、特に間接的な共有結合を使用した固定化もまた強い接着によって起こり得る。したがって、本発明による効果的な固定化は、化学的な結合によってだけでなく、物理的な吸着に関連する固定化による非結合によって、実現され得る。物理的な吸着の重要な特徴として、付着力がファンデルワールス力によって引き起こされるという現象が作用する。「非結合」という用語は、共有結合以外の結合を示す。

【0417】

本発明による固定化形態としての化学吸着は、固体支持体と式(I)の糖類との間の化学的な結合を使用する。そのような結合は共有結合性であり得るが、イオン性もあり得る。

【0418】

本発明の好ましい態様において、固体支持体への式(I)の糖類の固定化は、直接的な共有結合、すなわちこれら2つの反応物間の化学反応、好ましくは置換反応によって実現される。本発明のより好ましい態様において、固体支持体は、本発明の化合物との反応時に固体支持体を離れることができる官能基で修飾されている。このような官能基は、固体支持体の構成分子に直接結合しても、固体支持体の構成分子に直接結合しているリンカーに結合してもよい。したがって、本発明のより好ましい実施形態では、固体支持体は適切な脱離基を有するように修飾されている。適切な脱離基は、塩化物、臭化物及びヨウ化物のようなハロゲン化物、水酸化物、オキシム、マレイミド、スクシンイミド、アルコール及びエステルであり得る。そのような脱離基は、マレイミド；-ヨードアセチル；-プロモアセチル；N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHS)及び2-ピリジルジチオールであっても、組み込まれてもよい。さらにより好ましい実施形態において、固体支持体の脱離基は、好ましくはプロトン交換の際に、アミン、アルコール及びチオールと反応することができる。本発明の最も好ましい実施態様において、固体支持体は、スクシンイミジルヒドロキシド官能基、より好ましくはN-スクシンイミジルヒドロキシドで官

10

20

30

40

50

能化され、これはN-ヒドロキシスクシンイミドとしての本発明の化合物との反応時に固体支持体を脱離する。

【0419】

適切な脱離基の導入による固体支持体の修飾は、好ましくは未修飾担体と反応性二官能性分子、好ましくは2つの官能基間に分子架橋又はスペーサーアームを有する二官能性分子との反応により行われる。本発明の好ましい実施形態では、固体支持体と積極的に反応する官能基は、スルホスクシンイミドエステル及びスクシンイミドを含む。

【0420】

二官能性連結分子の1つのさらなる好ましい態様は、式(I)の糖類と結合することを意図する官能基を、固体担体まで適切な距離になるようにすることである。そのような適切な距離は、適切な長さの分子架橋又はスペーサーアームによって得られる。そのような分子架橋又はスペーサーアームは、好ましくは3(10⁻¹⁰m)~10nm、より好ましくは5~50、最も好ましくは6~30の長さを有し得る。

【0421】

固体支持体の修飾に適した反応性二官能性分子は、N-(*α*-マレイミドブチリルオキシ)スルホスクシンイミドエステル(スルホ-GMBO)、スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(スルホ-SIAN)、スクシンイミジル-3-(プロモアセトアミド)プロピオネート(SBAP)、ジスクシンイミジルグルタレート(DSG)、2-ピリジルジチオール-テトラオキサテトラデカン-N-ヒドロキシスクシンイミド(PEG-4-SPDP)を含む。

【0422】

共有結合のために導入された反応性官能基を有するポリマーから製造された市販の固体支持体もある。一例は、Thermoサイエンティフィック社によりCovalink(商標)NHと命名されたマイクロプレートであり、これは第二級アミン基を介した共有結合を可能にする。

【0423】

本発明の別の態様は、ヘモフィルス属インフルエンザ菌b型によって引き起こされる髄膜炎、肺炎、及び喉頭蓋炎の診断のための、共有結合によって固体支持体に固定化された一般式(I)の少なくとも1つの合成糖類を含む診断装置の使用である。

【0424】

キット

本発明の一実施形態は、共有結合によって固体支持体に固定化された一般式(I)の少なくとも1つの糖類、又は固体支持体に固定化するための一般式(I)の糖類を含むキットに関する。一般式(I)の少なくとも1つの糖類は、該アッセイにおけるマーカーとして使用できる。本発明の別の実施形態は、一般式(I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(V-2)のいずれか1つの糖類に対する少なくとも1つの抗体を含むキットに関する。

【0425】

分子生物学又は医学的診断におけるキットは、特定の方法又は単独の工程を実施するために必要なすべての成分を含むパッケージである。いかなる標準的な分子生物学や医学研究室に存在する標準的な化学物質も、通常含まれていない。それにもかかわらず、これらの標準的な化学物質のいくつかは、診断又は固定化を適切に実施するために不可欠であり得る。すべての成分は、科学的、診断的及び工業的用途の大部分での所望の反応を適切に実行できる量で提供されることが理解される。

【0426】

常にではない多くの場合、これらの成分はすでに調製された溶液中で、すぐに使える状態、又はすぐに使えるのに近い状態で提供される。すでに一緒に添加されている異なる成分の組み合わせもあり得る。さらなる利点は、そのようなキットが検証されるために使用されるということである。したがって、操作者は診断方法の実行可能性を再度証明する必要はなく、少なくともいくつかの制御実験を省くことができる。したがって、キットは

10

20

30

40

50

研究、診断及び産業の実験室で非常に一般的なツールである。

【0427】

- 本発明によるそのようなキットは、少なくとも以下の構成要素を含むものとする：
- A) 一般式 (I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(IV-2)の少なくとも1つの糖類が固定化されている固体支持体、
- B) 検出抗体のような少なくとも1つの抗体、
- C) 標準溶液。

又は本発明によるキットは少なくとも以下の構成要素を含むものとする：

- A') 一般式 (I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(IV-2)の糖類に対する少なくとも1つの抗体が固定化されている固体支持体、
- B) 検出抗体のような少なくとも1つのさらなる抗体、
- C) 標準溶液。

【0428】

以下の構成要素もそのようなキットに含まれてもよい：

- D) ブロッキング液
- E) 洗浄液
- F) 試料緩衝液。

【0429】

キットの抗体は、捕捉抗体として使用することができる特異的抗体であり得る。しかし好ましくは、抗体のFc領域に特異的に結合するのは、検出抗体として使用される少なくとも酵素結合二次抗体である。定量的判定のために、試料の光学密度(OD)又は蛍光を標準曲線と比較する。それは、典型的には、標的分子の既知の濃度の溶液(標準溶液)の連続希釈である。ブロッキング溶液は、抗原によってコーティングされていないウェル内の任意のプラスチック表面をブロックするために添加される、ウシ血清アルブミンやカゼインなどの非反応性タンパク質の溶液であり得る。洗浄液は非結合成分を除去するために使用される。標的分子の濃度が、使用される試験システムによって通常検出され得る範囲内にあるように、試料緩衝液を使用して患者の試料(血液、血清、尿)を希釈することができる。

【0430】

固体支持体に一般式 (I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(IV-2)の糖類を固定化することに対してキットが許容される場合、キットは少なくとも以下を含むべきである：

- A) 一般式 (I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)及び(IV-2)のいずれか1つの少なくとも1つの糖類、又は一般式 (I)、(II-1)、(II-2)、(II-3)、(II-4)、(III-1)、(III-2)、(IV-1)、(IV-2)の少なくとも1つの合成糖類に対する抗体、

- B) マイクロタイタープレート又はマイクロアレイスライドのような固体支持体。

【0431】

それによって、固体支持体を修飾することができ、例えば、固体支持体を上記のようにリンカーモノマーで官能化することができる。

以下の構成要素もそのようなキットに含まれてもよい：

- C) ブロッキング液
- D) 洗浄液
- E) 反応緩衝液

【図面の簡単な説明】

【0432】

【図1】本発明による市販の相互連結分子を示す。

10

20

30

40

50

【図2】(A) 担体タンパク質とコンジュゲートした糖類。(B) 固体支持体にコンジュゲートした糖類を示す。

【図3】CRM₁₉₇ 及びシスティンにコンジュゲートした2'-メトキシリボシリリビトールホスフェート四量体29の合成スキーム。

【図4】(A) 0.1Mの水酸化ナトリウム溶液で20時間処理した後の断片化Hi b CPS、及び(B)参照としての未処理Hi b CPSの¹H NMRスペクトル。比較は、Hi b CPSが塩基性条件下で20時間以内に完全に加水分解することを示す。

【図5】0.1M水酸化ナトリウム溶液で20時間処理した後の断片化Hi b CPSの(A)HPLCクロマトグラム及び(B)ESI質量スペクトル。

【図6】(A)7日間及び(B)37で2日間、ならびに(D)7日間及び(E)室温で2日間、Al hydrogel(登録商標)で処理した後のHi b CPSのHPLCクロマトグラム。未処理Hi b CPSのHPLCクロマトグラムを(C)に示す。

【図7】(A)Al hydrogel(登録商標)、(B)リン酸アルミニウム、(C)水で7日間37で処理した後の化合物16のHPLCクロマトグラム。未処理化合物16及び8のHPLCクロマトグラムを(D)及び(E)に示す。

【図8】(A)Al hydrogel(登録商標)、(B)リン酸アルミニウム、(C)水で2~8で7日間処理した後の化合物16のHPLCクロマトグラム。未処理化合物16及び8のHPLCクロマトグラムを(D)及び(E)に示す。

【図9】(A)Al hydrogel(登録商標)、(B)リン酸アルミニウム、(C)水で7日間室温で処理した後の化合物16のHPLCクロマトグラム。未処理化合物16及び8のHPLCクロマトグラムを(D)及び(E)に示す。

【図10】(A)Al hydrogel(登録商標)、(B)リン酸アルミニウム、(C)水で7日間70で処理した後の化合物16のHPLCクロマトグラム。未処理化合物16及び8のHPLCクロマトグラムを(D)及び(E)に示す。

【図11】(A)Al hydrogel(登録商標)、(B)リン酸緩衝液、(C)水で14日間室温で処理した後の化合物30のHPLCクロマトグラム。未処理化合物30、16及び8のHPLCクロマトグラムを(D)、(E)及び(F)に示す。

【図12】(A)Al hydrogel(登録商標)、(B)リン酸緩衝液、(C)水で2~8で14日間処理した後の化合物30のHPLCクロマトグラム。未処理化合物30、16及び8のHPLCクロマトグラムを(D)、(E)及び(F)に示す。

【図13】(A)0.1M水酸化ナトリウム溶液で3日間処理した後の化合物30、(C)0.1M水酸化ナトリウム溶液で3日間処理した後の化合物16のHPLCクロマトグラム。未処理の化合物30、16及び8のHPLCクロマトグラムを(B)、(D)及び(E)に示す。

【図14A】CRM₁₉₇にコンジュゲートした(A)化合物30のMALDI質量スペクトル。

【図14B】CRM₁₉₇にコンジュゲートした(B)化合物94のMALDI質量スペクトル。

【図15】リン酸緩衝剤の存在下での化合物94のHPLC-SECクロマトグラム。

【図16】コンジュゲート94の構造を示す。

【図17A】グリカンアレイ分析：(A)21日後のHi b PRP阻害剤の存在下(灰色の棒)又は阻害剤なし(黒い棒)の化合物19、24、29、53及び62の抗体(Hi bヒト参照血清)への結合を示す。エラーバーは四重反復試料の標準偏差を表す。

【図17B】グリカンアレイ分析：(B)21日後の、Hi b PRP阻害剤の存在下(灰色の棒)又は阻害剤なし(黒い棒)の化合物19、24、29、53及び62の抗体(ウサギタイピング血清)への結合を示す。エラーバーは四重反復試料の標準偏差を表す。

【図17C】グリカンアレイ分析：35日後の、(C)化合物94及び(D)Al hydrogelで化合物94を免疫することによって生じた抗体に対する参照としての化合物19、24、29、53、62及び天然Hi b PRPの結合。エラーバーは四重反復試料の標準偏差を表す。

10

20

30

40

50

【図17D】グリカンアレイ分析：35日後の、(C)化合物94及び(D)Alhydrogelで化合物94を免疫することによって生じた抗体に対する参照としての化合物19、24、29、53、62及び天然Hib-PRPの結合。エラーバーは四重反復試料の標準偏差を表す。

【図18A】ELISA研究：非アジュバントコンジュゲート94(四角)、Alhydrogelでアジュバントしたコンジュゲート94(三角)、PBS/Alhydrogel(黒丸)、及びHiberix(登録商標)(逆三角)で免疫化したウサギ(n=4)から得たIgG抗体の、0日後(A-陰性対照)の天然Hib-PRP抗原でコートされたプレートへの結合。血清を1%BSA-PBSで5倍に希釈した。希釈した血清(100μL)を1μgのHib-PRP多糖類で被覆したマイクロタイタープレートの各ウェルに加え、1:10000に希釈したHRPコンジュゲートヤギ抗ウサギ二次抗体で検出し、TMBを用いて現像した。吸光度を450nmで測定し、データをグラフパッドプリズムソフトウェアを用いてプロットした。

【図18B】ELISA研究：非アジュバントコンジュゲート94(四角)、Alhydrogelでアジュバントしたコンジュゲート94(三角)、PBS/Alhydrogel(黒丸)、及びHiberix(登録商標)(逆三角)で免疫化したウサギ(n=4)から得たIgG抗体の、14日後(B)の天然Hib-PRP抗原でコートされたプレートへの結合。血清を1%BSA-PBSで5倍に希釈した。希釈した血清(100μL)を1μgのHib-PRP多糖類で被覆したマイクロタイタープレートの各ウェルに加え、1:10000に希釈したHRPコンジュゲートヤギ抗ウサギ二次抗体で検出し、TMBを用いて現像した。吸光度を450nmで測定し、データをグラフパッドプリズムソフトウェアを用いてプロットした。

【図18C】ELISA研究：非アジュバントコンジュゲート94(四角)、Alhydrogelでアジュバントしたコンジュゲート94(三角)、PBS/Alhydrogel(黒丸)、及びHiberix(登録商標)(逆三角)で免疫化したウサギ(n=4)から得たIgG抗体の、21日後(C)の天然Hib-PRP抗原でコートされたプレートへの結合。血清を1%BSA-PBSで5倍に希釈した。希釈した血清(100μL)を1μgのHib-PRP多糖類で被覆したマイクロタイタープレートの各ウェルに加え、1:10000に希釈したHRPコンジュゲートヤギ抗ウサギ二次抗体で検出し、TMBを用いて現像した。吸光度を450nmで測定し、データをグラフパッドプリズムソフトウェアを用いてプロットした。

【図18D】ELISA研究：非アジュバントコンジュゲート94(四角)、Alhydrogelでアジュバントしたコンジュゲート94(三角)、PBS/Alhydrogel(黒丸)、及びHiberix(登録商標)(逆三角)で免疫化したウサギ(n=4)から得たIgG抗体の、35日後(D)の天然Hib-PRP抗原でコートされたプレートへの結合。血清を1%BSA-PBSで5倍に希釈した。希釈した血清(100μL)を1μgのHib-PRP多糖類で被覆したマイクロタイタープレートの各ウェルに加え、1:10000に希釈したHRPコンジュゲートヤギ抗ウサギ二次抗体で検出し、TMBを用いて現像した。吸光度を450nmで測定し、データをグラフパッドプリズムソフトウェアを用いてプロットした。

【図19A】ELISA研究：非アジュバントコンジュゲート94(四角)、Alhydrogelでアジュバントしたコンジュゲート94(三角)、PBS/Alhydrogel(黒丸)、及びHiberix(登録商標)(逆三角)で免疫化したウサギ(n=4)から得たIgG抗体の、0日後(A-陰性対照)の天然Hib-PRP抗原でプレコートされた市販のADIプレートへの結合。血清を1%BSA-PBSで5倍に希釈した。希釈した血清(100μL)を1μgのHib-PRP多糖類で被覆したマイクロタイタープレートの各ウェルに加え、1:10000に希釈したHRPコンジュゲートヤギ抗ウサギ二次抗体で検出し、TMBを用いて現像した。吸光度を450nmで測定し、データをグラフパッドプリズムソフトウェアを用いてプロットした。

【図19B】ELISA研究：非アジュバントコンジュゲート94(四角)、Alhyd

10

20

30

40

50

rogelでアジュバントしたコンジュゲート94(三角)、PBS/Alhydrogel(黒丸)、及びHibrix(登録商標)(逆三角)で免疫化したウサギ($n=4$)から得たIgG抗体の、14日後(B)の天然Hib-PRP抗原でプレコートされた市販のADIプレートへの結合。血清を1%BSA-PBSで5倍に希釈した。希釈した血清(100μL)を1μgのHib-PRP多糖類で被覆したマイクロタイタープレートの各ウェルに加え、1:10000に希釈したHRPコンジュゲートヤギ抗ウサギ二次抗体で検出し、TMBを用いて現像した。吸光度を450nmで測定し、データをグラフパッドプリズムソフトウェアを用いてプロットした。

【図19C】ELISA研究：非アジュバントコンジュゲート94(四角)、Alhydrogelでアジュバントしたコンジュゲート94(三角)、PBS/Alhydrogel(黒丸)、及びHibrix(登録商標)(逆三角)で免疫化したウサギ($n=4$)から得たIgG抗体の、21日後(C)の天然Hib-PRP抗原でプレコートされた市販のADIプレートへの結合。血清を1%BSA-PBSで5倍に希釈した。希釈した血清(100μL)を1μgのHib-PRP多糖類で被覆したマイクロタイタープレートの各ウェルに加え、1:10000に希釈したHRPコンジュゲートヤギ抗ウサギ二次抗体で検出し、TMBを用いて現像した。吸光度を450nmで測定し、データをグラフパッドプリズムソフトウェアを用いてプロットした。

【図19D】ELISA研究：非アジュバントコンジュゲート94(四角)、Alhydrogelでアジュバントしたコンジュゲート94(三角)、PBS/Alhydrogel(黒丸)、及びHibrix(登録商標)(逆三角)で免疫化したウサギ($n=4$)から得たIgG抗体の、35日後(D)の天然Hib-PRP抗原でプレコートされた市販のADIプレートへの結合。血清を1%BSA-PBSで5倍に希釈した。希釈した血清(100μL)を1μgのHib-PRP多糖類で被覆したマイクロタイタープレートの各ウェルに加え、1:10000に希釈したHRPコンジュゲートヤギ抗ウサギ二次抗体で検出し、TMBを用いて現像した。吸光度を450nmで測定し、データをグラフパッドプリズムソフトウェアを用いてプロットした。

【発明を実施するための形態】

【0433】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれている。以下の実施例に開示される技術は、本発明の実施において十分に機能することが本発明者によって発見された技術を表し、したがってその実施のための好ましい様式を構成すると考えられるなどを、当業者は理解するべきである。しかし、当業者は、本開示に照らして、開示されて依然本発明の精神及び範囲から逸脱することなく同様又は類似の結果を依然として得る特定の実施形態において、多くの変更がなされ得ることを理解すべきである。

【0434】

本発明の様々な態様のさらなる修正及び代替の実施形態は、この説明に鑑みて当業者には明らかであろう。したがって、この説明は例示にすぎないと解釈されるべきであり、当業者に本発明を実施する一般的な方法を教示することを目的としている。本明細書に示され記載された本発明の形態は、実施形態の例として解釈されるべきであることを理解されたい。本明細書の説明の恩恵を受けた後に当業者にすべて明らかとなるように、要素及び材料は本明細書で図示及び説明したものに代わることができ、部品及びプロセスは逆にすることができ、本発明の特定の特徴は独立して利用できる。以下の特許請求の範囲に記載の本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の要素に変更を加えることができる。

【実施例】

【0435】

化学合成

略語：

TLC：薄層クロマトグラフィー、EtOAc：酢酸エチル、DCM：ジクロロメタン、RBF：丸底フラスコ、ACN：アセトニトリル、AcOH：酢酸、TBAF：フッ化

10

20

30

40

50

テトラブチルアンモニウム、BnBr：ベンジルプロマイド、DMAP：ジメチルアミノピリジン、PTFE：ポリテトラフルオロエチレン、AIBN：アゾビスイソブチロニトリル、THF：テトラヒドロフラン、NAP：2-ナフチルメチル、Lev：レブリニル。

化学合成に関する一般情報

特記しない限り、市販の試薬をさらに精製することなく使用した。溶媒を通常の方法で使用前に乾燥して再蒸留した。特記しない限り、すべての反応は、乾燥器乾燥ガラス器具中で不活性雰囲気下で実施した。分析用薄層クロマトグラフィー（TLC）は、0.25mmの厚さのシリカゲルでプレコートされたKieselgel 60 F254アルミニウムプレートで行った。TLCプレートをUV光で、Hanesian溶液（硫酸水溶液の硫酸セリウム及びモリブデン酸アンモニウム）又は硫酸-エタノール溶液で染色することによって可視化した。カラムクロマトグラフィーはFluka Kieselgel 60（230-400メッシュ）で行った。旋光度（OR）は、g/100mLで表される濃度（c）でSchmidt & Haensch Unipol L1000旋光計を用いて測定した。¹H及び¹³C NMRスペクトルは、内部標準としてMe₄Siを用いてVarian 400-MR又はVarian 600分光計で測定した。NMRの化学シフト（）はppmで記録し、カップリング定数（J）はHzで報告した。Agilent 6210 ESI-TOF質量分析計を用いて高分解能質量スペクトル（HRMS）を記録した。

一般手順A)ジシリルオキシ脱保護

TBAF（0.21mL、0.21mmol）及びAcOH（7μL、0.11mmol）を、THF（1.5mL）中の出発物質（0.073mmol）の搅拌溶液に、アルゴン雰囲気下で、10mLのRBF（乾燥器での乾燥）の中で室温で加えた。反応混合物を室温で4時間搅拌した。反応をTLCによってモニターした。出発物質を完全に消費した後、反応混合物をDCM（10mL）で希釈し、真空下で濃縮して粗生成物を得た。粗生成物は、溶離液としてn-ヘキサン中のEtOAc（20~60%）を用いる自動フラッシュクロマトグラフィーによるものであった。生成物（TLCに基づく）を含有する試験管からの溶媒を真空で濃縮すると、無色の油状物が得られた。

一般手順B)Bu₂SnOを用いたベンジル化

Ag₂O（0.116g、0.5mmol）及びBnBr（8μL、0.07mmol）を、DCM（1mL）中の出発物質（0.063mmol）の搅拌溶液に、アルゴン雰囲気下で、10mLのRBF（乾燥器での乾燥）の中で室温で加えた。反応混合物を室温で6時間搅拌し続けた。反応をTLCによってモニターした。出発物質を完全に消費した後、反応混合物をDCM（30mL）で希釈し、セライトパッドを通して濾過し、濾液を真空下で濃縮して粗生成物を得た。粗生成物を、溶離液としてn-ヘキサン中のEtOAc（0~50%）を用いて自動フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。生成物（TLCに基づく）を含有する試験管からの溶媒を真空で濃縮すると、無色の油状物が得られた。

【0436】

トルエン（50mL）中のジオール出発物質（4.6g、6.48mmol）の透明溶液に、搅拌子を備えてアルゴン雰囲気下で室温にて1400rpmで搅拌しながら、Bu₂SnO（2.42g、9.73mmol）を加えた。次に反応混合物を130℃で6時間還流下に保った。6時間後、溶媒を真空下で除去し、反応物をトルエン（5×10mL）の乾燥トルエン）と共に沸乾燥させた。溶媒を完全に除去した後、アセタールを真空下で20分間乾燥した。アセタールをアルゴンの存在下で真空から除去し、DMF（50mL）に溶解した。この溶液にBnBr（1.16mL、9.73mmol）及びTBAI（4.78g、12.96mmol）を加え、反応混合物を100℃で20時間搅拌し続けた。反応をTLC（n-ヘキサン中の40%のEtOAc）によりモニターした。20時間後、反応混合物をEtOAc（50mL）と水（20mL）で希釈した。水層を分離し、EtOAc（2×30mL）で洗浄した。合わせた有機層をNa₂SO₄（約2g）で乾

10

20

30

40

50

燥し、濾過し、濾液を真空中で濃縮して粗生成物を得た。粗生成物を、溶離液としてn-ヘキサン中のEtOAc(勾配、0~30%)を使用するシリカゲルでのカラムクロマトグラフィーによって精製した。試験管から得た溶媒の濃縮により、無色の油状物(3.8g、73%)が得られた。

一般手順C) Levによる保護

アルゴン雰囲気下、25mLのRBF中のDCM(3mL)中のヒドロキシル化合物(0.195mmol)の溶液に、レブリン酸(0.3mmol、30μL)、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩(0.3mmol、58mg)及びDMAP(0.2mmol、24mg)を加えた。得られた反応混合物を室温で2時間攪拌した。反応をTLCによってモニターした。出発物質を完全に消費した後、反応混合物をDCM(10mL)で希釈し、ブライン(5mL)で洗浄した。水層をDCM(2×5mL)で抽出した。有機層をNa₂SO₄(0.2g)で乾燥し、濾過し、濾液を真空中で濃縮して粗生成物を得た。粗生成物を、溶離液としてn-ヘキサン中のEtOAc(0~50%)を用いて自動フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。生成物(TLCに基づく)を含有する試験管からの溶媒を真空中で濃縮すると、白色油状物が生じた。

一般手順D) NAP脱保護

アルゴン雰囲気下、10mLのRBF(乾燥器での乾燥)中のジクロロメタン:H₂O(1.8:0.2mL)のNAP保護化合物(0.048mmol)の溶液に、2.3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノン(14mg、0.058mmol)を0で加えた。反応混合物を室温で1.5時間攪拌した。反応をTLCによってモニターした。反応液をDCM(10mL)で希釈し、飽和NaHCO₃水溶液(5mL)及びブライン(5mL)で抽出した。有機層をNa₂SO₄(0.2g)で乾燥し、濾過し、濾液を真空中で15分間濃縮して粗生成物を得た。粗生成物を、溶離液としてn-ヘキサン中のEtOAc(0~80%)を用いて自動フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。生成物(TLCに基づく)を含有する試験管からの溶媒を真空中で濃縮すると、白色油状物が生じた。

一般手順E) リン酸カップリング: ホスホルアミダイト法

アルゴン雰囲気下、25mLのRBF(乾燥器での乾燥)中のDCM(1.2mL)中の3-OH化合物(0.054mmol)の溶液に、ビス(ジイソプロピルアミノ)-ベンジルオキシホスフィン(0.108mmol)及びジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド(0.081mmol)を加え、溶液を室温で1.5時間攪拌した。反応をTLCによってモニターした。反応混合物をDCM(10mL)で希釈し、飽和NaHCO₃水溶液(5mL)でクエンチした。水層をDCM(2×5mL)で抽出した。合わせた有機層をブライン(5mL)で洗浄し、Na₂SO₄(0.5g)で乾燥し、濾過し、濾液を真空中で濃縮して粗生成物を得た。粗生成物を、溶離液としてn-ヘキサン中のEtOAc(0~30%)及び2%トリエチルアミンを用いて、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(カラム2×10cm)で精製した。生成物(TLCに基づく)を含有する試験管からの溶媒を真空中で濃縮すると、黄色油状物が得られた。生成物をトルエン(5mL)を用いてより小さなRBF(10mL)に移し、溶媒を真空中で20分間蒸発させると、白色油状物が得られた。生成物を高真空中に10分間放置し、アルゴンでフラッシュし、直ちに次の工程に使用した。アルゴン雰囲気下、10mLのRBF(乾燥器での乾燥)中のDCM(1.2mL)中のホスホルアミダイト(0.054mmol)の溶液に、5-OH化合物(0.036mmol)及びACN中のテトラゾール0.45M溶液(0.24mL、0.108mmol)を加え、溶液を室温で2時間攪拌した。次に、デカン中のt-ブチルペルオキシド5.0~6.0M溶液(0.015mL、0.072mmol)を室温で加え、反応混合物を1時間攪拌した。反応混合物をDCM(10mL)で希釈し、飽和NaHCO₃水溶液(5mL)でクエンチした。水層をDCM(2×5mL)で抽出した。合わせた有機層をブライン(5mL)で洗浄し、Na₂SO₄(0.3g)で乾燥し、濾過し、濾液を35の槽温度であるロータリーエバボレーターで15分間真空中で濃

10

20

30

40

50

縮して粗生成物を得た。粗生成物を、n-ヘキサン中のEtOAc(0~80%)を用いて自動フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。生成物(TLCに基づく)を含有する試験管からの溶媒を真空で濃縮すると、無色の油状物が生じた。

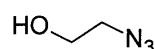
一般手順F) リンカーとのリン酸カップリング: ホスホルアミダイト法(ワンポット手順)

アルゴン雰囲気下、10mLのRBF(乾燥器での乾燥)中のDCM(1.0mL)中のヒドロキシル化合物(0.016mmol)の溶液に、ビス(ジイソプロピルアミノ)-ベンジルオキシホスфин(0.032mmol)及びジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド(0.024mmol)を加え、溶液を室温で1.5時間攪拌した。次に、リンカー(0.097mmol)及びテトラゾール0.45MのACN溶液(0.11mL、0.049mmol)、及び溶液を室温で2時間攪拌した。反応をTLCによってモニターした。次に、デカン中のt-ブチルペルオキシド5.0~6.0M溶液(0.006mL、0.032mmol)を室温で加え、反応混合物を1時間攪拌した。反応をTLCによってモニターした。反応混合物をDCM(5mL)で希釈し、飽和NaHCO₃水溶液(3mL)でクエンチした。水層をDCM(2×3mL)で抽出した。合わせた有機層をブライン(3mL)で洗浄し、Na₂SO₄(0.2g)で乾燥し、濾過し、濾液を真空下で濃縮して粗生成物を得た。粗生成物を、n-ヘキサン中のEtOAc(0~80%)を用いて自動フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。生成物(TLCに基づく)を含有する試験管からの溶媒を真空で濃縮すると、無色の油状物が生じた。

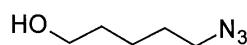
以下のリンカーを合成に用いた。

【0437】

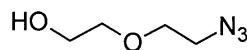
【化132】



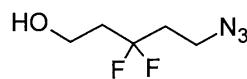
3a,



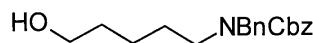
3b,



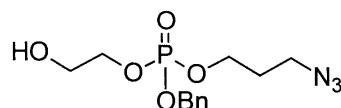
3c,



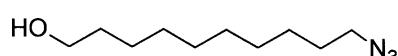
3d,



3e,

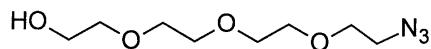


3f,

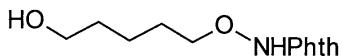


3g,

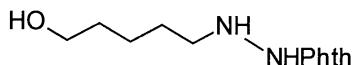
【0438】



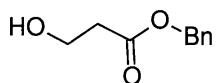
3h,



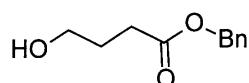
3i,



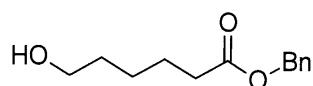
3j,



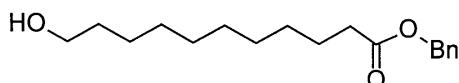
3k,



3l,



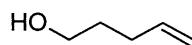
3m,



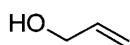
3n,

10

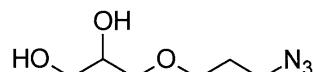
20



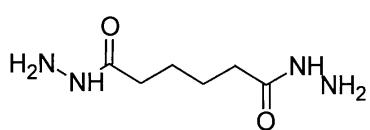
3o,



3p,



3q,



3r.

