

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6524218号
(P6524218)

(45) 発行日 令和1年6月5日(2019.6.5)

(24) 登録日 令和1年5月10日(2019.5.10)

(51) Int.Cl.

F 1

C07H 15/04 (2006.01)
 A61K 31/7028 (2006.01)
 A61K 31/715 (2006.01)
 A61P 37/04 (2006.01)
 A61P 31/04 (2006.01)

C07H 15/04
 A61K 31/7028
 A61K 31/715
 A61P 37/04
 A61P 31/04

C S P E

請求項の数 15 (全 133 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-516323 (P2017-516323)
 (86) (22) 出願日 平成27年9月28日 (2015.9.28)
 (65) 公表番号 特表2017-532321 (P2017-532321A)
 (43) 公表日 平成29年11月2日 (2017.11.2)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2015/072294
 (87) 國際公開番号 WO2016/046420
 (87) 國際公開日 平成28年3月31日 (2016.3.31)
 審査請求日 平成29年10月23日 (2017.10.23)
 (31) 優先権主張番号 14186597.2
 (32) 優先日 平成26年9月26日 (2014.9.26)
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 15163290.8
 (32) 優先日 平成27年4月10日 (2015.4.10)
 (33) 優先権主張国 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
 ウアー 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 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 ジーバーガー ペーター
 ドイツ国 14532 クラインマハノー
 ルドルフーブライトシャイト-シュトラ
 ーゼ 46
 (72) 発明者 ペレイラ クレイニー レベウ
 ドイツ国 12203 ベルリン ホルテ
 ンジエンシュトラーゼ 66
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】肺炎連鎖球菌血清型8に対するワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

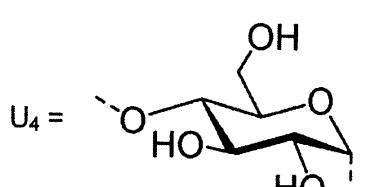
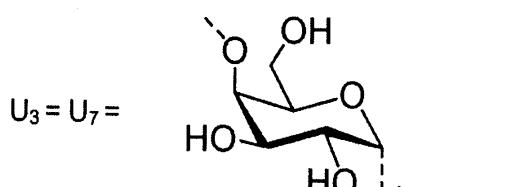
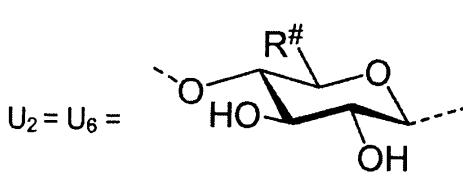
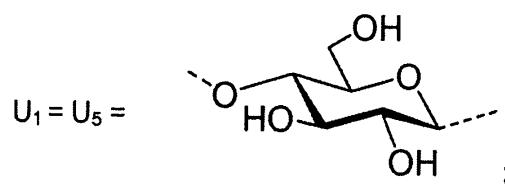
一般式(I)に示される糖類であって、

V^{*} - U_{x+3} - U_{x+2} - U_{x+1} - U_x - O - L - NH₂ (I)

この式において

xは1, 2, 3及び4から選択される整数であり

【化1】



10

20

V^* - は、H - 、H - U_x - 、あるいはH - U_{x+1} - U_x - を示し、
 R # は、- COOH、あるいは- CH₂OHを示し、
 Lは、- (CH₂)_L。- を示し、oは1から10までの間の整数である、
 糖類、あるいは薬学的に許容されるその塩。

【請求項2】

R # は、- COOHを示している、請求項1記載の糖類。

【請求項3】

V^* - は、H - U_{x+1} - U_x - を示している、請求項1または2記載の糖類。

【請求項4】

V^* - は、H - U_x - を示している、請求項1または2記載の糖類。

【請求項5】

V^* - は、H - を示している、請求項1または2記載の糖類。

【請求項6】

xは、3を示している、請求項1から5いずれか1項に記載の糖類。

【請求項7】

以下で構成される群から選ばれる請求項1記載の糖類：

- D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) -
 - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 1) 10
 - (2 - アミノ)エタノール (1 0)
 - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4)
) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 1)
 - (2 - アミノ)エタノール (1 8)
 5 - アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - - D -
 グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラ
 クトピラノシド (1 9)
 5 - アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラ
 ノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノ
 シド (6 0)
 5 - アミノ・ペントニル - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコ 30
 ピラノシルウロン酸 - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グ
 ルコピラノシド (2 0)
 5 - アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピ
 ラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - - D - グル
 コピラノシド (2 1)
 5 - アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラ
 ノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノ
 シルウロン酸 (2 2)
 - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシルウロネート - (1
 4) - - D - グルコイラノシル - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - 40
 ガラクトピラノシル - (1 1) - (2 - アミノ)エタノール (5 5)
 - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) -
 - D - グルコピラノシルウロネート - (1 4) - - D - グルコイラノシル - (1 4)
) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 1)
 - (2 - アミノ)エタノール (5 7)
 5 - アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピ
 ラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - - D - グル
 コピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクト
 ピラノシド (6 3)
 5 - アミノ・ペントニル ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル 50

- (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシルウロ
 ン酸 - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド
 (6 4)
 5 - アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシルウロニン酸 - (1 4) - - D - グ
 ルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラク
 トピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシルウロニン酸 - (1 4) - - D -
 グルコピラノシド (6 5)
 5 - アミノ・ペントニル - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコ
 ピラノシルウロニン酸 - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グ
 ルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グル
 コピラノシルウロニン酸 (6 6)
 5 - アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピ
 ラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシルウロニン酸 - (1 4) - - D - グル
 コピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクト
 ピラノシド (6 7)
 5 - アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラ
 ノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノ
 シル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド
 (6 8)
 5 - アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラ
 ノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノ
 シル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド
 (6 9)
 5 - アミノ・ペントニル - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラ
 ノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノ
 シル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシ
 ド (7 0)
 3 - アミノプロピル - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノ
 シルウロニン酸 - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコ
 ピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシド (7 1)
 5 - アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピ
 ラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシルウロニン酸 - (1 4) - - D - グル
 コピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド (7 2)
 3 - アミノプロピル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシ
 ル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル
 ウロニン酸 - (1 4) - - D - グルコピラノシド (7 3)
 5 - アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシルウロニン酸 - (1 4) - - D - グル
 コピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクト
 ピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシルウロニン酸 (7 4)
 4 - アミノブチル - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシ
 ル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル -
 (1 4) - - D - ガラクトピラノシド (7 5)
 6 - アミノ・ヘキサニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピ
 ラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノ
 シル - (1 4) - - D - グルコピラノシド (7 6)
 3 - アミノプロピル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシ
 ル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル
 - (1 4) - - D - グルコピラノシド (7 7)
 5 - アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピ
 ラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラ
 (10)
 20
 30
 40
 50

ノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド (78)
 4 - アミノブチル - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド (79)
 3 - アミノプロピル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド (80)
 6 - アミノ・ヘキサニル - D グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド (81)

10

【請求項 8】

請求項 1 に記載の一般式 (I) の糖類を含む、 - O - L - NH₂ 基の窒素原子を介して免疫原性担体に共有結合されている接合体。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の接合体であって、前記接合体は、一般式 (X) で示され、

[V * - U_{x+3} - U_{x+2} - U_{x+1} - U_x - O - L - NH - W]_m - CRM₁₉₇
 (X)

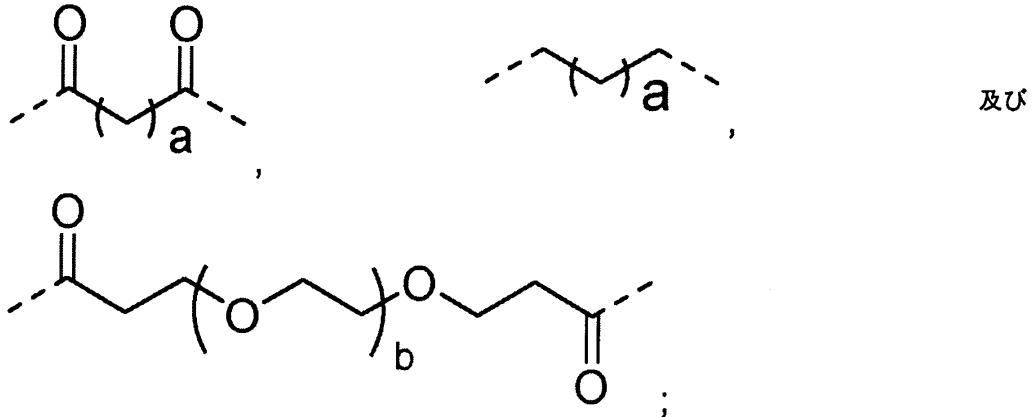
この式において、

m は 2 から 18 までの範囲であり、

- W - は以下から選択され

20

【化 2】



30

a は 1 から 10 の範囲の整数を示し、

b は 1 から 4 までの範囲の整数を示し、及び、

V * 、 U_{x+3} 、 U_{x+2} 、 U_{x+1} 、 U_x 、 x 及び L は、 請求項 8 が引用する請求項 1 に定義されている意味を有する、接合体。

【請求項 10】

40

ヒト及び / 又は動物宿主に防御免疫応答を発生させるために使用する請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の糖類、あるいは請求項 8 または 9 記載の接合体。

【請求項 11】

莢膜多糖類に以下の糖フラグメントの 1 つを含むバクテリアを伴う疾病的予防及び / 又は治療に使用するための請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の糖類、あるいは請求項 8 または 9 記載の接合体：

- D - Glcp - (1 4) - - D - Galp - (1 4) - - D - GlcAp -
 (1 4) - - D - Glcp、
 - D - Glcp - (1 4) - - D - Glcp - (1 4) - - D - Galp - (1 4) - - D - GlcAp、

50

- D - G 1 c A p - (1 4) - - D - G 1 c p - (1 4) - - D - G 1 c p -
 (1 4) - - D - G a 1 p ,
 - D - G a 1 p - (1 4) - - D - G 1 c A p - (1 4) - - D - G 1 c p -
 (1 4) - - D - G 1 c p 。

【請求項 12】

前記バクテリアは肺炎連鎖球菌血清タイプ 8 である、請求項 11 に記載の使用するための糖類あるいは使用するための接合体。

【請求項 13】

前記バクテリアを伴う疾病は、肺炎、髄膜炎、中耳炎、菌血症並びに慢性気管支炎、慢性副鼻腔炎、慢性関節炎、及び慢性結膜炎の急性悪化を含む群から選ばれる、請求項 11 10 に記載の使用するための糖類あるいは使用するための接合体。

【請求項 14】

薬学的に許容されるアジュバント、抗凍結剤、凍結乾燥防止剤、賦形剤及び / 又は希釈剤の少なくとも 1 つと共に使用される、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の糖類あるいは請求項 8 または 9 に記載の接合体を含むワクチン。

【請求項 15】

肺炎連鎖球菌血清タイプ 8 に対する抗体を検出するための免疫学的アッセイのマーカーとして使用するための請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の糖類。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は肺炎連鎖球菌血清型 8 荚膜多糖類に関連した一般式 (I) で示される合成多糖類、その接合体、及びヒトおよび / または動物性宿主内で防御的な免疫応答を発生させるための上記多糖類およびその接合体類の使用に関するものである。さらに、一般式 (I) で示される上記合成多糖類構造は肺炎連鎖球菌に対する抗体検出のための免疫学的アッセイにおけるマーカーとして有用である。

【発明の背景】

【0002】

肺炎連鎖球菌はグラム陽性で、呼吸器系の感染の主要な原因であり重篤な侵入性肺炎球菌疾患 (IPD) を発症させる可能性のある莢膜細菌である。今日までに、90種以上の異なる肺炎血清型が知られている。これらは、それぞれの血清型に特有なその莢膜多糖類 (CPS) の構造によって分類される。従って、CPS に対して起こされる免疫応答は異なる血清型の間に違いがある。このことはウサギにおいて各血清型に対する特殊な抗原を発生させるために用いられている。異なる血清型の CPS の構造的な類似性の故に、これらの特殊な抗体とそれらが意図されて発生させられた他の血清型との間の交差反応性がしばしば観察される。その免疫学的な特性の故に、CPS は肺炎連鎖球菌ワクチンの主成分として用いられる。

【0003】

4つの異なる血清型の CPS を含んだ最初の効果的なワクチンについては 1945 年に最初に記述されている。14 の血清型に対応できるワクチンが導入されるまでにほぼ三十年間かかったが、そのすぐ後に、23 価ワクチンが導入された。しかしながら、これらの多糖類ワクチンはいくつかの欠陥を有していた。それらは、長期間継続する保護を引き出すことが出来なかつたし、最も感染しやすい人口部分、つまり、二歳以下の子ども達と年配の親達に対しては効果がなかった。これらの欠陥は炭水化物の免疫性によるものであり、炭水化物 タンパク質接合体ワクチンの導入によって、その欠陥は克服された。最初の肺炎球菌接合体ワクチンは 7 価 (PCV-7) 及び 10 価 (PCV-10) ワクチンであった。PCV-7 は後日最も最近のワクチン (PCV-13) に取り換えられたが、このワクチンは 13 の異なる血清型の CPS - 糖接合体を含んでいる。

【0004】

現在販売されているワクチンは特定の年齢層の個人に対して、北米とヨーロッパで効果

30

40

50

を発揮している。これらのワクチンの製造工程は複雑で、従って、価格が高価である。従って、これらのワクチンはほとんどの開発途上国では利用することができない。本発明の目的は発展途上地域で最も広く見られる血清型の1つを含んだ一般的に利用可能な合成糖類ワクチンを提供することである。

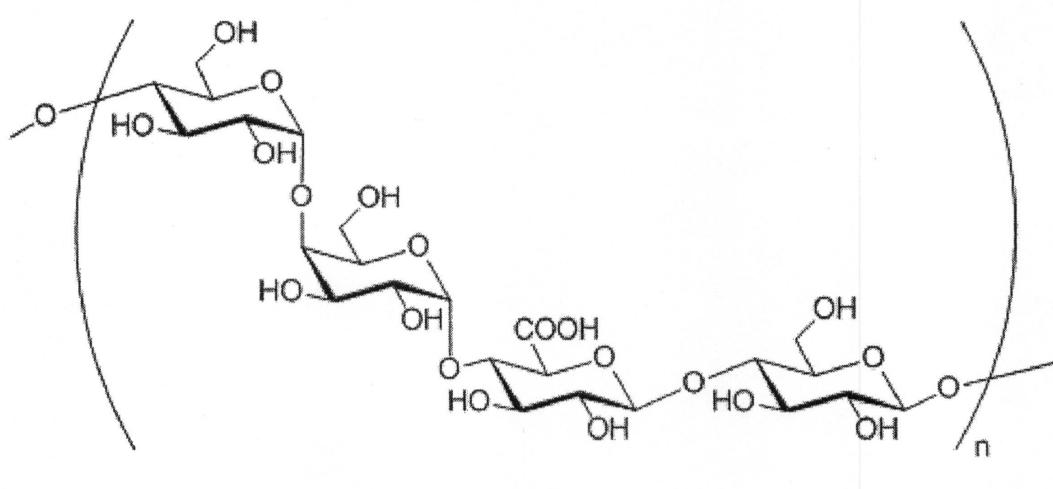
【0005】

肺炎連鎖球菌血清型8は血清型置換との関係性が認められており、ここ数十年間において、侵入性肺炎球菌疾患の症例は徐々に増大した。

肺炎連鎖球菌血清型8は広く見られる肺炎連鎖球菌血清型の1つである。天然のS p 8 (肺炎連鎖球菌血清型8) 荚膜多糖類反復単位の構造は、(4)-Glc-(1-4)-Gal-(1-4)-GlcA-(1-4)-Glc(1)の配列を有する四糖である (J. Am. Chem. Soc. 1957, 79 (11), 2787)。

【0006】

【化1】



10

20

30

【0007】

興味深いことに、天然の血清型8四糖反復単位は血清型3の二糖反復単位を内包している。その結果、血清型3と8との間には交差反応が認められるが、対応する異種多糖類による抗体の沈降反応は不完全である。不完全なエピトープ重複は、両方の血清型からの莢膜多糖類(CPS)が、このワクチンの製造を開始する前の交差反応性に関する広範な考察が行われたにも拘わらず23価多糖類ワクチンに含まれてしまったことがその理由である。

【0008】

WO 96 40225 A1では、EDCを用いて破傷風トキソイドに結合された2から4の反復単位の混合物からなる肺炎連鎖球菌血清型8オリゴ糖タンパク質接合体を提供している。2から4の反復単位の混合体は莢膜多糖類の非選択的切断とそれに続くサイズ排除クロマトグラフィーによって得られる。莢膜多糖類の分解によって得られるオリゴ糖類が、共分離された不純物と、分解中に、あるいは病原体による免疫回避戦術の一部として取り込まれた新しいエピトープのために高度の不均質性を示すことはよく知られている。WO 96 40225 A1の場合、この不均質性は上記の非選択的切断(TFA、100%)によって増大され、2つの反復単位を含むフラクションのために少なくとも4つの糖類の混合体がつくられてしまう。従って、莢膜多糖類から分離されたオリゴ糖類は、宿主免疫系によって「非自己」と認識されてしまう構造的な決定基に従う一連の潜在的な免疫原性の抗原決定基を含んでいるのである。従って、WO 96 40225 A1の接合体などのような単離されたオリゴ糖類の接合体に基づくワクチンを伴う免疫の1つの欠陥は、その一

40

50

部が非防御性（つまり、惹起される抗体が肺炎連鎖球菌血清型8に関連した疾病を防御しない）であるか、あるいは免疫優性であるようなものの中で複数の免疫源性エピトープに向けられる多クローナル免疫応答の発生である。こうした多クローナル免疫応答は、健康な（多くは幼い）人々に予防的に投与されるワクチンにとって受け入れられない毒性につながる。この欠陥は、本発明の純粋な糖によって克服され、この糖は、よく定義された構造を有し、臨床応用に適した純度を示し、そして、バッチ毎の変差を含まない。

【0009】

さらに、WO 96 40225 A1 は1つの反復単位を含むオリゴ糖類の混合体、つまり、四糖類の混合体が免疫源性エピトープを含んでおらず、肺炎連鎖球菌血清型8に対する接合体をつくるために、少なくとも八糖類の混合体が必要であることを示している。驚くべきことに、本発明者らは、ここに述べられているような短糖類でも防御性のグリカン・エピトープを含んでおり、ヒト及び／あるいは動物の宿主内の肺炎連鎖球菌血清型8バクテリアに対する防御的な免疫応答を示すことを見出した。

10

【0010】

従って、本発明の目的は、肺炎連鎖球菌血清型8莢膜多糖類に関する一般式（I）に示される純粋な合成糖類を提供することであり、それは防御的な免疫源性グリカン・エピトープ、即ち肺炎連鎖球菌血清型8が引き起こす疾病を防御する抗体により顕在化し認識されるグリカン・エピトープを含んでいる。連鎖球菌肺炎より限定的には肺炎連鎖球菌血清型8関連した疾患の予防及び／又は措置に有用な接合体とその医薬品組成物を調製するために、上記の糖は、免疫原性担体に接合されるのに適している。さらに、一般式（I）に示されるこの合成糖類は、連鎖球菌肺炎バクテリアに対する抗体を検出するための免疫学的アッセイにおけるマーカーとして有用である。

20

【0011】

本発明の目的は独立請求項に記載されている教示内容によって解決される。さらに、本発明のさらなる好適な特徴、側面、及び詳細事項は本願の独立請求項、明細書、図面、及び実施例から明らかである。

【発明の概要】

【0012】

定義

本明細書で用いられる「リンカー」という用語は、場合によって少なくとも1つの連結分子に結合することによって、免疫原性担体あるいは固体基質と糖の還元性末端単糖を接続させることができるものである。従って、このリンカーの機能は、それ自体あるいは上記接続分子と共に、上記還元性末端単糖と免疫原性担体あるいは固体支持体との間の特定の距離を確立、保持及び／又は架橋することである。より具体的に言うと、上記リンカーの1つの末端は上記還元性末端単糖のアノマー中心で上記環外酸素と結合されているのであり、他方の末端は窒素原子を介して相互接続分子と接続されているか、あるいは、直接に上記免疫原担体あるいは固体支持体と直接に接続されている。

30

【0013】

本明細書で用いられている意味合いでは、上記の「相互接続分子」とは、機能基Xと機能基Yを含んでいる二機能性分子を意味しており、機能基Xは上記リンカーレの末端アミノ基と反応することができ、機能基Yは免疫原性担体上、あるいは固体支持体上に存在している機能性と反応することができる。図1は市販されている相互接続分子の例を示しているが、本発明に従って利用できる相互接続分子を図示されている例に限定するものではない。

40

【0014】

本明細書で用いられている「アジュバント」という用語は免疫学的なアジュバント、例えば、それと抗原的に関連せずにそのワクチン内に含まれている任意の抗原に対する免疫応答を増強することで上記ワクチンの効果を修正あるいは補強するワクチン組成物内で用いられる物質を意味している。当業者のために言うとすれば、従来から認識されているア