30

40

【0439】

一般手順G) Lev脱保護

DCM (2 mL) 中のLev保護化合物 (0.060 mmol) の溶液に、酢酸 (0.08 mL) とピリジン (0.12 mL) に溶解したヒドラジン水和物 (0.267 mmol、13 μ L) の溶液を加えた。得られた反応混合物を室温で2時間攪拌した。アセトン (0.5 mL) を添加して反応をクエンチし、溶媒を真空下で除去して粗生成物を得た。粗生成物を、溶離液としてn-ヘキサン中のEtOAc (0~80%) を用いて自動フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。生成物 (TLCに基づく) を含有する試験管からの溶媒を真空で濃縮すると、白色油状物が生じた。

一般手順H) 水素化

攪拌子を備えた10 mLの丸底フラスコ中の保護された化合物 (20 mg) のEtOAc : MeOH : H₂O : AcOH (1.0 : 0.5 : 0.25 : 0.125、1.825 mL) 中の溶液に、パラジウム炭素 (20 mg) を加えた。バルーンを使用して、溶液を水素で2分間洗い流し、室温で水素圧下に40時間攪拌した。反応物をPTFEフィルター (0.45 μ M) で濾過し、フラスコをH₂O : MeOH溶液 (1 : 1、5 mL) を用いて洗浄した。濾液を真空下で濃縮して粗生成物を得た。粗生成物をSepPak C18 e c (小) で100% H₂O、H₂O : MeOH (1 : 1) 及び100% MeOHを

50

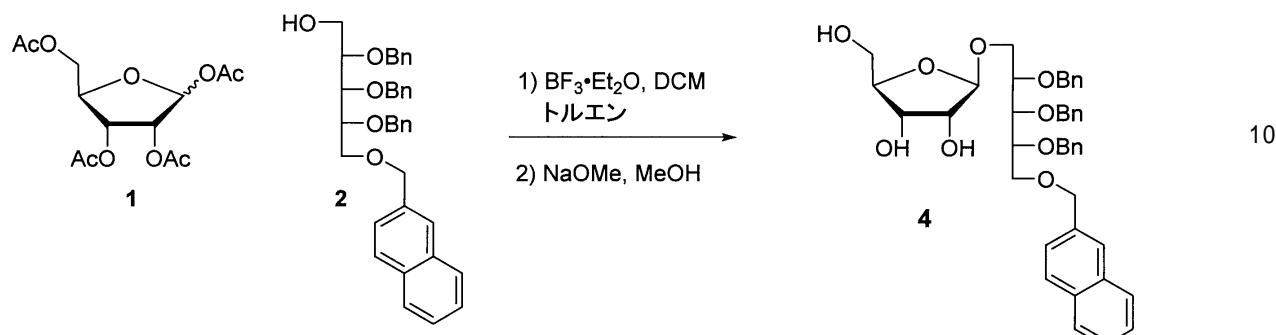
溶離液として使用して精製した。凍結乾燥機で主生成物を含有するバイアルからの溶媒を一晩濃縮すると、白色の固体物が得られた。

実施例 A . グリコシル化

実施例 A - 1 . 化合物 4

【 0 4 4 0 】

【 化 1 3 3 】



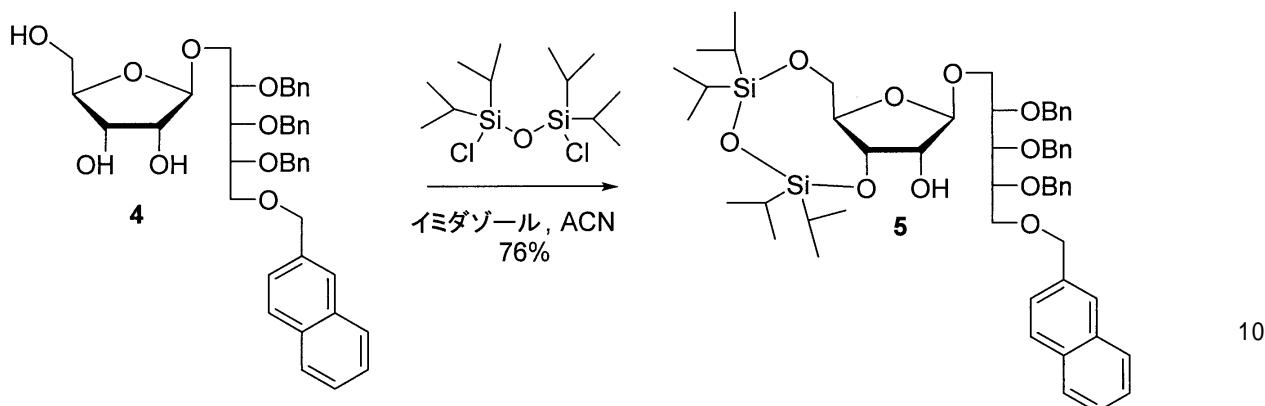
【 0 4 4 1 】

2, 3, 4 - トリ - O - ベンジル - 5 - O - (2 - ナフタレニルメチル) - 1 - O - d - リビトール 2 (4.0 g, 71.08 mmol) を無水トルエンと同時蒸発させ、真空で 20 乾燥させた。アルゴン雰囲気下で攪拌しながら無水 DCM (320 mL) 中の 2 の溶液を 0 に冷却し、BF₃ · Et₂O (19.3 mL, 156.38 mmol) を滴下した。5 分後、トルエン (480 mL) 中の 1, 2, 3, 5 - テトラ - O - アセチル - d - リボフラノース 1 (15.08 g, 47.38 mmol) の溶液を 45 分かけて加えた。反応混合物を室温に温め、2 時間攪拌した。反応を TLC によってモニターした。反応混合物をトリエチルアミン (50 mL) を添加することでクエンチし、DCM (200 mL) で希釈した。反応混合物を飽和 NaHCO₃ 水溶液 (200 mL) で洗浄し、水層を DCM (2 × 150 mL) で抽出した。合わせた有機層を飽和 NaCl 水溶液 (100 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ (約 20 g) で乾燥し、濾過し、濾液を真空下で濃縮して粗生成物を得た。粗生成物 4 を、溶離液として n - ヘキサン中の EtOAc (20 ~ 30 %) を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。生成物を含む試験管からの溶媒を真空で濃縮すると黄色油状物が得られた。次いで生成物 (31.05 g, 37.82 mmol) をアルゴン雰囲気下で 250 mL の RBF (乾燥器での乾燥) 中のメタノール (70 mL) に再溶解し、メタノール中のナトリウムメトキシド 2.5 重量 % 溶液 (4.09 mL, 18.91 mmol) を加えた。溶液を室温で 4 時間攪拌した。反応を TLC によってモニターした。反応混合物を Amberlite IR-120H (500 mg) の添加により中和し (pH 7) 、濾過し、溶媒を真空下で蒸発させて粗生成物を得た。粗生成物を、溶離液として n - ヘキサン中の EtOAc (50 ~ 100 %) を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。生成物 4 を含む試験管からの溶媒を真空で濃縮すると黄色油状物を得た (11.46 g, 2 工程にわたって 35 %)。HRMS (ES⁺) C₄₂H₄₆O₉Na⁺ [M + Na]⁺ についての計算値 717.3040、実測値 717.3057。

実施例 A - 2 . 化合物 5

【 0 4 4 2 】

【化134】



【0443】

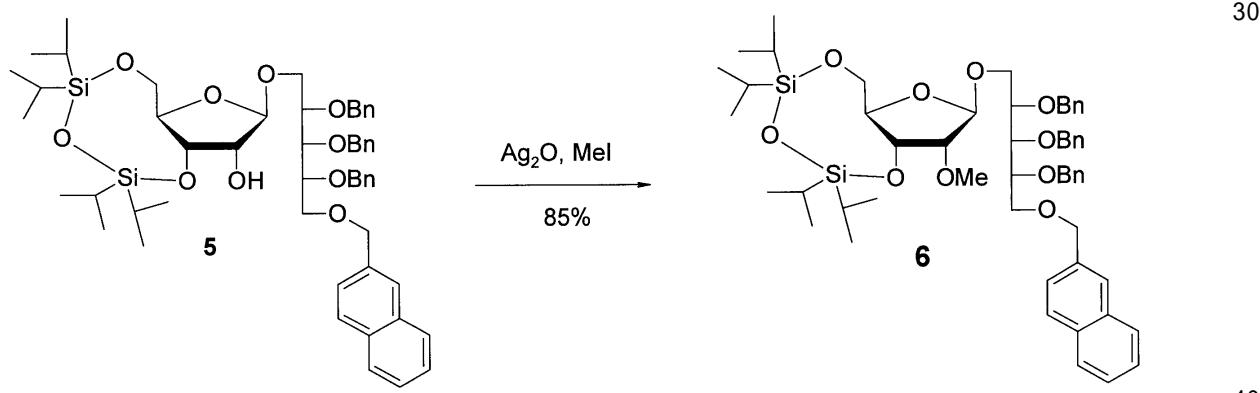
1,3-ジクロロ-1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン (8.2 g, 1.79 mmol) を、アルゴン雰囲気下で 100 mL の RBF (乾燥器での乾燥) 中でアセトニトリル (70 mL) 中トリオール 4 (3.53 g, 11.2 mmol) 及びイミダゾール (3.05 mg, 44.8 mmol) の溶液に滴下した。反応を TLC によってモニターした。室温で 10 分間攪拌した後、反応混合物を水 (10 mL) を加えることによりクエンチし、DCM (50 mL) 及び水 (20 mL) で希釈した。水層を分離し、DCM (2 × 30 mL) で洗浄した。合わせた有機層を Na₂SO₄ (約 2 g) で乾燥し、濾過し、濾液を真空下で濃縮して粗生成物を得た。粗生成物を、溶離液として n-ヘキサン中の EtOAc (0 ~ 30 %) を用いて自動フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。生成物 5 を含有する試験管からの溶媒を真空で濃縮すると、無色の油状物 (8.4 g, 76 %) が得られた。HRMS (ESI⁺) C₅₄H₇₂N₂O₁₀Si₂Na⁺ [M + Na]⁺ の計算値 959.4562、実測値 959.4590。

実施例 B-2' - メトキシポリリボシリルリビトールホスフェート

実施例 B-1. 化合物 6

【0444】

【化135】



【0445】

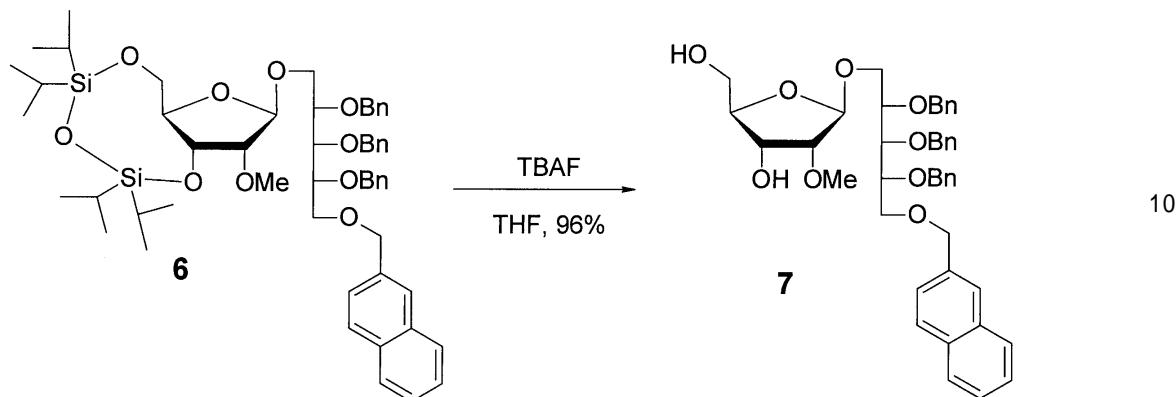
アルゴン雰囲気下、25 mL の RBF (乾燥器での乾燥) 中、室温で Ag₂O (6 g, 26.0 mmol) を MeI (6 mL) 中のアルコール 5 (3.5 g, 3.73 mmol) の攪拌溶液に添加した。反応混合物を 2.5 日間攪拌した。反応を TLC によってモニターした。出発物質を完全に消費した後、反応混合物を DCM (50 mL) で希釈し、Cellite (登録商標) パッドで濾過し、濾液を真空下で濃縮して粗生成物を得た。粗生成物を、溶離液として n-ヘキサン中の EtOAc (0 ~ 20 %) を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。生成物を含む試験管からの溶媒を真空で濃縮すると、無色の油状物 6 (3.0 g, 85 %) が得られた。HRMS (ESI⁺) C₅₅H₇₄N₂O₁₀Si₂Na⁺ [M + Na]⁺ の計算値 973.4718、実測値 973.47

38。

実施例 B - 2 . 化合物 7

【0446】

【化136】



【0447】

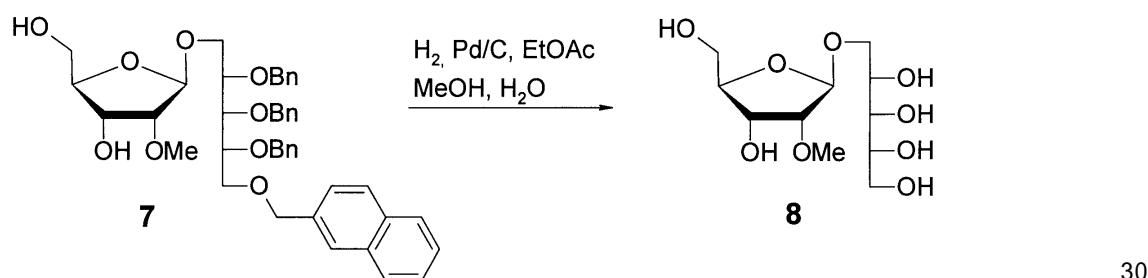
一般手順 A) に従って、シリル化化合物 6 をジオール生成物 7 (4 . 6 g 、 96 %) に変換した。 H R M S (E S I ⁺) C ₄ ₃ H ₄ ₈ O ₉ N a ⁺ [M + N a] ⁺ についての計算値 731 . 3196 、実測値 731 . 3217 。

実施例 B - 3 . 化合物 8

20

【0448】

【化137】



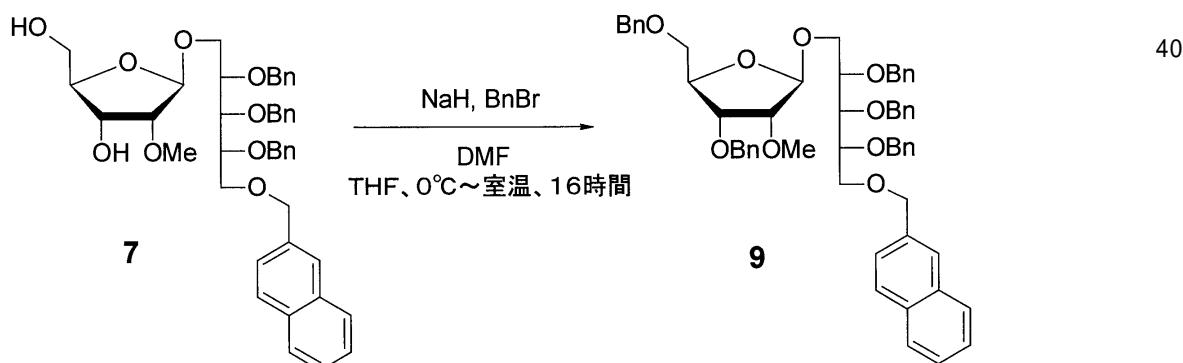
【0449】

一般手順 H) に従って、単量体 7 を脱保護单量体 8 (5 m g 、 67 %) に変換した。 H R M S (E S I ⁺) C ₁ ₁ H ₂ ₂ O ₉ N a ⁺ [M + N a] ⁺ についての計算値 321 . 1162 、実測値 321 . 1187 。

実施例 B - 4 . 化合物 9

【0450】

【化138】



【0451】

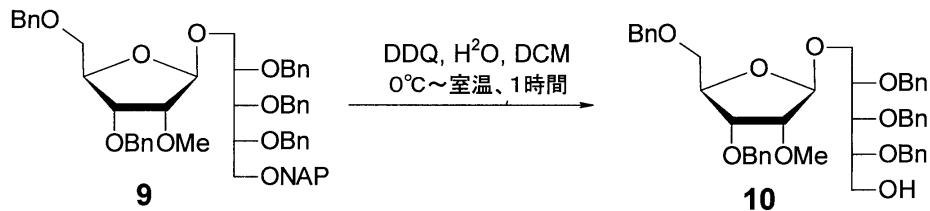
50

臭化ベンジル (77 mg、0.45 mmol) 及び水素化ナトリウム (16 mg、0.672 mmol) を、アルゴン雰囲気下0度、THF:DMF (1.5:0.2、1.7 mL) 中のジオール7 (80 mg、0.112 mmol) の搅拌溶液に加えた。反応物を室温に温め、一晩搅拌した。反応混合物を氷冷水 (1 mL) でクエンチし、EtOAc (3 x 10 mL) で抽出した。合わせた有機層をNa₂SO₄ (約0.5 g) で乾燥し、濾過し、濾液を真空下で濃縮して粗生成物を得た。粗生成物を、溶離液としてn-ヘキサン中のEtOAc (0~50%) を用いてフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。生成物9を含有する試験管からの溶媒を真空で濃縮すると、無色の油状物 (75 mg、75%) が得られた。HRMS (ESI⁺) C₅₇H₆₀O₉Na⁺ [M+Na]⁺ についての計算値 911.4135、実測値 911.4162。 10

実施例 B-5. 化合物10

【0452】

【化139】



10

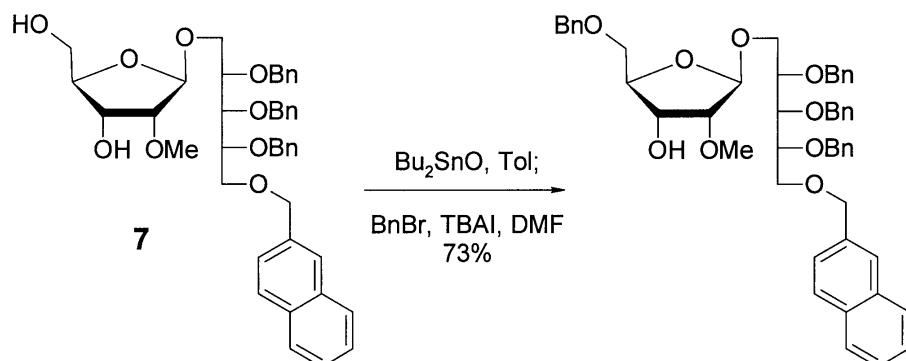
【0453】

一般手順D) に従って、NAP保護中間体9を5-ヒドロキシル化合物10 (189 mg、89%) に変換した。HRMS (ESI⁺) C₄₆H₅₂O₉Na⁺ [M+Na]⁺ の計算値 771.3509、実測値 771.3521。 20

実施例 B-6. 化合物11

【0454】

【化140】



30

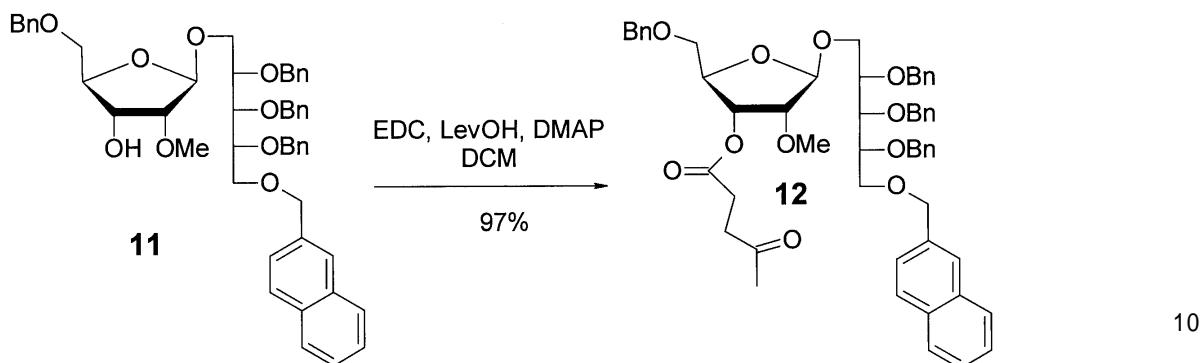
【0455】

一般手順B) に従って、ジオール7をベンジル化生成物11 (3.8 g、73%) に変換した。HRMS (ESI⁺) C₅₀H₅₄O₉Na⁺ [M+Na]⁺ の計算値 821.3666、実測値 821.3672。 40

実施例 B-7. 化合物12

【0456】

【化141】



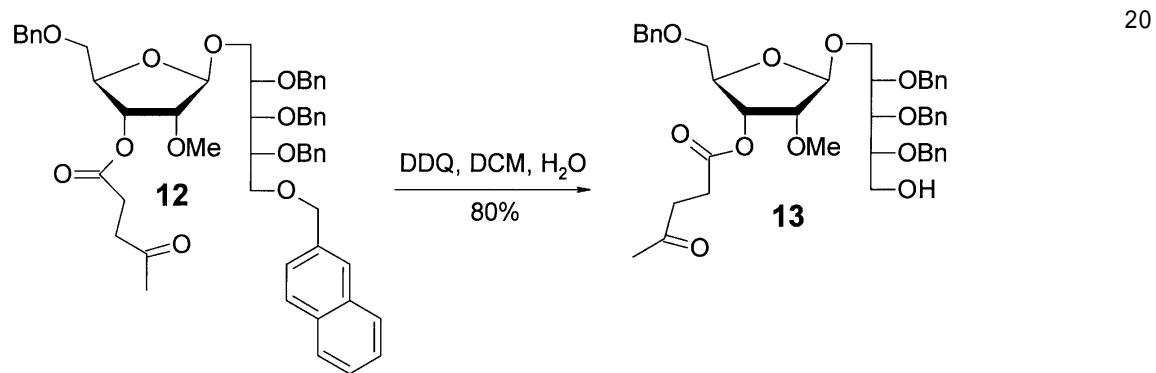
【0457】

一般手順C)に従って、3-ヒドロキシル中間体11をLev保護化合物12(1.75 g、97%)に変換した。HRMS (ESI⁺) C₅₅H₆₀O₁₁Na⁺ [M+Na]⁺の計算値919.4033、実測値919.4062。

実施例B-8. 化合物13

【0458】

【化142】



【0459】

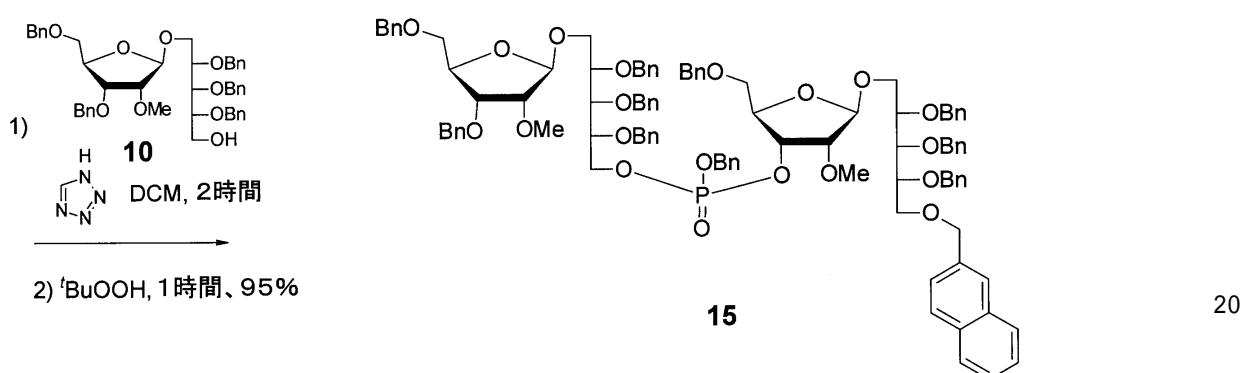
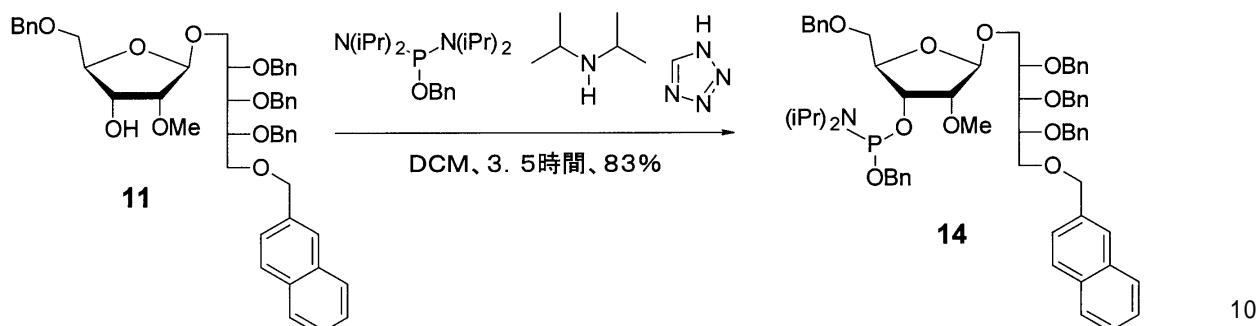
一般手順D)に従って、NAP保護中間体12を5-ヒドロキシル化合物13(1.23 g、80%)に変換した。HRMS (ESI⁺) C₄₄H₅₂O₁₁Na⁺ [M+Na]⁺の計算値779.3407、実測値779.3431。

実施例B-9. 化合物15

【0460】

30

【化143】



【0461】

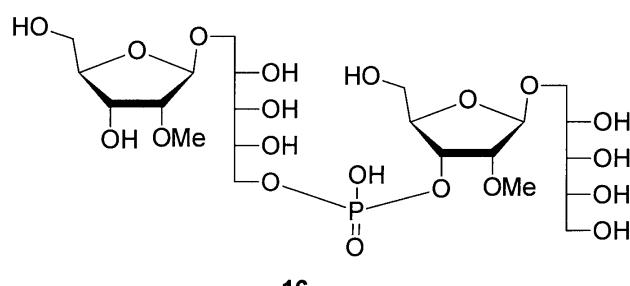
一般手順E)に従って、3-ヒドロキシル化合物11及び5-ヒドロキシル化合物10を二量体15(60mg、95%)に変換した。H R M S (E S I ⁺) C ₁₀ H ₁₁ O ₂ P Na ⁺ [M + Na] ⁺ についての計算値 1721.7304、実測値 1721.7393。

実施例B-10. 化合物16

【0462】

30

【化144】



40

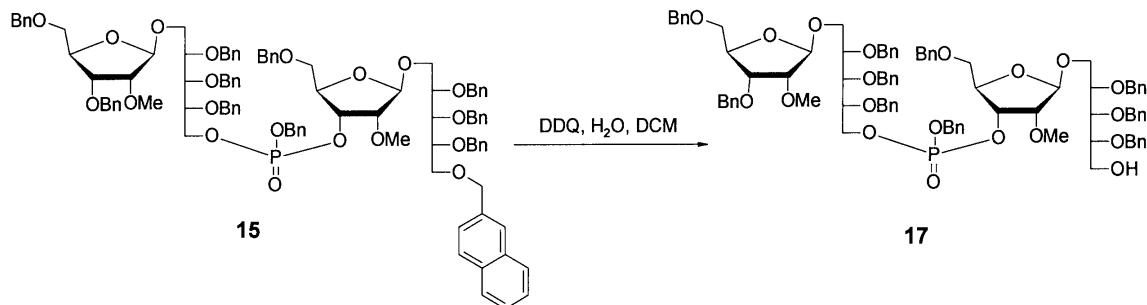
【0463】

一般手順H)に従って、二量体15を脱保護二量体16(5.6mg、77%)に変換した。H R M S (E S I ⁺) C ₁₁ H ₂₂ O ₉ Na ⁺ [M + Na] ⁺ についての計算値 681.1983、実測値 681.2000。

実施例B-11. 化合物17

【0464】

【化 1 4 5 】



10

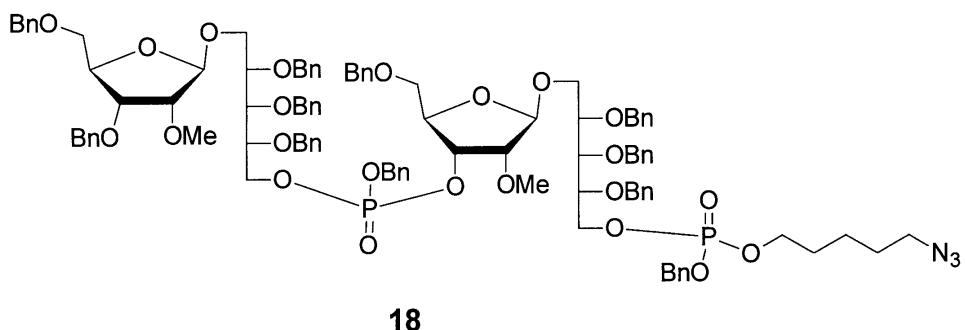
【 0 4 6 5 】

一般手順D)に従って、NAP保護二量体15を5-ヒドロキシル化合物17(30mg、60%)に変換した。HRMS(ESI⁺) C₉H₁₀O₂Na⁺ [M+Na]⁺についての計算値1581.6678、実測値1581.6734。

実施例 B - 1 2 . 化合物 1 8

【 0 4 6 6 】

【化 1 4 6 】



20

〔 0 4 6 7 〕

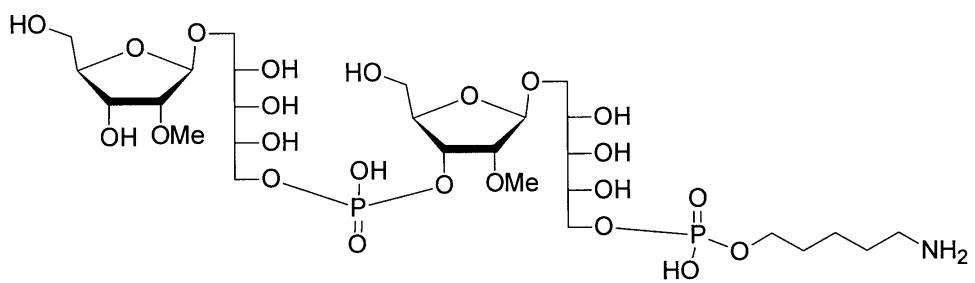
一般手順 E) に従って、二量体 17 をリンカ -5 - アジド - ペンタノールにカップリングさせて二量体 18 (6 mg 、 42 %) を得た。 HRMS (ESI⁺) C₁₀H₁₁N₃O₂P₂Na⁺ [M + Na]⁺ についての計算値 1863.7641、実測値 1863.7709。

30

塞施例 B - 1.3. 化合物 1.9

(0 4 6 8)

【化 1 4 7】



40

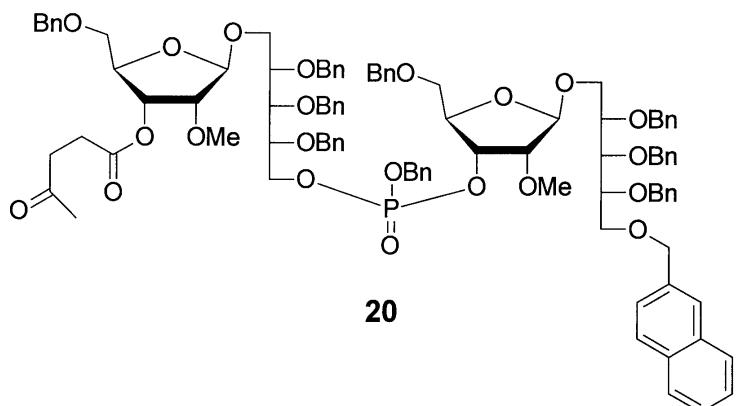
[0 4 6 0 1]

一般手順 H) に従って、二量体 18 を脱保護二量体 19 (1 . 2 m g 、 5 5 %) に変換した。 H R M S (E S I ⁺) C ₂ ₇ H ₅ O ₂ ₃ P ₂ N a ⁺ [M + N a] ⁺ についての計算値 8.46, 8.53, 8. 実測値 8.46, 8.54, 8.0

圖 3-4-3：2,3,5,6-四溴代-1,4-二溴己烷的合成

实施例 B

【化148】



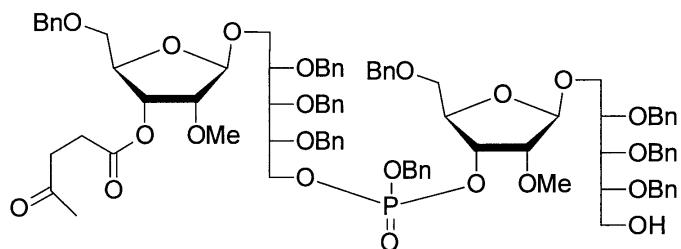
【0471】

一般手順E)に従って、3-ヒドロキシル化合物11及び5-ヒドロキシル化合物13を二量体20(1.5g、76%)に変換した。H R M S (E S I ⁺) C ₁₀ H ₁₁ O ₂ P N a ⁺ [M + N a] ⁺についての計算値 1729.7202、実測値 1729.7240。

実施例B-15. 化合物21

【0472】

【化149】



20

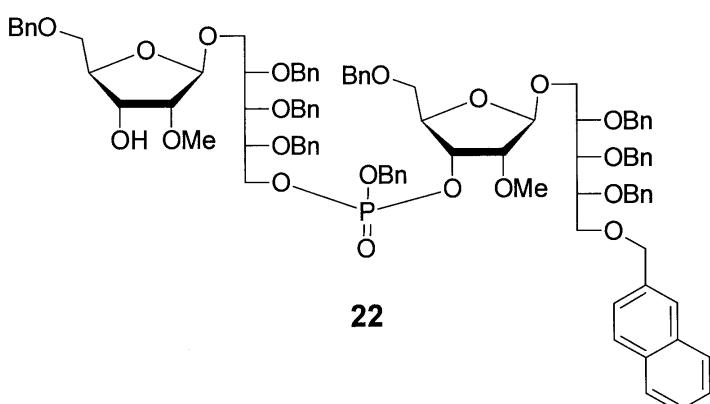
【0473】

一般手順D)に従って、N A P保護中間体20を5-ヒドロキシル化合物21(386mg、63%)に変換した。H R M S (E S I ⁺) C ₉ H ₁₀ O ₂ P N a ⁺ [M + N a] ⁺についての計算値 1589.6576、実測値 1589.6613。

実施例B-16. 化合物22

【0474】

【化150】



40

【0475】

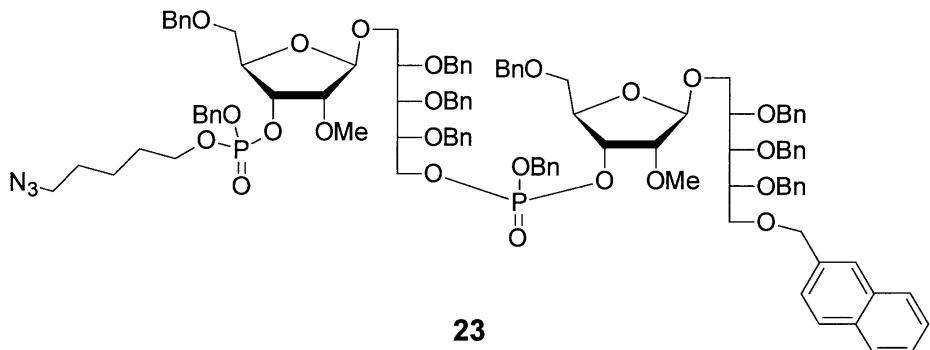
50

一般手順 G) に従って、二量体 20 を 3 - ヒドロキシリ二量体 22 (473 mg、74 %) に変換した。H R M S (E S I ⁺) C₉H₁₀O₅PNa⁺ [M + Na] ⁺ についての計算値 1631.6835、実測値 1631.6873。

実施例 B - 17. 化合物 23

【 0476 】

【 化 151 】



10

【 0477 】

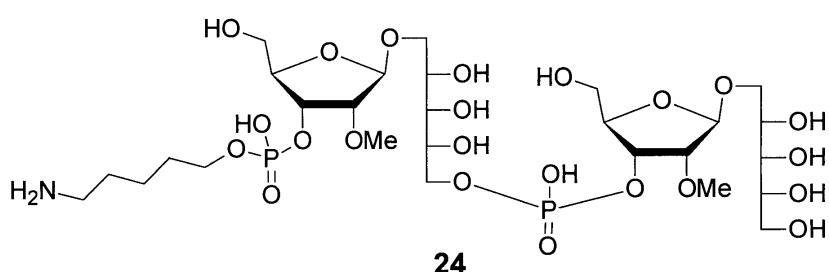
一般手順 E) に従って、3 - ヒドロキシリ二量体 22 をリンカ - 5 - アジド - ペンタノールにカップリングさせて二量体 23 (3 mg、30 %) を得た。H R M S (E S I ⁺) C₁₀H₁₂N₃O₂P₂Na⁺ [M + Na] ⁺ についての計算値 1912.7764、実測値 1912.7781。

20

実施例 B - 18. 化合物 24

【 0478 】

【 化 152 】



30

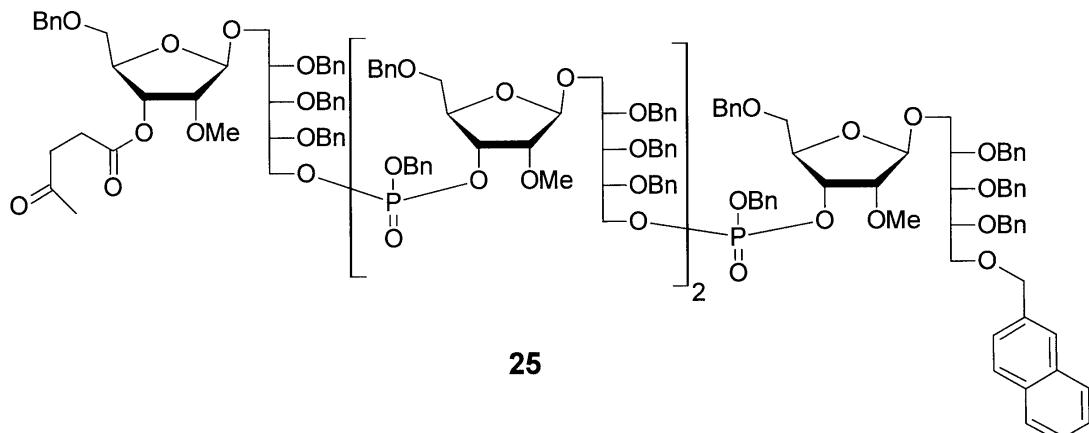
【 0479 】

一般手順 H) に従って、二量体 23 を脱保護二量体 24 (1.1 mg、76 %) に変換した。H R M S (E S I ⁺) C₂H₅O₂P₂Na⁺ [M + Na] ⁺ についての計算値 846.2538、実測値 846.2540。

実施例 B - 19. 化合物 25

【 0480 】

【化153】



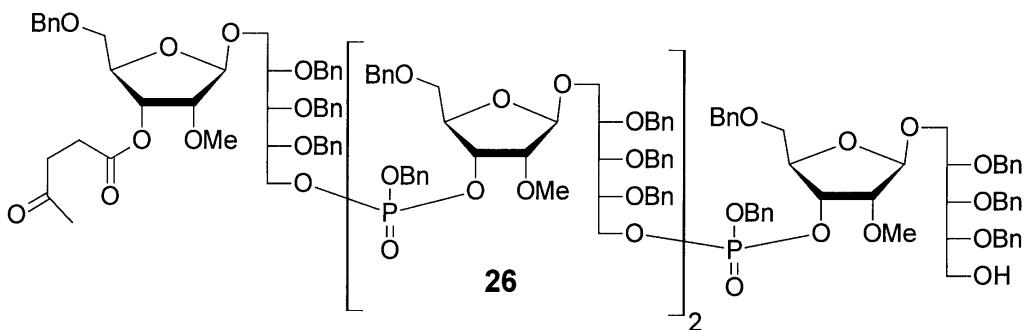
【0481】

一般手順E)に従って、3-ヒドロキシリル二量体22及び5-ヒドロキシリル二量体21を四量体25(367mg、86%)に変換した。HRMS(ESI⁺)C₁₉H₂₁O₄P₃Na⁺[M+Na]⁺についての計算値3350.3540、実測値3350.3531。

実施例B-20. 化合物26

【0482】

【化154】



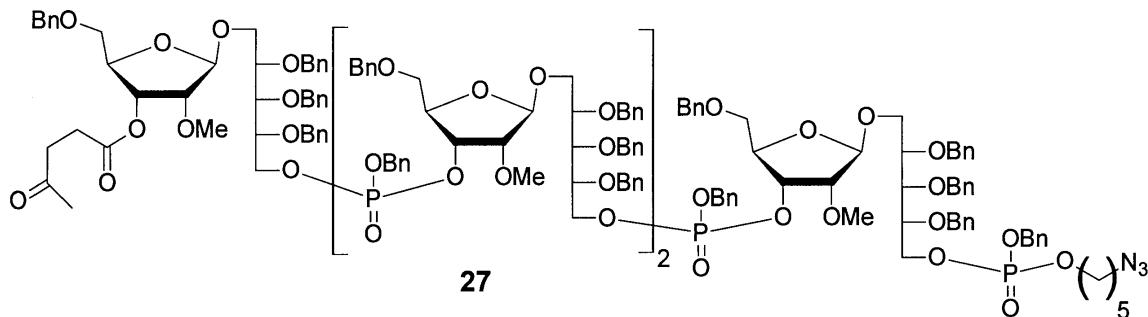
【0483】

一般手順D)に従って、NAP保護四量体25を5-ヒドロキシリル四量体26(125mg、75%)に変換した。HRMS(ESI⁺)C₁₈H₂₀O₄P₃Na⁺[M+Na]⁺についての計算値3210.2914、実測値3210.2911。

実施例B-21. 化合物27

【0484】

【化155】



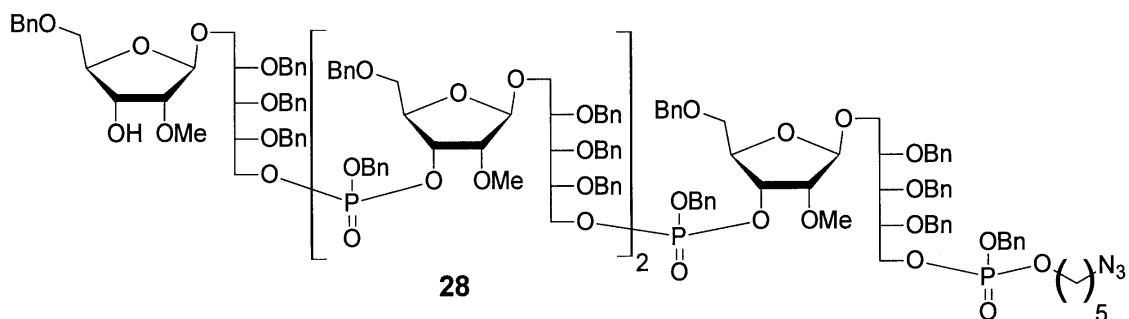
【0485】

一般手順 E) に従って、四量体 26 をリンカ - 5 - アジド - ペンタノールにカップリングさせて四量体 27 (35 mg, 77 %) を得た。H R M S (E S I ⁺) C₁₉H₂₂N₃O₄P₄Na⁺ [M + Na]⁺ についての計算値 3491.3844、実測値 3492.3787。

実施例 B - 22. 化合物 28

【 0486 】

【 化 156 】



10

【 0487 】

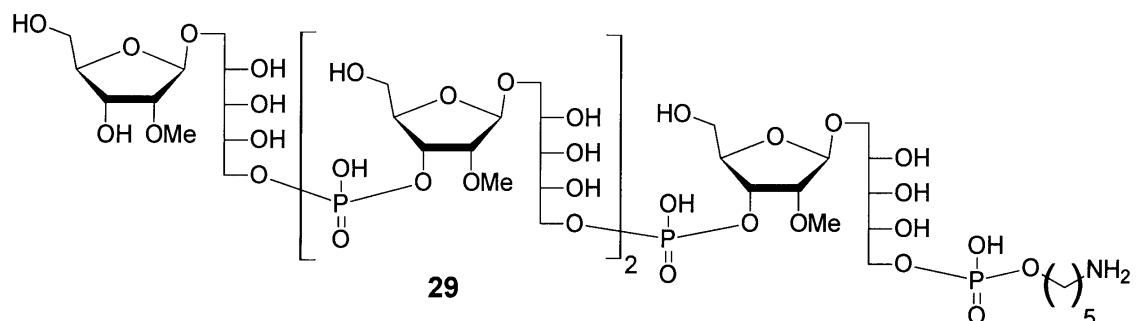
一般手順 G) に従って、四量体 27 を 3 - ヒドロキシル四量体 28 (30 mg, 90 %) に変換した。H R M S (E S I ⁺) C₁₈H₂₁N₃O₄P₄Na⁺ [M + Na]⁺ についての計算値 3393.3476、実測値 3393.3543。

20

実施例 B - 23. 化合物 29

【 0488 】

【 化 157 】



30

【 0489 】

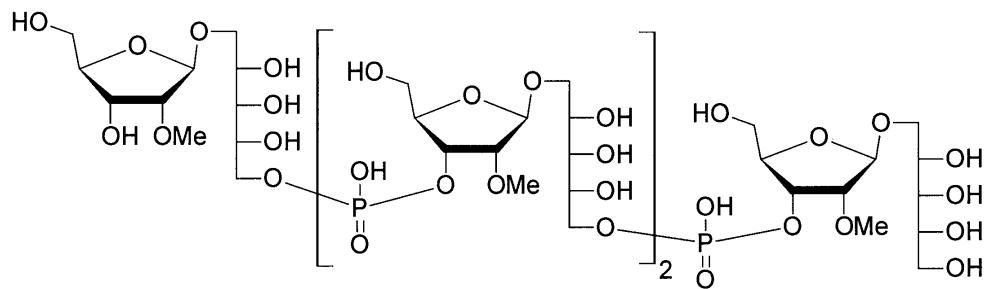
一般手順 H) に従って、四量体 28 を脱保護四量体 29 (10 mg, 73 %) に変換した。H R M S (E S I ⁺) C₄₉H₉₇NO₄₅P₄Na⁺ [M + Na]⁺ についての計算値 1566.4181、実測値 1566.4174。

実施例 B - 24. 化合物 30

【 0490 】

40

【化158】



30

10

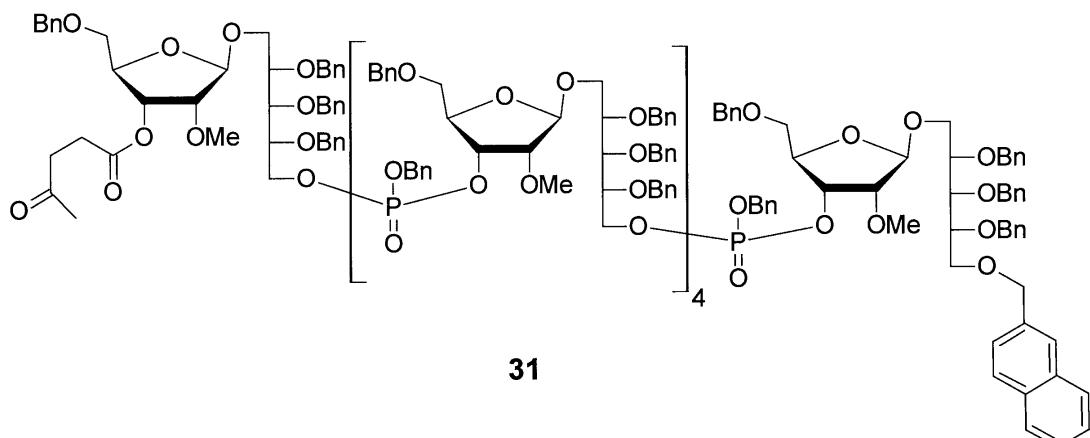
【0491】

四量体30は、一般手順G)及び一般手順H)に従って四量体26から2段階で調製される。

実施例B-25. 化合物31

【0492】

【化159】



31

20

30

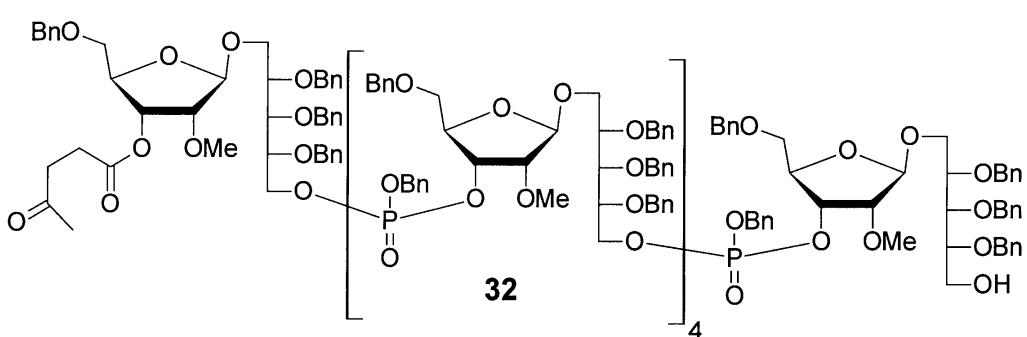
【0493】

一般手順E)に従って、3-ヒドロキシリル二量体22及び5-ヒドロキシリル四量体26を六量体31(85mg、85%)に変換した。H R M S (E S I +) C₂₈H₃₁O₆P₅Na⁺ [M/2+Na]⁺の計算値2496.9888、実測値2496.0271。

実施例B-26. 化合物32

【0494】

【化160】



32

40

【0495】

一般手順D)に従って、NAP保護六量体31を5-ヒドロキシリル六量体32(50m

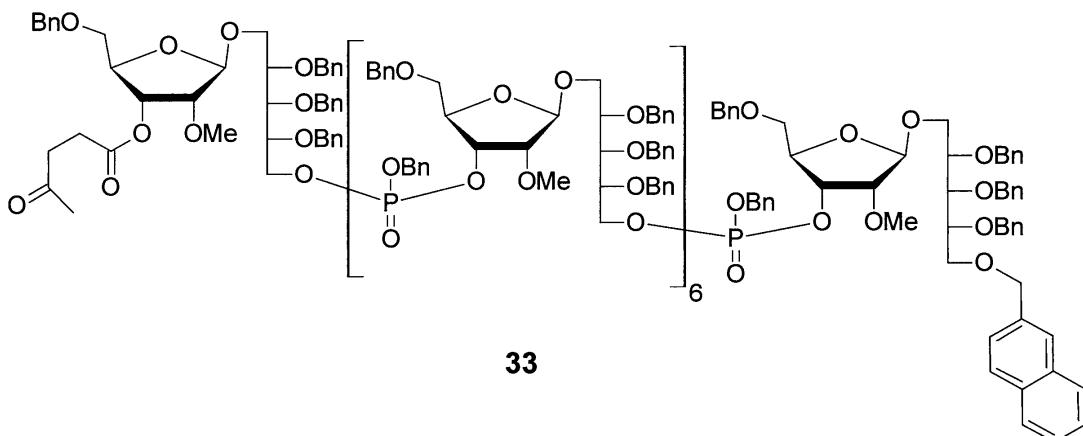
50

g、65%に変換した。HRMS (ESI⁺) C₂₇H₃₀O₇P₅Na⁺ [M+2+Na]⁺の計算値2426.9677、実測値2426.9977。

実施例B-27. 化合物33

【0496】

【化161】



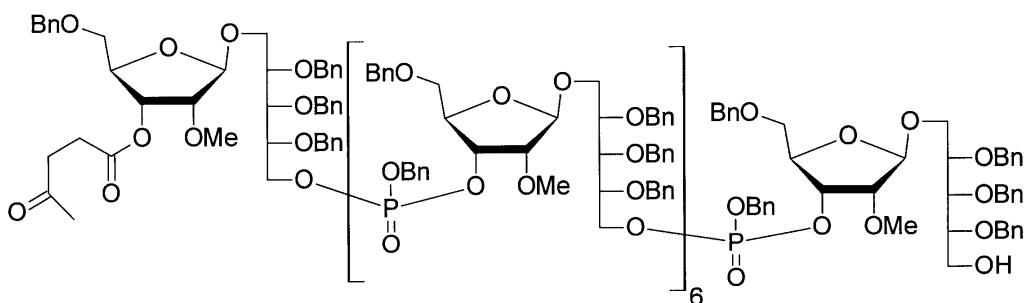
【0497】

一般手順E)に従って、3-ヒドロキシル二量体22及び5-ヒドロキシル六量体32を八量体33(50mg、77%)に変換した。¹H NMR(400MHz, クロロホルム-d) 7.86-7.62(m, 4H), 7.51-7.35(m, 3H), 7.37-7.06(m, 19H), 5.10(t, J = 5.5Hz, 1H), 5.03(dt, J = 7.6, 4.2Hz, 7H), 4.97-4.77(m, 22H), 4.69-4.37(m, 60H), 4.36-4.14(m, 23H), 3.98-3.55(m, 47H), 3.53-3.36(m, 13H), 3.34-3.21(m, 24H), 2.72(t, J = 6.5Hz, 2H), 2.65-2.54(m, 2H), 2.16(s, 3H)。