50

ジュバントの例としては、以下のものがある。

【0015】

- カルシウム塩及びアルミニウム塩（あるいはそれらの混合物）を含むミネラル含有組成物。カルシウム塩はリン酸カルシウムを含む。アルミニウム塩は水酸化物、リン酸塩、硫酸塩などを含み、いずれの適切な形態をとる塩（例えば、ゲル、結晶、あるいは非結晶性など）も含まれている。これらの塩類に対する吸着が好ましい。ミネラル含有組成物は金属塩の粒子として規定されてもよい。水酸化アルミニウム及びリン酸アルミニウムとして知られているアジュバントも用いることができる。本発明においては、アジュバントとして一般に用いられている「水酸化」あるいは「リン酸」アジュバントのいずれでも用いることができる。「水酸化アルミニウム」として知られているアジュバントは、通常少なくとも部分的に結晶性の典型的なアルミニウム酸水素塩である。「リン酸アルミニウム」として知られているアジュバントは典型的にはアルミニウムヒドロキシホスフェートであり、少量の硫酸塩（例えば、アルミニウム硫酸ヒドロキシホスフェート）を含んでいる場合もしばしばある。それらは沈殿で得ることが出来、沈殿中の反応条件と濃度が上記塩中の水酸基へのリン酸の置換の程度に影響を及ぼす。水酸化アルミニウムとリン酸アルミニウム双方の混合物は、本発明による規定を適用することができる。

【0016】

- 広い範囲の植物種の樹皮、葉、幹、根、さらには花の中にさえ見られるステロールグリコシドとトリテルペルペノイド・グルコシドの異種基であるサポニン類。キラヤ・サボンソウ（シャボンノキ）の樹皮から得られるサポニン類はアジュバントとして広く研究されている。スミラックス・オルナタ（サルサ根）、ジプソフィラ・パニキュラタ（ブライド・ヴェール）、及びサポナリア・オフィシアナリス（かすみ草）からもサポニン類が商業ベースで入手することができる。サポニン・アジュバント製剤は、ISCOMなどの液体製剤とともに、QS21などの純製剤を含む。サポニン組成物はHPLC及びRPC-HPLCを用いて精製してきた。これらの技術を用いた特殊な精製フラクションも確認されており、QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-B及びQH-Cが含まれる。サポニン製剤は、コレステロールなどのステロールを含んでいてもよい。免疫刺激複合体（ISCOM）と呼ばれる特殊な粒子を形成するためにサポニン類とコレステロールの組み合わせを用いることもできる。ISCOMは、通常、ホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルコリンなどのリン脂質を含んでいる。ISCOMにおいては、既知のどのサポニンでも使用することができる。ISCOMはQuila、QHA及びQHCの1種以上を含むことが好ましい。

【0017】

- 生分解性があって非毒性の物質から形成される微粒子（例えば、直径が100nmから150pm、より好ましくは直径が200nmから30pm、あるいは直径が500nmから10pmの範囲のもの）。こうした非毒性で生分解性のある物質には以下のようなものがあるが、必ずしもこれらに限定されない。ポリ（-ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリ無水物、ポリカプロラクトン。

【0018】

- - グリコシルセラミド、フイットスフィンゴシン含有 - グリコシルセラミド、OCH₂、KRN7000[(2S,3S,4R)-1-O-(-D-ガラクトピラノシリル)-2-(N-ヘキサコサノイルアミノ)-1,3,4-オクタデカントリオール]、CRONY-101、3"-スルフォ-ガラクトシリル-セラミドなどのCD1dリガンド。

【0019】

- CpGモチーフ含有のもの（リン酸塩結合でグアノシン残基に結合された非メチル化シトシン残基を含むジヌレオチド配列）、あるいはCp1モチーフ含有のもの（イノシンに結合されたシトシンを含有するジヌクレオチド配列）、あるいは、二本鎖RNA、あるいはパリンドローム配列を含むオリゴヌクレオチド、あるいはポリ(dG)配列を含むオリゴヌクレオチド。免疫刺激性のオリゴヌクレオチドはホスホロチオエート修正物等のヌクレオチド修正物／その類似物などを含んでいてもよく、二本鎖あるいは（RNAを除い

10

20

30

30

40

50

て)一本鎖であってもよい。

【0020】

- TLR4アンタゴニストE5564などのリン酸塩含有非環式構造に結合された脂質を含む化合物。

- (例えば、フロイド・アジュバント)油乳剤。

【0021】

理論的には、一連の免疫事象において特定の状態を有利に働きかせたりそれを増強させたりして、最終的にはより深い免疫応答に導くことができる各分子や物質は、アジュバントとして定義することができる。

【0022】

原則として、ワクチン製剤でアジュバントを用いることで、以下のようなことが可能となる。

- ワクチンに適した、あるいは望ましい免疫応答を指定し、最適化する。

【0023】

- 例えば、ワクチンを口や胃腸や肺上皮及び関連のリンパ系組織などの粘膜表面に接触させるようにするワクチンの粘膜投与を可能にする。

- 細胞媒介免疫応答を促進する。

【0024】

- 高度に純化された、あるいは組み換え抗原などの効力が弱い免疫原の免疫原性を強化する。

- 防御的な免疫を提供するために必要な抗原の量あるいは免疫化の頻度を減らす。そして、

- 新生児や老人や免疫低下状態のワクチン受容者などの免疫応答が低下あるいは弱体化した個人におけるワクチンの効果を増強する。

【0025】

作用の機序についてはあまりよく知られていないが、現在の段階では、アジュバント補強免疫は、以下のメカニズムの1つによって応答すると考えられている。

- 抗原の生物学的あるいは免疫学的半減期を増大させる。

【0026】

- 例えば、APCによる抗原アジュバント複合体が内に取り込まれた後にエンドソーム膜を横切って細胞基質内に取り込まれるようにすることによって、抗原提示細胞(APC)への抗原伝達と、抗原プロセス及び提示を改善させる。

【0027】

- ストレスや損傷を受けた細胞からの危険誘発信号を擬似的に発生させて、免疫応答を開始させる。

- 免疫調整サイトカインの生産を促す。

【0028】

- 免疫系の特定のサブセットの方向に免疫応答の偏向させる。

- 抗原攻撃の急速な拡散を阻止する。

糖類は当業者にはTI-2(T細胞独立-2)抗原及び劣性の免疫源として知られている。従って、糖類に基づいたワクチンを生産するためには、元の糖類と比較してより増強された免疫原性を示す接合体を発生させるために、上記の糖類を免疫原性担体に接合させる。この文脈で、「免疫原性担体」とは、上記の糖類に接合されて、元の糖類と比較してより増強された免疫原性を示す接合体を形成するために、上記の糖類に接合される構造と定義される。従って、その糖類の免疫原性担体への接合は、上記の免疫原性担体に対する免疫応答を起こさずに上記の糖類に対する免疫応答を刺激させるという効果を持っている。

【0029】

驚くべきことに、本発明による一般式(I)で示される1つの純粋な糖は防御的な免疫原性グリカン・エピトープを含んでおり、ヒト及び/又は動物宿主内で、肺炎連鎖球菌血

10

20

30

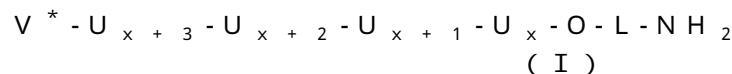
40

50

清型 8 バクテリアに対して防御的な免疫応答を誘発することができる。一般式 (I) で示される上記糖は肺炎連鎖球菌血清型 8 荚膜多糖類と交差反応する抗体を放出し、肺炎連鎖球菌血清型 8 バクテリアを特異的に認識し、食細胞の貪食のためにそれらをオプソニン化する。

【0030】

本発明は一般式 (I) で示される糖類、あるいは薬学的に許容されるその塩を提供する。

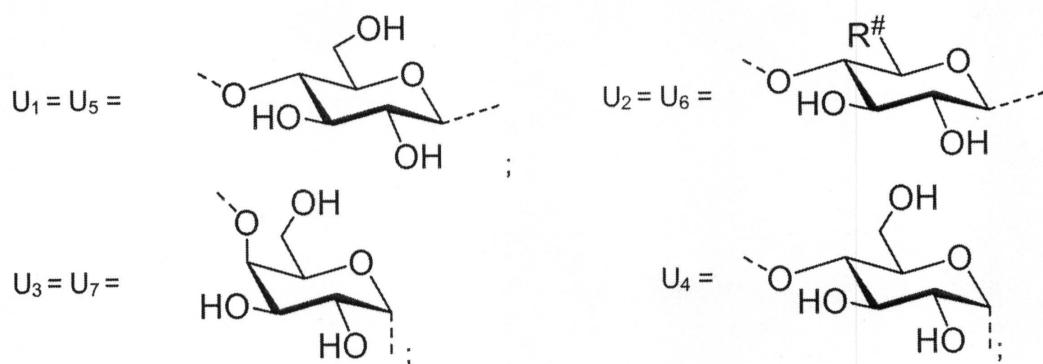


この式では、 x は 1、2、3、及び 4 から選ばれる整数である。

10

【0031】

【化 2】



20

【0032】

これらの式で、

V^* は、 H - 、 H - U_x - あるいは H - U_{x+1} - U_x を示し、

$R^{\#}$ は、 $COOH$ あるいは CH_2OH を示し、

L はリンカーを示している。

30

【0033】

- L - はリンカーであり、フラグメント - $O - L - NH_2$ の部分として定義される。従って、このリンカー - L - は酸素原子及び NH_2 の窒素原子と結合している。このリンカーの少なくとも 2 つの炭素原子は上記の酸素原子と NH_2 基との間にあって、- $O - C - C - NH_2$ のようになっているのが好ましい。このリンカー - L - は脂肪鎖であってよく、この場合、上記の脂肪鎖はオプションとして、その中に挿入された芳香鎖、あるいは 0 - 10 の範囲で増減する多数のヘテロ原子を含んでいてもよい。

【0034】

リンカー L は好ましくは 2 から 40 までの範囲の炭素原子（いずれかの側鎖の炭素原子を含む）、より好ましくは 2 から 30 の範囲、さらに好ましくは 2 から 20 の範囲、さらに好ましくは 2 から 14 の範囲、さらに好ましくは 2 から 12 の範囲、そしてさらに好ましくは 2 から 10 の範囲の炭素原子を含んでいることが好ましい。

40

【0035】

酸素原子（例えば、- $O - L - NH_2$ の酸素）と NH_2 基の間の最短の原子鎖は、好ましくは 2 から 14 の範囲の原子、より好ましくは 2 から 12 の範囲の原子、より好ましくは 2 から 10 の範囲の原子、さらに好ましくは 2 から 8 の範囲の原子で構成されていることが好ましい。その最短の鎖（そのアノマーの中心の酸素と NH_2 基の間で可能な最短の接続）が 2 から 6 の範囲の原子で構成されている場合は、これらの原子が炭素原子であることが好ましい。その最短の鎖が 4 から 8 の範囲の原子で構成されている場合、その鎖は O、N 及び S から選択される 1、2 あるいは 3 個のヘテロ原子を含んでいてもよい。そ

50

の最短の鎖が 9 から 14 個の原子で構成されている場合は、その鎖は、O、N 及び S から選択される 1、2、3、4、5 あるいは 6 個のヘテロ原子を含んでいても差し支えない。

【0036】

リンカー - L - あるいは上記の最短の鎖が完全に、あるいは部分的にフッ素化されていることも好ましい。このリンカー - L - は構成原子数が 3 個か 4 個か 5 個か 6 個の飽和炭素環、構成原子数が 5 個の部分的に不飽和な（そして芳香族でない）炭素環、あるいは構成原子数が 4 個か 5 個か 6 個の飽和酸素ヘテロ環、あるいは、構成原子数が 4 個か 5 個かあるいは 6 個の飽和窒素ヘテロ環あるいは構成原子数が 6 個の芳香族炭素環を含んでいてもよい。

【0037】

10
リンカー - L - はアミド (- NH - CO -、 - CO - NH -) 及び / 又は尿素 (- NH - CO - NH -) 残基を含んでいてもよく、アミドあるいは尿素残基が 1 個であることが好ましい。またこのリンカーは置換基を含んでいてもよく、R¹⁰、R¹¹ などの 2 つの置換基、あるいは R¹⁰、R¹¹、R¹⁵ 及び R¹⁴ などの 4 つの置換基を含んでいてもよく、このことは本明細書で定義されている意味を有し、これらの置換基は - 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 から選択されるのが好ましい。

【0038】

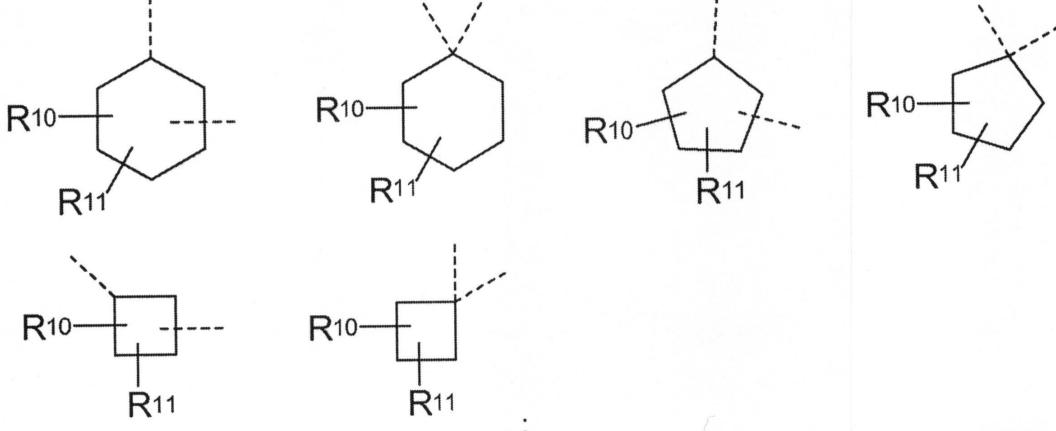
20
リンカー - L - がフッ化物であった場合、2 つ以上の置換基 - F が含まれていることが好ましい。

より好ましくは、リンカー - L - は以下のもの、つまり、 - CH₂ -、 - (CH₂)₂ -、 - (CH₂)₃ -、 - (CH₂)₄ -、 - (CH₂)₅ -、 - (CH₂)₆ -、 - (CH₂)₇ -、 - (CH₂)₈ -、 - (CH₂)₉ -、 - (CH₂)₁₀ -、 - CF₂ -、 - (CF₂)₂ -、 - (CF₂)₃ -、 - (CF₂)₄ -、 - (CF₂)₅ -、 - (CF₂)₆ -、 - (CF₂)₇ -、 - (CF₂)₈ -、 - (CF₂)₉ -、 - (CF₂)₁₀ -、 - (CH₂)₂ - O - (CH₂)₂ -、 - CH₂ - O - (CH₂)₃ -、 - (CH₂)₃ - O - CH₂ -、 - CH₂ - O - (CH₂)₂ -、 - (CH₂)₂ - O - (CH₂)₃ -、 - (CH₂)₄ - O - CH₂ -、 - CH₂ - O - (CH₂)₄ -、 - 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、

この場合、 - L^a - は - (CH₂)₀ -、 - (CF₂)₀ -、 - (CH₂ - CH₂ - O)₀ -、 - C₂H₄ -、 - (CH₂ - CH₂ - O)₀ - CH₂ -、 - (CR¹⁰R¹¹)₀ -、

【0039】

【化3】



10

20

30

40

50

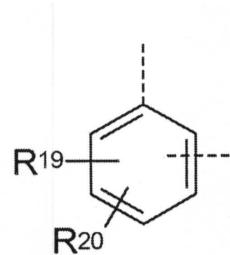
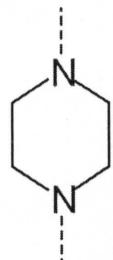
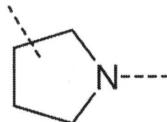
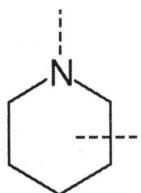
【0040】

から選択される。

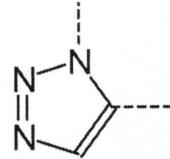
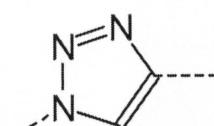
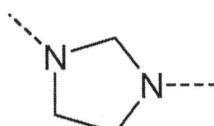
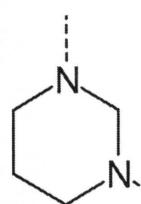
- L^b - 及び - L^c - は、相互に無関係に、 - O - 、 - NH - C (O) - NH - 、 - N H - C (S) - NH - 、 - NH - C (O) - 、 - C (O) - NH - 、 - NH - C (O) - O - 、 - N R⁹ - 、 - N R¹⁸ - 、 - SO₂ - 、

【0041】

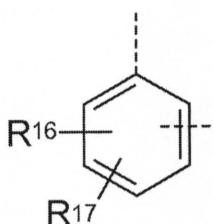
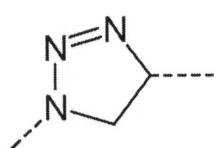
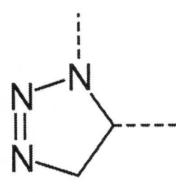
【化4】



10



20



30

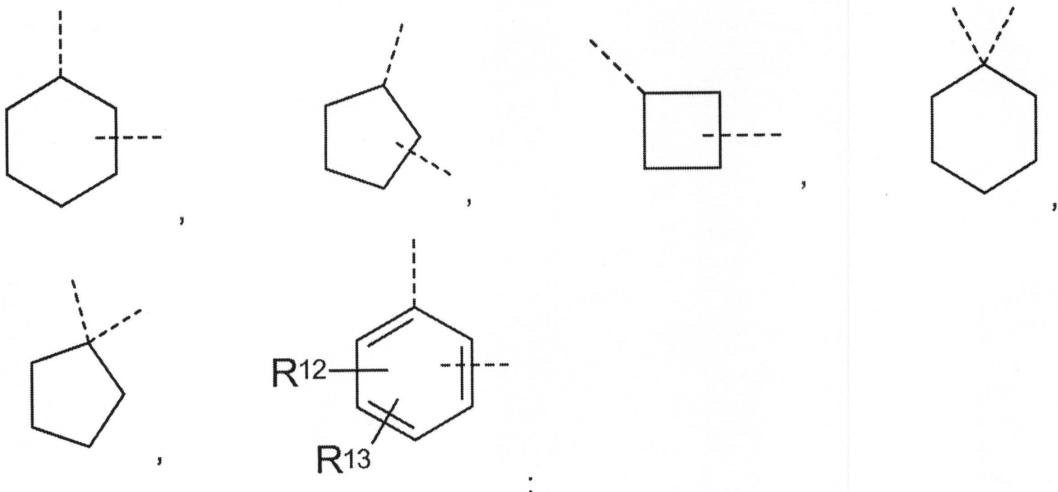
から選択される。

【0042】

- L^d - は、 - (C H₂)_q - 、 - (C F₂)_q - 、 - (C R¹ R² R³)_q - 、 - (C H₂ - C H₂ - O)_q - C₂H₄ - 、 - (C H₂ - C H₂ - O)_q - C H₂ - 、

【0043】

【化5】



10

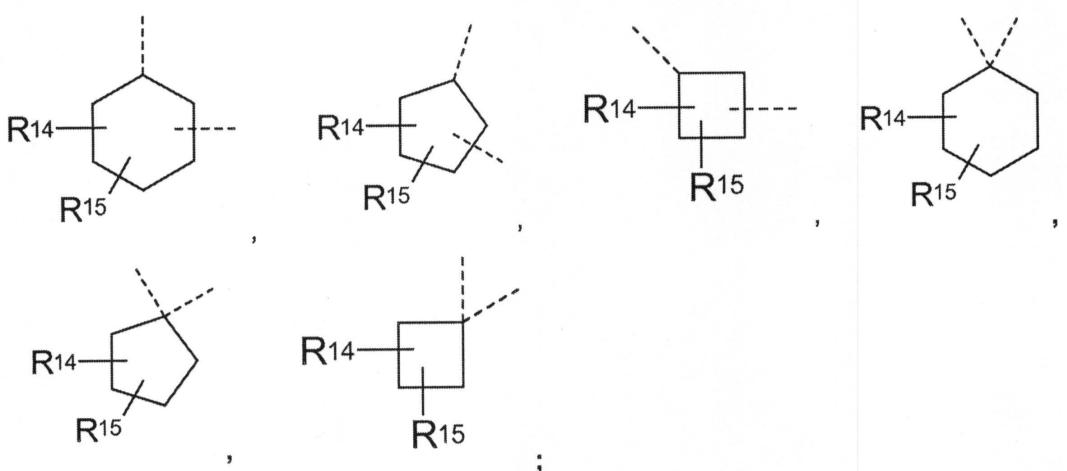
で示される。

【0044】

- L^e - は、 - (C₂H₂)_{p1} - 、 - (CF₂)_{p1} - 、 - C₂H₄ - (O - CH₂ - C₂H₂)_{p1} - 、 - CH₂ - (O - CH₂ - C₂H₂)_{p1} - 、 - (CH₂)_{p1} - O - (CH₂)_{p2} - 、 - (CR¹₄R¹₅)_{p1} - 、 - (CR¹₄R¹₅)_{p1} - O - (CR²₁R²₂)_{p2} -

【0045】

【化6】



30

【0046】

から選択される。

R⁹ と R¹⁻⁸ は相互に無関係に、 - 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 はそれぞれ相互に無関係に - H、 - F、 - Cl、 - CH₃、 - C₂H₅、 - C₃H₇、 - C₅H₉、 - C₆H₁₃、 - OCH₃、 - OC₂H₅、 - CH₂F、 - CH₂Cl、 - CF₃、 - C(O) - NH₂、 - SCH₃、 - SC₂H₅、 - NHCOCH₃、 - N(CH₃)₂ 及び - N(C₂H₅)₂ から選択され、

o、q、p₁ 及び p₂ はそれぞれ相互に無関係に、1、2、3、4、5、6、7、8、9 及び 10 から選択される整数である。

【0047】

40

50

本発明による糖類は塩基性及び/又は酸性の置換基を有しており、それらは有機あるいは無機の酸や塩基と塩を形成している場合もある。

こうした酸付加塩形成のために適切な酸の例としては、塩酸、臭酸、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、蟻酸、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、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、チャイナ酸(china acid)、マンデル酸、o-メチルマンデル酸、ハイドロゲン-ベンゼンスルホン酸、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、及び当業者によく知られているその他の鉱物性あるいはカルボキシル酸がある。その塩はこれらの遊離塩基形態を通常の方法で塩を発生させるのに十分な量の望ましい酸と接触させることで調製される。

【0048】

適切な無機塩基あるいは有機塩基の例は、例えば、NaOH、KOH、NH₄OH、テトラアルキルアンモニウム水酸化物、リシン及びアルギニンなどである。塩は、業界でよく知られた方法を伴う従来の方法、例えば、一般式(I)の化合物の溶液を、上に述べたグループから選択した塩基の溶液で処理することによって調製することができる。

【0049】

一般式(I)の糖類は、-O-O-結合、及び/又はそのアノマーあるいはC-1炭素経由で相互に接続されている、あるいは結合されている糖フラグメント(U_x、U_{x+1}、U_{x+2}、U_{x+3})を含んでいないことは炭水化物化学分野の当業者には明らかである。グリコシド結合の立体化学が上記の一般式の糖フラグメントの立体的な中心を示していることも当業者には周知の事実である。従って、糖フラグメントU₁及びU₅に対するアノマー中心の立体化学はであり、糖フラグメントU₂及びU₆に対してはであり、糖フラグメントU₃及びU₇に対してはであり、糖フラグメントU₄に対してはである。

【0050】

一般式(I)で示される糖類は防御的な免疫原性エピトープを含んでおり、ヒト及び/又は動物宿主内で、肺炎連鎖球菌血清型8に対する防御的な免疫応答を誘発することができる。一般式(I)で示される糖類は抗体を放出し、抗体は肺炎連鎖球菌血清型8莢膜多糖類と交差反応し、肺炎連鎖球菌血清型8を特異的に識別し、食細胞の貪食のためにそれらをオプソニン化する。

【0051】

一般式(I)で示される本発明の化合物は、例えば、WO 96 40225 A1に開示されている分離された糖類の混合物が、必ずしも十分に特徴づけられておらず、分離源にしたがってオリゴ糖類の組成に変化が多く、GMP規制を遵守するのがやっかいであるのに対して、一般式(I)で示される本発明の化合物はGMP規制に合致して簡単に製造できる純粋な合成化合物であるという利点を有している。

【0052】

従って、本発明のワクチンは一般式(I)あるいは以下に開示されている他の一般式(I-a)-(I-c)、(II)、(II-a)-(II-g)、(III)、(III-a)-(III-g)、(IV)、(IV-a)-(IV-g)、(V)、(V-a)-(V-g)、(VI)、(VI-a)-(VI-g)、(VII)、(VII-a)-(VII-g)、(VIII)、(VIII-a)-(VIII-g)あるいはIX-a)-(IX-c)のうちの1つだけ化合物を含むのが最も好ましく、最も好ましいのは化合物10、18-22、55、57、60及び62-89のうちの1つだけが免疫原性担体、好ましくは担体タンパク質、より好ましくはCRM₁₉₇に結合して

10

20

30

40

50

いる形態である。

【0053】

従って、一般式(Ⅰ)あるいは以下に開示されている他の一般式(Ⅰ-a)-(Ⅰ-c)、(ⅠI)、(ⅠI-a)-(ⅠI-g)、(ⅠII)、(ⅠII-a)-(ⅠII-g)、(ⅠV)、(ⅠV-a)-(ⅠV-g)、(V)、(V-a)-(V-c)、(VI)、(VI-a)-(VI-c)、(VII)、(VII-a)-(VII-c)、(VIII)、(VIII-a)-(VIII-c)、(IX)あるいは(IX-a)-(IX-c)によって示される化合物は、よく定義され、よく特徴づけがなされた純粋なワクチンの調製に用いられ、このワクチンはたとえ1つの、人為的に合成され、よく特徴づけがなされた三糖類、四糖類、五糖類、あるいは六糖類のうちの1つだけを含んでいる。これらの糖は、好ましくは免疫原性担体、好ましくは担体タンパク質、さらに好ましくはCRM₁₉₇に結合している。

【0054】

その結果、本発明のワクチンは、一般式(Ⅰ)あるいは以下に開示されている他の一般式(Ⅰ-a)-(Ⅰ-c)、(ⅠI)、(ⅠI-a)-(ⅠI-g)、(ⅠII)、(ⅠII-a)-(ⅠII-g)、(ⅠV)、(ⅠV-a)-(ⅠV-g)、(V)、(V-a)-(V-c)、(VI)、(VI-a)-(VI-c)、(VII)、(VII-a)-(VII-c)、(VIII)、(VIII-a)-(VIII-c)、(IX)あるいは(IX-a)-(IX-c)のうちの1つで示され、免疫原性担体、好ましくは担体タンパク質、もっと好ましくはCRM₁₉₇に結合しているただ1つの人為的に合成された化合物を含んでいる。

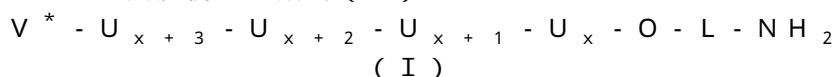
【0055】

こうしたワクチンは分離された（そして合成されたものではない）肺炎連鎖球菌血清型8莢膜多糖類の非選択的な分裂で得られる糖の混合体を含んでいるワクチンと比較して、副作用及び/又は非防御的な免疫応答を起こすことが多い。さらに、この本発明によるワクチンは非選択的な分裂莢膜多糖類の分離された混合体を含んでいるワクチンと比較してGMP規制に合致してより簡単に製造することができ、簡単に特徴づけられるので、不純物の種類と量の検出とともに安定性および純度管理がより容易になる。

【0056】

残基R[#]は-COOHを示すのが好ましい。

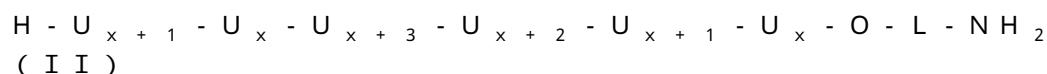
本発明の1つの実施例は一般式(Ⅰ)



の糖類に関し、この式で、V^{*}-はH-U_{x+1}-U_x-を示し、x、L、U_x、U_{x+1}、U_{x+2}、U_{x+3}及びR[#]は、本明細書で定義する意味を有する。

【0057】

このように、本発明の1つの実施形態は、一般式(ⅠI)



で示される六糖類に関し、この式でxは1, 2, 3及び4から選択される整数である。

【0058】

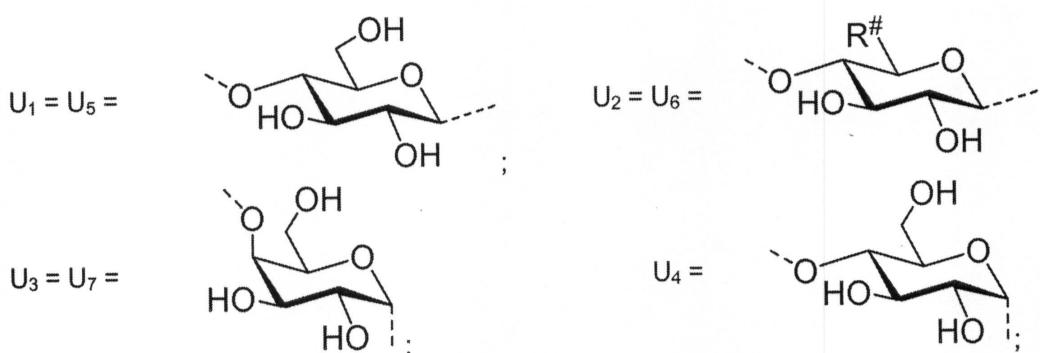
10

20

30

40

【化7】



10

【0059】

R[#] は、-COOH 又は-CH₂OH を示し、

L は、リンカー、あるいは薬学的に許容できるその塩を示す。

さらに好ましいのは一般式 (II) で示される六糖類で、R[#] は-COOH を示す。

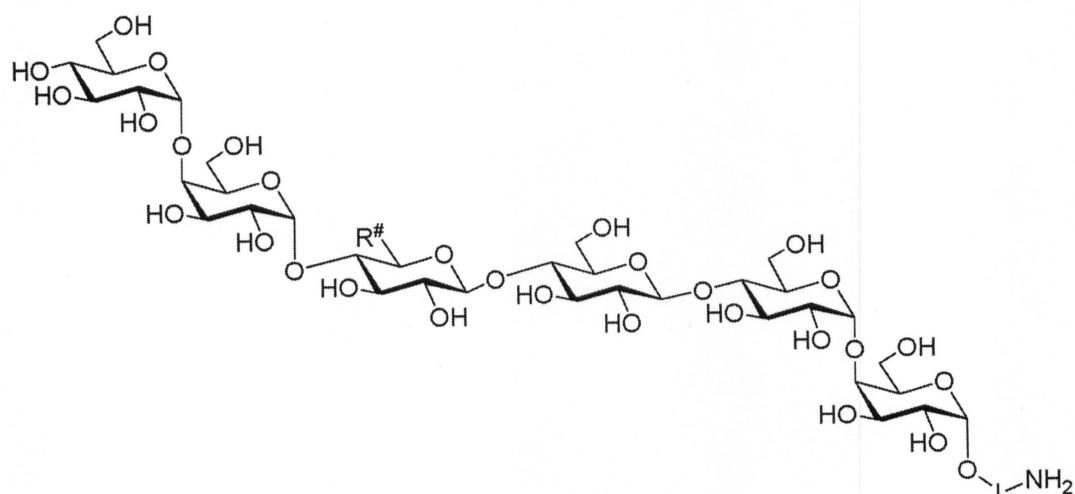
【0060】

従って、一般式 (II-a) の六糖類は以下の構造を有し、この式の R[#] と L は上に定義した意味を有している。

20

【0061】

【化8】



30

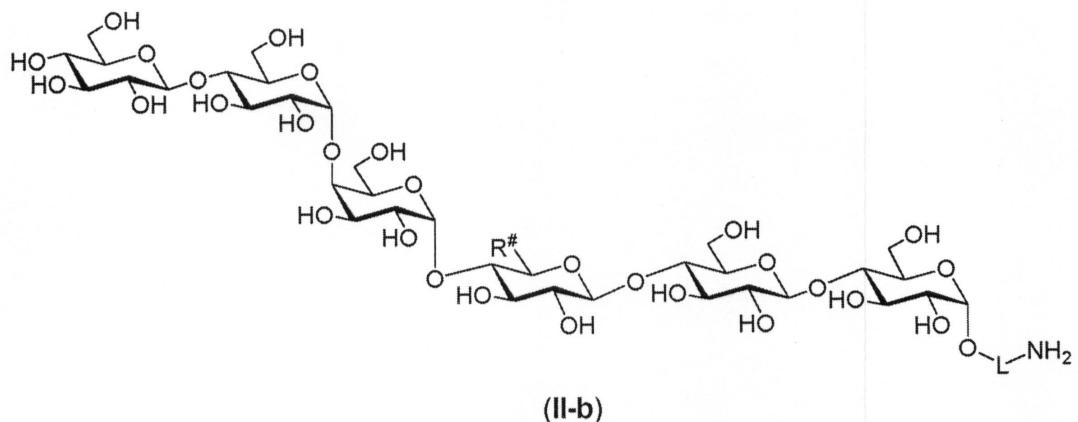
【0062】

また、一般式 (II-b) の糖類は以下の構造を有し、この式の R[#] と L は本明細書で定義する意味を有している。

【0063】

40

【化9】



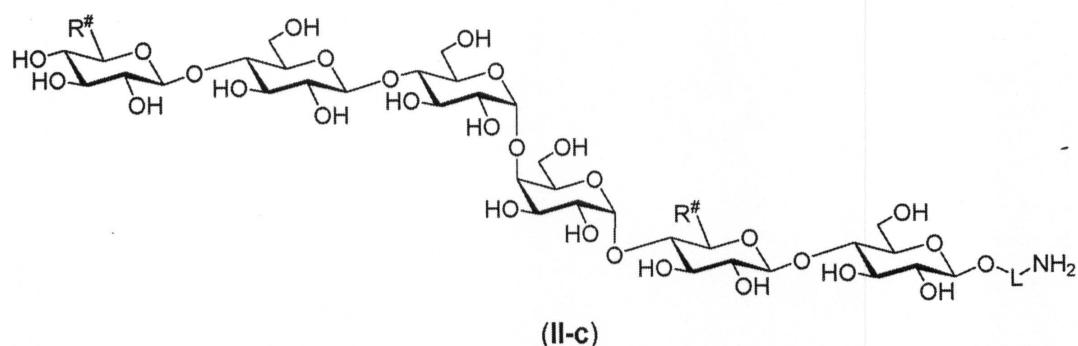
【0064】

また、一般式(II-c)の糖類は以下の構造を有しており、この式のR[#]とLは本明細書で定義する意味を有している。

【0065】

【化10】

20



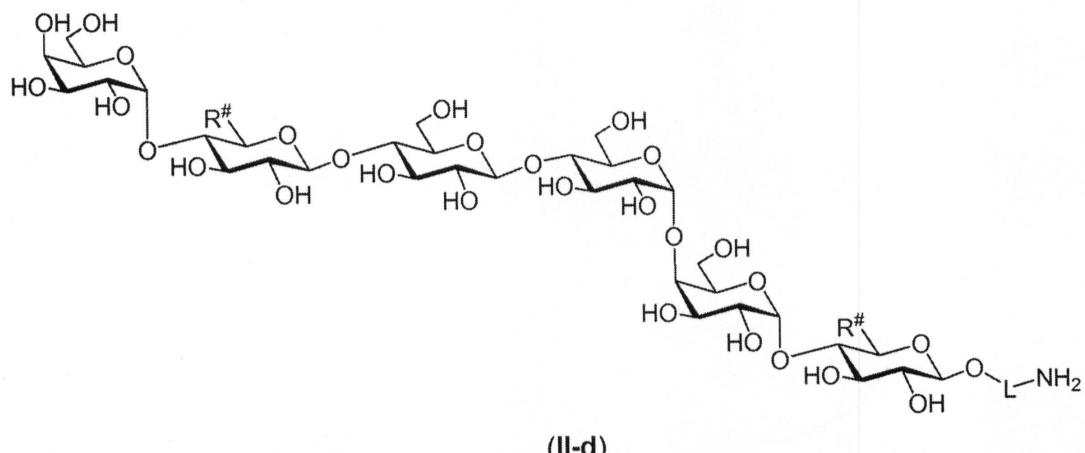
30

【0066】

さらに、一般式(II-d)の糖類は以下の構造を有しており、この式のR[#]とLは本明細書で定義する意味を有しており、これもまた好ましい。

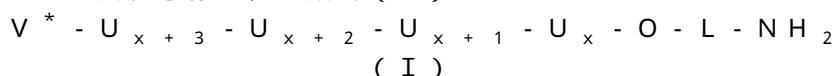
【0067】

【化11】



【0068】

別の好ましい実施態様は、一般式(Ⅰ)



で示される糖類に関し、この式で、 V^* は $H - U_x -$ を示し、 x 、 L 、 U_x 、 U_{x+1} 、 U_{x+2} 、 U_{x+3} 及び R^* は、本明細書で定義されている意味を有する。

【0069】

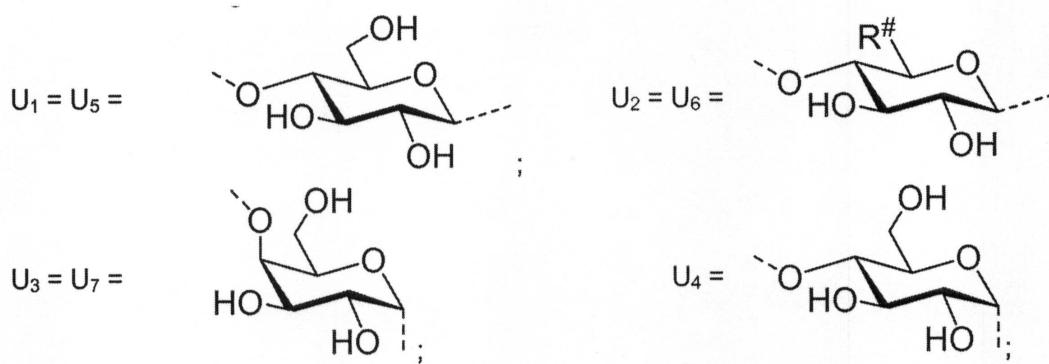
別の好ましい実施形態は、一般式(ⅠⅠⅠ)



で示される五糖類に関し、この式で x は1、2、3、及び4から選択される整数である。

【0070】

【化12】



【0071】

R^* は、 $-COOH$ 又は $-CH_2OH$ を示し、

L は、リンカー、あるいは薬学的に許容できるその塩を示す。

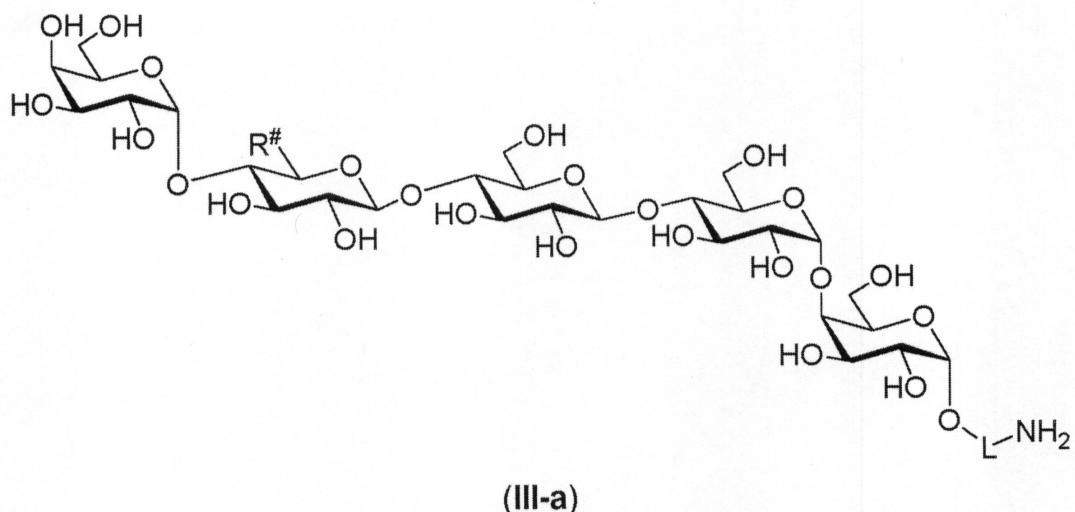
好ましくは、一般式(ⅠⅠⅠ)では、残基 R^* は $-COOH$ を示す。

【0072】

従つて、一般式(ⅠⅠⅠ-a)の五糖類は以下の構造を有し、 R^* と L は本明細書に定義する意味を有している。

【0073】

【化13】



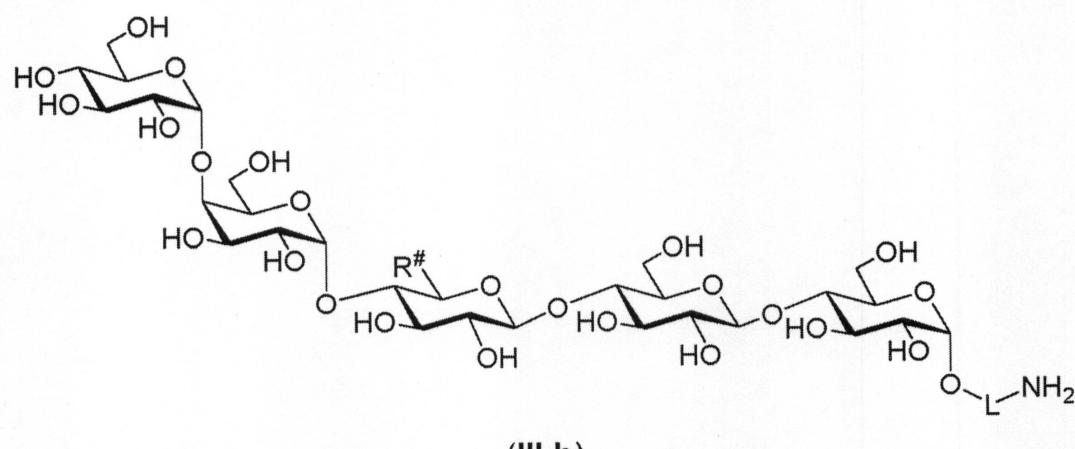
【0074】

また、一般式(III-b)の糖類は以下の構造を有し、この式のR[#]とLは本明細書に定義する意味を有している。

20

【0075】

【化14】



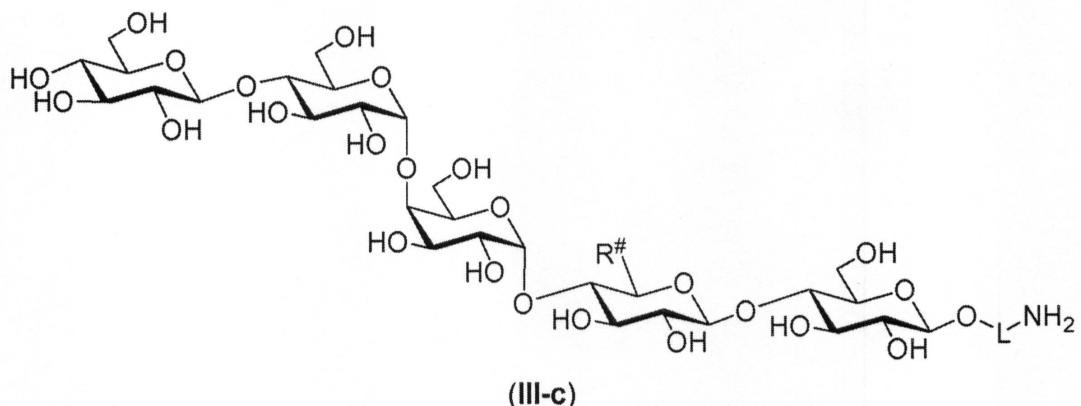
【0076】

また、一般式(III-c)の糖類は以下の構造を有し、この式のR[#]とLは本明細書に定義する意味を有している。

【0077】

40

【化15】



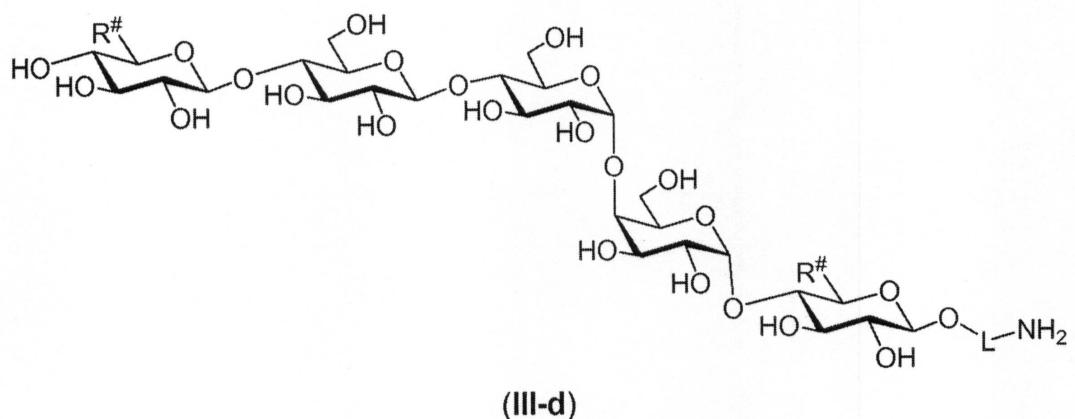
【0078】

また、一般式(III-d)の糖類は以下の構造を有し、この式のR#とLは本明細書に定義する意味を有しており、これもまた好ましい。

【0079】

【化16】

20



【0080】

本発明のさらに好ましい実施形態は一般式(I)