実施例B-28. 化合物34

【0498】

【化162】



【0499】

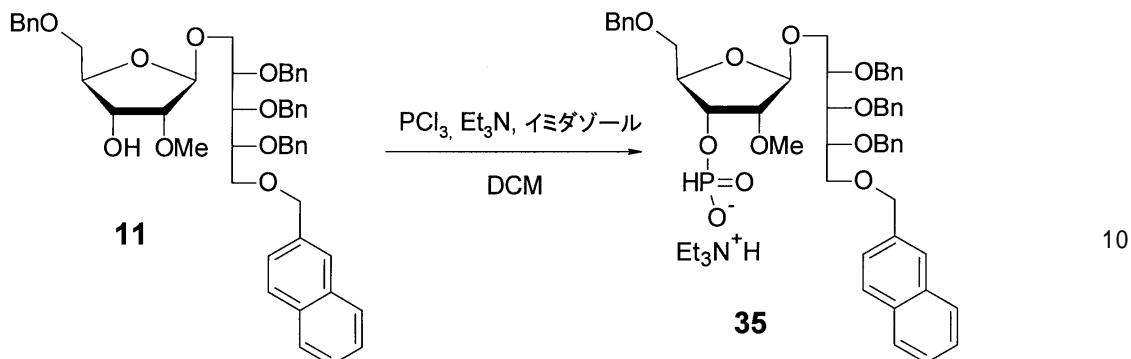
一般手順D)に従って、NAP保護八量体33を5-ヒドロキシル八量体34(35mg、73%)に変換した。¹H NMR(400MHz, クロロホルム-d) 7.43-7.07(m, 19H), 5.10(t, J = 5.4Hz, 1H), 5.08-4.78(m, 29H), 4.70-4.45(m, 51H), 4.45-4.15(m, 38H), 3.95-3.54(m, 50H), 3.54-3.36(m, 16H), 3.36-3.25(m, 24H), 2.72(t, J = 6.5Hz, 2H), 2.65-2.56(m, 2H), 2.16(s, 3H)。

50

実施例 B - 29. 化合物 35 - ホスホネート化学現象

【0500】

【化163】



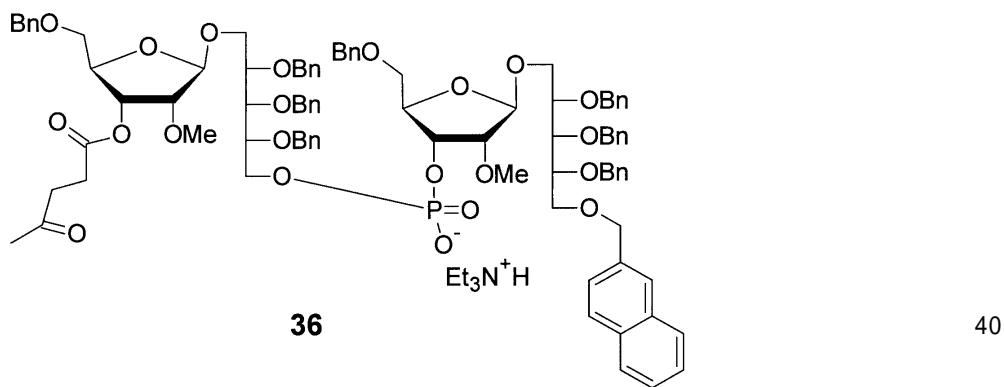
【0501】

アルゴン雰囲気下、10 mL の RBF (乾燥器での乾燥) 中の DCM (2 mL) 中の 3 - ヒドロキシル化合物 11 (10 mg) 及びイミダゾール (5.96 mg, 0.087 mmol) の溶液に、0 °C で PCl_3 (4.37 μL 、0.050 mmol) 及びトリエチルアミン (12.28 μL 、0.087 mmol) を加えた。5 分後、反応混合物を室温に温め、1 時間攪拌した。反応を TLC によってモニターした。反応液を DCM (5 mL) で希釈し、飽和 NaHCO_3 水溶液 (5 mL) 及びトリエチルアンモニウム緩衝液 (5 mL) を加えてクエンチした。水層を DCM (2 × 10 mL) で抽出し、合わせた有機層をブライン (5 mL) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 (0.25 g) で乾燥し、濾過し、濾液を真空下で濃縮して粗生成物を得た。粗生成物を、溶離液として DCM 中 10% MeOH を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。生成物 35 (TLC に基づく) を含有する試験管からの溶媒を真空で濃縮して、黄色油状物 (10 mg, 83%) を得た。HRMS (ESI⁺) $\text{C}_{56}\text{H}_{71}\text{NO}_{11}\text{SP}^+ [\text{M} + \text{H}]^+$ の計算値 964.4765、実測値 964.4759。

実施例 B - 30. 化合物 36

【0502】

【化164】



【0503】

H - ホスホネート 35 (10 mg, 0.010 mmol) 及び化合物 13 (7.85 mg, 0.010 mmol) をピリジン (1 mL) に溶解した。次に塩化トリメチルアセチル (3.83 μL 、0.031 mmol) をゆっくり加えた。反応混合物を室温で 1 時間攪拌した。ピリジン - 水 (96:4, v/v; 67 μL) 中のヨウ素 (2.6 mg, 0.010 mmol) の溶液を加え、反応物を室温で 30 分間さらに攪拌した。反応混合物を CH_2Cl_2 (5 mL) で希釈し、飽和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液 (5 mL) で洗浄し、次いで 1.0 M の TEAB 溶液 (5 mL) で洗浄した。合わせた有機層を Na_2SO_4 で乾燥

50

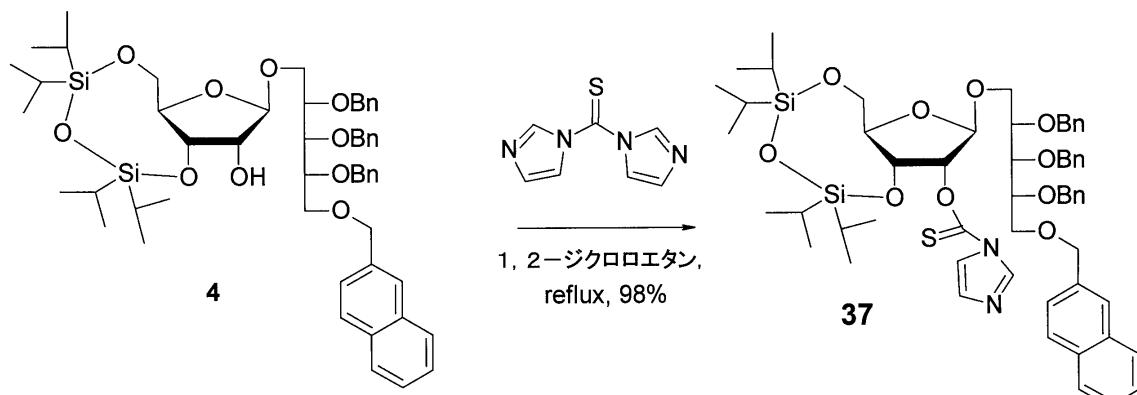
し、濾過し、真空中で濃縮した。残渣をフラッシュクロマトグラフィー (D C M / M e O H、10:1、v/v) で精製して、無色油状物として 36 (5.5 g、29%) を得た。H R M S (E S I +) C₉H₁₀O₂P⁺ [M]⁺ の計算値 1615.6762、実測値 1615.7056。

実施例 C - 2' - デオキシポリリボシリルリビトールホスフェート

実施例 C - 1. 化合物 37

【 0504】

【化 165】



10

20

【 0505】

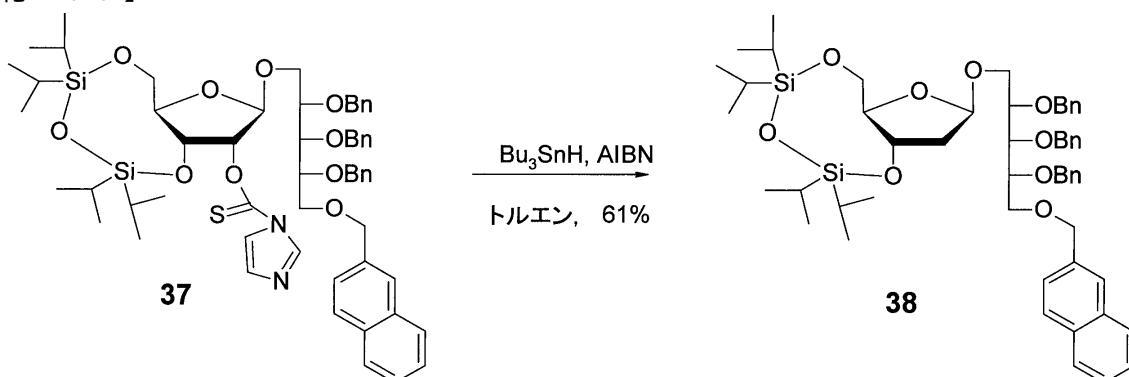
アルゴン雰囲気下、25 mL の R B F (乾燥器での乾燥) 中の 1,2 - ジクロロエタン (5 mL) 中のアルコール 4 (860 mg、0.92 mmol) の溶液に、チオカルボニルジイミダゾール (327 mg、1.83 mmol) を加えた。溶液を 60° で 64 時間攪拌した。反応を T L C によってモニターした。溶媒を真空中で蒸発させて粗生成物を得た。粗生成物を、溶離液として n - ヘキサン中の E t O A c (0 ~ 30%) を用いてフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製した。生成物 37 (T L C に基づく) を含有する試験管からの溶媒を真空中で濃縮すると、白色油状物 (950 mg、98%) が得られた。H R M S (E S I +) C₅H₇N₂O₁SSi₂Na⁺ [M + Na]⁺ の計算値 1069.4500、実測値 1069.4525。

30

実施例 C - 2. 化合物 38

【 0506】

【化 166】



40

【 0507】

60° のアルゴン雰囲気下で、100 mL の R B F (乾燥器での乾燥) 中の B u₃S N H (0.49 mL、1.814 mmol) 及び A I B N (ツルエン中 0.2 M、0.46 mL、0.091 mmol) のツルエン (20 mL) 中の溶液に、チオカルバメート 37 (950 mg、0.907 mmol) のツルエン (20 mL) 中の溶液を滴下した。反応混合物を 2 時間攪拌した。反応を T L C によってモニターした。反応混合物を希釈し、飽和 N a H C O₃ 水溶液 (10 mL) でクエンチした。水層を酢酸エチル (2 × 20 mL)

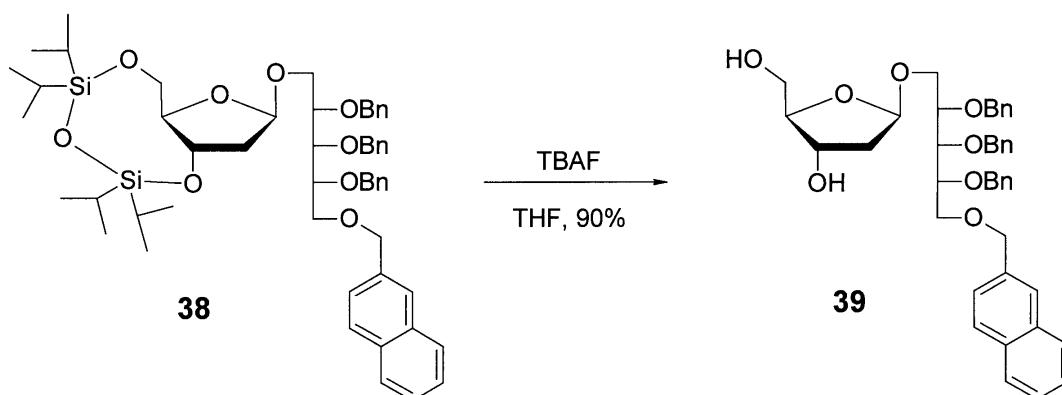
50

で抽出した。合わせた有機層をブライン(10mL)で洗浄し、 Na_2SO_4 (0.5g)で乾燥し、濾過し、濾液を真空下で濃縮して粗生成物を得た。粗生成物を、n-ヘキサン中のEtOAc(0~50%)を使用する自動フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。生成物38(TLCに基づく)を含有する試験管からの溶媒を真空で濃縮すると、無色の油状物(510mg、61%)が得られた。HRMS(ESI⁺) $\text{C}_{58}\text{H}_{72}\text{O}_9\text{Si}_2\text{Na}^+[\text{M}+\text{Na}]^+$ の計算値943.4613、実測値943.4640

実施例C-2. 化合物39

【0508】

【化167】



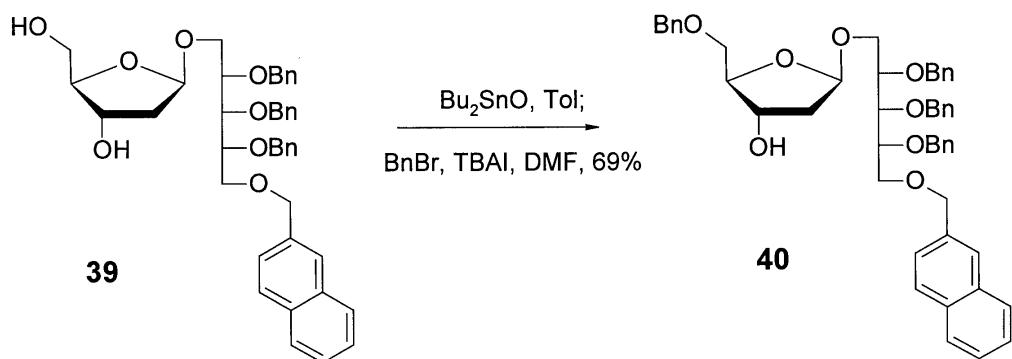
【0509】

一般手順A)に従って、シリル化化合物38をジオール生成物39(330mg、90%)に変換した。HRMS(ESI⁺) $\text{C}_{42}\text{H}_{46}\text{O}_8\text{Na}^+[\text{M}+\text{Na}]^+$ についての計算値701.3090、実測値701.3117。

実施例C-3. 化合物40

【0510】

【化168】



【0511】

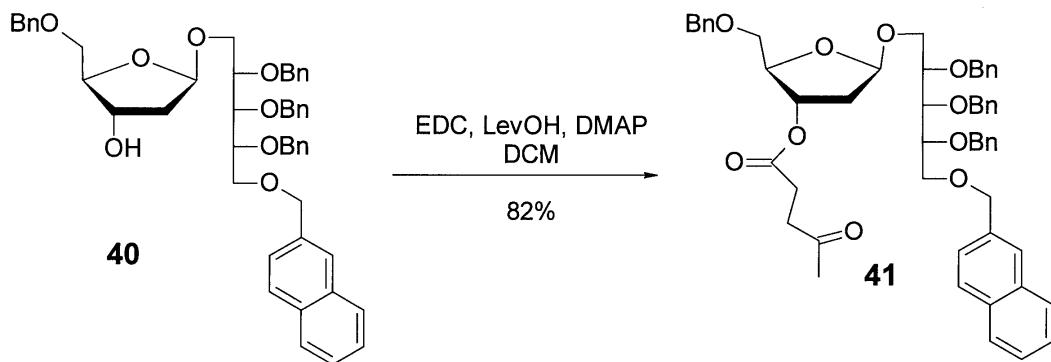
一般手順B)に従って、ジオール39をベンジル化生成物40(260mg、69%)に変換した。HRMS(ESI⁺) $\text{C}_{49}\text{H}_{52}\text{O}_8\text{Na}^+[\text{M}+\text{Na}]^+$ についての計算値791.3560、実測値791.3565。

実施例C-4. 化合物41

【0512】

40

【化169】



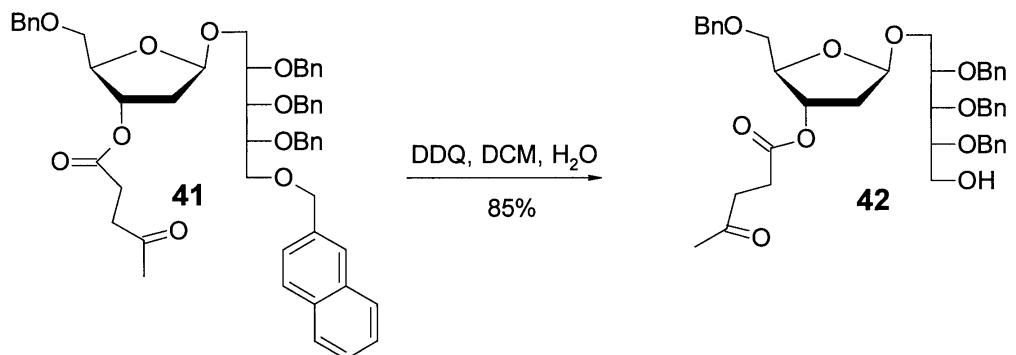
【0513】

一般手順C)に従って、3-ヒドロキシル中間体40をLev保護化合物41(135mg、82%)に変換した。HRMS (ESI⁺) C₅H₈O₁₀Na⁺ [M+Na]⁺についての計算値889.3928、実測値889.3928。

実施例C-5. 化合物42

【0514】

【化170】



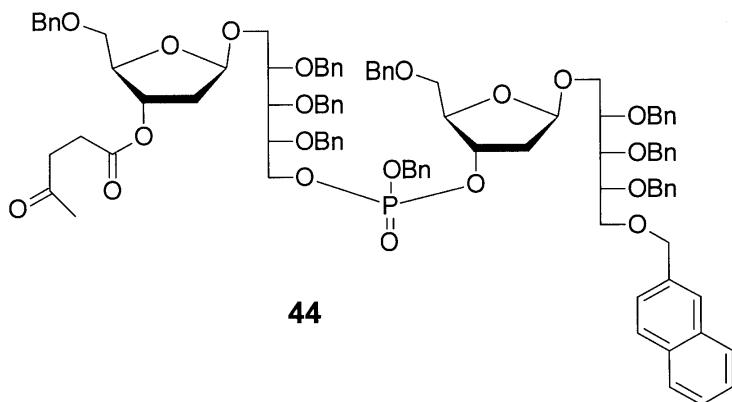
【0515】

一般手順D)に従って、NAP保護中間体41を5-ヒドロキシル化合物42(95mg、85%)に変換した。HRMS (ESI⁺) C₄H₅O₁₀Na⁺ [M+Na]⁺についての計算値749.3302、実測値749.3325。

実施例C-6. 化合物44

【0516】

【化171】



【0517】

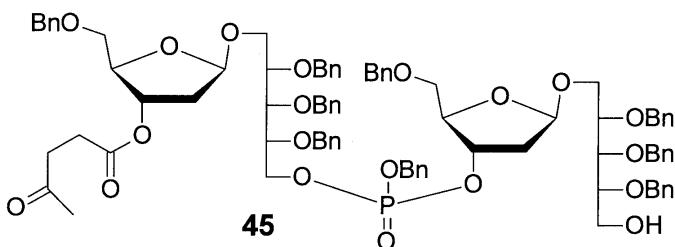
一般手順E)に従って、3-ヒドロキシル化合物40及び5-ヒドロキシル化合物42を二量体44(160mg、78%)に変換した。HRMS (ESI⁺) C₉H₁₀O₂₀PNa⁺ [M+Na]⁺についての計算値1669.6991、実測値1669.50

6 9 8 1 。

实施例 C - 7 . 化合物 4-5

【 0 5 1 8 】

【化 1 7 2 】



10

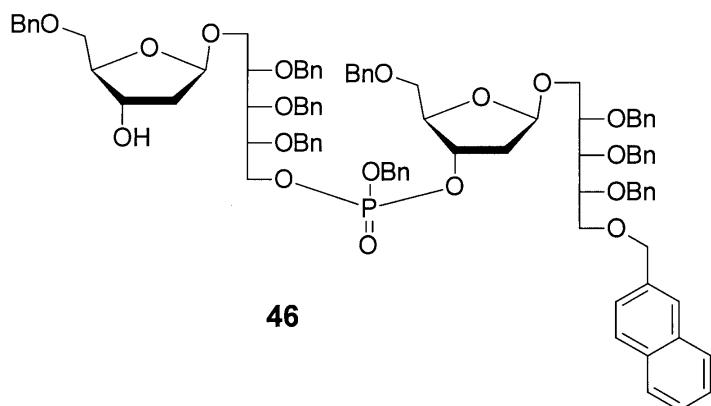
【 0 5 1 9 】

一般手順D)に従って、二量体4-4を5-ヒドロキシリ二量体4-5(53mg、73%)に変換した。HRMS(ESI⁺)C₉H₁₀O₂Na⁺[M+Na]⁺についての計算値1529.6365、実測値1529.6397。

實施例 C - 8 . 化合物 4-6

【 0 5 2 0 】

【化 1 7 3】



20

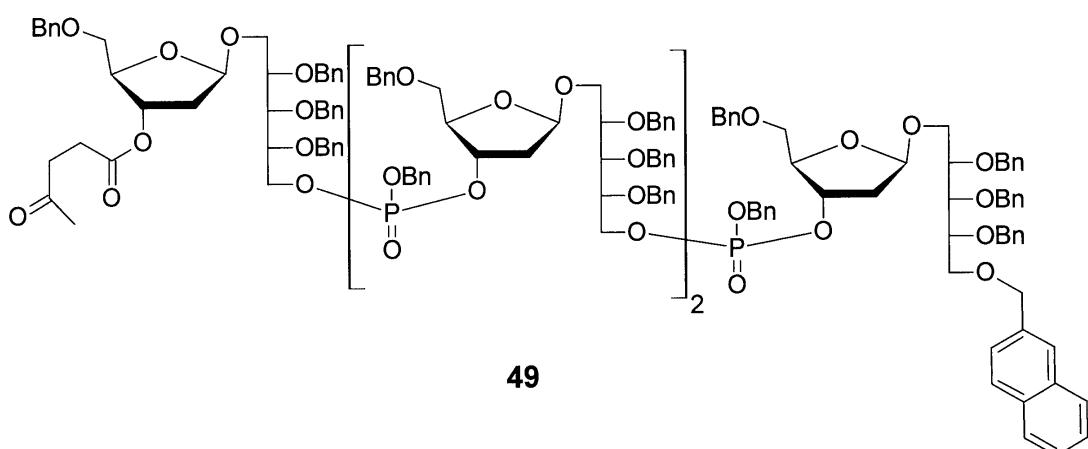
【 0 5 2 1 】

一般手順 G) に従って、二量体 4-4 を 3-ヒドロキシリル二量体 4-6 (85 mg, 91%) に変換した。HRMS (ESI⁺) C₉H₁₀O_{1.8}PNa⁺ [M + Na]⁺ についての計算値 1571.6623、実測値 1571.6656。

实施例 C - 9. 化合物 4-9

【0522】

【化 1 7 4】



40

50

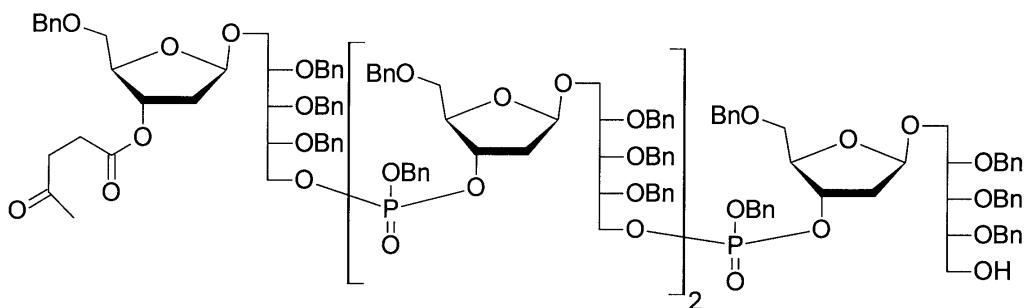
[0 5 2 3]

一般手順 E) に従って、 3 - ヒドロキシリニ量体 4 6 及び 5 - ヒドロキシリニ量体 4 5 を四量体 4 9 (9 6 m g 、 8 3 %) に変換した。 H R M S (E S I ⁺) C _{1 8 9} H _{2 0 5} O _{4 0} P ₃ N a ⁺ [M + N a] ⁺ についての計算値 3 2 3 0 . 3 1 1 8 、 実測値 3 2 3 0 . 3 1 1 1 。

寒施例 C - 10 . 化合物 5 0

【 0 5 2 4 】

【化 1 7 5 】



50

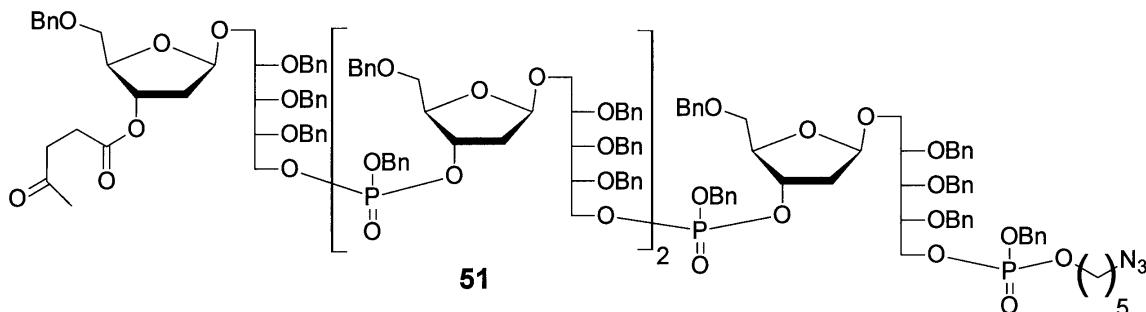
【 0 5 2 5 】

一般手順D)に従って、NAP保護四量体49を5-ヒドロキシル四量体50(50mg、56%)に変換した。HRMS(ESI⁺) C₁₇H₁₉O₄Na⁺ [M + Na]⁺についての計算値3090.2492、実測値3090.2405。

実施例 C - 1 1 . 化合物 5 1

【 0 5 2 6 】

【化 1 7 6 】



51

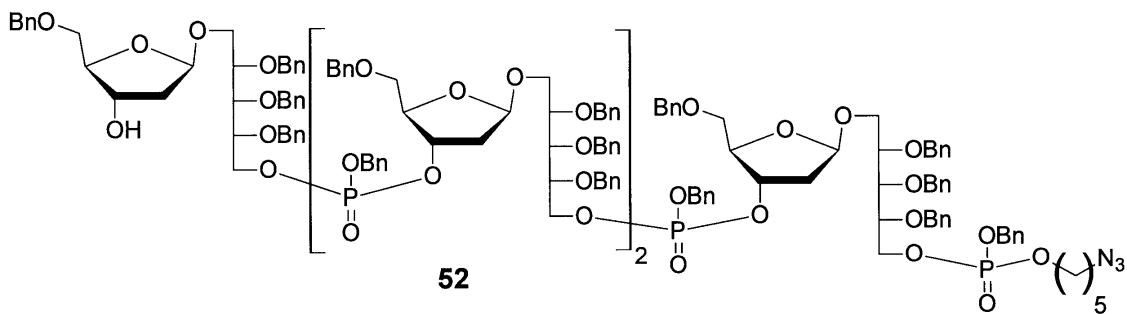
【 0 5 2 7 】

一般手順 E) に従って、四量体 5 0 をリンカ - 5 - アジド - ペンタノールにカップリングさせて四量体 5 1 (4.1 mg, 7.6 %) を得た。 H R M S (E S I ⁺) C₁₉H₂₁O₃N₃P₄Na⁺ [M + Na]⁺ についての計算値 3371.3421、実測値 3371.3321。

实施例 C - 1 2 . 化合物 5 2

【 0 5 2 8 】

【化 1 7 7 】



10

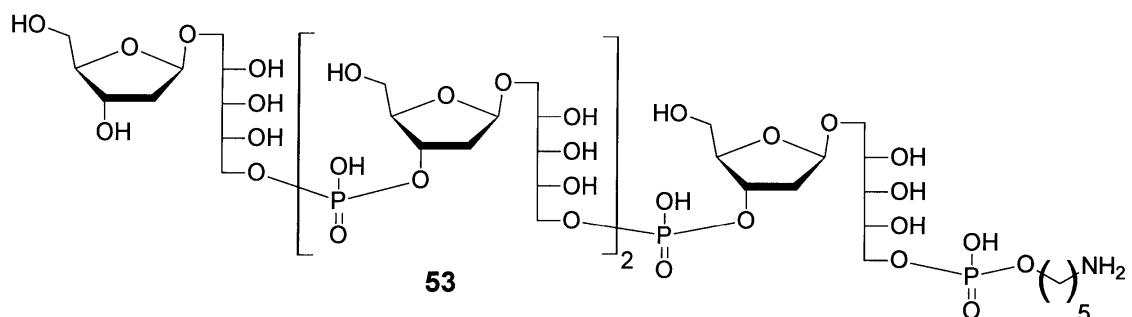
〔 0 5 2 9 〕

一般手順 G) に従って、四量体 5-1 を 3-ヒドロキシル四量体 5-2 (3.6 mg, 9.2 %) に変換した。HRMS (ESI⁺) C₁₈H₂₀N₃O₄Na⁺ [M+Na]⁺ についての計算値 3273.3053、実測値 3273.3079。

寒施例 C - 1 3 . 化合物 5 3

〔 0 5 3 0 〕

【化 1 7 8 】



20

[0 5 3 1]

一般手順 H) に従って、四量体 5-2 を脱保護四量体 5-3 (6 mg, 70 %) に変換した。HRMS (ESI⁺) C₄₅H₈₉NO₄₁P₄Na⁺ [M + Na / 2]⁺についての計算値 723.1879、実測値 723.1996。

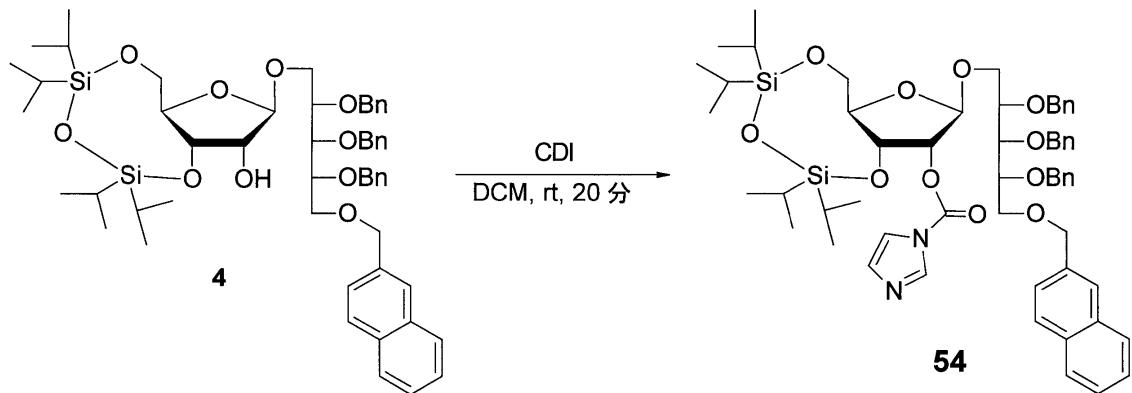
30

実施例 D . 2 ' - N 、 N 、 - ジメチルアミノカルボニルポリリボシルリビトールリン酸

实施例 D - 1 . 化合物 5 4

〔 0 5 3 2 〕

【化 1 7 9 】



40

【 0 5 3 3 】

アルゴン雰囲気下、室温で DCM (10 mL) 中のアルコール 4 (2.153 g, 2.299 mmol) の溶液に 1,1'-カルボニルジイミダゾール (145 mg, 4.598 mmol) を加えた。反応混合物を 20 分間攪拌し (CDI が完全に溶解したとき)、

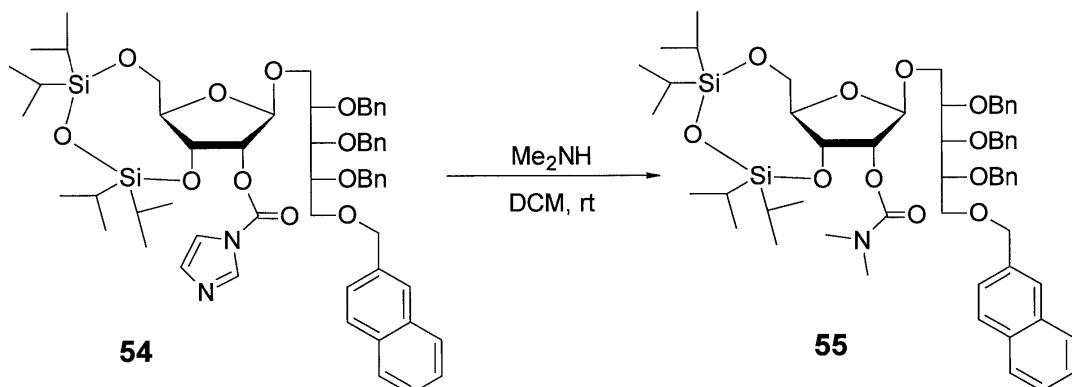
50

出発物質が完全に消費されるまで T L C でモニターした。溶媒を真空中で蒸発させて粗生成物を得た。粗生成物を、溶離液として n - ヘキサン中の E t O A c (0 ~ 1 0 0 %) を用いて自動フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。生成物 5 4 (T L C に基づく) を含有する試験管からの溶媒を真空中で濃縮すると、無色の油状物 (2 . 3 5 g, 9 9 %) が得られた。 H R M S (E S I ⁺) C ₅ ₈ H ₇ ₅ N ₂ O ₁ ₁ S i ₂ ⁺ [M + H] ⁺ の計算値 1 0 3 1 . 4 9 0 9 、実測値 1 0 3 1 . 4 9 3 6 。

実施例 D - 2 . 化合物 5 5

【 0 5 3 4 】

【 化 1 8 0 】



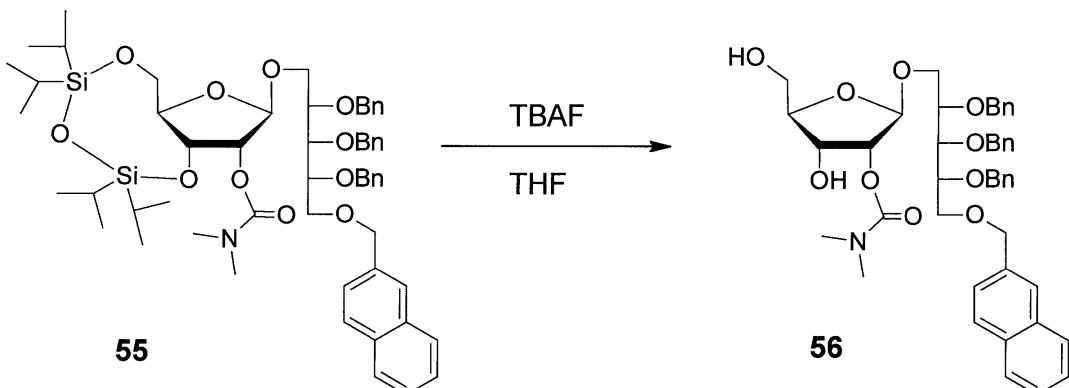
【 0 5 3 5 】

单量体 5 4 (2 . 3 9 6 g, 2 . 3 2 m m o l) を室温のアルゴン雰囲気下で A C N (2 0 m L) に溶解し、 M e ₂ N H を加えた (1 . 8 9 g, 2 3 . 2 m m o l) 。反応混合物を室温で 6 5 時間攪拌し、 T L C によりモニターした。溶液をセライトのパッドで濾別し、 D C M (5 0 m L) で洗浄した。溶媒を真空中で蒸発させた。得られた固体を D C M (1 0 0 m L) に可溶化し、有機溶液をブライン (1 0 0 m L) で洗浄し、 N a ₂ S O ₄ (約 2 g) で乾燥した。有機溶媒を真空中で蒸発させて粗生成物を得た。粗生成物を、溶離液として n - ヘキサン中の E t O A c (0 ~ 1 0 0 %) を用いて自動フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。生成物 5 5 (T L C に基づく) を含有する試験管からの溶媒を真空中で濃縮すると、無色の油状物 (2 g, 8 5 %) が得られた。 H R M S (E S I ⁺) C ₅ ₇ H ₇ ₇ N O ₁ ₁ S i ₂ N a ⁺ [M + N a] ⁺ の計算値 1 0 3 0 . 4 9 3 3 、実測値 1 0 3 0 . 4 9 5 8 。

実施例 D - 3 . 化合物 5 6

【 0 5 3 6 】

【 化 1 8 1 】



【 0 5 3 7 】

一般手順 A) に従って、シリル化化合物 5 5 をジオール生成物 5 6 (1 . 1 g, 7 3 %) に変換した。 H R M S (E S I ⁺) C ₄ ₅ H ₅ ₁ N O ₁ ₀ N a ⁺ [M + N a] ⁺ についての計算値 7 8 8 . 3 4 1 1 、実測値 7 8 8 . 3 4 3 1 。

10

20

30

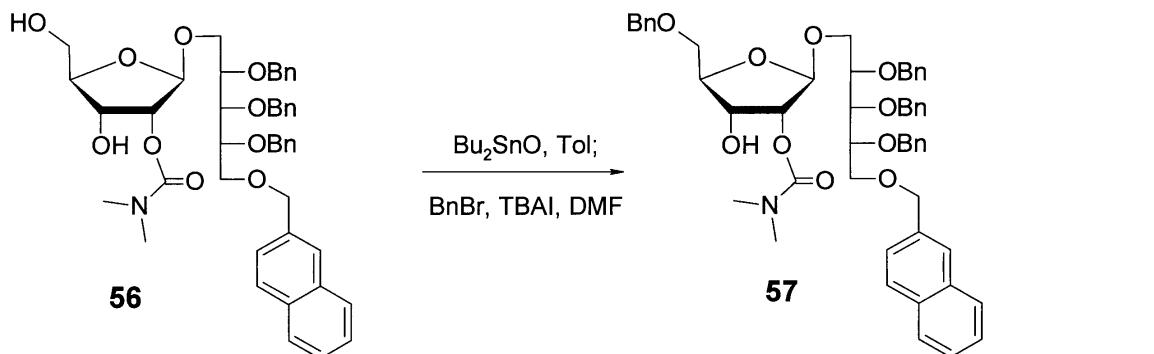
40

50

実施例 D - 4 . 化合物 57

【0538】

【化182】



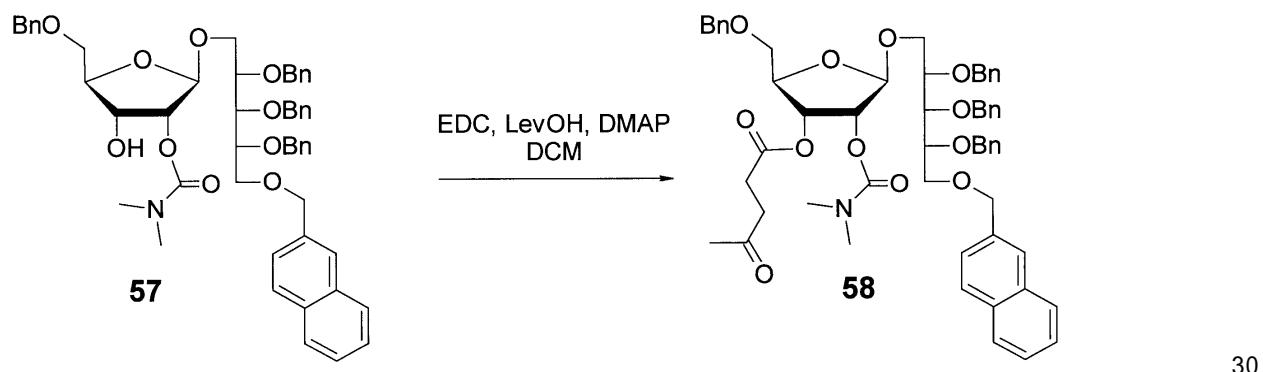
【0539】

一般手順 B) に従って、ジオール 56 をベンジル化生成物 57 (91 m g 、 16 %) に変換した。H R M S (E S I ⁺) C ₅ ₂ H ₅ ₇ N O ₁ ₀ N a ⁺ [M + N a] ⁺ についての計算値 878.3880 、実測値 878.3930 。

実施例 D - 5 . 化合物 58

【0540】

【化183】



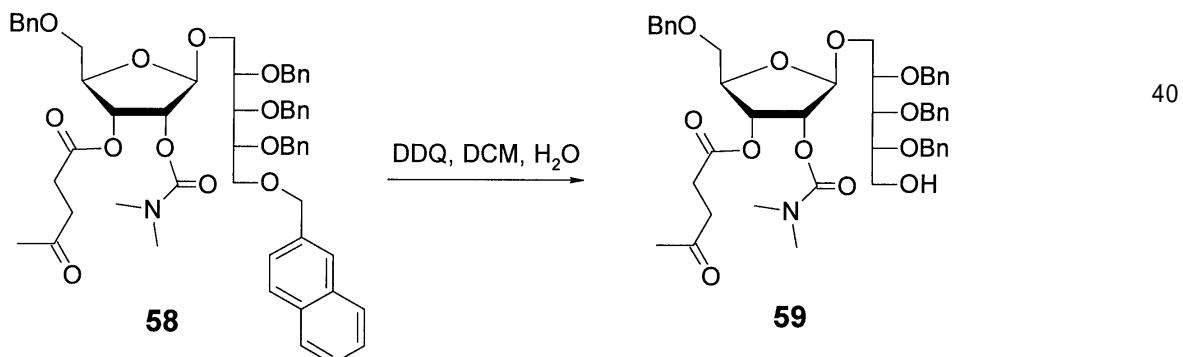
【0541】

一般手順 C) に従って、3 - ヒドロキシル中間体 57 を L e v 保護化合物 58 (46 m g 、 92 %) に変換した。H R M S (E S I ⁺) C ₅ ₇ H ₆ ₃ N O ₁ ₂ N a ⁺ [M + N a] ⁺ についての計算値 976.4248 、実測値 976.4318 。

実施例 D - 6 . 化合物 59

【0542】

【化184】



【0543】

一般手順 D) に従って、単量体 58 を 5 - ヒドロキシル単量体 59 (23 m g 、 60 %) に変換した。H R M S (E S I ⁺) C ₄ ₆ H ₅ ₅ N O ₁ ₂ N a ⁺ [M + N a] ⁺ について

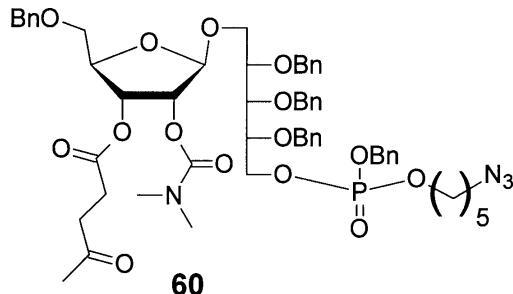
50

ての計算値 836.3622、実測値 836.3682。

実施例 D - 7. 化合物 60

【0544】

【化185】



10

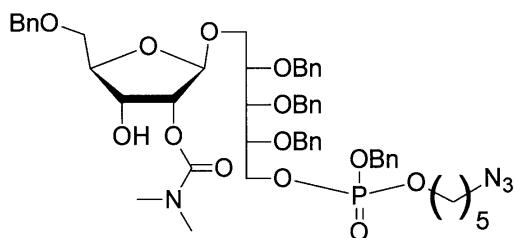
【0545】

一般手順 E) に従って、単量体 59 をリンカ - 5 - アジド - ペンタノールにカップリングさせて単量体 60 (19 mg, 70 %) を得た。H R M S (E S I ⁺) C ₅ ₈ H ₇ ₁ N ₄ O ₁ ₅ P N a ⁺ [M + N a] ⁺ の計算値 1117.4551、実測値 1117.4628。

実施例 D - 8. 化合物 61

【0546】

【化186】



20

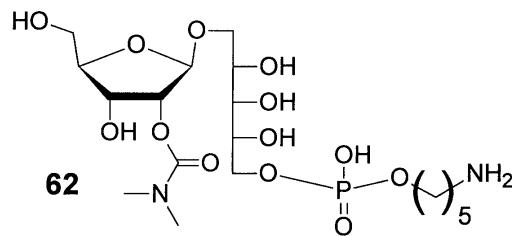
【0547】

一般手順 G) に従って、単量体 60 を 3 - ヒドロキシル単量体 61 (12 mg, 71 %) に変換した。H R M S (E S I ⁺) C ₅ ₃ H ₆ ₅ N ₄ O ₁ ₃ P N a ⁺ [M + N a] ⁺ の計算値 1019.4183、実測値 1019.4246。

実施例 D - 9. 化合物 62

【0548】

【化187】



30

【0549】

一般手順 H) に従って、単量体 61 を脱保護単量体 62 (3 mg, 60 %) に変換した。H R M S (E S I ⁺) C ₁ ₈ H ₃ ₈ N ₂ O ₁ ₃ P N a ⁺ [M + H] ⁺ の計算値 521.2112、実測値 521.2125。

実施例 E - 2 ' - フルオロロポリリボシルリビトールホスフェート

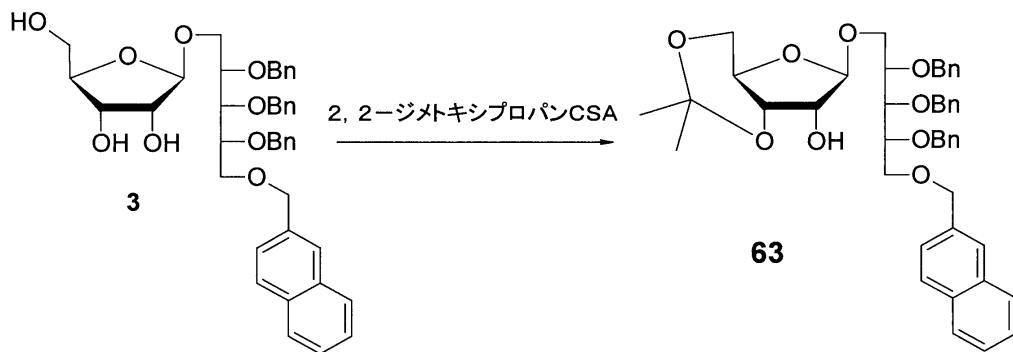
実施例 E - 1 . 化合物 63

40

50

【0550】

【化188】



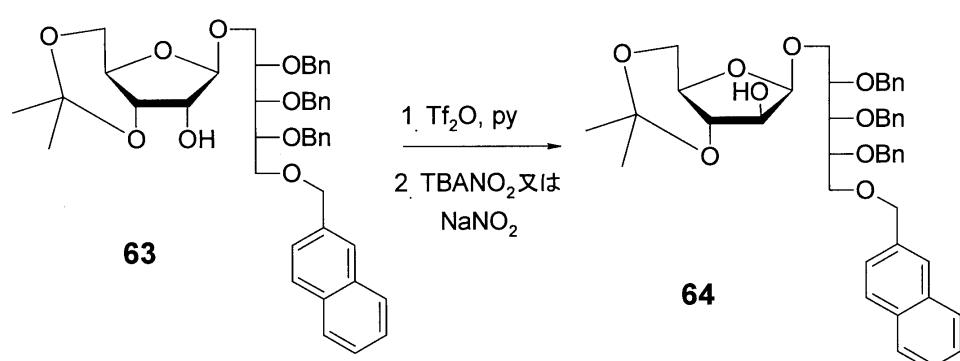
【0551】

アセトン中の化合物4に2,2-ジメトキシプロパン(1.2当量)、続いてカンファースルホン酸(0.5当量)を加えた。6時間攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮し、それをカラムクロマトグラフィーで精製して純粋な化合物63を得た。

実施例E-2. 化合物64

【0552】

【化189】



【0553】

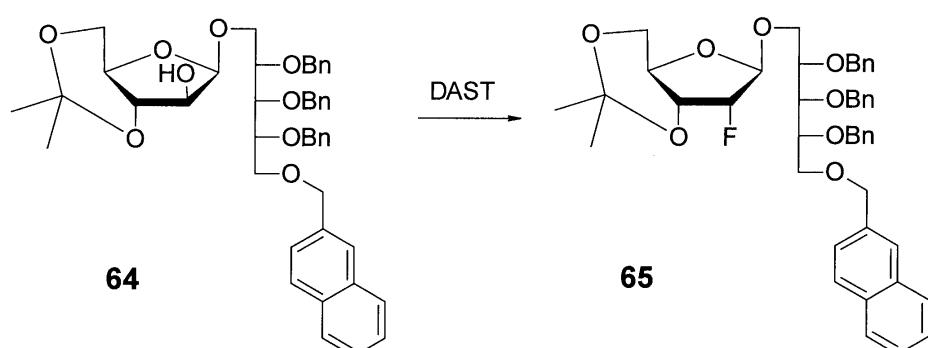
30

化合物63を0でDCM中のトリフルオロメタンスルホン酸無水物及びピリジンで処理した。2時間後、テトラブチルアンモニウムトリヨウ化物及び亜硝酸ナトリウムを加え、混合物を室温でさらに5時間攪拌した。生成物をヘキサン(200mL)中に抽出した。抽出物を水酸化ナトリウム水溶液(2N)、ブラインで洗浄し、乾燥し(Na2SO4)、減圧下で濃縮して褐色油状物を得た。フラッシュクロマトグラフィー(ヘキサン:エーテルで溶出する)により精製して64を得た。

実施例E-3. 化合物65

【0554】

【化190】



【0555】

50

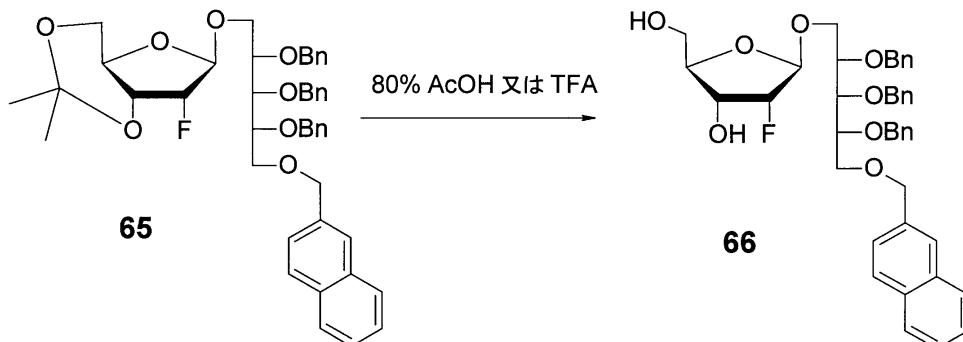
DAST (ジエチルアミノサルファートリフルオリド) (1.2当量)を、ジクロロメタン中64の搅拌溶液に-78で滴下した。適所で冷却に曝して、混合物を一晩かけて室温まで温めた。20時間後、溶液を氷と過剰の飽和炭酸水素ナトリウム水溶液の激しく搅拌した混合物にゆっくり注いだ。発泡が止んだとき、生成物をヘキサン(200mL)中に抽出した。抽出物を水酸化ナトリウム水溶液(2N)、ブラインで洗浄し、乾燥し(Na_2SO_4)、減圧下で濃縮して褐色油状物を得た。フラッシュクロマトグラフィー(ヘキサン:エーテルで溶出)で精製して65を得た。

実施例E-4. 化合物66

【0556】

【化191】

10



20

【0557】

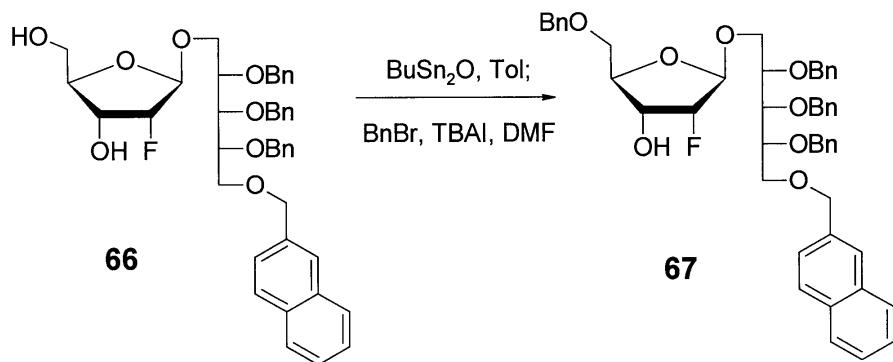
化合物65を80%の酢酸にて取得し、80で2時間搅拌した。反応終了後(TLC)、酸性溶液を減圧濃縮して粗生成物を得、これをカラムクロマトグラフィーで精製して化合物66を得た。

実施例E-5. 化合物67

【0558】

【化192】

30



【0559】

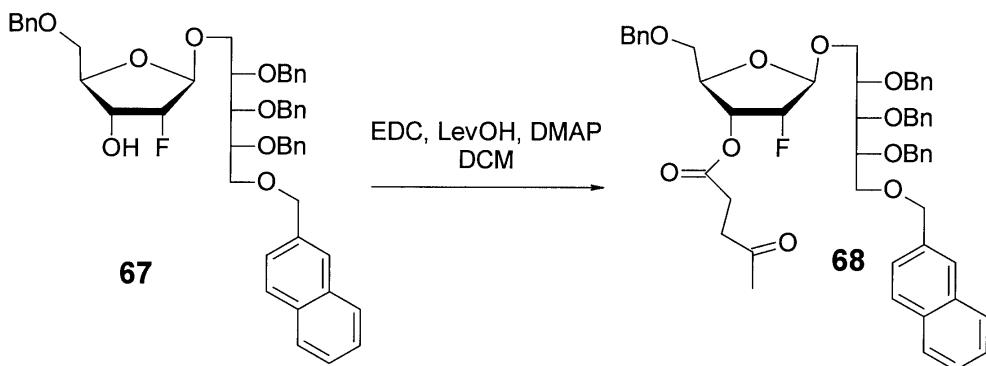
一般手順B)に従って、ジオール66をベンジル化生成物67に変換した。

実施例E-6. 化合物68

【0560】

40

【化193】



10

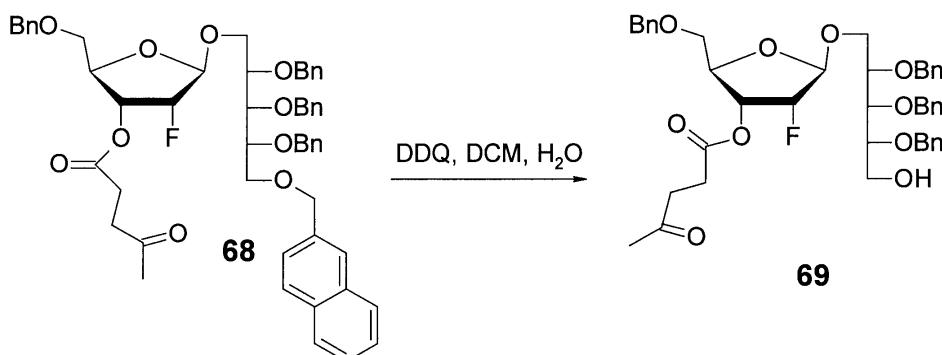
【0561】

一般手順C)に従って、3-ヒドロキシル中間体67をLev保護化合物68に変換した。

実施例E-7. 化合物69

【0562】

【化194】



20

【0563】

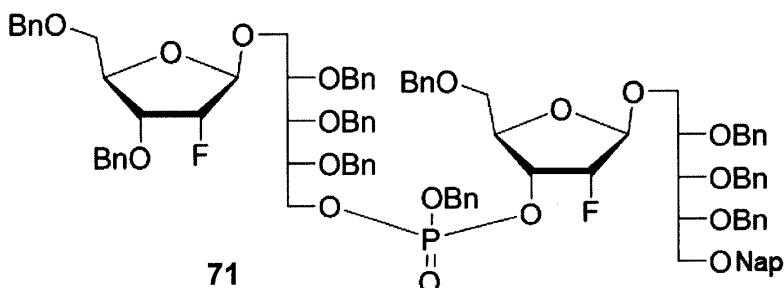
一般手順D)に従って、NAP保護中間体68を5-ヒドロキシル化合物69に変換した。