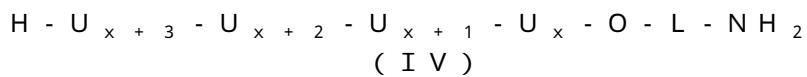


で示される糖類に関し、この式でV*はH-を示し、x、L、U_x、U_{x+1}、U_{x+2}、U_{x+3}及びR#は、本明細書に定義する意味を有する。

40

【0081】

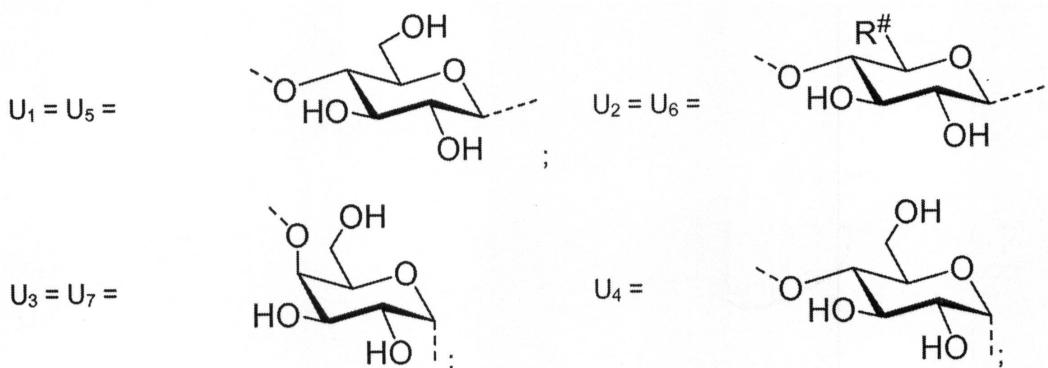
従って、本発明のさらに好ましい実施形態は一般式(IV)



で示される四糖類、あるいは薬学的に許容されるその塩に関し、この式でxは1、2、3、及び4から選択される整数である。

【0082】

【化17】



10

【0083】

$R^\#$ は、 $-COOH$ 又は $-CH_2OH$ を示し、

L は、リンカーを示す。

好ましくは、一般式(IV-a)において、残基 $R^\#$ は $-COOH$ を示す。

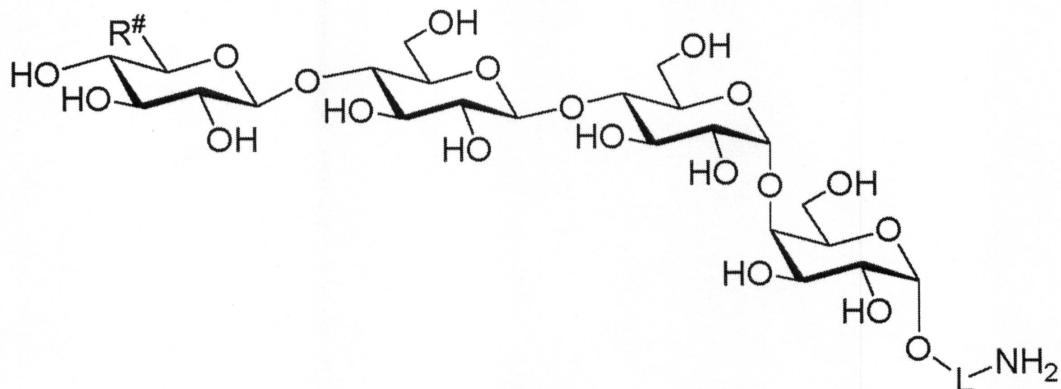
【0084】

従って、一般式(IV-a)の四糖類は以下の構造を有し、 $R^\#$ と L は本明細書に定義する意味を有している。

20

【0085】

【化18】



30

(IV-a)

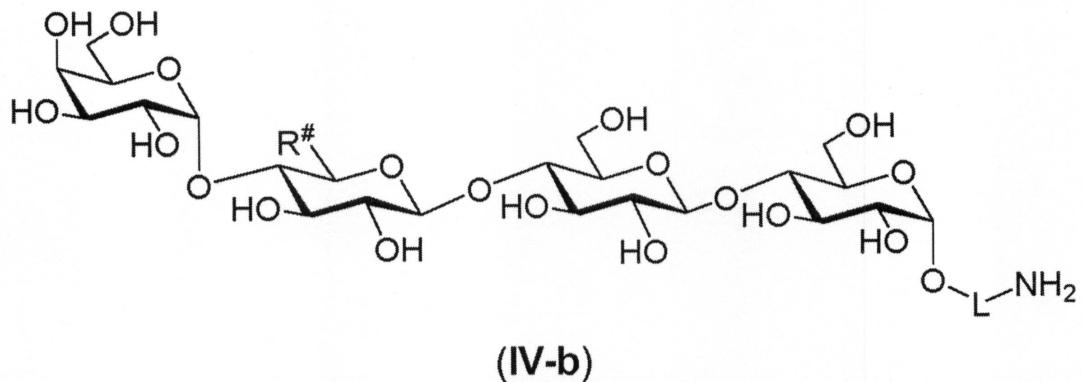
【0086】

また、一般式(IV-b)で示される糖類は以下の構造を有し、この式の $R^\#$ と L は本明細書に定義する意味を有している。

40

【0087】

【化19】



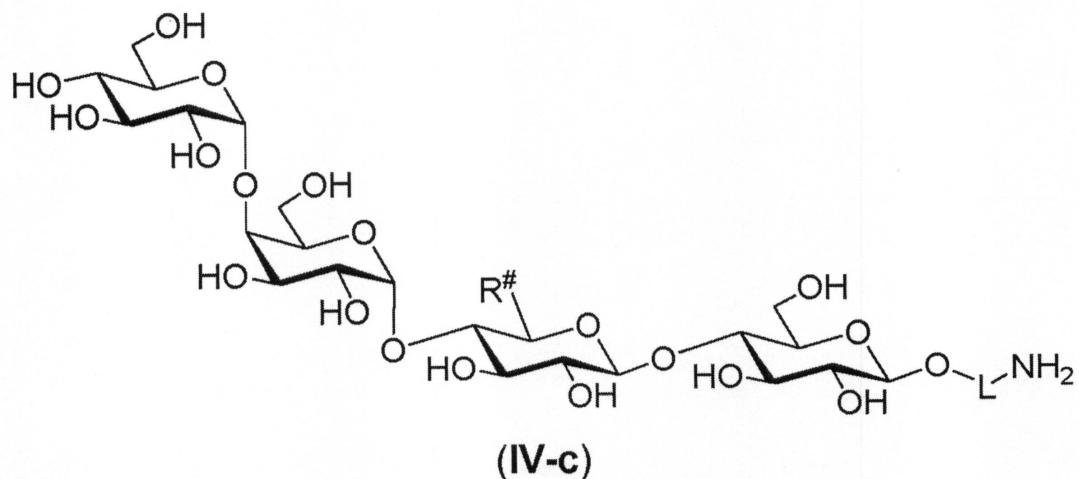
【0088】

また、一般式(IV-c)で示される糖類は以下の構造を有し、この式のR[#]とLは本明細書に定義する意味を有している。

【0089】

【化20】

20



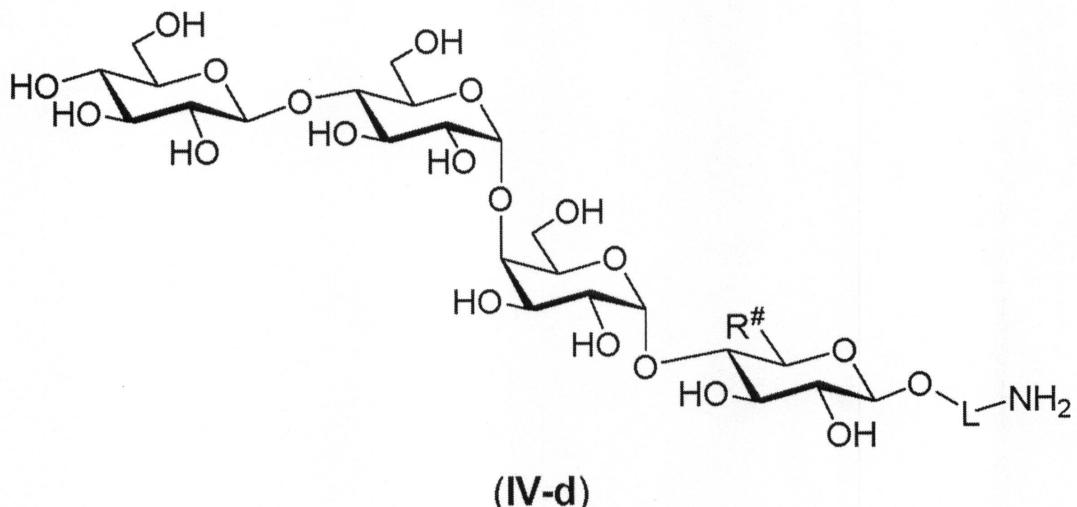
【0090】

また、一般式(IV-d)で示される糖類は以下の構造を有し、この式のR[#]とLは本明細書に定義する意味を有し、これもまた好ましい。

【0091】

40

【化21】



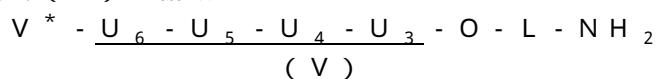
【0092】

特に好ましいのは一般式(I)の糖類、式(II)の六糖類、式(III)の五糖類、式(IV)の四糖類で、防御的な免疫原エピトープ - D - Glc - (1 - 4) - D - Glc - (1 - 4) - D - Galp を含んでいる。従って、六糖類(II-a)、(II-c)、(II-d)、五糖類(III-a)、(III-c)、(III-d)及び四糖類(IV-a)、(IV-d)が特に好ましい。防御的な免疫原エピトープ - D - Glc - (1 - 4) - D - Glc - (1 - 4) - D - Galp を含んでいる糖類は、抗体の力値を上昇させることができ、抗体は、肺炎連鎖球菌タイプ8を選択的に認識し、それらを食細胞の貪食のためにオプソニン化することが出来る。

【0093】

さらに好ましいのは一般式(I)の糖類、あるいは薬学的に許容されるその塩で、この式ではxは3を表わす。

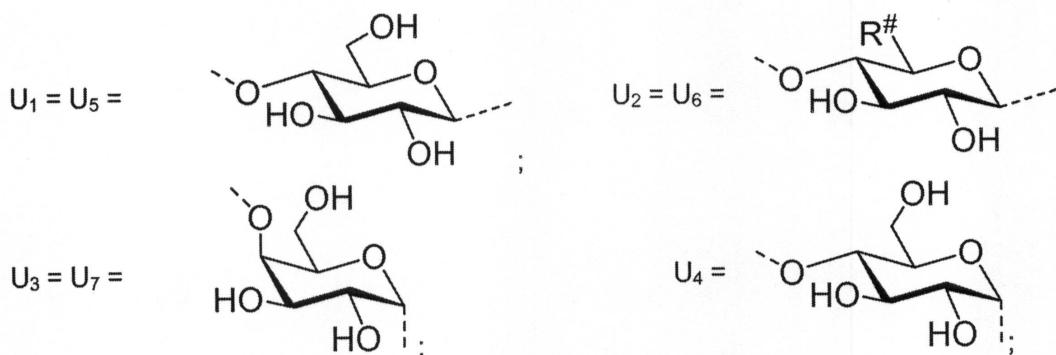
従って、一般式(V)の糖類は



で示され、

【0094】

【化22】



【0095】

の構造を有し、この式で、

50

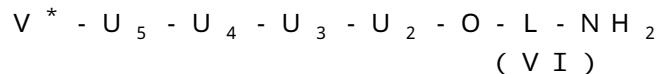
V^* - は H^- 、 $H - U_3^-$ 、 あるいは $H - U_4^- U_3^-$ を示し、

R^* は $- COOH$ あるいは $- CH_2OH$ を示し、

L は リンカーで、特に好ましい。一般式 (V) の糖類は、連鎖球菌血清タイプ8肺炎球菌の感染でマウスを守ることで知られているヒト抗血清肺炎連鎖球菌血清タイプ8莢膜多糖類及び肺炎連鎖球菌血清タイプ8莢膜多糖類に対して発生するマウス抗体と非常に頑強に相互作用する。付け加えると、一般式 (V) の糖類は抗体を放出し、抗体は、肺炎連鎖球菌血清タイプ8莢膜多糖類と交差反応し、特に、肺炎連鎖球菌血清タイプ8を識別して、食細胞の貪食のためにそれらをオプソニン化する。

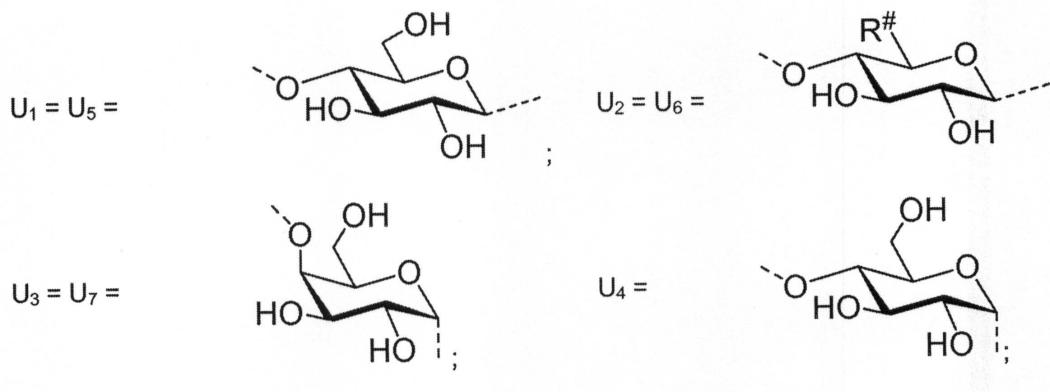
【0096】

同様に好ましいのは一般式 (I) の糖類で、 \times が 2 を表わす場合である。従って、一般式 (VI)



【0097】

【化23】



10

20

【0098】

で示される構造を有し、

V^* - は H^- 、 $H - U_2^-$ 、 あるいは $H - U_3^- U_2^-$ を示し、

30

R^* は $- COOH$ あるいは $- CH_2OH$ を示し、

L は リンカーあるいは薬学的に許容されるその塩で、その場合も好ましい。

【0099】

好ましくは、リンカー - 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、この場合、

- L^a - は - $(CH_2)_o$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_o - C_2H_4$ - 、 及び - $(CH_2 - CH_2 - O)_o - CH_2$ - から選択され、

- L^b - は - O - を表わし、

- L^d - は - $(CH_2)_q$ - 、 - $(CF_2)_q$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_q - C_2H_4$ - 及び - $(CH_2 - CH_2 - O)_q - CH_2$ - から選択され、

40

- L^e - は - $(CH_2)_p$ - 、 - $(CF_2)_p$ - 、 - $C_2H_4 - (O - CH_2 - CH_2)_p$ - 、 - $CH_2 - (O - CH_2 - CH_2)_p$ - 、 及び - $(CH_2)_p - O - (CH_2)_p$ - から選択され、

o 、 q 、 p 1 及び p 2 は、1、2、3、4、5、及び 6 から相互に無関係に選択される整数である。

【0100】

従って、一般式 (I)、(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、(III)、(III-a)、(III-b)、(III-c)、(III-d)、(IV)、(IV-a)、(IV-b)、(IV-c)、(IV-d)、(V) あるいは (VI) で示される糖類においては、

50

- 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、

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

- L ^b - は - O - を表わし、

- 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、1、2、3、4、5、及び6から相互に無関係に選択される整数である場合が特に好ましい。

【0101】

さらにより好ましいのは、一般式(I)、(II)、(II-a)、(II-b)、(II-c)、(II-d)、(III)、(III-a)、(III-b)、(III-c)、(III-d)、(IV)、(IV-a)、(IV-b)、(IV-c)、(IV-d)、(V)あるいは(VI)で示される糖類であり、- L - が - (CH₂)_o - を示し、oが2、3、4、5及び6から選択される整数である場合である。

【0102】

さらに好ましいのは一般式(I-a)の糖類で、

$V^* - U_{x+3} - U_{x+2} - U_{x+1} - U_x - O - L^a - L^e - NH_2$ (I-a) 20
で示され、

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

V^{*}、x、o、p1、p2、U_x、U_{x+1}、U_{x+2}及びU_{x+3}は本明細書で定義する意味を有している場合である。

【0103】

また、より好ましいのは一般式(II-e)の糖類で、

$H - U_{x+1} - U_x - U_{x+3} - U_{x+2} - U_{x+1} - U_x - O - L^a - L^e - NH_2$ (II-e) 30
で示され、

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

x、o、p1、p2、U_x、U_{x+1}、U_{x+2}及びU_{x+3}は本明細書で定義する意味を有している場合である。

【0104】

また、より好ましいのは、一般式(III-e)の糖類で、

$H - U_x - U_{x+3} - U_{x+2} - U_{x+1} - U_x - O - L^a - L^e - NH_2$ (III-e) 40
で示され、

- L ^a - は - (CH₂)_o - 、 - (CH₂ - CH₂ - O)_o - C₂H₄ - 、 及び - (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

10

20

30

40

50

択され、

x 、 o 、 p_1 、 p_2 、 U_x 、 U_{x+1} 、 U_{x+2} 及び U_{x+3} は本明細書で定義する意味を有している場合である。

【0105】

また、さらに好ましいのは、一般式 (IV-e) の糖類で

$H - U_{x+3} - U_{x+2} - U_{x+1} - U_x - O - L^a - L^e - NH_2$ (IV-e)

で示され、

- L^a - は - $(CH_2)_o$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_o$ - C_2H_4 - 、 及び - $(CH_2 - CH_2 - O)_o$ - CH_2 - から選択され

- L^e - は - C_2H_4 - $(O - CH_2 - CH_2)_{p_1}$ - 、 - $CH_2 - (O - CH_2 - CH_2)_{p_1}$ - 、 及び - $(CH_2)_{p_1}$ - $O - (CH_2)_{p_2}$ - から選択され、

x 、 o 、 p_1 、 p_2 、 U_x 、 U_{x+1} 、 U_{x+2} 及び U_{x+3} は本明細書で定義する意味を有している場合である。

【0106】

また、さらに好ましいのは、一般式 (V-a) の糖類で

$V^* - U_6 - U_5 - U_4 - U_3 - O - L^a - L^e - NH_2$ (V-a)

で示され、

- L^a - は - $(CH_2)_o$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_o$ - C_2H_4 - 、 及び - $(CH_2 - CH_2 - O)_o$ - CH_2 - から選択され

- L^e - は - C_2H_4 - $(O - CH_2 - CH_2)_{p_1}$ - 、 - $CH_2 - (O - CH_2 - CH_2)_{p_1}$ - 、 及び - $(CH_2)_{p_1}$ - $O - (CH_2)_{p_2}$ - から選択され、

V^* 、 o 、 p_1 、 p_2 、 U_6 、 U_5 、 U_4 及び U_3 は本明細書で定義する意味を有している場合である。

【0107】

また、さらに好ましいのは、一般式 (VI-a) の糖類で

$V^* - U_5 - U_4 - U_3 - U_2 - O - L^a - L^e - NH_2$ (VI-a)

で示され、

- L^a - は - $(CH_2)_o$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_o$ - C_2H_4 - 、 及び - $(CH_2 - CH_2 - O)_o$ - CH_2 - から選択され

- L^e - は - C_2H_4 - $(O - CH_2 - CH_2)_{p_1}$ - 、 - $CH_2 - (O - CH_2 - CH_2)_{p_1}$ - 、 及び - $(CH_2)_{p_1}$ - $O - (CH_2)_{p_2}$ - から選択され、

V^* 、 o 、 p_1 、 p_2 、 U_5 、 U_4 、 U_3 及び U_2 は本明細書で定義する意味を有している場合である。

【0108】

さらにより好ましいのは、一般式 (I-b) の糖類で

$V^* - U_{x+3} - U_{x+2} - U_{x+1} - O - L^a - NH_2$ (I-b)

で示され、

- L^a - は - $(CH_2)_{o_1}$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - C_2H_4 - 、 及び - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - CH_2 - を表わし、

o_1 は 2、3、4、5、及び 6 から選択される整数であり、

o_2 は 1、2、3、4、5 及び 6 から選択される整数であり、

V^* 、 x 、 U_x 、 U_{x+1} 、 U_{x+2} 及び U_{x+3} は本明細書で定義する意味を有している場合である。

【0109】

また、より好ましいのは、一般式 (II-f) の糖類で

$H - U_{x+1} - U_x - U_{x+3} - U_{x+2} - U_{x+1} - U_x - O - L^a - NH_2$ (II-f)

で示され、

- L^a - は - $(CH_2)_{o_1}$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - C_2H_4 - 、 及び - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - CH_2 - を表わし、
 o_1 は 2、 3、 4、 5、 及び 6 から選択される整数であり、
 o_2 は 1、 2、 3、 4、 5 及び 6 から選択される整数であり、
 x 、 U_x 、 U_{x+1} 、 U_{x+2} 及び U_{x+3} は本明細書で定義する意味を有している場合である。

【0110】

また、より好ましいのは一般式 (III-f) の糖類で

$H - U_x - U_{x+3} - U_{x+2} - U_{x+1} - U_x - O - L^a - NH_2$ (III-f) 10
 で示され、

- L^a - は - $(CH_2)_{o_1}$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - C_2H_4 - 、 及び - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - CH_2 - を表わし、
 o_1 は 2、 3、 4、 5、 及び 6 から選択される整数であり、
 o_2 は 1、 2、 3、 4、 5 及び 6 から選択される整数であり、
 x 、 U_x 、 U_{x+1} 、 U_{x+2} 及び U_{x+3} は本明細書で定義する意味を有している場合である。

【0111】

さらに好ましいのは、一般式 (IV-f) の糖類で

$H - U_{x+3} - U_{x+2} - U_{x+1} - U_x - O - L^a - NH_2$ (IV-f) 20
 で示され、

- L^a - は - $(CH_2)_{o_1}$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - C_2H_4 - 、 及び - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - CH_2 - を表わし、
 o_1 は 2、 3、 4、 5、 及び 6 から選択される整数であり、
 o_2 は 1、 2、 3、 4、 5 及び 6 から選択される整数であり、
 x 、 U_x 、 U_{x+1} 、 U_{x+2} 及び U_{x+3} は本明細書で定義する意味を有している場合である。

【0112】

また、さらに好ましいのは一般式 (V-b) の糖類で

$V^* - U_6 - U_5 - U_4 - U_3 - O - L^a - NH_2$ (V-b) 30
 で示され、

- L^a - は - $(CH_2)_{o_1}$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - C_2H_4 - 、 及び - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - CH_2 - を表わし、
 o_1 は 2、 3、 4、 5、 及び 6 から選択される整数であり、
 o_2 は 1、 2、 3、 4、 5 及び 6 から選択される整数であり、
 V^* 、 U_6 、 U_5 、 U_4 及び U_3 は本明細書で定義する意味を有している場合である。

【0113】

また、より好ましいのは一般式 (VI-b) の糖類で

$V^* - U_5 - U_4 - U_3 - O - L^a - NH_2$ (VI-b) 40
 で示され、

- L^a - は - $(CH_2)_{o_1}$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - C_2H_4 - 、 及び - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - CH_2 - を表わし、
 o_1 は 2、 3、 4、 5、 及び 6 から選択される整数であり、
 o_2 は 1、 2、 3、 4、 5 及び 6 から選択される整数であり、
 V^* 、 U_5 、 U_4 及び U_3 は本明細書で定義する意味を有している場合である。

【0114】

さらにより好ましいのは一般式 (I-c) の糖類で

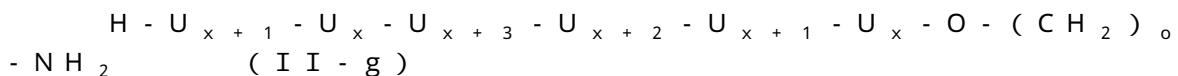
$V^* - U_{x+3} - U_{x+2} - U_{x+1} - U_x - O - (CH_2)_{o_1} - NH_2$ (I-c)
 で示され、

○が2、3、4、5及び6から選択される整数で、

V^* 、 X 、 U_x 、 U_{x+1} 、 U_{x+2} 及び U_{x+3} は本明細書で定義する意味を有している場合である。

【0115】

また、より好ましいのは一般式(I I - g)の糖類で



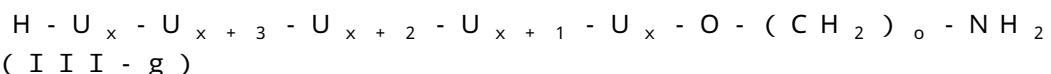
で示され、

○が2、3、4、5及び6から選択される整数であり、

X 、 U_x 、 U_{x+1} 、 U_{x+2} 及び U_{x+3} は本明細書で定義する意味を有している場合である。 10

【0116】

また、より好ましいのは一般式(I I I - g)の糖類で



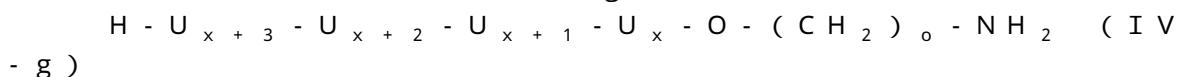
で示され、

○が2、3、4、5及び6から選択される整数であり、

X 、 U_x 、 U_{x+1} 、 U_{x+2} 及び U_{x+3} は本明細書で定義する意味を有している場合である。

【0117】 20

また、さらに好ましいのは一般式(I V - g)の糖類で



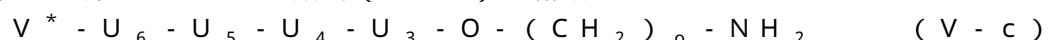
で示され、

○が2、3、4、5及び6から選択される整数であり、

X 、 U_x 、 U_{x+1} 、 U_{x+2} 及び U_{x+3} は本明細書で定義する意味を有している場合である。

【0118】

また、より好ましいのは一般式(V - c)の糖類で



で示され、

○が2、3、4、5及び6から選択される整数であり、

V^* 、 U_6 、 U_5 、 U_4 及び U_3 は本明細書で定義する意味を有している場合である。

【0119】

また、より好ましくいのは一般式(V I - c)の糖類で



で示され、

○が2、3、4、5及び6から選択される整数であり、

V^* 、 U_5 、 U_4 、 U_3 及び U_2 は本明細書で定義する意味を有している場合である。

【0120】 40

またさらに、別の好ましい実施例では、本発明による上記糖類は、以下のもので構成される群から選択される。

- D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) -

- D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 1)

- (2 - アミノ)エタノール (1 0)、

- D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4)

) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 1)

- (2 - アミノ)エタノール (1 8)、

5 - アミノ・ペンタニル - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラク 50

トピラノシド(19)、
 5-アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラ
 ノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノ
 シド(60)、
 5-アミノ・ペントニル - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピ
 ラノシルウロン酸 - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グル
 コピラノシド(20)、
 5-アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピ
 ラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - - D - グル
 コピラノシド(21)、
 5-アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラ
 ノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラ
 ノシルウロン酸(22)、
 - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシルウロネート - (1
 4) - - D - グルコピラノシル - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D -
 ガラクトピラノシル - (1 1) - (2-アミノ)エタノール(55)、
 - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) -
 - D - グルコピラノシルウロネート - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4
) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 1)
 - (2-アミノ)エタノール(57) 10
 5-アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピ
 ラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - - D - グル
 コピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクト
 ピラノシド(63)
 5-アミノ・ペントニル ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル
 - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシルウ
 ロン酸 - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシ
 ド(64)
 5-アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - - D - グ
 ルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラク
 トピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - - D -
 グルコピラノシド(65) 30
 5-アミノ・ペントニル - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピ
 ラノシルウロン酸 - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グル
 コピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコ
 ピラノシルウロン酸(66)
 5-アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピ
 ラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - - D - グル
 コピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクト
 ピラノシド(67) 40
 5-アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラ
 ノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラ
 ノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド
 (68)
 5-アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラ
 ノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラ
 ノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド
 (69)
 5-アミノ・ペントニル - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピ
 ラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノ 50

シル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシ
ド (7 0)
3 - アミノプロピル - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノ
シルウロン酸 - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコ
ピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシド (7 1)
5 - アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピ
ラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - - D - グル
コピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド (7 2)
3 - アミノプロピル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシ
ル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル 10
ウロン酸 - (1 4) - - D - グルコピラノシド (7 3)
5 - アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - - D - グ
ルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラク
トピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシルウロン酸 (7 4)
4 - アミノブチル - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシ
ル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル -
(1 4) - - D - ガラクトピラノシド (7 5)
6 - アミノ・ヘキサニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピ
ラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノ
シル - (1 4) - - D - グルコピラノシド (7 6) 20
3 - アミノプロピル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシ
ル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル
- (1 4) - - D - グルコピラノシド (7 7)
5 - アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラ
ノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラ
ノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド (7 8)
4 - アミノブチル - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシ
ル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド (7 9)
3 - アミノプロピル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノ 30
シル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド
(8 0)
6 - アミノ・ヘキサニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラ
ノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノ
シド (8 1)。

【0121】

驚くべきことに、さらに、一般式 (VII) の純粋な糖が防御的な免疫原性グリカン・
エピトープ - D - G1pc - (1 4) - - D - G1cp - (1 4) - - D - G
a1p を含んでおり、ヒト及び / 又は動物宿主において肺炎連鎖球菌血清型 8 バクテリア
に対する防御的な免疫応答を誘発することができる見いだされた。防御性免疫原性 40
グリカン・エピトープ - D - G1pc - (1 4) - - D - G1cp - (1 4) -
- D - Ga1p を含む一般式 (VII) の糖類は、抗体を放出する。抗体は肺炎連鎖球
菌血清型 8 荚膜多糖類と交差反応し、肺炎連鎖球菌血清型 8 バクテリアを個別的に識別し
て、食細胞の貪食のためにそれらをオプソニン化する。

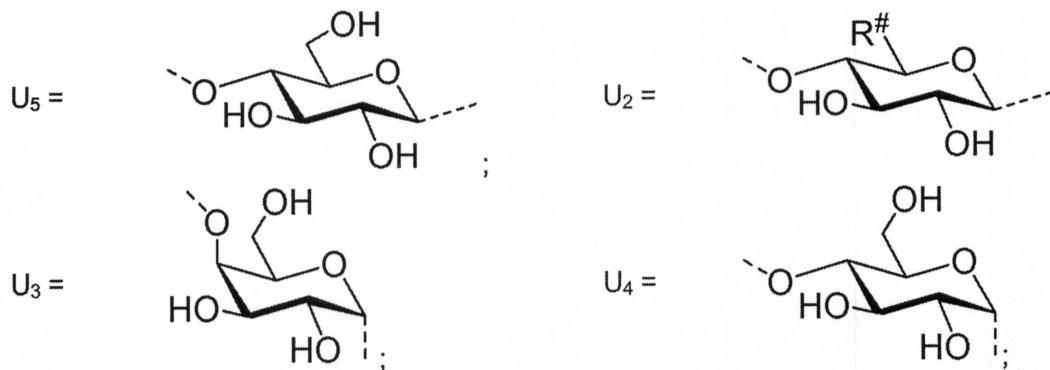
【0122】

こうした理由で、本発明の別の側面は一般式 (VII) の糖類に関連している。

S^{*} - U₅ - U₄ - U₃ - S - O - L - NH₂ (VII)

【0123】

【化24】



10

【0124】

この構造において、

R[#] は - COOH あるいは - CH₂OH を表わし、

- S - は - S_a - あるいは - S_b - を表わし、

- S_a - は - (U₅)_{n1} - 、 - (U₅ - U₄)_{n2} - あるいは - (U₅ - U₄ - U₃)_{n3} - を表わし、

- S_b - は - (U₂)_{n1} - 、 - (U₂ - U₅)_{n2} - あるいは - (U₂ - U₅ - U₄)_{n3} - を表わし、

S^{*} - は S^{*}_a - あるいは S^{*}_b - を表わし、

S^{*}_a - は H - (U₃)_{n4} - あるいは H - (U₄ - U₃)_{n5} - を表わし、

S^{*}_b - は H - (U₂)_{n4} - 、 H - (U₃ - U₂)_{n5} - あるいは H - (U₄ - U₃ - U₂)_{n6} - を表わし、

n₁、n₂、n₃、n₄、n₅ 及び n₆ は 0 及び 1 から選択され、

L はリンカーであるが、以下のことを前提にしている。

【0125】

- S - が - S_a - を表わしているのであれば、 S^{*} - は S^{*}_a - を表わし、

- S - が - S_b - を表わしているのであれば、 S^{*} - は S^{*}_b - を表わし、

n₁ = 1 であれば、 n₆ = 0 であり、

n₂ = 1 であれば、 n₅ = n₆ = 0 であり、

n₃ = 1 であれば、 n₄ = n₅ = n₆ = 0 であり、

n₄ = 1 であれば、 n₃ = 0 であり、

n₅ = 1 であれば、 n₂ = n₃ = 0 であり、

n₆ = 1 であれば、 n₁ = n₂ = n₃ = 0 であり、

あるいは、それらの薬学的に供される塩である。

【0126】

- L - はリンカーとして定義され、フラグメント - O - L - NH₂ の一部である。従つて、リンカー - L - は酸素原子と NH₂ 基の窒素原子と結合している。このリンカーの少なくとも 2 つの炭素原子は、 - O - C - C - NH₂ のように、酸素原子と NH₂ 基の間にすることが好ましい。リンカー - L - は脂肪鎖でもよく、その場合、その脂肪鎖はオプションとしてそれに挿入されている芳香鎖、あるいは 0 - 10 までの範囲のヘテロ原子を含んでいてもよい。

30

40

【0127】

リンカー L は、2 から 40 個（任意の側鎖の炭素を含む）、より好ましくは 2 から 30 個、より好ましくは 2 から 20 個、より好ましくは 2 から 14 個、より好ましくは 2 から 12 個、そしてもっと好ましくの 2 から 10 個の範囲の炭素を含んでいるのが好ましい。

【0128】

上記酸素元素（例えば、 - O - L - NH₂ の酸素）と NH₂ 基の間の最短の分子鎖は、好ましくは 2 - 12 の範囲、より好ましくは 2 - 10 の範囲、そしてより好ましくは 2 -

50

8の間の範囲の個数の原子で構成されているのが好ましい。その最短の鎖（つまり、そのアノマーの中心の酸素とNH₂基との間で可能な最短の接続）が2個から6個の原子で構成されている場合、これらは炭素原子であることが好ましい。その最短の鎖が4個から8個の原子で構成されている場合、その鎖は、O、N及びSから選択される1、2、あるいは3個のヘテロ原子を含んでいてもよい。その最短の鎖が9個から14個の原子で構成されている場合、その鎖はO、N及びSから選択される1、2、3、4、5、あるいは6個のヘテロ原子を含んでいてもよい。

【 0 1 2 9 】

リンカー - L - あるいは最短の鎖が完全に、あるいは部分的にフッ化されているのも好ましい。このリンカー - L - は構成原子が 3 個か 4 個か 5 個あるいは 6 個の飽和炭素環を含んでいてもよいし、構成原子が 5 個の部分的に不飽和の（そして芳香族でない）炭素環、あるいは構成原子数が 4 個か 5 個か 6 個の飽和酸素ヘテロ環、あるいは、構成原子数が 4 個か 5 個か 6 個の飽和窒素ヘテロ環、あるいは構成原子が 6 個の芳香族炭素環を含んでいるのが好ましい。

10

【 0 1 3 0 】

リンカー - L - はアミド (- NH - CO - 、 - CO - NH -) 及び / 又は尿素 (- NH - CO - NH -) 残基を含んでいてもよいし、 1 個だけのアミドあるいは尿素残基を含んでいるのが好ましい。このリンカーは置換基を含んでいてもよく、 $R^{1,0}$ 及び $R^{1,1}$ のような 2 つの置換基、あるいは $R^{1,0}$ 、 $R^{1,1}$ 、 $R^{1,5}$ 及び $R^{1,4}$ の 4 つの置換基を含んでいるのが好ましく、これらは、ここで定義されているような意味を有し、 - F 、 - Cl 、 - CH₃ 、 - C₂H₅ 、 - C₃H₇ 、 - C₅H₉ 、 - C₆H₁₃ 、 - OCH₃ 、 - OC₂H₅ 、 - CH₂F 、 - CH₂F₂ 、 - CF₃ 、 - C(O) - NH₂ 、 - SCH₃ 、 - SC₂H₅ 、 - NHCOCH₃ 、 - N(CH₃)₂ 、及び - N(C₂H₅)₂ から選択されるのが好ましい。

20

【 0 1 3 1 】

リンカー - L - がフッ化している場合、3個以上の置換基が好ましい。

好ましくは、リンカー-L-は、-CH₂-、-(CH₂)₂-、-(CH₂)₃-、-(CH₂)₄-、-(CH₂)₅-、-(CH₂)₆-、-(CH₂)₇-、-(CH₂)₈-、-(CH₂)₉-、-(CH₂)₁₀-、-CF₂-、-(CF₂)₂-、-(CF₂)₃-、-(CF₂)₄-、-(CF₂)₅-、-(CF₂)₆-、-(CF₂)₇-、-(CF₂)₈-、-(CF₂)₉-、-(CF₂)₁₀-、-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-、-CH₂-O-(CH₂)₃-、-(CH₂)₃-O-CH₂-、-CH₂-O-(CF₂)₂-、-(CH₂)₂-O-CH₂-、-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-、-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-、-(CH₂)₄-O-CH₂-、-CH₂-O-(CH₂)₄-、-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から選択される。

30

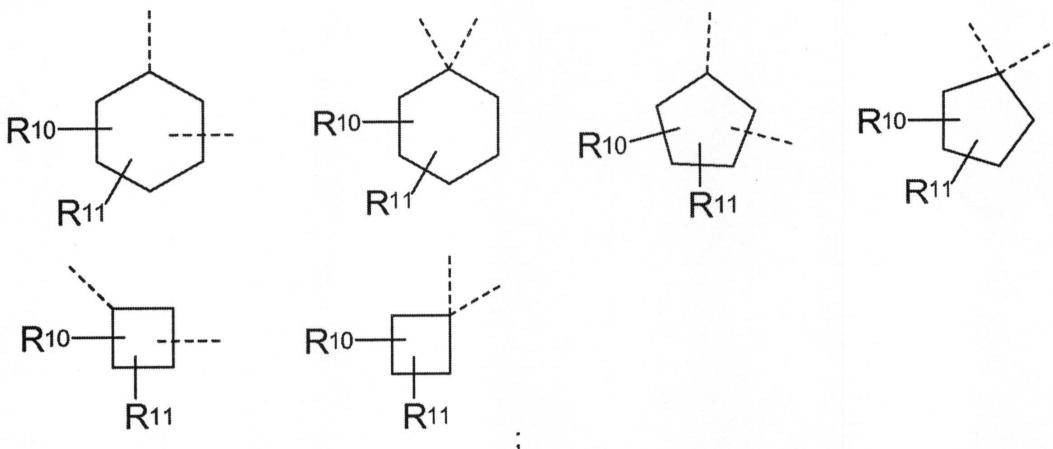
【 0 1 3 2 】

この場合、 $-L^a-$ は、 $-(CH_2)_o-$ 、 $-(CF_2)_o-$ 、 $-(CH_2-CH_2-O)_o-$ 、 CH_2- 、 $(CR^{10}R^{11})_o-$

18

[0 1 3 3]