30

実施例E-8. 化合物71

【0564】

【化195】



40

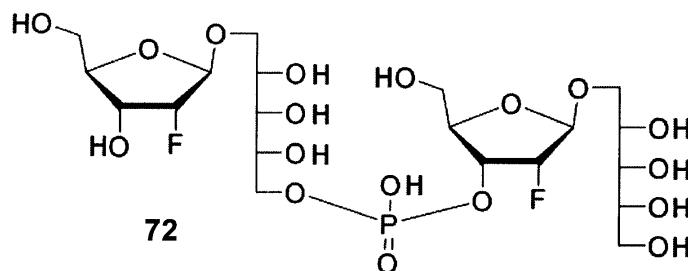
【0565】

一般手順E)に従って、3-ヒドロキシル化合物67及び5-ヒドロキシル化合物69を二量体71に変換した。

実施例E-9. 化合物72

【0566】

【化196】



【0567】

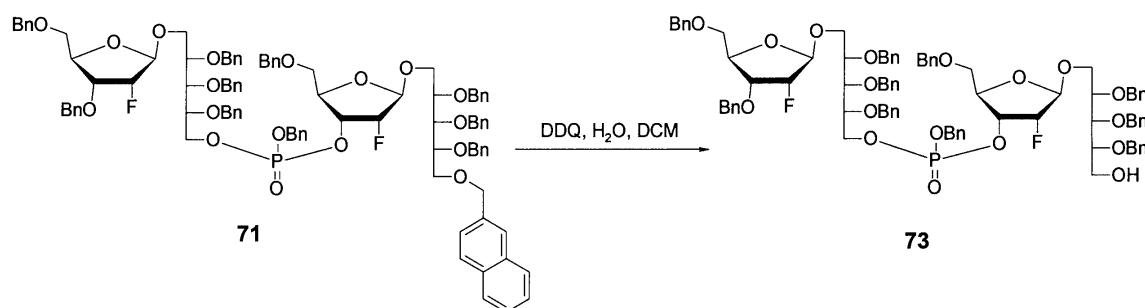
10

一般手順H)に従って、二量体71を脱保護二量体72に変換した。

実施例E-10. 化合物73

【0568】

【化197】



20

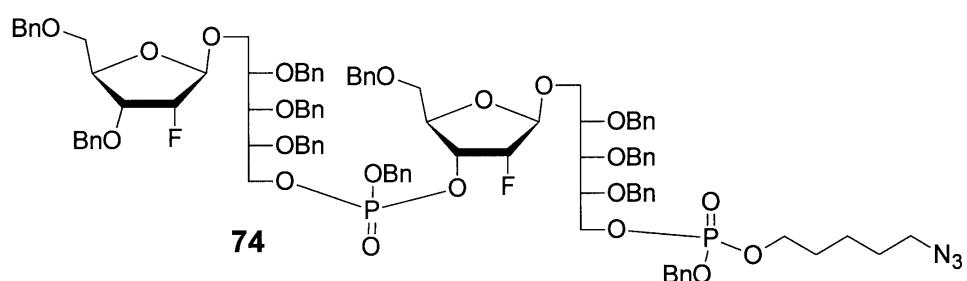
【0569】

一般手順D)に従って、NAP保護二量体71を5-ヒドロキシル化合物73に変換した。

実施例E-11. 化合物74

【0570】

【化198】



30

【0571】

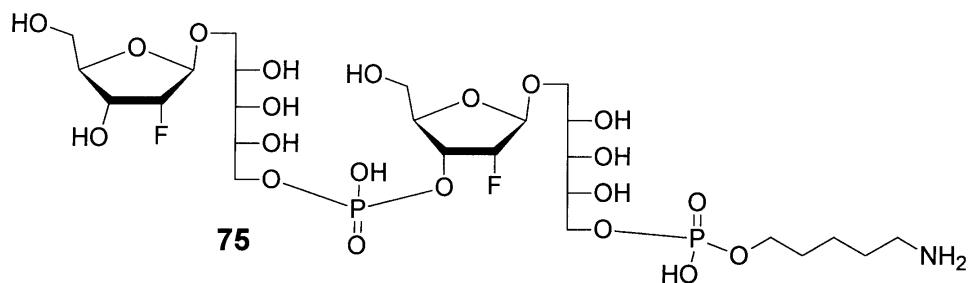
一般手順E)に従って、二量体73をリンカーフィジド-ペンタノールにカップリングさせて二量体74を得た。

40

実施例E-12. 化合物75

【0572】

【化199】



【0573】

10

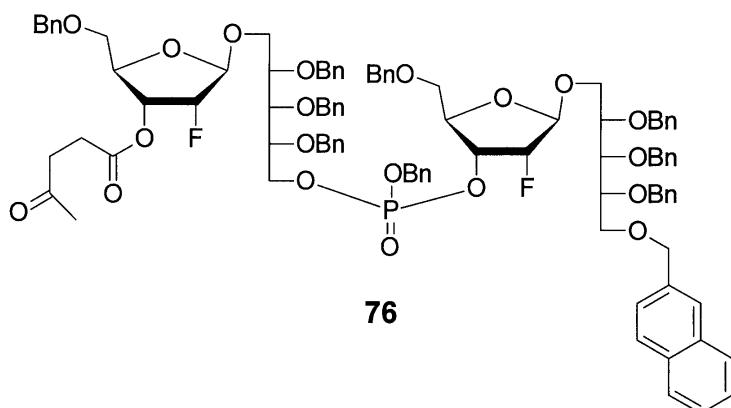
一般手順H)に従って、二量体74を脱保護二量体75に変換した。

実施例F-2'-置換ポリリボシリルリビトールホスフェート

実施例F-1. 化合物76

【0574】

【化200】



20

【0575】

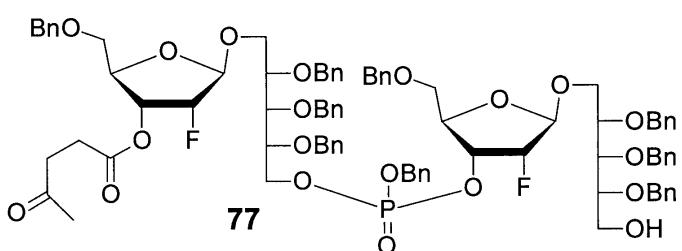
一般手順E)に従って、3-ヒドロキシル化合物67及び5-ヒドロキシル化合物69を二量体76に変換した。

実施例F-2. 化合物77

30

【0576】

【化201】



【0577】

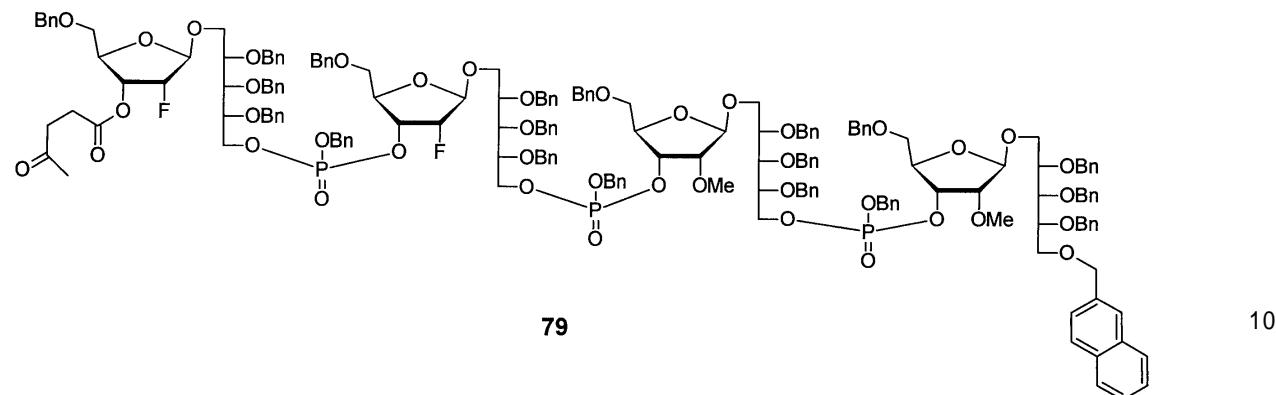
40

一般手順D)に従って、NAP保護中間体76を5-ヒドロキシル化合物77に変換した。

実施例F-3. 化合物79

【0578】

【化202】



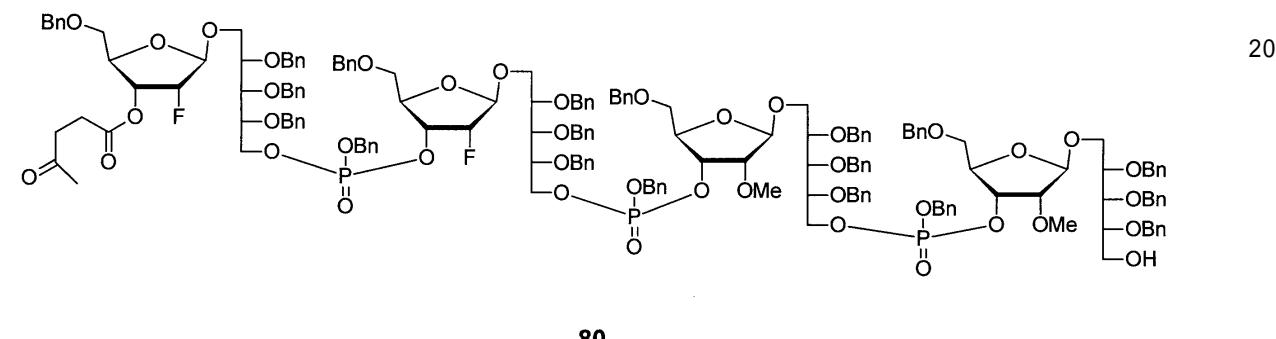
【0579】

一般手順E)に従って、3-ヒドロキシリル二量体22及び5-ヒドロキシリル二量体77を四量体79に変換した。

実施例F-4. 化合物80

【0580】

【化203】



【0581】

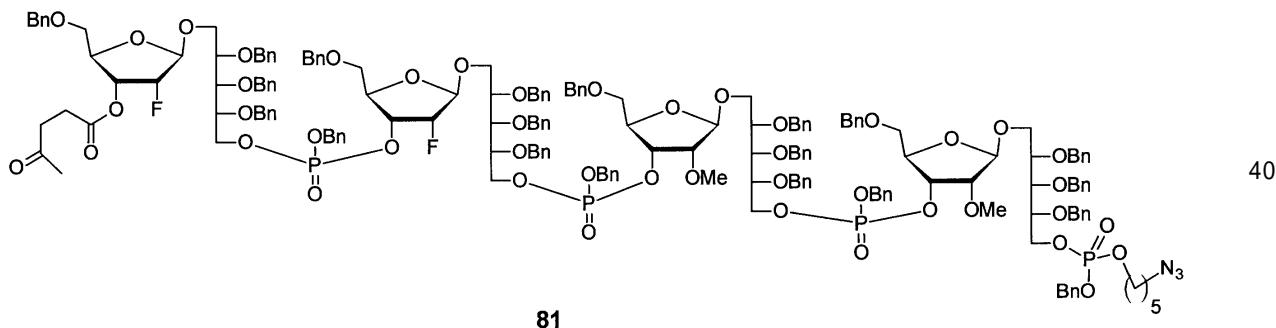
一般手順D)に従って、NAP保護四量体79を5-ヒドロキシリル四量体80に変換した。

30

実施例F-5. 化合物81

【0582】

【化204】



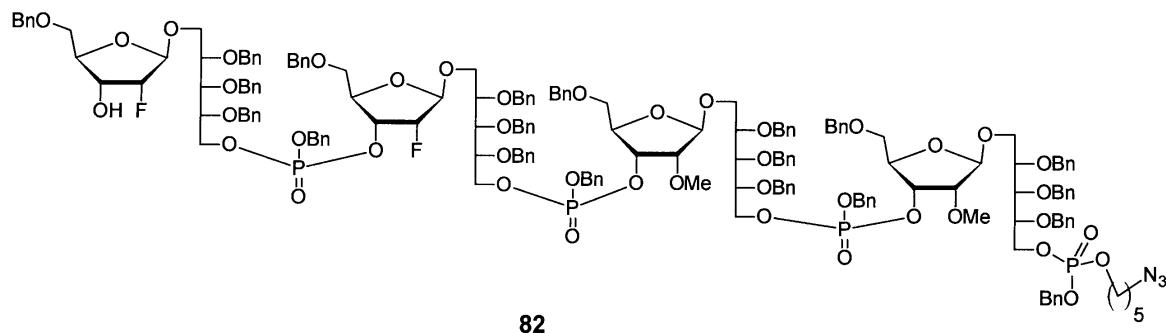
【0583】

一般手順E)に従って、四量体80をリンカーフィルムアジド-ペントノールにカップリングさせて四量体81を得た。

実施例F-6. 化合物82

【0584】

【化205】



10

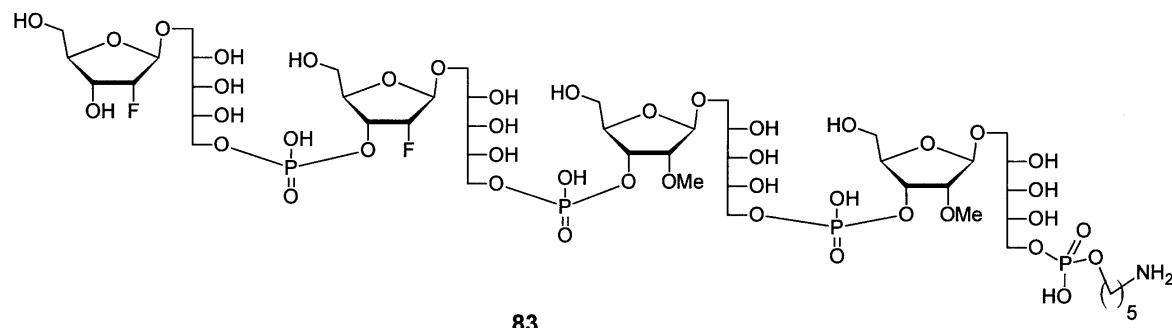
【0585】

一般手順G)に従って、四量体81を3-ヒドロキシル四量体82に変換した。

実施例F-7. 化合物83

【0586】

【化206】



20

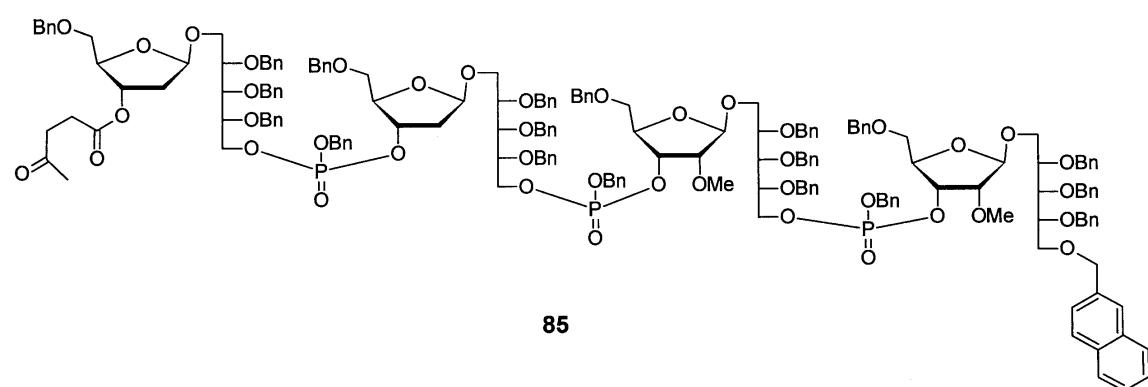
【0587】

一般手順H)に従って、四量体82を脱保護四量体83に変換した。

実施例F-8. 化合物85

【0588】

【化207】



30

【0589】

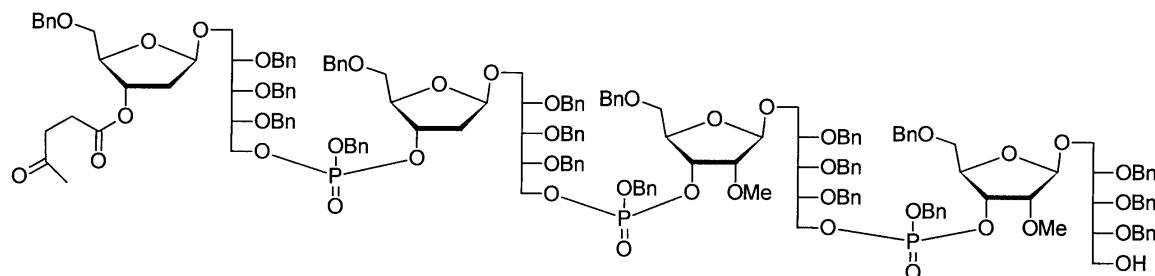
一般手順E)に従って、3-ヒドロキシル二量体22及び5-ヒドロキシル二量体45を四量体85に変換した。

実施例F-9. 化合物86

【0590】

40

【化208】



86

10

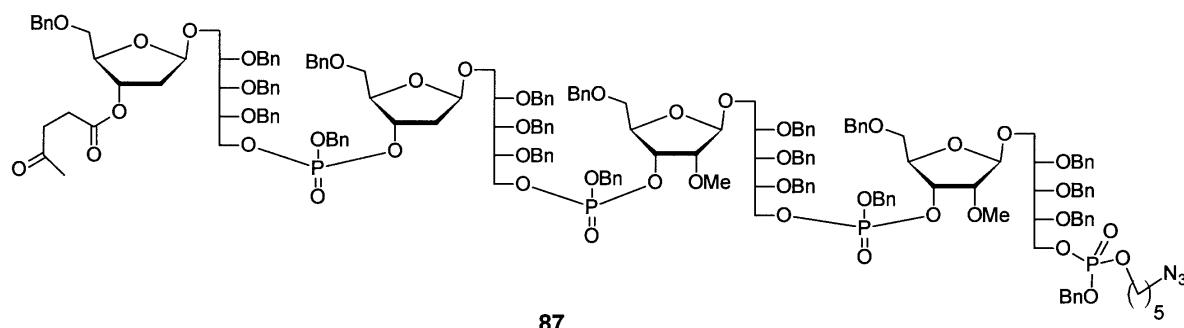
【0591】

一般手順D)に従って、NAP保護四量体85を5-ヒドロキシル四量体86に変換した。

実施例F-10. 化合物87

【0592】

【化209】



87

20

【0593】

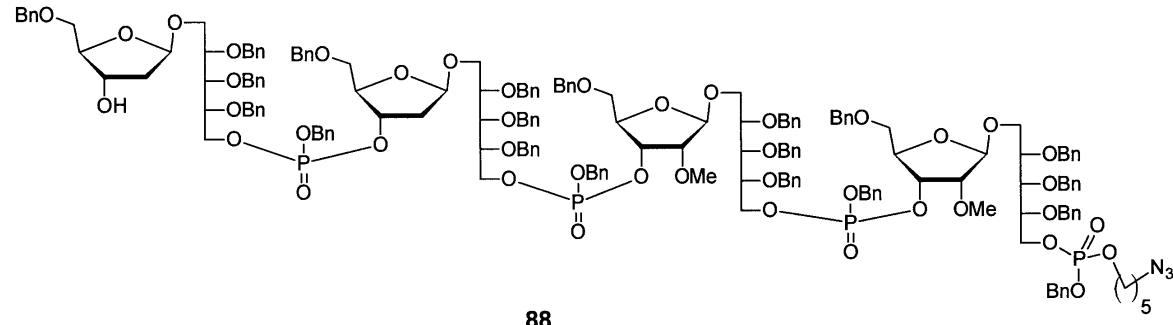
一般手順E)に従って、四量体86をリンカーフィジド-ペントノールにカップリングさせて四量体87を得た。

30

実施例F-11. 化合物88

【0594】

【化210】



88

40

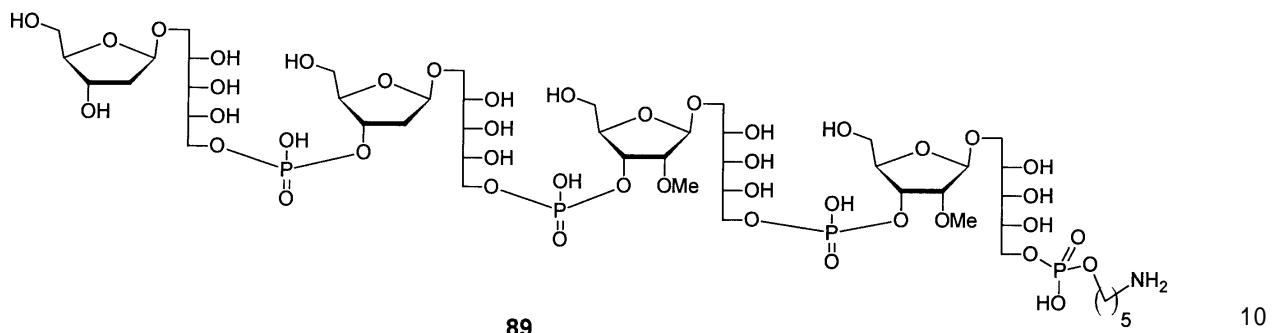
【0595】

一般手順G)に従って、四量体87を3-ヒドロキシル四量体88に変換した。

実施例F-12. 化合物89

【0596】

【化211】



【0597】

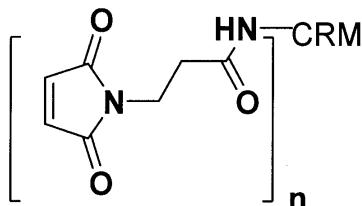
一般手順H)に従って、四量体88を脱保護四量体89に変換した。

実施例G. 安定化糖類-CRM₁₉₇-システインコンジュゲートの合成

実施例G-1. 化合物90

【0598】

【化212】



【0599】

CRM₁₉₇のコンジュゲーションに向けた準備：ストック溶液からのCRM₁₉₇ (3.0 mg、0.0517 μmol)をAmiconフィルター (0.5 mL、MWCO 30 KDa)に移し、10000 RPMで3分間遠心分離した。300 μLの1×PBSをAmiconフィルター中の残りのタンパク質に添加し、10000 RPMで3分間再度遠心分離した。次に400 μLの1×PBS緩衝液 (pH 7.4)をAmiconフィルターに加え、10000 RPMで3分間遠心分離した。次に、タンパク質を含むフィルターを新しいAmiconマイクロ遠心分離チューブ (1.5 mL)の内側で逆転させ、1000 RPMで1分間遠心分離してタンパク質をマイクロ遠心分離チューブ (容量約100~120 μL)に集めた。

【0600】

コンジュゲーション手順：1×PBS緩衝液 (約100 μL)中のCRM₁₉₇を、攪拌子を備えた反応バイアルにおいて室温で、1.3 mLの1×PBS緩衝液で希釈した。3-(マレイミド)プロピオン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (0.688 mg、2.58 μmol)を20 μLのDMSOで溶解したタイプIガラス-2 mL反応バイアルに移し、それを1×PBS緩衝液中のCRM₁₉₇を含む反応バイアルに加えた。反応物を室温で4時間攪拌した。RMは無色透明の溶液であった。

【0601】

洗浄工程：反応混合物をAmiconフィルター (0.5 mL、MWCO 30 KDa)に移し、10000 RPMで3分間遠心分離し、全反応混合物を移して遠心分離するまでこのプロセスを繰り返した。その後、400 μLの1×PBS緩衝液を反応バイアルに加え、すすいでそれをAmiconフィルターに移した。この洗浄を400 μLのPBS緩衝液でさらに4回繰り返した。最後に、CRM₁₉₇-マレイミドを含むAmiconフィルターを新しいAmiconマイクロ遠心分離チューブ (1.5 mL)内で逆転させ、1000 RPMで1分間遠心分離してマイクロ遠心分離チューブ内に約130 μLのCRM₁₉₇-マレイミドを回収した。そこに950 μLのPBS溶液 (pH 7.4)を加

40

50

え、バイアルを2～8℃で保存した（総容量＝約1.08mL）。CRM₁₉₇-マレイミドコンジュゲートをMALDI、SDS-page、ウエスタンプロット、SEC-HPLC及びBCAによるタンパク質推定によって分析した。CRM₁₉₇-マレイミドコンジュゲートをMALDIによって分析したところ21～24の間に見出された。BCA推定もまた、タンパク質の良好な回収率を示した。SDS-pageは、CRM-マレイミドコンジュゲート90がCRM₁₉₇よりも高い分子量であり、安定していることを示した。ウエスタンプロットは、CRM抗ヤギ抗体がCRMコンジュゲート90を認識しているのに対し、Hib抗ウサギ抗体は糖を含まないCRM-マレイミドコンジュゲート90を認識しなかったことを示している。さらに使用するまで、試料を2～8℃で保存した。

10

実施例G-2. 化合物94糖類-CRM₁₉₇-システインコンジュゲート

化合物94の合成経路は図3に概説されている。

DTT法：化合物29（5mg、0.003mmol）をpH7.4のPBS緩衝液（5mL）に溶解し、DSP（ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート））（20mg、0.049mmol）のDMSO（2.5mL）溶液を室温で一晩加えた。その後、ジチオトレイトール（DTT）（4mg、0.025mmol）を加え、溶液を40℃でさらに2時間攪拌した。化合物91をSephadex G-25カラムクロマトグラフィー（4.5mg、88%）で精製した。HRMS（ESI⁺）C₅₁H₉₉NO₄₆P₄S [M+2Na+2K-4H]⁺についての計算値1736.2793、実測値1736.279。

20

【0602】

糖類-チオールのコンジュゲーションに向けた準備：TEEP方法：100μLのTEEP懸濁液を1.5mLバイアル中に取り、300μLの1×PBS溶液（pH7.4）を添加した。遠心分離し、上澄み液を除去した。そしてPBSによる洗浄をもう一度繰り返した。そして最後に、残渣を100μLのPBS溶液に取り、2mLのタイプIガラスバイアル中のPBS緩衝液（0.15mL）中のSugar-ジスルフィド91（1.38mg、0.292μmol）に加えた。室温で1時間、オービタルシェーカーを用いて穏やかに振とうした。RMをバイアルに移し、ガラス製反応バイアルを200μLのPBS溶液ですすぎ、バイアルに移した。遠心分離し、2mLのタイプIガラスバイアル中のPBS溶液の上清（約325μL）を集めた。残渣に200μLのPBS溶液を添加し、よく混合し、遠心分離し、上澄みを集めて再び2mLのタイプIガラスバイアルに移した。そのため、還元型チオール78溶液の総量は約525μLであった。分析用に約25μL保存した。

30

【0603】

コンジュゲーション手順：1×PBS緩衝液（約850μL）中のCRM₁₉₇-マレイミド90を、室温で攪拌子を備えた反応バイアルに入れた。1×PBS緩衝液中のPBS溶液（～500μL）中の糖類-チオール92をCRM₁₉₇-マレイミド90溶液に滴下して加えた。バイアルを50μLのPBS溶液ですすぎ、溶液を室温で反応混合物に移した。RMは透明溶液であり、室温で20時間攪拌した。[反応混合物の約40μLのアリコートを分析目的で取り出した]。次に、リン酸緩衝液（pH7.4、30μL）中のシステイン（0.14mg）を、93を含むRMに添加し、室温で1時間攪拌した。

40

【0604】

洗浄工程：94を含む反応混合物をAmiconフィルター（0.5mL、MWCO30KDa）に移し、10000RPMで3分間遠心分離し、全反応混合物を移して遠心分離するまでこのプロセスを繰り返した。その後、400μLの1×PBS緩衝液を反応バイアルに加えて洗浄し、溶液をAmiconフィルターに移した。この洗浄を400μLのPBS緩衝液でさらに4回繰り返した。最後に、CRM₁₉₇-マレイミド-糖類-システイン94を含むフィルターを新しいAmiconマイクロ遠心分離チューブ（1.5mL）の内側で逆転させ、10000RPMで1分間遠心分離して約150μLのCRM₁₉₇-マレイミド-糖類-システインをマイクロ遠心分離チューブに集めた。Amic

50

on フィルターに 200 μ L の PBS 溶液 (pH 7.4) を添加し、よくすすいで溶液をマイクロ遠心分離チューブに移し、750 μ L の PBS 溶液 (pH 7.4) で溶液を希釈し、バイアルを 2~8 で保存した。(総容量 = 約 1100 μ L)。40 μ L のコンジュゲート 94 のアリコートを Amicon フィルターを用いて milliQ 水で洗浄し、MALDI (シナピン酸マトリックス) を用いて分析し、3.4~4.2 の負荷を得た。SDS-PAGE、ウエスタンプロット及び SEC-HPLC を用いて、コンジュゲート 94 をさらにうまく分析した。BCA 法を用いたタンパク質推定は、コンジュゲート中のタンパク質の良好な回収率を示した。

【0605】

実施例 H. 安定性テスト

10

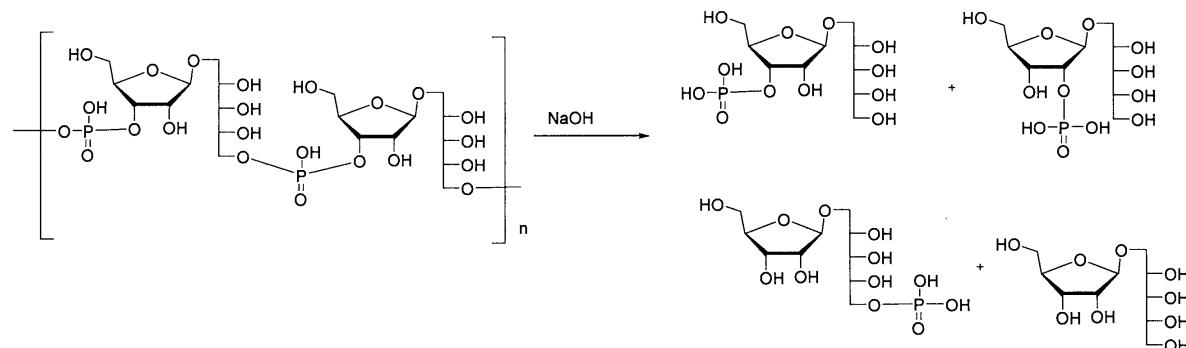
実施例 H-1. 塩基性媒体中の Hib 荚膜多糖類の安定性

本発明の糖類の安定性研究は、安定な液体 Hib 複合糖質ワクチンの開発にとって重要である。対照として、最初に Hib ポリリボシルリビトールホスフェート莢膜多糖類 (CPS) の安定性及び開裂を調べた。したがって、Hib CPS は、0.43 mL の 0.1 M NaOH 中の 1 mg の Hib CPS、20 時間という、Vaccine, 2000, 18, 1982-1993 に記載されているような、標準的な手順を使用して断片化された。精製後に得られた断片 (30 kDa の Amicon フィルターを通して濾過し、続いて脱塩する) を、¹H NMR、HPLC 及び HRMS によって分析した。

【0606】

【化 213】

20



30

【0607】

図 4 A は断片化された Hib CPS の ¹H NMR スペクトルを示し、図 4 B は未処理 Hib CPS の ¹H NMR スペクトルを示す。図 5 A は、断片化された Hib CPS の HPLC クロマトグラムを示し、図 5 B は、処理された Hib CPS の ESI 質量スペクトルを示す。この一連の初期の実験は、Hib CPS が塩基性培地でその最小の 2 及び 3-O リン酸断片に開裂されたことを実証した。

実施例 H-2. 水酸化アルミニウム懸濁液中の Hib 荚膜多糖類の安定性

対照 Hib CPS の安定性データを確立した後、水酸化アルミニウム中の Hib CPS の安定性を調べたが、それは様々な温度 {37 (A1) 及び室温 (A3)} でワクチン製剤 {0.5 mg Hib CPS、3 mL Alhydrogel (登録商標) (Brentag) 及び 22 mL milliQ 水} において不安定であることが知られている。37 では 2 日後に最小の断片への開裂が認められ、室温では 7 日後にこのパターンが認められた (図 6)。この実験から、Hib CPS は、市販のワクチンに使用される最も一般的なアジュバントである水酸化アルミニウム中で、温度に応じて 2~7 日で 2 及び 3-O リン酸断片に分解することが確認された。

40

実施例 H-3. 化合物 16 の安定性

合成された 2'-メトキシリボシルリビトールホスフェート二量体 16 の安定性研究を、様々なアジュバントの存在下で実行した。16 の第 1 の工程の安定性は A1 (OH)₃、A1 PO₄、水を用いて様々な温度 {37 (A1)、2~8 (A2)、室温 (A3)、70 (A4)} で研究された。

50

【0608】

この研究に使用された Al(OH)_3 及び AlPO_4 の量は、市販の Hib ワクチンに存在する量と同様であった。1週間後の HPLC を用いた異なる温度での試料の分析を図 7 ~ 10 に示す。二量体 16 の分解は单量体 8 をもたらすはずであるので、化合物 16 及び 8 を参照として用いた。24時間ごとに $40 \mu\text{L}$ の溶液を各バイアルから分注し、 5000 rpm で 4 分間遠心分離した。HPLC 分析のために上清 ($25 \mu\text{L}$) を採取した。7日後でさえも、分解は認められなかった。この研究から、2' - メトキシ - リボシリリビトール二量体 16 は A1 (2' - メトキシ - リボシリリビトールホスフェートオリゴマー)、A2 (2' - メトキシリボシリリビトールホスフェートオリゴマー)、A3 (室温) 及び A4 (70°C) で安定していることが明らかになった。

【0609】

実施例 H - 1 に適用したように、水性塩基性条件下で二量体 16 の安定性をさらに調べた。図 13D の HPLC クロマトグラムから、二量体 16 は 4 日後に完全に開裂されたが、天然の Hib CPS は 20 時間以内に既に完全に開裂されていたと結論付けられた。これは、2' - メトキシリボシリリビトールホスフェートオリゴマーが、天然の Hib CPS と比較して極端な塩基性条件下でさえも非常に安定していることを実証している。

実施例 H - 4 . 化合物 29 の安定性

リンカ - 29 を有する合成された 2' - メトキシリボシリリビトールホスフェート四量体の安定性研究を様々なアジュバントの存在下で行った。第 1 の工程として、29 の安定性を Al(OH)_3 、リン酸緩衝液 (PBS) 及び水を用いて様々な温度 { A2 (2 ~ 8°C)、及び室温 (A3) } で研究した。

【0610】

この研究に使用された Al(OH)_3 の量は市販の Hib ワクチンに存在する量と同様であった。1週間後の HPLC を用いた異なる温度での試料の分析を図 11 及び 12 に示す。四量体 29 の分解は二量体 16 及び单量体 8 をもたらすはずであるので、化合物 29、16 及び 8 を参照として用いた。24時間ごとに $40 \mu\text{L}$ の溶液を各バイアルから分注し、 5000 rpm で 4 分間遠心分離した。HPLC 分析のために上清 ($25 \mu\text{L}$) を採取した。7日後でさえも、分解は認められなかった。この研究から、2' - メトキシ - リボシリリビトールホスフェート四量体 29 は、 Al(OH)_3 の存在下、リン酸緩衝液 (PBS) 中及び水中で A2 (2 ~ 8°C) 及び室温 (A3) で安定していることが明らかであった。

【0611】

実施例 H - 1 に適用したように、水性塩基性条件下で四量体 29 の安定性をさらに調べた。図 13A の HPLC クロマトグラムから、四量体 29 は 4 日後に完全に開裂されたが、天然の Hib CPS は 20 時間以内に既に完全に開裂されていたと結論付けられた。これは、2' - メトキシリボシリリビトールホスフェートオリゴマーが、天然の Hib CPS と比較して極端な塩基性条件下でさえも非常に安定していることを実証している。

実施例 H - 5 . リン酸緩衝液の存在下におけるコンジュゲート 94 の安定性

2つのバイアルに入っている約 $5 \mu\text{g}$ の化合物 94 をそれぞれ $500 \mu\text{L}$ の PBS、pH 7.4 に希釈した。一方のバイアルを 25°C で保存し、もう一方のバイアルを 2 ~ 8°C で保存した。1日後及び 15 日後に、ビシンコニン酸アッセイ (BCA) 及び HPLC - SEC (カラム: TSKgel G2000SW \times 1、緩衝液: 50 mM の Tris、20 mM の NaCl、pH 7.2) によって試料を分析した。データは、15 日後もなおコンジュゲート 94 が存在し、25°C 及び 2 ~ 8°C の両方の温度条件で安定していることを示した。

実施例 H - 6 . 水酸化アルミニウムの存在下における化合物 94 の安定性

約 $5 \mu\text{g}$ の化合物 94 と Alhydrogel (登録商標) (0.125 mg / 用量) を含む 2つのバイアルに、それぞれ $500 \mu\text{L}$ の PBS、pH 7.4 を充填した。1つのバイアルを 25°C で、もう 1 つのバイアルを 2 ~ 8°C で保存した。試料を 1 日後及び 1 週間後ビシンコニン酸アッセイ (BCA)、HPLC - SEC カラム: TSKgel G2000SW \times 1、緩衝液: 50 mM Tris、20 mM NaCl、pH 7.2)、S

10

20

30

40

50

D S - p a g e 及びウエスタンプロットにより分析した。データは、約 75 % のコンジュゲート 94 が Alhydrogel (登録商標) に吸着され、吸着されたコンジュゲートは両方の温度条件で安定していることを示した。この間に分解生成物は認められなかった。

【 0 6 1 2 】

【表 1】

表 1 : リン酸緩衝液及び水酸化アルミニウムの存在下におけるコンジュゲート 94 の B C A アッセイ

	t=0 におけるタンパク質濃度 (μg/mL)	温度 (°C)	最終タンパク質濃度 (μg/mL)
94+PBS	155	2-8	15 日後の 119
94+PBS	155	25	15 日後の 107
94+Alhydrogel (登録商標)	113	2-8	1 日後に 32
94+Alhydrogel (登録商標)	113	25	1 日後に 36
94+Alhydrogel (登録商標)	113	2-8	7 日後に 34
94+Alhydrogel (登録商標)	113	25	7 日後の 39

10

20

30

【 0 6 1 3 】

実施例 I . グリカンアレイ分析

実施例 I - 1 . ウサギにおける免疫化

免疫実験をウサギで行った (Chong et al. Infect. Immun., 1997, p. 4918 - 4925; Fernandez-Santana et al. Science, 2004, 305 (5683), p. 522 - 525.)。ウサギは国際的な動物の規制 (EU指令 2010 / 63 / EU) に従って飼育及び処理され、政府当局 (Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittel sicherheit 及び Fischerei Mecklenburg-Vorpommern) の認可を受けている。

30

【 0 6 1 4 】

各群につき 4 匹のウサギを含む 4 つの群を、5 μg の糖類 29 を含有するアジュバント化されていないコンジュゲート 94 又は Alhydrogel をアジュバント化したコンジュゲート 94 (5 μg の Hib 糖類 29 を含有) で、プライムブーストレジメンで免疫した。陰性対照群は PBS / Alhydrogel のみを投与した。陽性対照群には、承認されたワクチン A c t H I B (登録商標) (5 μg の PRP、ヒトの用量の半分に相当する)、破傷風トキソイド (TT) に対する天然 PRP のコンジュゲートを投与した。免疫前血清及び出血 21 日目の抗血清 (2 回の免疫化後) を採取し、グリカンアレイにて分析した。A c t H I B 特異的血清は、本発明の H I B 類似体の 2 回の免疫化とは対照的に 3 回の投与後に得られた。

40

実施例 I - 2 . グリカンアレイ分析

PBS 中の糖類を、S 3 マイクロアレイスロッター (Scienion) を用いて N - ヒドロキシスクシンイミド活性化ガラススライド (CodeLink スライド、Surroundics) 上に印刷した。スライドを湿気飽和チャンバー中で一晩インキュベートし、100 mM のエタノールアミン、50 mM のリン酸ナトリウム、pH 7.5 で 2 時間クエンチし、水で洗浄して乾燥した。

50

【0615】

インキュベーションのために、スライドを3% (w/v) BSA - PBSで1時間プロッキングし、PBS及び水で洗浄し、遠心分離により乾燥した。64ウェルインキュベーショングリッドを取り付けた。血清を3% BSA - PBS、0.1% (v/v) Tween - 20で希釈し、37℃で15分間インキュベートし、3220 rpmで2分間遠心分離した。血清希釈物をスライドに適用し、室温で1時間インキュベートした。ウェルをPBS + 0.1% Tween - 20 (PBS-T)で3回洗浄した。二次抗体（抗ウサギIgG FITC、抗ウサギIgM AlexaFluor 647、抗ヒトIgG - Fc AlexaFluor 488及びIgM AlexaFluor 594）をスライド上で30分間室温でインキュベートした。ウェルをPBS-Tで2回洗浄した。インキュベーショングリッドを外し、スライドをPBSと水で洗浄した。遠心分離により乾燥した後、スライドをGenePix 4300A (Molecular Devices)マイクロアレイリーダーを用いてスキャンした。 10

【0616】

一次免疫応答を、0日目、21日目及び35日目に回収された血清試料のグリカンアレイスクリーニングによって評価した。2' - メトキシリボシルリビトールホスフェート二量体19、2' - メトキシリボシルリビトールホスフェート二量体24、2' - メトキシリボシルリビトールホスフェート四量体29、2' - デオキシリボシルリビトールホスフェート四量体53及び2' - ジメチル - アミノカルボニルリボシルリビトールホスフェート62ならびに天然Hib PRPをNHSエステル活性化マイクロアレイスライドに印刷した。Alhydrogelでアジュvant添加されたコンジュゲート94及びアジュvantなしのコンジュゲート94で免疫した後、Hib PRP誘導体19、24、29、53及び62、ならびにすべての免疫化ウサギにおける天然のHib PRP多糖類に対するIgG及びIgMのサブタイプの抗体を検出した。 20

【0617】

グリカンアレイスクリーニングはまた、ヒト参照血清（図17A）及びウサギタイピング血清（図17B）中に存在する抗Hib抗体がHib PRP誘導体19、24、29、53及び62に結合することを示した。天然のHib PRPが存在することで、Hib PRP誘導体19、24、29及び62の結合が阻害されるが、2' - デオキシリボシルリビトールホスフェート53の結合は阻害しない。 30

【0618】

血清IgG抗体は、Alhydrogelをアジュvant化したコンジュゲート94での最初の免疫化の21日後、及びアジュvant化していないコンジュゲート94での最初の免疫化の35日後に、検出可能であった。天然のHib PRP多糖類と交差反応する抗体は、これらの抗体がヘモフィルス属インフルエンザ菌に結合し、ヘモフィルス属インフルエンザ菌感染に対する防御を付与する可能性を示している。

J.ELISAでの研究の例

- ELISAプレート（高結合、EIA/RIAプレート、96ウェル、平底、低蒸発蓋付き、会社名：costar（登録商標）3361）
- 市販のウサギ抗Hib - PRP IgG ELISAアセンブリキット（Alpha Diagnostic International, Inc. #980-130-PRG；ロット：170531K5、有効期限：2018年6月） 40
- 抗原：ヘモフィルス属インフルエンザ菌b由来のホスホリボシルホスフェート（PRP）莢膜多糖類（NIBSC、コード：12/306）
- 試験血清：Biogenesis GmbHにより供給された。
- 検出抗体：ヤギ抗ウサギIgGペルオキシダーゼコンジュゲート（Sigma、#A4914）。
- リン酸緩衝生理食塩水（PBS）：自社製（Biochrom GmbH、カタログ番号：L182-10）
- プロッキング液：PBS中1% FCS (v/v)。 50

- ・抗体希釈液：P B S + 1 % B S A (w / v)。
 - ・洗浄緩衝液：P B S + 0 . 1 % T w e e n 2 0 (P B S - T)
 - ・現像液：1工程(商標) Ultra T M B - E L I S A d e v e l o p e r 。 (T h e r m o S c i e n t i f i c 、 カタログ番号：3 4 0 2 8)
 - ・停止液 - 2 M硫酸(H₂ S O₄) (自社製)
 - ・プレートリーダー：A n t h o s h t 2
- ソフトウェア：吸光度測定用のW i n R e a d 2 . 3 6 及びデータプロット及び分析用のG r a p h P a d P r i s m 7 。

実施例 J - 1 . 免疫化スケジュールと血清採取

免疫実験はすべてB i o G e n e s G m b H B e r l i nで実施した。実験群は、
i) A l h y d r o g e lを含むP B S (陰性対照)、ii) A l h y d r o g e lを含まない化合物94、iii) A l h y d r o g e lを含む化合物94、及びiv) 市販のワクチンH i b e r i X (登録商標) (陽性対照)を含んだ。手短に言えば、ウサギ(n = 4)を、表1に記載されているように、それぞれの実験群のための構築物を用いてプライムブーストレジメンで免疫した。プライムブーストレジメンに従ってマウスを免疫し、0日目(免疫前)、14日目、21日目、及び35日目に血清を収集した。

【 0 6 1 9 】

【表2】

表2. ウサギの免疫化スケジュールと抗原用量の情報 (n = 4)

群	ウサギ	抗原量 [μ g/用量]	Alhydrogel の量[mg/用量]	賦形剤	免疫化スケジ ュール[日数]	血清の収 集[日]
94	4	0.5	0	1X PBS pH7.4	d0、d14、d28	d0、d14、 d21、d28、 d35
Alhydrogel を含む94	4	0.5	0.32	1X PBS pH7.4	d0、d14、d28	d0、d14、 d21、d28、 d35
Alhydrogel を含むPBS	4	0	0.32	1X PBS pH7.4	d0、d14、d28	d0、d14、 d21、d28、 d35
HiBeriX(登 録商標)	4	5	-		d0、d14、d28	d0、d14、 d21、d28、 d35

【 0 6 2 0 】

血清の収集と取り扱い

異なる実験群から得た血清及びそれぞれの時点から得た血清は - 2 0 で保存した。特定の実験群の個々のウサギからの血清(2 0 μ l)をプールして、- 2 0 で保存した。個々のウサギ血清(2 0 μ l)を別々のストックとして等分し、さらなる使用まで - 2 0 で保存した。

実施例 J - 2 . 自家抗原被覆プレートを用いた血清の酵素結合免疫吸着法 (E L I S A) 抗原によるプレートのコーティング

抗原、H i b P R P 荚膜多糖類(ストック濃度1 m g / m L)をp H 7 . 4 のP B S 中で作用抗原濃度1 0 μ g / m L に希釈した。1 0 0 μ Lを各ウェルに添加し(1 μ g 抗原 / ウェル)、4 で一晩インキュベートした。

洗浄：

10

20

30

40

50

抗原を一晩吸着させた後、プレートをP B S - T (2 0 0 μ L / ウェル) で 3 回洗浄し、プレートを反転させて清潔な乾いたティッシュタオルで軽くたたくことにより、各ウェルの過剰な流体を除去した。

プロッキング：

プレートを 3 0 0 μ L のプロッキング溶液 (P B S + 1 % F C S) を用いて室温で 2 時間プロッキングした。

洗浄：

プロッキング後、プレートをP B S - T (2 0 0 μ L / ウェル) で 3 回洗浄し、プレートを反転させて清潔な乾いたティッシュタオルで軽くたたくことにより、各ウェルの過剰な流体を除去した。

10

【 0 6 2 1 】

血清とインキュベーションの希釈：

異なる実験群のプールされた (n = 4 ウサギ / 群) 免疫前血清及び試験血清、及び個々のウサギの試験血清 (n = 4) を、抗体希釈剤 (P B S + 1 % B S A) 中で、それらの個々の希釈度に希釈した。異なる実験群の 1 0 0 μ L の希釈血清試料 (1 0 0 個を対応するウェルに 2 連で加え、 2 5 0 r p m に設定した振とう機で、室温で 1 時間インキュベートした。 1 0 0 μ L / ウェルの抗体希釈剤 (P B S + 1 % B S A) が実験用ブランクを形成した。血清とインキュベートした後プレートをP B S - T (2 0 0 μ L / ウェル) で 5 回洗浄し、プレートを反転させて清潔な乾いたティッシュタオルで軽くたたくことにより、各ウェルの過剰な流体を除去した。

20

インキュベーション (検出抗体) :

検出抗体、ヤギ抗ウサギ Ig G ペルオキシダーゼを抗体希釈剤 (P B S + 1 % B S A) 中で 1 : 1 0 , 0 0 0 に希釈し、 1 0 0 μ L をウェルに添加し、室温で 2 5 0 r p m で 1 時間、振とう機でインキュベートした。検出抗体と共にインキュベートした後、プレートをP B S - T (2 0 0 μ L / ウェル) で 5 回洗浄し、プレートを反転させて清潔な乾いたティッシュタオルで軽くたたくことによって、各ウェルの過剰な流体を除去した。

現像：

各ウェルに、 1 0 0 μ L のすぐに使える T M B 基質 (4 の室温の形態に標準化されたもの) を加え、 1 5 分間暗所でインキュベートした。酵素反応の青色は、 1 0 0 μ L / ウェルの 2 M の H₂ S O₄ 溶液を添加することによって停止され、黄色の溶液が得られた。黄色の溶液の吸収を、プレートリーダーを使用して 6 3 0 n m の補正波長で 4 5 0 n m で測定した。 G r a p h p a d P r i s m ソフトウェアを使用してグラフをプロットすることによって、吸収値を分析した。

30

結果：

図 1 8 A に見られるように、全希釈にわたる全実験群の免疫前血清は、有意な応答を示さず、示度は 0 に等しかった。免疫後 / 試験血清において、 1 4 日目の H i b e r i X 群 (逆三角) は、 2 1 日目及び - 3 5 日目の群に 1 : 2 5 0 0 の力値まで増加した P B S 対照群 (黒丸) よりもかなり高い免疫応答を示した (図 1 8 B ~ D) 。アジュバント化化合物 9 4 で免疫した実験群 (三角) では、抗体力値は、 1 4 日目の P B S 群のものより低かった。それは、 1 : 2 5 0 0 0 の力値で H i b e r i X 群のものまで実質的に増加したが、 1 倍低かった。非アジュバント化化合物 9 4 (四角) で免疫した実験群は 1 4 日目に H i b e r i X 群に匹敵する免疫力値を示したが、アジュバント化群が追加免疫応答を示した 2 1 日目の時点で追加免疫応答は認められなかった。しかし、 2 回目の追加免疫の後、非アジュバント化化合物 9 4 は、アジュバント化群に匹敵するが、 H i b e r i x 群のそれよりも低い免疫力値を示した。

40

実施例 J - 3 . 市販の A D i プレートを用いた血清の酵素結合免疫吸着法 (E L I S A)

ウサギ抗 H i b - P R P Ig G E L I S A キット (A D i) は、ワクチン接種動物の血清中の H i b - P R P 特異的 Ig G 抗体を検出する。キットは、洗浄緩衝液及び過酸化物コンジュゲート検出抗体を供給され、抗原 H i b - P R P 多糖類でプレコートした 9 6 ウェルマイクロタイプレートを含んでいる。このキットには、一連のキャリブレー

50

タ（0.5、1.0、2.5、及び5.0 U / mL）と陽性対照 / 参照血清も含まれている。キャリブレータは、内部アッセイパラメータの制御をし、1:50以上の血清希釈度において偽陽性を区別する。0.5 U / mL 値は、最低検出可能力値になり、それ未満では試験値が偽陽性である可能性がある。製造業者からの指示に従って通常のELISAフォーマットでアッセイを実施した。簡単に説明すると、試験する血清を、キットに含まれる希釈剤中で、1:100以上の適切な希釈範囲に希釈した。キャリブレーター、陽性対照及び陰性対照と共に100 μLの希釈血清を所定のウェルに添加し、室温で1時間インキュベートした。次いでウェルをキット洗浄緩衝液で4回洗浄し、100 μLの検出抗体を添加し、さらに30分間インキュベートし、続いて5回洗浄した。100 μLのTMB基質を加え、15分間インキュベートし、続いて100 μLの停止溶液を用いて反応を停止させることによってウェルを現像し、黄色の溶液を得た。黄色の溶液の吸収は、マイクロプレートリーダーを使用して630 nmの補正波長で450 nmで測定した。Graph pad Prismソフトウェアを使用してグラフをプロットすることによって、吸収値を分析した。

結果：

Hib - PRP多糖類（抗原）は、ELISAにおいて抗原の検出が低下する可能性があるpHの差及び他の物理化学的要因のために、加水分解に対して非常に反応しやすい。図18B～図18Dで認められた免疫力値を裏付けるために、抗原の自家でのコーティングに起因する異常を排除するために、Hib - PRP多糖類で予めコーティングした市販の診断プレート（Advanced Diagnostics-adi）で、ウサギの血清をスクリーニングした。実施例J-2に記載のように、異なる実験群及び時点から得たウサギの免疫血清を5倍希釈し（1:100、500、2500、及び12500）、多糖類特異的IgG抗体について分析した。図19Aに見られるように、全希釈にわたる全実験群の免疫前血清は有意な応答を示さず、示度は閾値未満であった。閾値は、同じプレートで実行された0.5 U / mLキャリブレータについて得られた吸収値を示し、それ未満の値は陰性又は偽陽性として割り当てることができる。

【0622】

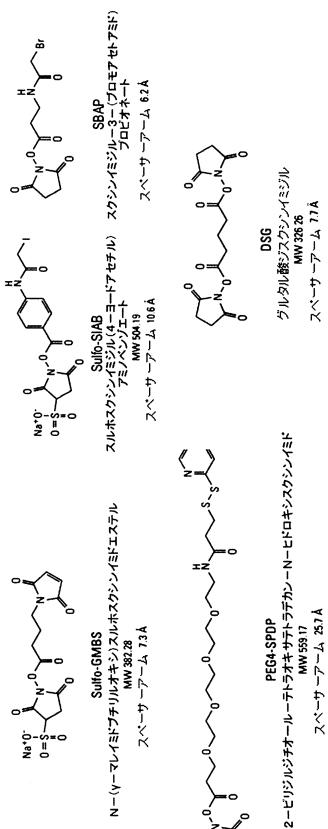
免疫後 / 試験血清において、14日目のHibériX群（逆三角形）、Alhydrogelを含む（三角）及び含まない（四角）化合物94は、1:100の最高希釈でさえも閾値より低い免疫力値を示した（図19B）。しかし、PBS対照群（黒丸）は、14日目の時点でのみ1:100の最高希釈で閾値より高いシグナルを示したが、21日目と35日目の他のすべての時点で閾値よりも低かった。これは、自家でコーティングした抗原プレートにおいて認められたのと同様の傾向であった（図18B～D）。21日目及び35日目の時点におけるアジュvant化化合物94（三角）及びHibériX群（逆三角）は、それぞれ1:500及び1:2500の希釈まで飽和を示した。力値が21日目の時点での1:2500から35日目の時点での1:12500まで顕著に増加するので、アジュvant及び追加免疫応答の効果は、Alhydrogel群を有する化合物94において明らかに見られた。明らかに35日目に、アジュvant化化合物94で免疫した群はHibériXに対して同等の応答を示したが、1倍低かった。しかし、非アジュvant化化合物94で免疫した群では、21日目まで検出可能なIgG力値はなかったが、2回目の追加免疫後に1:2500まで顕著に増加した。この傾向は、自家の抗原コートプレートを使用して実施されたELISAにおいて認められたものと同様であった（図18C、D）。