【化25】



10

【0134】

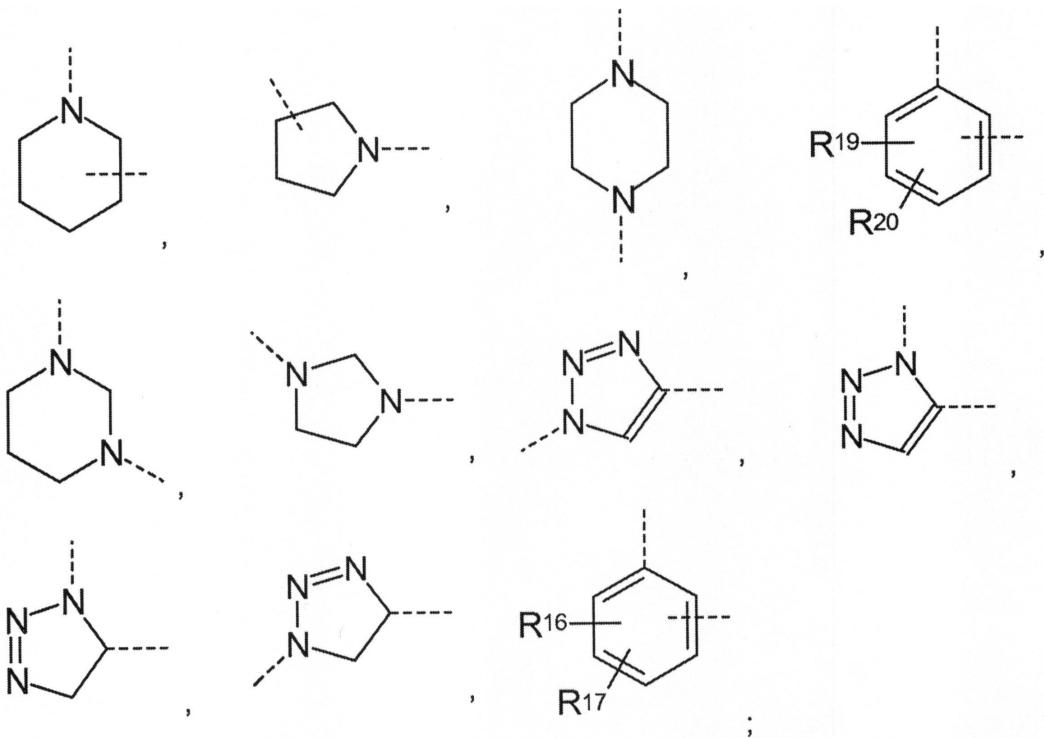
から選択される。

- L^b - と - L^c - は、 - O - 、 - NH - C (O) - NH - 、 - NH - C (S) - NH - 、
 - NH - C (O) - 、 - C (O) - NH - 、 - NH - C (O) - O - 、 - NR⁹ - 、
 - NR¹ R⁸ - 、 - SO₂ -

【0135】

【化26】

20



30

【0136】

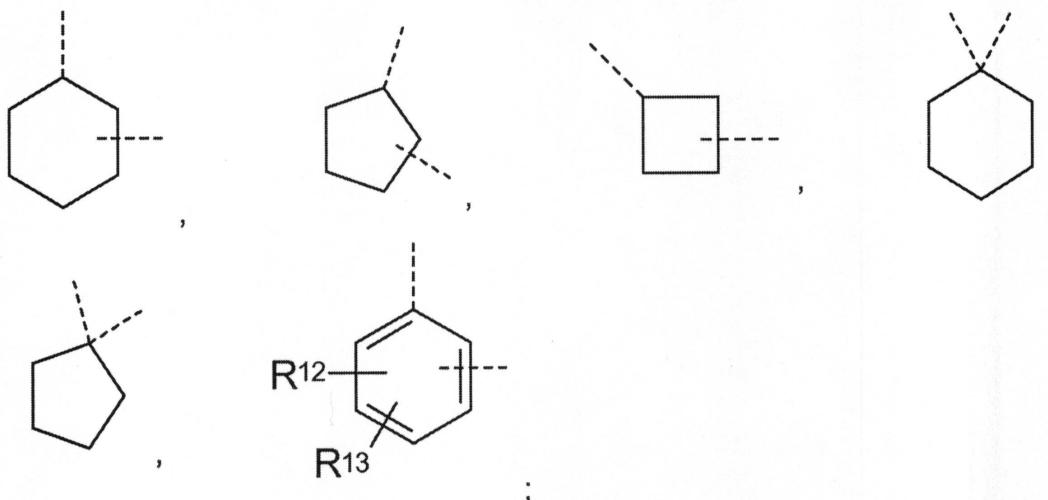
から相互に無関係に選択される。

- L^d - は、 - (CH₂)_q - 、 - (CF₂)_q - 、 - (CR¹ R²)_q - 、 - (CH₂ - CH₂ - O)_q - C₂H₄ - 、 - (CH₂ - CH₂ - O)_q - CH₂ -

【0137】

40

【化27】



10

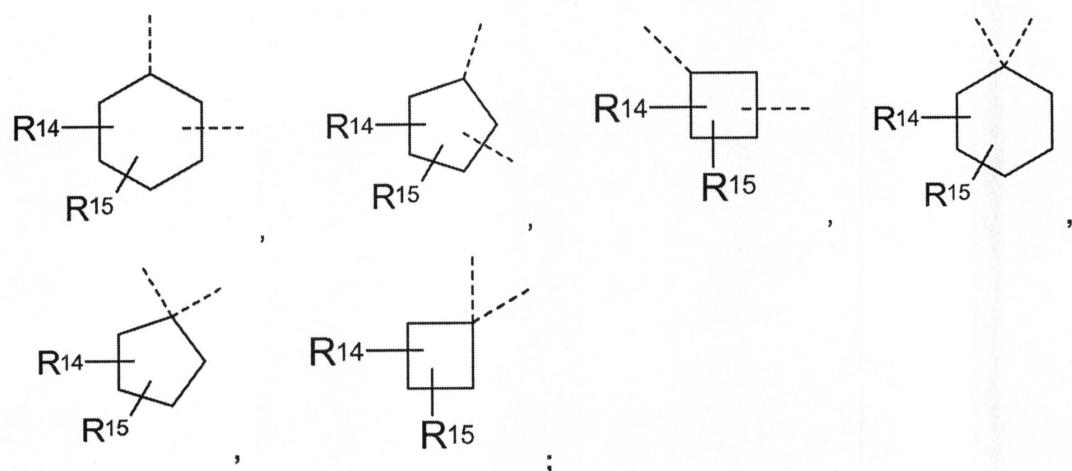
【0138】

から相互に無関係に選択される。

- L^e - は、 - (C₂H₂)_{p1} - 、 - (C₂F₂)_{p1} - 、 - C₂H₄ - (O - C₂H₂ - C₂H₂)_{p1} - 、 - C₂H₂ - (O - C₂H₂ - C₂H₂)_{p1} - 、 - (C₂H₂)_{p1} - O - (C₂H₂)_{p2} - 、 - (C₂R¹₄R¹₅)_{p1} - 、 - (C₂R¹₄R¹₅)_{p1} - O - (C₂R²₁C₂R²₂)_{p2} -

【0139】

【化28】



30

【0140】

から相互に無関係に選択される。

R⁹ と R¹₈ は、 - C₂H₃ - 、 - C₂H₅ 、 - C₃H₇ 、 及び - C(O)CH₃ から相互に無関係に選択される。

【0141】

R¹₀ 、 R¹₁ 、 R¹₂ 、 R¹₃ 、 R¹₄ 、 R¹₅ 、 R¹₆ 、 R¹₇ 、 R¹₉ 、 R²₀ 、 R²₁ 及び R²₂ は、 それぞれ相互とは無関係に、 - H 、 - F 、 - Cl 、 - CH₃ 、 - C₂H₅ 、 - C₃H₇ 、 - C₅H₉ 、 - C₆H₁₃ 、 - OCH₃ 、 - OC₂H₅ 、 - CH₂F 、 - CH₂HF₂ 、 - CF₃ 、 - C(O) - NH₂ 、 - SCH₃ 、 - SC₂H₅ 、 - NH₂ 、 - C(O)CH₃ 、 - N(CH₃)₂ 及び - N(C₂H₅)₂ から選択され、 o 、 q 、 p₁ 及び p₂ は、 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 及び 10 から相互とは無関係に選択される整数である。

40

50

【0142】

本発明による糖類は塩基性及び/又は酸性の置換基を含んでいてもよく、それらが有機あるいは無機の酸あるいは塩基と塩を形成していてもよい。

そうした酸付加塩形成に適した酸の例としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、酢酸、クエン酸、蔥酸、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、亜磷酸、過塩素酸、硝酸、蟻酸、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、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фон酸、チャイナ酸 (china acid) (キナ酸)、マンデル酸、o-メチルマンデル酸、ハイドロゲン-ベンゼンスルホン酸、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、及び当業者によく知られているその他の鉱酸あるいはカルボキシル酸である。それらの塩は、通常の方法で塩をつくるために、遊離塩基を十分な量の望ましい酸と接触させて作製される。

【0143】

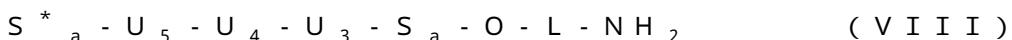
適切な無機あるいは有機塩基は、例えば、NaOH、KOH、NH₄OH、テトラアルキルアンモニウム水酸化物、リシンあるいはアルギニンなどである。塩は当業者に周知の方法を用いる通常のやり方で調製してもよく、例えば、一般式(I)の化合物の溶液を上に列記したグループから選択した塩基の溶液で処理する方法がある。

【0144】

一般式(VII)の糖類が-O-O-結合及び/又はアノマーあるいはC-1炭素経由で相互に接続しているか結合している糖フラグメント(U₂、U₃、U₄、U₅)を含んでいないことは、炭水化物化学分野の当業者には明らかである。グリコシド結合の立体化学が一般式においては糖フラグメントのアノマー中心に示される立体化学であることもこの分野の当業者には明らかである。従って、糖フラグメントU₁及びU₅のアノマー中心の立体化学は であり、糖フラグメントU₂及びU₆についても であり、糖フラグメントU₃及びU₇について であり、糖フラグメントU₄ については である。

【0145】

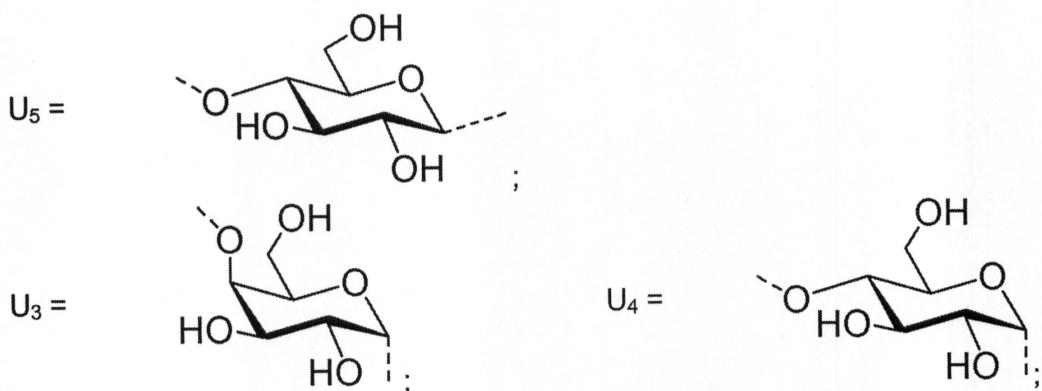
-S-が-S_a-を表わし、S^{*}-がS^{*}_a-を表わす一般式(VIII)の糖類が好ましい。従って、一般式(VIII)



の糖類が好ましく、この場合、

【0146】

【化29】



【0147】

10

20

20

30

40

50

の構造を有しており、上の式で

- S_a - は - $(U_5)_{n_1}$ - 、 - $(U_5 - U_4)_{n_2}$ - あるいは - $(U_5 - U_4 - U_3)_{n_3}$ - を表わしており、

S^*_{a} - は $H - (U_3)_{n_4}$ - あるいは $H - (U_4 - U_3)_{n_5}$ - を表わしており、
 n_1, n_2, n_3, n_4, n_5 は 0 と 1 から選択され、

L はリンカーであり、以下のことを前提としている。つまり

$n_2 = 1$ であれば、 $n_5 = 0$ であり、

$n_3 = 1$ であれば、 $n_4 = n_5 = 0$ であり、

$n_4 = 1$ であれば、 $n_3 = 0$ であり、

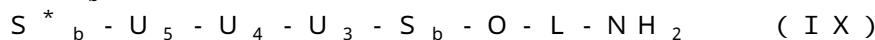
$n_5 = 1$ であれば、 $n_2 = n_3 = 0$ であり、

さらに、薬学的に許容されるこれらの塩も好ましい。

10

【0148】

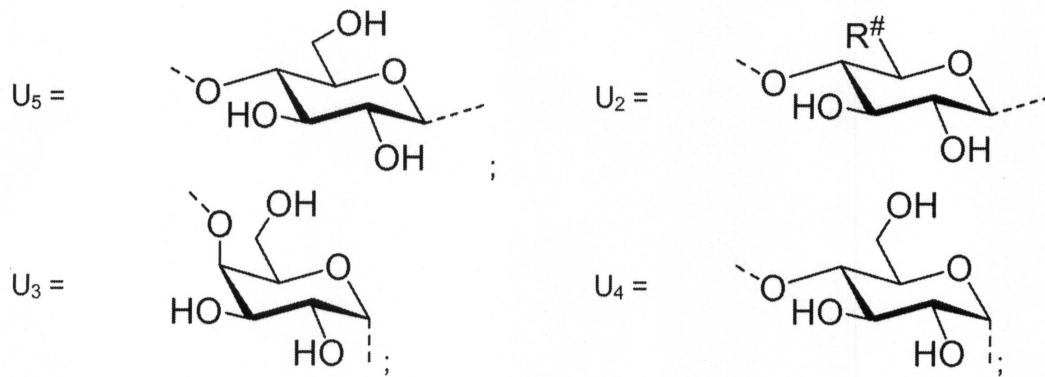
特に好ましいのは一般式 (VII) の糖類で、この場合、- S - は - S_b - を表わし、
 S^*_{b} - が S^*_{b} - を表わす。従って、一般式 (IX)



で示される糖類が好ましく、この糖類の場合以下の構造を有しており、

【0149】

【化30】



20

【0150】

この構造では、

$R^{\#}$ は - $COOH$ あるいは - CH_2OH を表わし、

- S_b - は - $(U_2)_{n_1}$ - 、 - $(U_2 - U_5)_{n_2}$ - 、 あるいは - $(U_2 - U_5 - U_4)_{n_3}$ - を表わし、

S^*_{b} - は $H - (U_2)_{n_4}$ - 、 $H - (U_3 - U_2)_{n_5}$ - あるいは $H - (U_4 - U_3 - U_2)_{n_6}$ - を表わし、

$n_1, n_2, n_3, n_4, n_5, n_6$ は 0 と 1 から選択され、

L はリンカーであり、しかも

$n_1 = 1$ であれば、 $n_6 = 0$ であり、

30

$n_2 = 1$ であれば、 $n_5 = n_6 = 0$ であり、

$n_3 = 1$ であれば、 $n_4 = n_5 = n_6 = 0$ であり、

$n_4 = 1$ であれば、 $n_3 = 0$ であり、

$n_5 = 1$ であれば、 $n_2 = n_3 = 0$ であり、

$n_6 = 1$ であれば、 $n_1 = n_2 = n_3 = 0$ であるという条件付きである。

あるいは薬学的に許容されるこれらの塩であってもよい。

【0151】

好ましくは、リンカー - 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、この場合、

- L^a - は、 - $(CH_2)_n$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_n - C_2H_4$ - 、 - $(CH_2)_n$ -

40

50

- C H₂ - O) o - C H₂ - から選択され、
 - L^b - は、 - O - を表わし、
 - L^d - は、 - (C H₂)_q - 、 - (C F₂)_q - 、 - (C H₂ - C H₂ - O)_q - C₂
 H₄ - 、 - (C H₂ - C H₂ - O)_q - C H₂ - から選択され、
 - L^e - は、 - (C H₂)_{p1} - 、 - (C F₂)_{p1} - 、 - C₂H₄ - (O - C H₂ - C
 H₂)_{p1} - 、 - C H₂ - (O - C H₂ - C H₂)_{p1} - 及び - (C H₂)_{p1} - O - (C H₂)_{p2} - から選択され、

o、q、p1及びp2は相互に無関係に、1、2、3、4、5、及び6から選択される。

【0152】

従って、一般式(VII)、(VIIII)、あるいは(IX)の糖類においては、 10
 - 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、

- L^a - は、 - (C H₂)_o - 、 - (C H₂ - C H₂ - O)_o - C₂H₄ - 、 - (C H₂ - C H₂ - O)_o - C H₂ - から選択され、
 - L^b - は、 - O - を表わし、
 - L^d - は、 - (C H₂)_q - 、 - (C F₂)_q - 、 - (C H₂ - C H₂ - O)_q - C₂
 H₄ - 、 - (C H₂ - C H₂ - O)_q - C H₂ - から選択され、
 - L^e - は、 - (C H₂)_{p1} - 、 - (C F₂)_{p1} - 、 - C₂H₄ - (O - C H₂ - C
 H₂)_{p1} - 、 - C H₂ - (O - C H₂ - C H₂)_{p1} - 及び - (C H₂)_{p1} - O - (C H₂)_{p2} - から選択され、 20

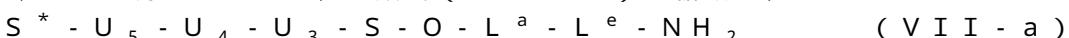
o、q、p1及びp2は相互に無関係に、1、2、3、4、5、及び6から選択されるのが特に好ましい。

【0153】

さらに好ましいのは一般式(VII)、(VIIII)、あるいは(IX)の糖類において、- L - が - (C H₂)_o - を表わし、oが2、3、4、5、6から選択される場合である。

【0154】

そして、さらに好ましいのは、一般式(VII-a)の糖類で、



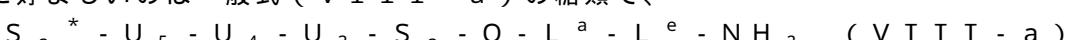
で示され、この場合、 30

- L^a - は、 - (C H₂)_o - 、 - (C H₂ - C H₂ - O)_o - C₂H₄ - 、 - (C H₂ - C H₂ - O)_o - C H₂ - から選択され、
 - L^e - は、 - C₂H₄ - (O - C H₂ - C H₂)_{p1} - 、 - C H₂ - (O - C H₂ - C
 H₂)_{p1} - 、 - (C H₂)_{p1} - 及び - (C H₂)_{p1} - O - (C H₂)_{p2} - から選
 択され、

S^{*}、S、o、p1、p2、U₅、U₄、及びU₃は本明細書で定義する意味を有している。

【0155】

さらに好ましいのは一般式(VIIII-a)の糖類で、



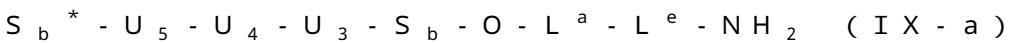
で示され、この場合、 40

- L^a - は、 - (C H₂)_o - 、 - (C H₂ - C H₂ - O)_o - C₂H₄ - 、 - (C H₂ - C H₂ - O)_o - C H₂ - から選択され、
 - L^e - は、 - C₂H₄ - (O - C H₂ - C H₂)_{p1} - 、 - C H₂ - (O - C H₂ - C
 H₂)_{p1} - 、 - (C H₂)_{p1} - 及び - (C H₂)_{p1} - O - (C H₂)_{p2} - から選
 択され、

S_a^{*}、S_a、o、p1、p2、U₅、U₄、及びU₃は本明細書で定義する意味を有している。

【0156】

また、さらに好ましいのは一般式(IX-a)の糖類で、 50



で示され、この場合、

- L^a - は、 - $(CH_2)_o$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_o$ - C_2H_4 - 、 - $(CH_2$

- $CH_2 - O)_o$ - CH_2 - から選択され、

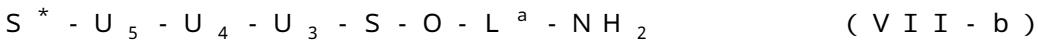
- L^e - は、 - C_2H_4 - $(O - CH_2 - CH_2)_{p1}$ - 、 - $CH_2 - (O - CH_2 - CH_2)_{p1}$ - 、及び - $(CH_2)_{p1}$ - $O - (CH_2)_{p2}$ - から選択され、

S_b^* 、 S_b 、 O 、 $p1$ 、 $p2$ 、 U_5 、 U_4 、及び U_3 は本明細書で定義する意味を有している。

【0157】

10

さらに好ましいのは、一般式 (VII - b) の糖類で、



で示され、この場合、

- L^a - は、 - $(CH_2)_{o1}$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o2}$ - C_2H_4 - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o2}$ - CH_2 - から選択され、

$o1$ は、2、3、4、5、及び6から選択される整数であり、

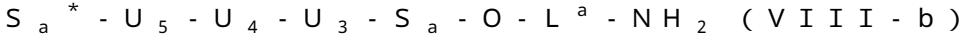
$o2$ は、1、2、3、4、5、及び6から選択される整数であり、

S^* 、 S 、 U_5 、 U_4 、及び U_3 は本明細書で定義する意味を有している。

【0158】

20

さらに好ましいのは、一般式 (VII - b) の糖類で、



で示され、この場合、

- L^a - は、 - $(CH_2)_{o1}$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o2}$ - C_2H_4 - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o2}$ - CH_2 - から選択され、

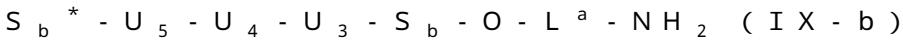
$o1$ は、2、3、4、5、及び6から選択される整数であり、

$o2$ は、1、2、3、4、5、及び6から選択される整数であり、

S^* 、 S_a 、 U_5 、 U_4 、及び U_3 は本明細書で定義する意味を有している。

【0159】

さらに好ましいのは、一般式 (IX - b) の糖類で、



30

で示され、この場合、

- L^a - は、 - $(CH_2)_{o1}$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o2}$ - C_2H_4 - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o2}$ - CH_2 - から選択され、

$o1$ 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り、

S_b^* 、 S_b 、 U_5 、 U_4 、及び U_3 は本明細書で定義する意味を有している。

【0160】

さらにより好ましいのは、一般式 (VII - c) の糖類で、



で示され、この場合、

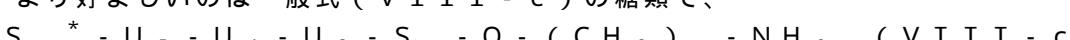
40

o は2、3、4、5、及び6から選択される整数であり、

S^* 、 S 、 U_5 、 U_4 、及び U_3 は本明細書で定義する意味を有している。

【0161】

また、より好ましいのは一般式 (VII - c) の糖類で、



)