【0623】

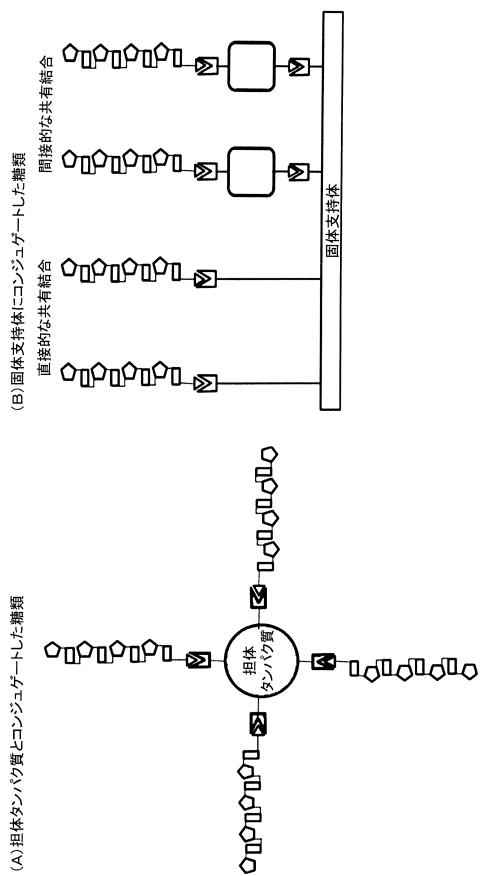
これらのデータはコンジュゲート94の免疫原性を実証している。アイソタイプ転換は、T細胞依存性の抗体応答を示している。血清IgG抗体は、Alhydrogelをアジュvant化したコンジュゲート94で最初に免疫化した21日後、及びアジュvant化していないコンジュゲート94での最初の免疫化の35日後に、検出可能であった。天然のHib PRP多糖類と交差反応する抗体は、それらの抗体がヘモフィルス属インフルエンザ菌に結合し、ヘモフィルス属インフルエンザ菌感染に対する防御を付与する可能性

を示している。

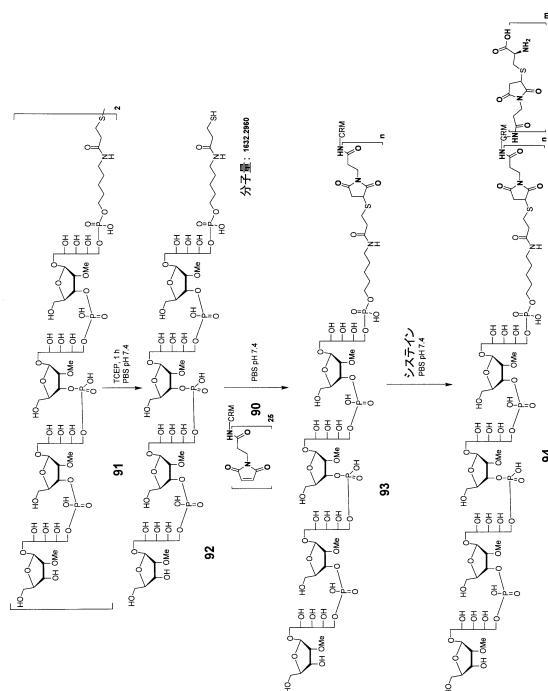
【図1】



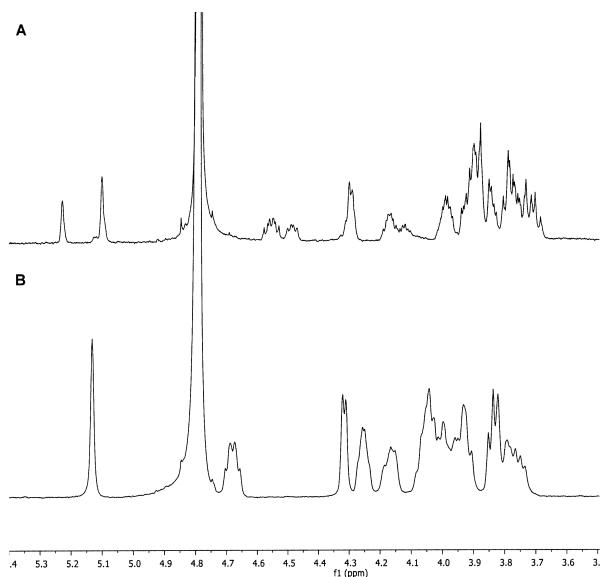
【図2】



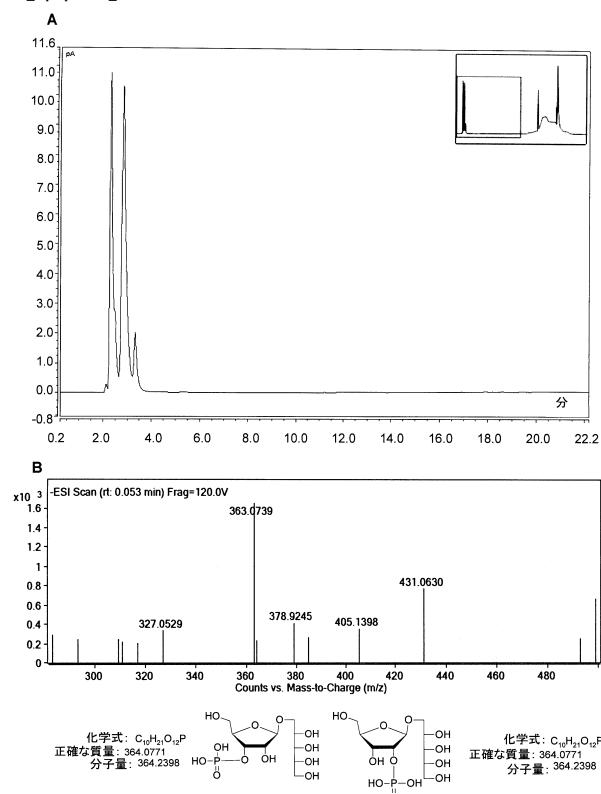
【図3】



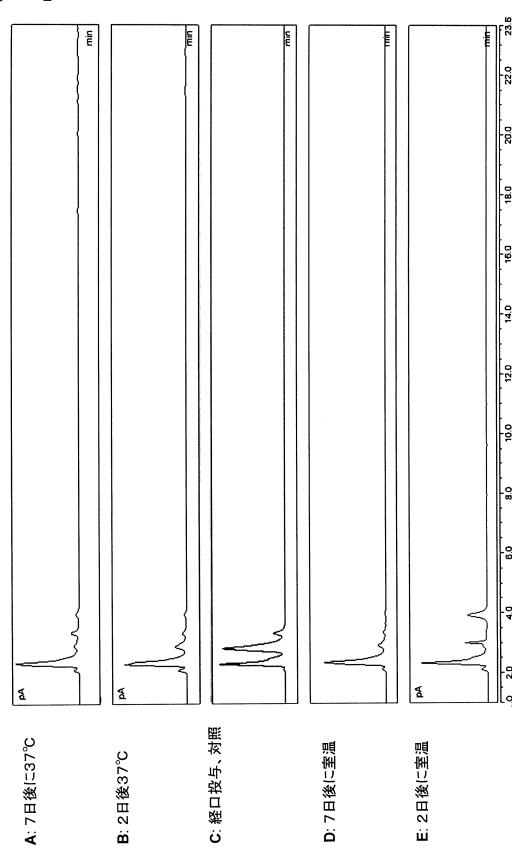
【図4】



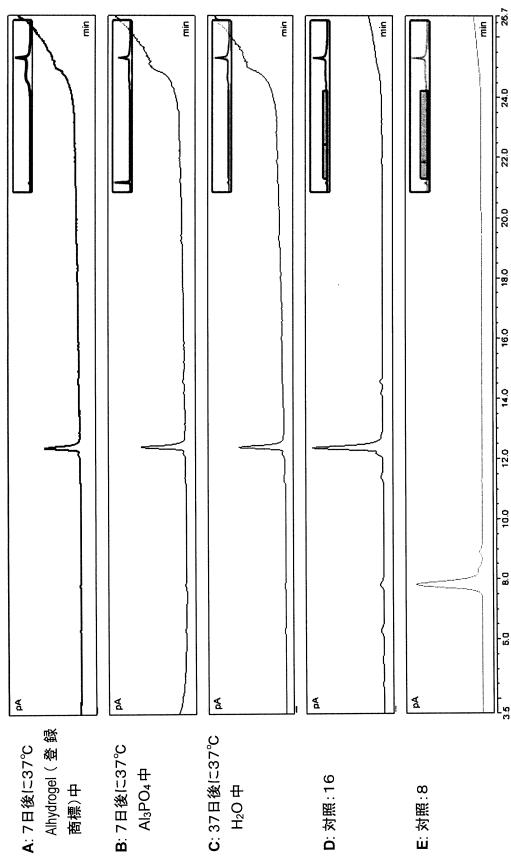
【図5】



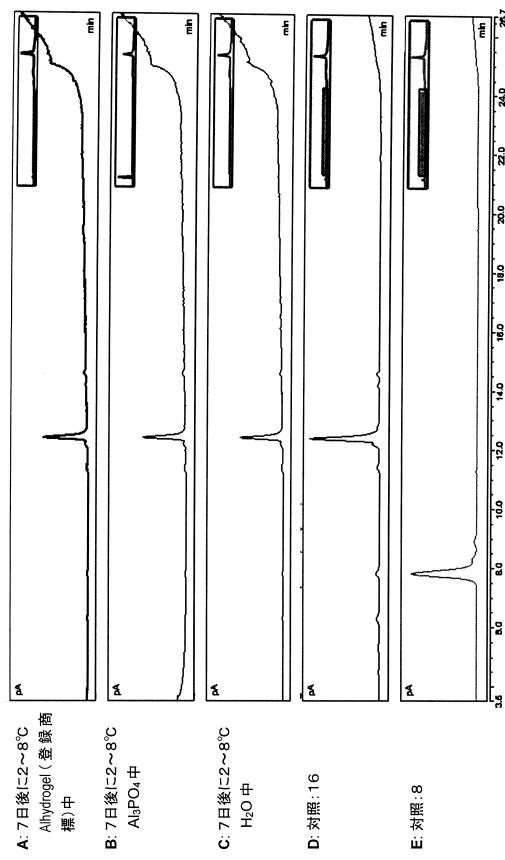
【図6】



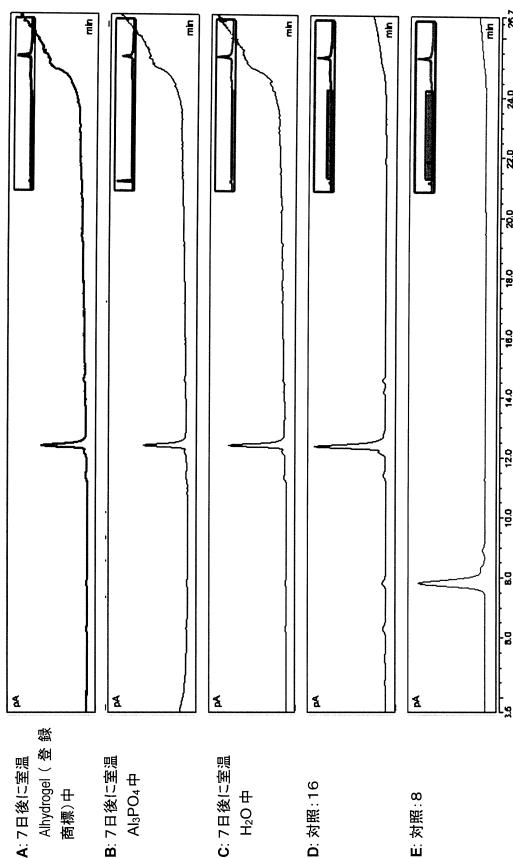
【図7】



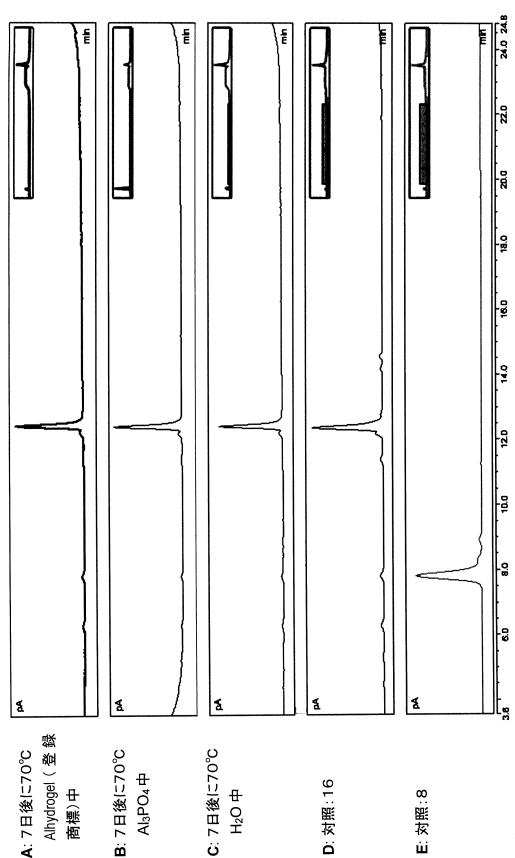
【図8】



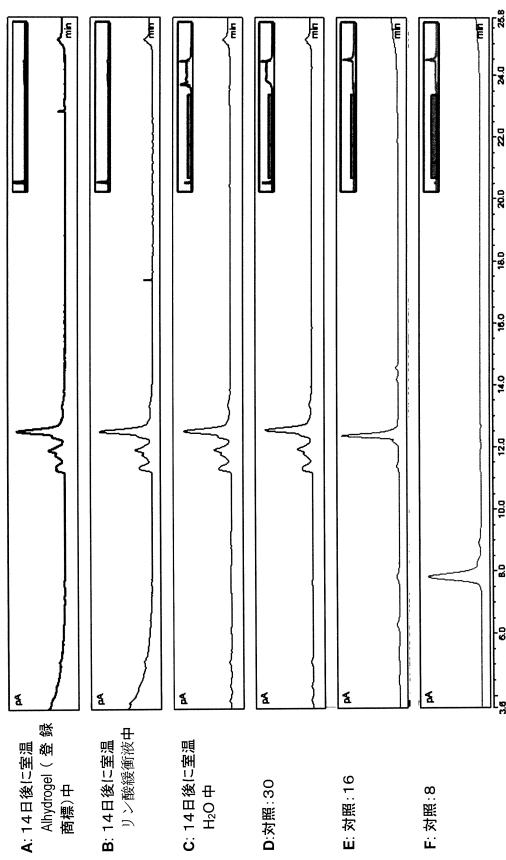
【図9】



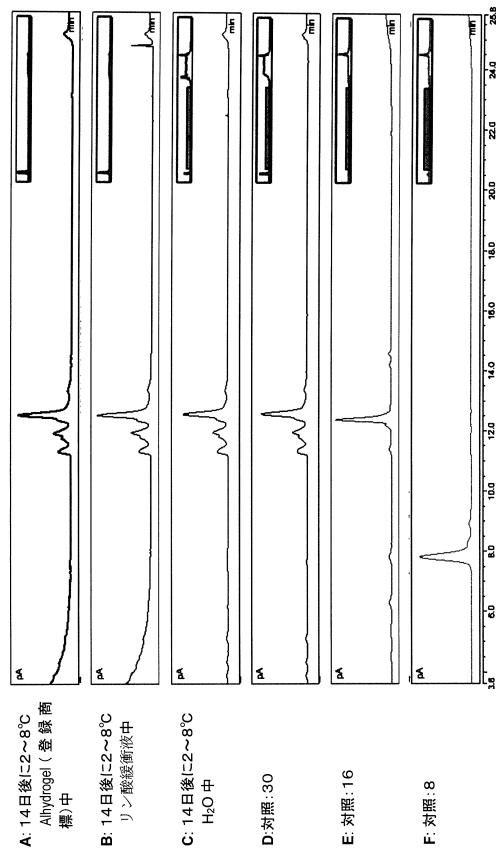
【図10】



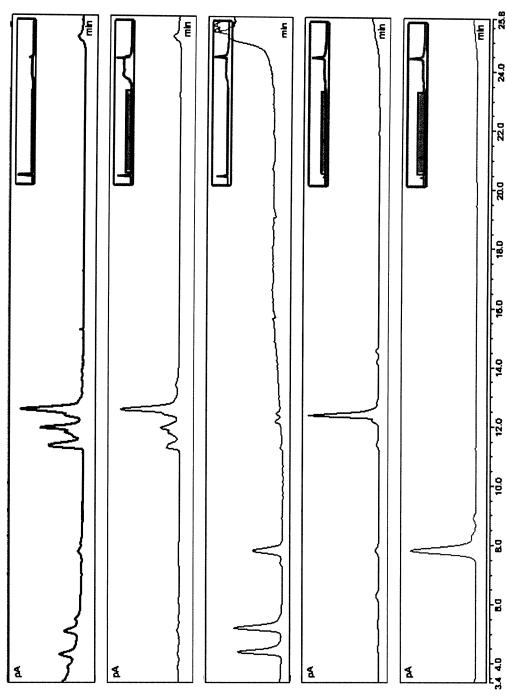
【図 1 1】



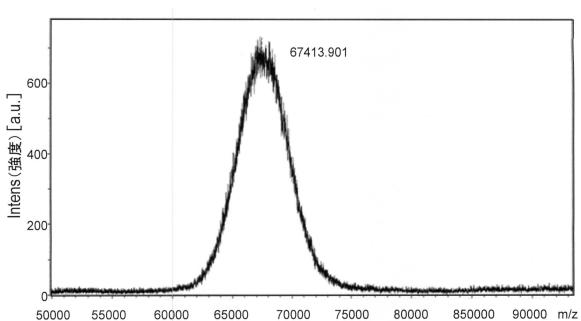
【図 1 2】



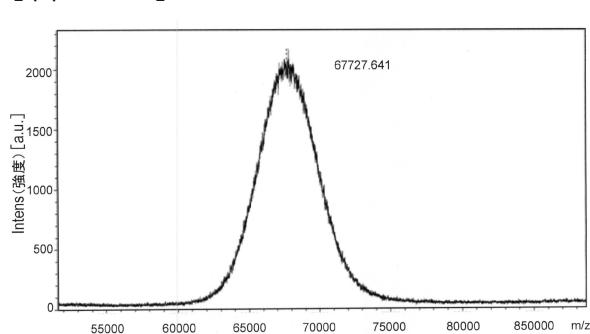
【図 1 3】



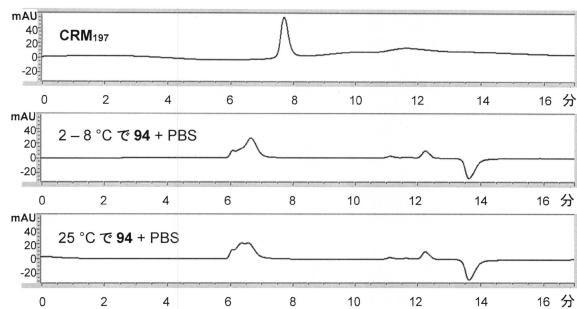
【図 1 4 A】



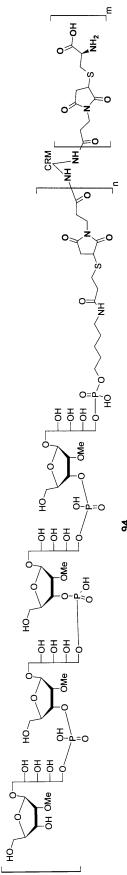
【図 1 4 B】



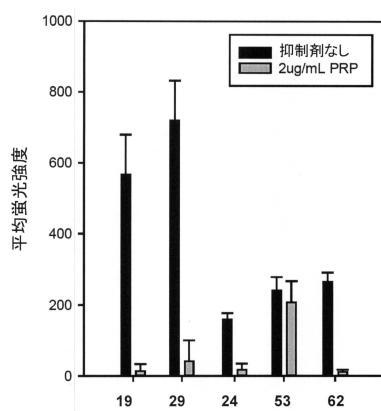
【図15】



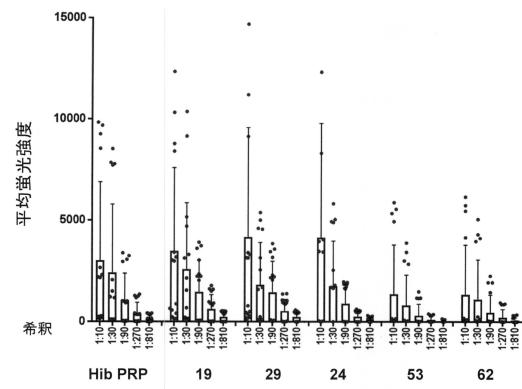
【図16】



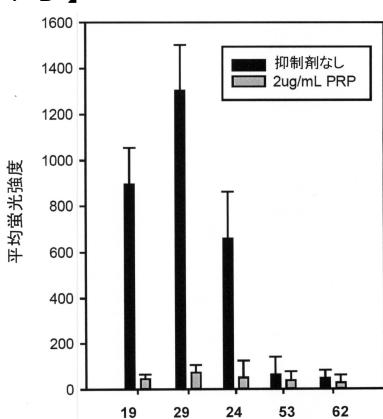
【図17A】



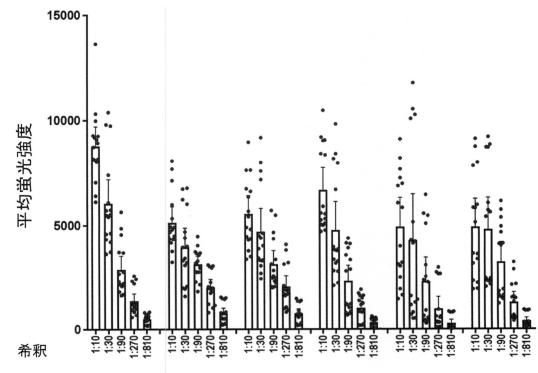
【図17C】



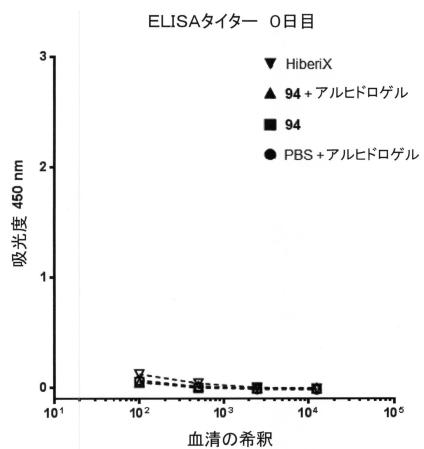
【図17B】



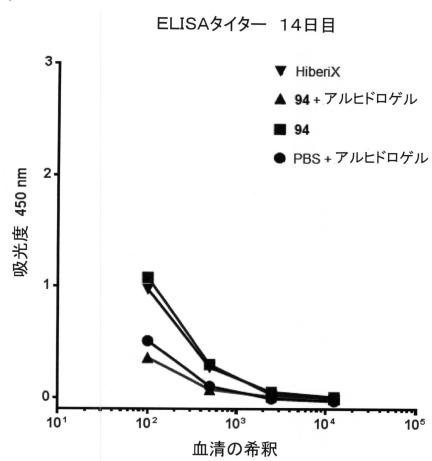
【図17D】



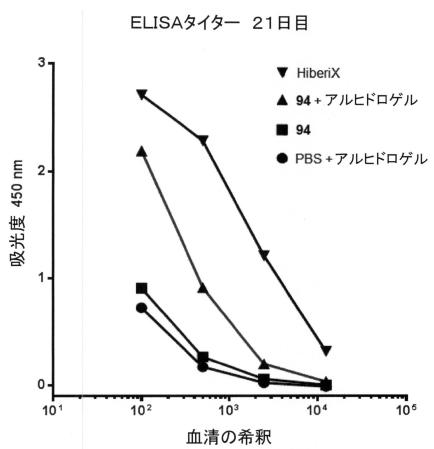
【図 18 A】



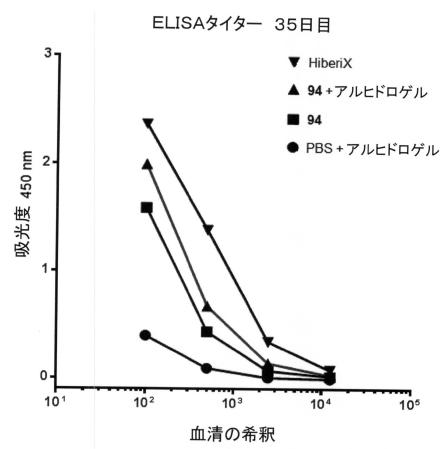
【図 18 B】



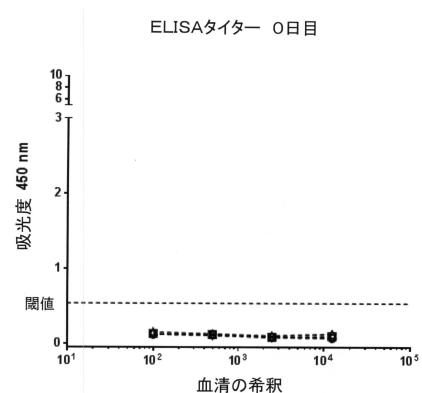
【図 18 C】



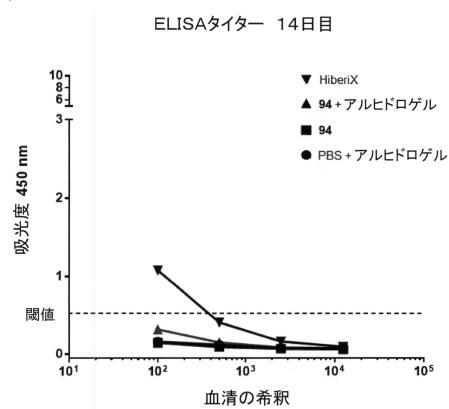
【図 18 D】



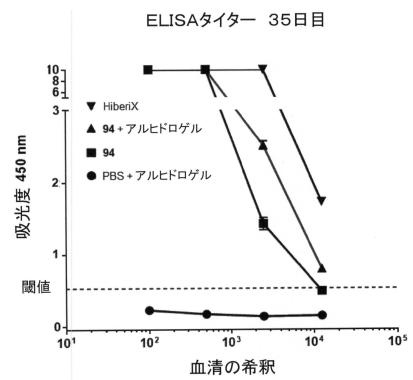
【図 19 A】



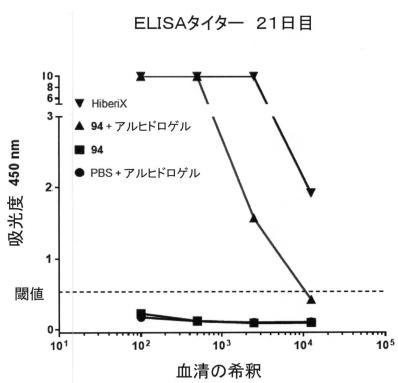
【図19B】



【図19D】



【図19C】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P	1/02	(2006.01)
A 6 1 K	39/102	(2006.01)
A 6 1 K	39/39	(2006.01)
A 6 1 P	37/04	(2006.01)
		A 6 1 P 1/02
		A 6 1 K 39/102
		A 6 1 K 39/39
		A 6 1 P 37/04

審査官 東 裕子

(56)参考文献 國際公開第2016/044164 (WO, A1)

VEREZ-BENCOMO, V., SCIENCE, 2004年 7月23日, 305, 522-525
GILL DAVINDER, HARALE KISHORE, ET AL, SYNTHESIS OF HAEMOPHILUS INFLUENZAE TYPE B (HIB)
) SACCHARIDES, インド特許公報, IN, 2015年 4月10日, IN 2989DE2013 A
FRASER B A, MASS-SPECTRAL STUDIES OF ISOMETRIC D-RIBOFURANOSYL RIBITOL DISACCHARIDES FR
OM THE CAPSULAR 以下備考, CARBOHYDRATE RESEARCH, 英国, PERGAMON, 1979年 8月, VOL
:73, NR:1, PAGE(S):59 - 65, POLYSACCHARIDES OF HAEMOPHILUS INFLUENZAE TYPE B AND ESCHE
RICHIA COLI K 100, U R L, [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)85474-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(00)85474-9)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 07 H
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)