で示され、この場合、

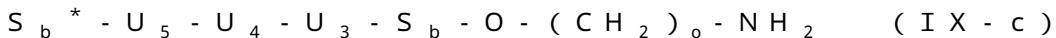
o は2、3、4、5、及び6から選択される整数であり、

S_a^* 、 S_a 、 U_5 、 U_4 、及び U_3 は本明細書で定義する意味を有している。

【0162】

50

また、より好ましいのは一般式 (IX-c) の糖類で、



で示され、この場合、

o は 2、3、4、5、及び 6 から選択される整数であり、

S_b^* 、 S_b 、 U_5 、 U_4 、及び U_3 は本明細書で定義する意味を有している。

【0163】

さらに別の好ましい実施形態においては、本発明による糖類は、以下のもので構成される群から選択される。

- D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - -
 D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 1) - (2 - 10
 アミノ) エタノール (60)
 - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4)
) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 1)
 - (2 - アミノ) エタノール (18)
 5 - アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - - D - グ
 ルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラ
 クトピラノシド (19)
 - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - -
 D - ガラクトピラノシル - (1 1) - (2 - アミノ) エタノール (62)
 5 - アミノ・ペントニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラ
 ノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラ
 ノシルウロン酸 (22)
 - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシルウロネート - (1
 4) - - D - グルコピラノシル - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D -
 ガラクトピラノシル - (1 1) - (2 - アミノ) エタノール (55)
 - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - -
 - D - グルコピラノシルウロネート - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4
) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 1)
 - (2 - アミノ) エタノール (57)
 4 - アミノ・ブチル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシ
 ル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル
 - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシド (30
 82)
 3 - アミノプロピル - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラ
 ノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシ
 ル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド (83)
 3 - アミノプロピル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラ
 ノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル
 - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド (40
 84)
 6 - アミノ・ヘキサニル - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコ
 ピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラ
 ノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド (85)
 3 - アミノプロピル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラ
 ノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル
 - (1 4) - - D - ガラクトピラノシド (86)
 4 - アミノブチル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル
 - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル -
 (1 4) - - D - グルコピラノシド (87) 50

4 - アミノブチル - D - グルコピラノシリ - (1 4) - - D - グルコピラノシリ - (1 4) - - D - ガラクトピラノシリ - (1 4) - - D - グルコピラノシド (8 8)

6 - アミノヘキサニル - D - ガラクトピラノシリ - (1 4) - - D - グルコピラノシリ - (1 4) - - D - グルコピラノシリ - (1 4) - - D - グルコピラノシド (8 9)

化学合成

本発明による糖類はいくつかの合成ルートで合成することができる。

【0164】

例えば、自動化固相合成によって、本発明の糖類はチオグリコシド構築ブロック B B 2 (糖フラグメント U₁、U₅、U₂、及び U₆ の前駆体)、B B 3 (糖フラグメント U₂、及び U₆ の前駆体)、B B 4 (糖フラグメント U₃、及び U₇ の前駆体)、及び B B 5 (糖フラグメント U₄ の前駆体)、そして、機能化された固体支持体 B B 1 (Angew. Chem. Int. Ed. 2013, 52, 5858) (スキーム 1 参照) から開始することで合成することができる。

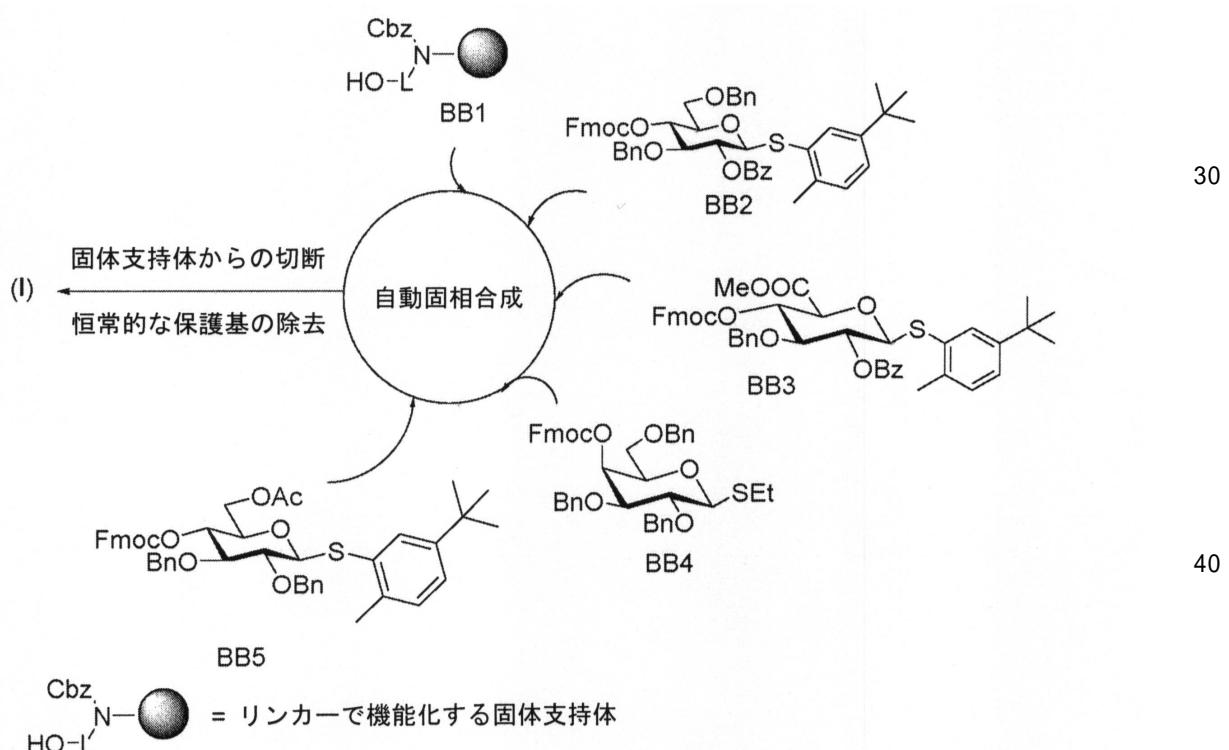
【0165】

スキーム 1 に要約的に示してある合成プロセスは以下の工程を含んでいる。

- ・ 望ましいオリゴ糖類の調製は、
- ・ N S / T f O N で活性化されることによる適切なチオグリコシド (B B 2、B B 3、B B 4 あるいは B B 5) によるグリコシリ化、
- ・ その後に、E t₃ N による処理で一時的な保護基 E m o c の除去、
- ・ 固体支持体からの切断、及び
- ・ 恒常的な保護基の除去を含む。

【0166】

【化31】



【0167】

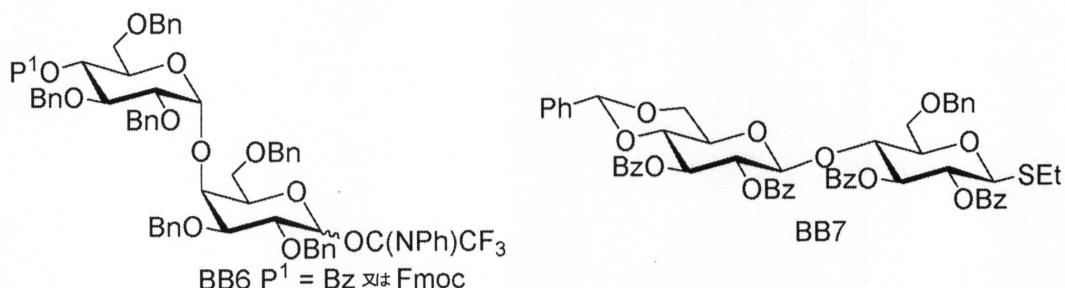
スキーム 1: 一般式 (I) の糖類の自動固相合成

別的方式として、一般式 (I) の糖類を得るために、オリゴ糖の液相合成を用いること

もできる。この合成プロセスを速めるために、BB6 及び BB7 などの二糖類形成プロックを延長ユニットとして用いるのが好ましい。

【0168】

【化32】



10

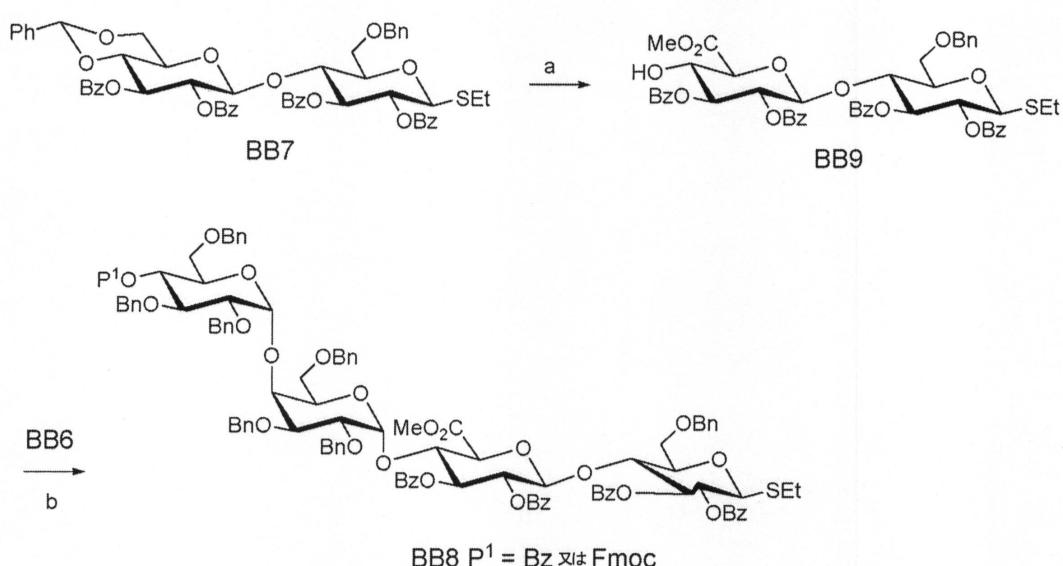
【0169】

一般式(I)のより高級な糖類を得るために、スキーム2に従って、二糖類BB6及びBB7から開始して容易に得られる四糖類BB8などのより延長されたユニットを用いるのが便利であることは、当業者なら理解出来るであろう。従って、二糖類BB7のベンジリデンアセタールはEtSH、p-TsOHを用いた処理で除去して中間的なジオールを得て、それをさらにBAIB及びTempoを用いた位置選択的な酸化を行い、さらに、新しく形成されたカルボン酸をエステル化して二次アルコールBB9を得る。アルコールBB9はさらに二糖類BB6を用いてグルコシル化反応をさせて、延長ユニットとして用いることが出来る四糖類BB8を得ることが出来る。都合がよいことに、-グルコシド構成単位のC-4位置のヒドロキシル基を直交Fmoc保護基で防御してさらなるグルコシル化反応を期待して選択的除去を可能にすることができる。しかしながら、-グルコシド構成単位が非還元性で末端の单糖を構成する場合には、ベンゾエート・エステルとしてC-4位のヒドロキシ基を保護することで合成がより迅速に行われるであろう。

20

【0170】

【化33】



30

40

【0171】

スキーム2：四糖類反復単位BB8. a. i. EtSH、p-TsOH；i i. BAIB、Tempo；i i i. TMS-CHN₂；b. BB6、TMSOTf、Et₂O/DCMの合成。

50

【0172】

マイクロアレイ

図4に示すように、式(I)、(I-a)-(I-c)、(II)、(II-a)-(II-g)、(III)、(III-a)-(III-g)、(IV)、(IV-a)-(IV-g)、(V)、(V-a)-(V-c)、(VI)、(VI-a)-(VI-c)、(VII)、(VII-a)-(VII-c)、(VIII)、(VIII-a)-(VIII-c)の新しい化合物、特に糖類10、18、19、20、21、22、55、57、60及び62-89の糖類は、SP-8天然多糖類と共にエピトープを含んでいる。これらの合成オリゴ糖類をN-ヒドロキシサクシンイミド-機能化ガラス・スライド上に印刷して、天然のSP8バクテリア(タイプ8抗血清、SSI Diagnostics, 図4(D))に対するウサギ抗血清あるいはPneumovax23(登録商標)(「007sp」、National Institute for Biological Standards and Control(国立生物基準管理研究所)、図4(B)、(C))によってワクチン化されたヒトの結合血清によって培養した。ウサギ抗血清の方は、すべてのプリントされた四糖類の認識を示したが(図4(D)、Pneumovax23(登録商標)でワクチン化されたヒトからの抗血清は、化合物19、20、22及び18を認識しただけであった(図4(B)及び4(C)参照)。糖類19及び18とPneumovax23(登録商標)でワクチン化されたヒトからの抗血清との間では、しっかりした相互作用が認められる。SP-8天然多糖類による培養は、結合を抑制した(図4(B)及び4(C)参照)。これらのデータは抗SP-8 CPS抗体への結合に向けて四糖類18、19、及び20の特殊性及び交差反応性を示している。

【0173】

マイクロアレイ分析は糖類19、20、21及び22に対するmAb 28H11(防御的なマウスIgM)の結合の評価も可能にする(図12参照)。MAb 28H11は、天然の肺炎連鎖球菌タイプ8に対して発生したマウスIgMであって、マウスを種々の状況で生きた肺炎連鎖球菌タイプ8肺炎球菌の感染から防御する(Yano and Pirofski(2011), Clin. Vaccine Immunol. 18(1). 59-66)。グリカン・マイクロアレイ分析は、天然の肺炎連鎖球菌タイプ8CPSにより最大で10 μg/mLの濃度で結合が切断されることに示されるように、mAb 28H11が肺炎連鎖球菌タイプ8に特有の糖類19と強い相互作用をすることを明らかにした。(図12参照)

グリコ接合体

本発明の別の側面は、-O-L-NH₂基の窒素原子を通じて免役原性担体に結合した、あるいは共有結合した一般式(I)の合成糖類を含んだ接合体に向けられている。言い換れば、本発明の別の側面は、-O-L-NH₂基の窒素原子を通じて免役原性担体に結合した、一般式(I)、(I-a)-(I-c)、(II)、(II-a)-(II-g)、(III)、(III-a)-(III-g)、(IV)、(IV-a)-(IV-g)、(V)、(V-a)-(V-c)、(VI)、(VI-a)-(VI-c)、(VII)、(VII-a)-(VII-c)、(VIII)及び(VIII-a)-(VIII-c)のいずれかの糖類に向けられている。従って、-O-L-NH₂基の窒素原子を通じて免役原性担体と結合した、あるいは共有結合した一般式(I)、(I-a)-(I-c)、(II)、(II-a)-(II-g)、(III)、(III-a)-(III-g)、(IV)、(IV-a)-(IV-g)、(V)、(V-a)-(V-c)、(VI)、(VI-a)-(VI-c)、(VII)、(VII-a)-(VII-c)、(VIII)または(VIII-a)-(VIII-c)は、また一般式(I)、(I-a)-(I-c)、(II)、(II-a)-(II-g)、(III)、(III-a)-(III-g)、(IV)、(IV-a)-(IV-g)、(V)、(V-a)-(V-c)、(VI)、(VI-a)-(VI-c)、(VII)、(VII-a)-(VII-c)、(VIII)及び(VIII-a)-(VIII-c)は、また一般式(I)、(I-a)-(I-c)、(II)、(II-a)-(II-g)、(III)、(III-a)-(III-g)、(IV)、(IV-a)-(IV-g)、(V)、(V-a)-(V-c)、(VI)、(VI-a)-(VI-c)、(VII)、(VII-a)-(VII-c)、(VIII)及び(VIII-a)-(VIII-c)。

VII-c)、(VIIII)、(VIII-a) - (VIIII-c)、(IX)及び(I
X-a) - (IX-c)のいずれかの糖類を免疫原性担体と反応させて得られる接合体と定義することもできる。上記の接合体は、肺炎連鎖球菌血清タイプ8バクテリアに関連した疾病に対する免疫化のためのワクチンとして効果的であることが分かった。

【0174】

糖類は当業者には一般にTI-2(T細胞独立-2)抗原及び弱免疫原として知られている。TI-2抗原は、表面が露出されている免疫グロブリンの交差結合を通じて成熟B細胞によってのみ認識される抗原である。T細胞の助けなしでは、免疫的記憶は発生されず、IgMから他のIgGサブクラスへのアイソタイプ交換もB細胞親和性成熟も起きない。さらに、糖類はヒトの糖脂質及び糖タンパク質との構造的な類似性の故に、ヒトにおける弱免疫原として知られている。それらの弱免疫原性の故に、糖類はB細胞による抗体生産と記憶細胞の形成の両方を発生させる能力が弱く、これらの特徴は強力なワクチンを生産するためには必須である。

10

【0175】

従って、糖類を基にした強力なワクチンを生産するために、一般式(I)、(I-a) - (I-c)、(II)、(II-a) - (II-g)、(III)、(III-a) - (III-g)、(IV)、(IV-a) - (IV-c)、(V)、(V-a) - (V-c)、(VI)、(VI-a) - (VI-c)、(VII)、(VII-a) - (VII-c)、(VIII)、(VIII-a) - (VIII-c)、(IX)または(IX-a) - (IX-c)のいずれかの糖類を免疫原性担体と接合させて、それらの糖類と比較して免疫原性が増強された接合体をつくりだす。

20

【0176】

そうした接合体は、一般式(I)、(I-a) - (I-c)、(II)、(II-a) - (II-g)、(III)、(III-a) - (III-g)、(IV)、(IV-a) - (IV-g)、(V)、(V-a) - (V-c)、(VI)、(VI-a) - (VI-c)、(VII)、(VII-a) - (VII-c)、(VIII)、(VIII-a) - (VIII-c)、(IX)または(IX-a) - (IX-c)の少なくとも1つの合成糖類と、一般式(I)、(I-a) - (I-c)、(II)、(II-a) - (II-g)、(III)、(III-a) - (III-g)、(IV)、(IV-a) - (IV-g)、(V)、(V-a) - (V-c)、(VI)、(VI-a) - (VI-c)、(VII)、(VII-a) - (VII-c)、(VIII)、(VIII-a) - (VIII-c)、(IX)または(IX-a) - (IX-c)の少なくとも1つの合成糖類が共有結合で結合された免疫原性担体で構成されている。

30

【0177】

驚くべきことに、本発明による接合体で免疫化を行うと、本発明による糖類の炭水化物部分に特異的に力価の抗体が形成されることが見いだされた。こうした抗体は自然のSP-8多糖類と交差反応してオプソニン作用及び殺菌活性を示し、従って、肺炎連鎖球菌血清タイプ8バクテリアに対する防御性を発生させる。本発明の接合体によって放出されるモノクローナル抗体と肺炎連鎖球菌血清タイプ8バクテリアの間の相互作用は特殊なもので、それは、抗体アイソタイプ制御あるいは肺炎連鎖球菌血清タイプ1あるいは3に対しては結合は観察できないからである(図8、9及び10参照)

40

本明細書の文脈においては、「免疫原性担体」とは糖類に接合されて、その糖自体と比較して免疫原性が増強された接合体を形成する構造と定義される。従って、一般式(I)、(I-a) - (I-c)、(II)、(II-a) - (II-g)、(III)、(III-a) - (III-g)、(IV)、(IV-a) - (IV-g)、(V)、(V-a) - (V-c)、(VI)、(VI-a) - (VI-c)、(VII)、(VII-a) - (VII-c)、(VIII)、(VIII-a) - (VIII-c)、(IX)または(IX-a) - (IX-c)で示される糖類の上記免疫原性担体との接合は、上記免疫原性担体に対する免疫応答を起こさずに、一般式(I)、(I-a) - (I-c)、(II)、(II-a) - (II-g)、(III)、(III-a) - (III-g)、

50

(IV)、(IV-a) - (IV-g)、(V)、(V-a) - (V-c)、(VI)、
(VI-a) - (VI-c)、(VII)、(VII-a) - (VII-c)、(VII
I)、(VII-a) - (VII-c)、(IX)または(IX-a) - (IX-c)
で示される糖類に対する免疫応答を刺激するという効果を有している。

【0178】

好ましい免疫原性担体は免疫調整能力を有する担体タンパク質あるいは糖スフィンゴ脂質である。当業者にとっては、担体タンパク質は以下などを含む、あるいはそれから構成される群から選ばれたタンパク質である：ジフテリア・トキソイド、変異したジフテリア・トキソイド、修正されたジフテリア・トキソイド、変異修正させたジフテリア・トキソイド、破傷風トキソイド、修正破傷風トキソイド、変異破傷風トキソイド、外膜タンパク質(OMP)、仔ウシ血清アルブミン(BSA)、キイホール・リンペット・ヘモシアニン(KLH)あるいはコレラ・トキソイド(CT)。本明細書で使われている「トキソイド」という用語は細菌性毒素(通常はエキソトキシンと表現される)を指しており、それらの毒性は化学(ホルマリン)あるいは熱処理で非活性化あるいは抑制されているが、その他の特性、通常は免疫原性は維持されている。本明細書で用いられている変異トキソイドとは遺伝子組み換え細菌性毒素のことであり、野生タイプのアミノ酸配列を修正して、毒性を低くするかあるいは無毒性にされている。そうした変異は1つか2つのアミノ酸の置換でもよい。そうした変異トキソイドはその表面で相互接続分子の機能基Yと反応して修正トキソイドを提供することができる機能性を有している。そうした機能性は当業者には知られており、還元剤の存在の下で活性化されたエステル、イソシアネート基あるいはアルデヒドと反応することができるリシン残基の主要アミノ機能性、カルボジイミドによって活性化させることができるグルタメートやアスパルテートのカルボキシレート機能性、あるいはシステイン残基のチオール機能性などがあるが、これらの機能性だけに限定されるものではない。

【0179】

活性化工エステルは、N-(y-マレイミドブチリロキシ)スルフォサクシンイミド・エステル(スルホ-GMBS)、サクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(スルホ-SIAB)、サクシンイミジル-3-(プロモアセトアミド)プロピオネート(SBAP)、ジサクシンイミジル・グルタネート(DSG)、ジサクシンイミジル・アジペート(DSA)、2-ピリジルジチオール・テトラオキサテトラデカン-N-ヒドロキシサクシンイミド(PEG-4-SPDP)、ビス-(4-ニトロフェニル)アジペート及びビス-(4-ニトロフェニル)サクシネートなどがあるが、これらに限定されない(図1参照)。好ましい活性化工エステルは、ジサクシンイミジル・アジペート(DSA)、ジサクシンイミジル・グルタネート(DSG)、ビス-(4-ニトロフェニル)アジペート及びビス-(4-ニトロフェニル)サクシネートである。

【0180】

担体タンパク質上のシステイン残基は対応するデヒドロアラニンに変換することができ、これをさらに適切な中間接続分子と反応させて、その表面に中間接続分子の機能基Xを有する修正担体タンパク質を提供することができる。

【0181】

本明細書に述べられている本発明の糖類は機能性としてリシン残基の主要アミン機能性を示す非毒性変異ジフテリア毒素CRM₁₉₇に接合されるのが特に好ましい。

CRM₁₉₇のような野生タイプのジフテリア毒素は、535個のアミノ酸(58kD)の単一ポリペプチド鎖であり、この単一ポリペプチド鎖は、グルタミン酸をグリシンに置換した単一の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つのサブユニットで構成される。Prevnarなど多数の公認の混合ワクチンにおいて、それは担体タンパク質として利用されている。

【0182】

このように、本発明の好ましい実施形態では、上記担体タンパク質は、その表面においてリシン残基の主要アミノ機能性を示し、リシン残基の主要アミノ機能性は、中間接続分

10

20

30

40

50

子の機能基Yと反応して中間接続分子の前記機能基Xを表面上に有する修正担体タンパク質を提供することができ、それはリンカーの端末アミノ基と反応して、本発明の糖類を機能化することができる。

【0183】

中間接続分子の上記機能基Xは、マレイミド、-ヨードアセチル、-ブロモアセチル、及びN-ヒドロキシサクシンイミド・エステル(NHS)、アルデヒド、イミドエステル、カルボキシル酸、アルキル・スルホネート、スルホニル塩化物、エポキシド、無水物、炭酸塩などを含む、あるいはそれらから構成される群から選択される。(図2参照)

一般式(X)の接合体が好ましく、

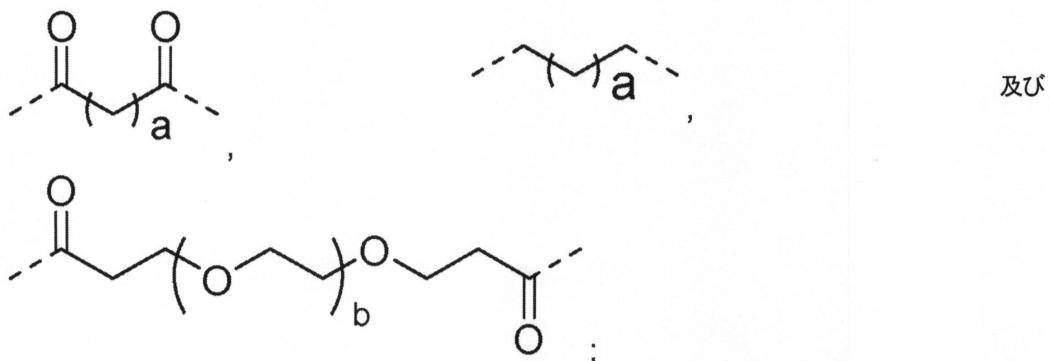
[V* - U_{x+3} - U_{x+2} - U_{x+1} - U_x - O - L - NH - W]_m - CRM₁₉₇ (10
X)

この場合、mは2から18の間であり、

-W-は以下から選択され、

【0184】

【化34】



20

【0185】

aは1から10までの整数であり、

bは1から4の整数であり、

V*、U_{x+3}、U_{x+2}、U_{x+1}、U_x、X、Lは本明細書で定義されている意味を有する。

30

【0186】

好ましくは、リンカー-L-は、-L^a-、-L^a-L^e-、L^a-L^b-L^e-及びL^a-L^d-L^e-から選択され、

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

-L^b-は、-O-を表わし、

-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}及び-(CH₂)_{p1}-O-(CH₂)_{p2}-から選択され、

o、q、p1及びp2は相互に無関係に1、2、3、4、5及び6から選択される整数である。

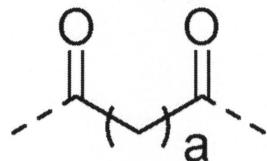
【0187】

また、-W-は、以下を表すのが好ましく、

【0188】

40

【化35】



【0189】

さらに a が、 2 , 3 , 4 , 5 及び 6 から選択される整数であることが特に好ましい。

従って、一般式 (X) の接合体で、この場合、

10

リンカ - L - は、 - L^a - 、 - L^a - L^e - 、 L^a - L^b - L^e - 及び L^a - L^d - L^e - から選択され、

- L^a - は、 - (C₂H₄)_o - 、 - (C₂H₂ - C₂H₂ - O)_o - C₂H₄ - 、 - (C₂H₂ - C₂H₂ - O)_o - C₂H₂ - から選択され、

- L^b - は、 - O - を表わし、

- L^d - は、 - (C₂H₂)_q - 、 - (C₂F₂)_q - 、 - (C₂H₂ - C₂H₂ - O)_q - C₂H₄ - 、 及び - (C₂H₂ - C₂H₂ - O)_q - C₂H₂ - から選択され、

- L^e - は、 - (C₂H₂)_{p1} - 、 - (C₂F₂)_{p1} - 、 - C₂H₄ - (O - C₂H₂ - C₂H₂)_{p1} - 、 - C₂H₂ - (O - C₂H₂ - C₂H₂)_{p2} - 及び - (C₂H₂)_{p1} - O - (C₂H₂)_{p2} - から選択され、

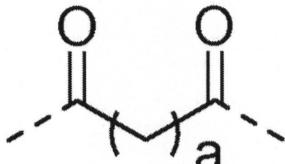
20

o、q、p1 及び p2 は相互に無関係に 1、2、3、4、5 及び 6 から選択される整数であり、

- W - は、以下を表すのが好ましく、

【0190】

【化36】



30

【0191】

さらに a が、 2 , 3 , 4 , 5 及び 6 から選択される整数であることが特に好ましい。

さらにより好ましいのは一般式 (X) の接合体で、この場合、 x は 3 を表す。従って、一般式 (XI) の接合体で、

[V^{*} - U₆ - U₅ - U₄ - U₃ - O - L - N H - W]_m - C R M₁₉₇
(XI)

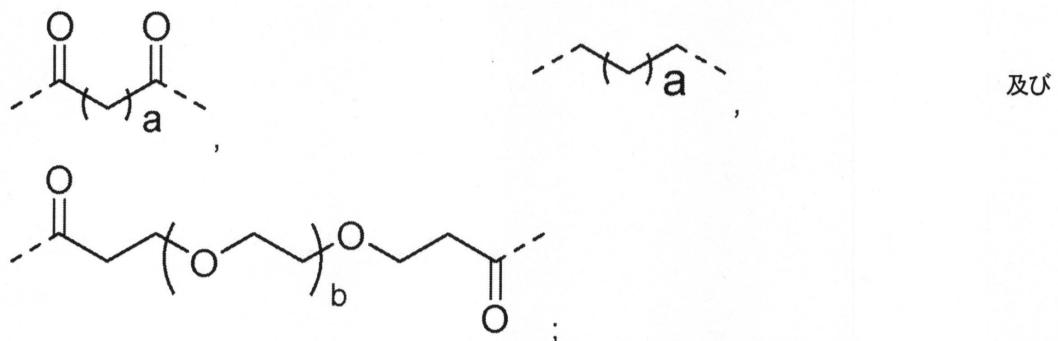
この場合、 m は 2 から 18 の間であり、

- W - は以下から選択され、

40

【0192】

【化37】

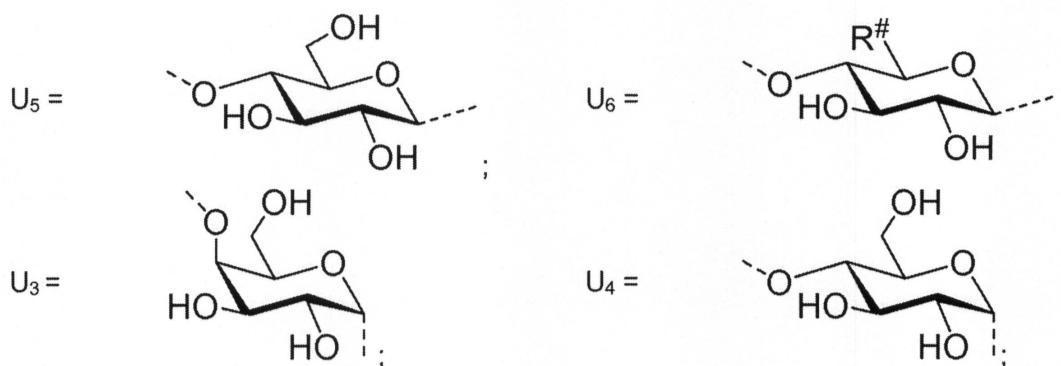


【0193】

a は 1 から 10 までの整数であり、
 b は 1 から 4 の整数であり、

【0194】

【化38】



【0195】

V^* は H^- 、 $H - U_3$ - あるいは $H - U_4 - U_3$ - を示し、
 $R^{\#}$ は $-COOH$ あるいは $-CH_2OH$ を示し、そして
 L は a リンカーであることが特に好ましい。

【0196】

好ましくは、一般式 (X I) では、
 リンカー - L - は、 - L^a - 、 - $L^a - L^e$ - 、 - $L^a - L^b - L^e$ - 及び - $L^a - L^d - L^e$ - から選択され、
 - L^a - は、 - $(CH_2)_o$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_o - C_2H_4$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_o - CH_2$ - から選択され、
 - L^b - は、 - O - を表わし、
 - L^d - は、 - $(CH_2)_q$ - 、 - $(CF_2)_q$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_q - C_2H_4$ - 及び - $(CH_2 - CH_2 - O)_q - CH_2$ - から選択され、
 - L^e - は、 - $(CH_2)_{p1}$ - 、 - $(CF_2)_{p1}$ - 、 - $C_2H_4 - (O - CH_2 - CH_2)_{p1}$ - 及び - $(CH_2)_{p1} - O - (CH_2)_{p2}$ - から選択され、
 o 、 q 、 $p1$ 及び $p2$ は相互に無関係に 1、 2、 3、 4、 5 及び 6 から選択される整数であり、
 - W - は、以下を表すのが好ましく、

【0197】

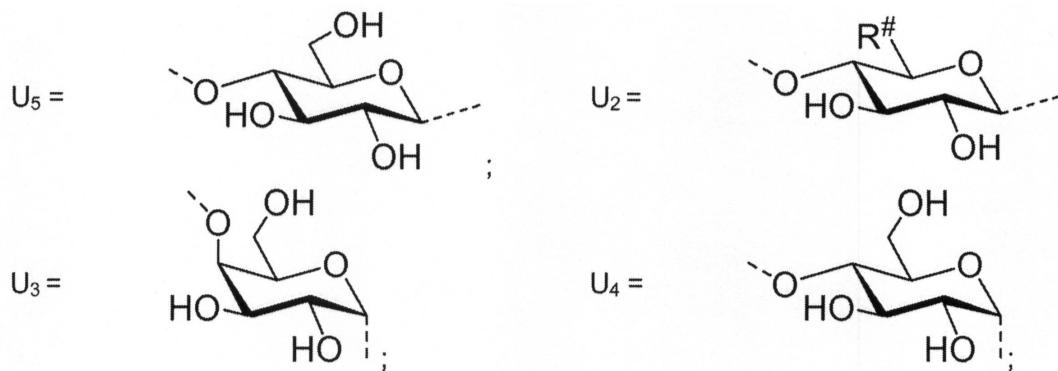
30

40

50

【0204】

【化42】



10

【0205】

$R^{\#}$ は、 $-COOH$ あるいは $-CH_2OH$ を表わし、
 $-S-$ は、 $-S_a$ あるいは $-S_b$ を表わし、
 $-S_a-$ は、 $- (U_5)_{n_1}-$ 、 $- (U_5 - U_4)_{n_2}-$ あるいは $- (U_5 - U_4 - U_3)_{n_3}-$ を表わし、
 $-S_b-$ は、 $- (U_2)_{n_1}-$ 、 $- (U_2 - U_5)_{n_2}-$ あるいは $- (U_2 - U_5 - U_4)_{n_3}-$ を表わし、
 S^*- は、 S^*_{a} あるいは S^*_{b} を表わし、
 $S^*_{a}-$ は、 $H - (U_3)_{n_4}-$ 、あるいは $H - (U_4 - U_3)_{n_5}-$ を表わし、
 $S^*_{b}-$ は、 $H - (U_2)_{n_4}-$ 、 $H - (U_3 - U_2)_{n_5}-$ 、あるいは $H - (U_4 - U_3 - U_2)_{n_6}-$ を表わし、
 n_1, n_2, n_3, n_4, n_5 、及び n_6 は、0 及び 1 から選択され、
 L はリンカーであるが、以下のことを前提にしている。
 $-S-$ が $-S_a-$ を示す場合、 S^*- は S^*_{a} を表わし、
 $-S-$ が $-S_b-$ を示す場合、 S^*- は S^*_{b} を表わし、
 $n_1 = 1$ であれば、 $n_6 = 0$ であり、
 $n_2 = 1$ であれば、 $n_5 = n_6 = 0$ であり、
 $n_3 = 1$ であれば、 $n_4 = n_5 = n_6 = 0$ であり、
 $n_4 = 1$ であれば、 $n_3 = 0$ であり、
 $n_5 = 1$ であれば、 $n_2 = n_3 = 0$ であり、
 $n_6 = 1$ であれば、 $n_1 = n_2 = n_3 = 0$ である。

20

【0206】

さらに好ましい接合体は、一般式 $(XIII)$ の接合体で、
 $[S_b^* - U_5 - U_4 - U_3 - S_b - O - L - NH - W]_m - CRM_{197}$
 $(XIII)$

30

この場合、 m は 2 から 18 の範囲であり、 $-W-$ は、以下から選択され、

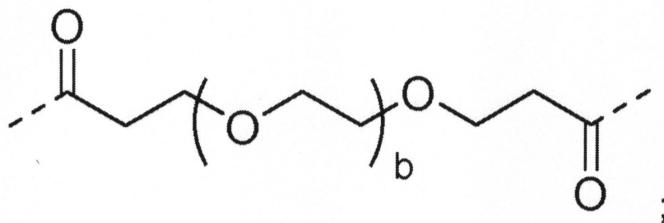
40

【0207】

【化43】



及び



10

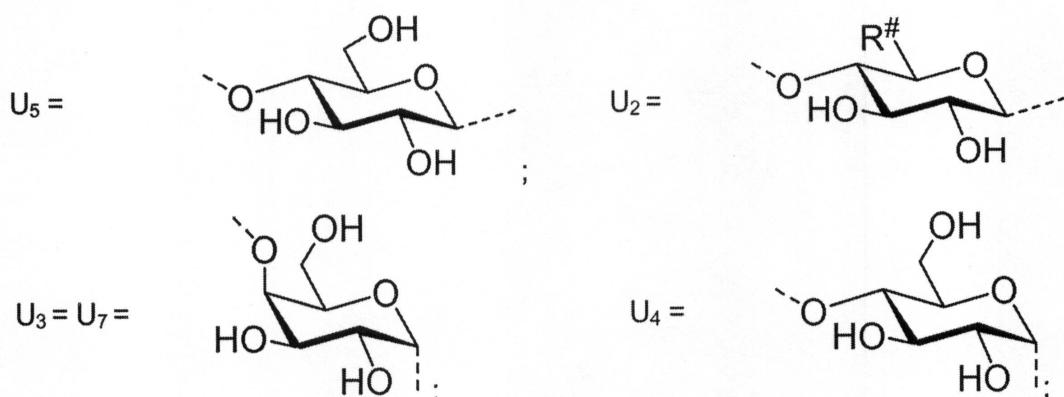
【0208】

さらに、aは、1から10までの整数であり、

bは、1から4までの整数であり、

【0209】

【化44】



20

30

【0210】

$R^{\#}$ は、 $-COOH$ あるいは $-CH_2OH$ を表わし、

$-S_b-$ は、 $-(U_2)_{n_1}-$ 、 $-(U_2-U_5)_{n_2}-$ あるいは $-(U_2-U_5-U_4)_{n_3}-$ を表わし

S_b^* は、 $H-(U_2)_{n_4}-$ 、 $H-(U_3-U_2)_{n_5}-$ 、あるいは $H-(U_4-U_3-U_2)_{n_6}-$ を表わし、

n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、及び n_6 は、0及び1から選択され、

L はリンカーであるが、以下のことを前提にしている。

$n_1 = 1$ であれば、 $n_6 = 0$ であり、

$n_2 = 1$ であれば、 $n_5 = n_6 = 0$ であり、

$n_3 = 1$ であれば、 $n_4 = n_5 = n_6 = 0$ であり、

$n_4 = 1$ であれば、 $n_3 = 0$ であり、

$n_5 = 1$ であれば、 $n_2 = n_3 = 0$ であり、

$n_6 = 1$ であれば、 $n_1 = n_2 = n_3 = 0$ である。

【0211】

好ましくは、リンカー $-L-$ は、 $-L^a-$ 、 $-L^a-L^e-$ 、 $-L^a-L^b-L^e-$ 及び $-L^a-L^d-L^e-$ から選択され、

$-L^a-$ は、 $-(CH_2)_0-$ 、 $-(CH_2-CH_2-O)_0-C_2H_4-$ 、 $-(CH_2-$

40

50

- C H₂ - O)_o - C H₂ - から選択され、
 - L^b - は、 - O - を表わし、
 - L^d - は、 - (C H₂)_q - 、 - (C F₂)_q - 、 - (C H₂ - C H₂ - O)_q - C₂
 H₄ - 、 及び - (C H₂ - C H₂ - O)_q - C H₂ - から選択され、
 - L^e - は、 - (C H₂)_{p1} - 、 - (C F₂)_{p1} - 、 - C₂H₄ - (O - C H₂ - C
 H₂)_{p1} - 、 - C H₂ - (O - C H₂ - C H₂)_{p1} - 及び - (C H₂)_{p1} - O - (C H₂)_{p2} - から選択され、
 o、q、p1及びp2は相互に無関係に1、2、3、4、5及び6から選択される整数である。

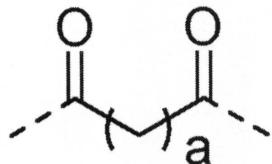
【0212】

10

また - W - は、以下を表すのが好ましく、

【0213】

【化45】



20

【0214】

さらに a が、2、3、4、5及び6から選択される整数であることが特に好ましい。

従って、一般式 (XII) あるいは (XIII) の接合体では、

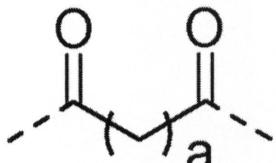
リンカ - L - は、 - L^a - 、 - L^a - L^e - 、 - L^a - L^b - L^e - 及び - L^a - L^d
 - L^e - から選択され、
 - L^a - は、 - (C H₂)_o - 、 - (C H₂ - C H₂ - O)_o - C₂H₄ - 、 - (C H₂
 - C H₂ - O)_o - C H₂ - から選択され、
 - L^b - は、 - O - を表わし、
 - L^d - は、 - (C H₂)_q - 、 - (C F₂)_q - 、 - (C H₂ - C H₂ - O)_q - C₂
 H₄ - 、 及び - (C H₂ - C H₂ - O)_q - C H₂ - から選択され、
 - L^e - は、 - (C H₂)_{p1} - 、 - (C F₂)_{p1} - 、 - C₂H₄ - (O - C H₂ - C
 H₂)_{p1} - 、 - C H₂ - (O - C H₂ - C H₂)_{p1} - 及び - (C H₂)_{p1} - O - (C H₂)_{p2} - から選択され、

o、q、p1及びP2は相互に無関係に1、2、3、4、5及び6から選択される整数であり、

また、 - W - が以下を表わし、

【0215】

【化46】



40

【0216】

さらに、a が2、3、4、5、及び6から選択される整数であることが特に好ましい。

一般式 (XII) あるいは (XIII) の接合体が特に好ましく、

この場合、リンカ - L - は - (C H₂)_o - を表わし、

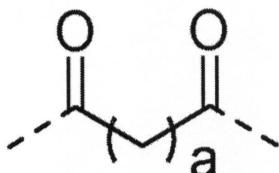
o は、2、3、4、5及び6から選択される整数であり、

50

また、-W- が以下を表わし、

【0217】

【化47】



10

【0218】

さらに、a が 2、3、4、5、及び 6 から選択される整数であることが特に好ましい。

さらにより好ましくは、一般式 (X-a) の接合体で、

$[V^* - U_{x+3} - U_{x+2} - U_{x+1} - U_x - O - L^a - L^e - NH - W]_m - CRM_{197}$
(X-a)

この場合、

- L^a - は、- $(CH_2)_0$ -、- $(CH_2 - CH_2 - O)_0$ - C_2H_4 -、- $(CH_2 - CH_2 - O)_0$ - CH_2 - から選択され、

- L^e - は、- C_2H_4 - $(O - CH_2 - CH_2)_{p1}$ -、- CH_2 - $(O - CH_2 - CH_2)_{p1}$ -、- $(CH_2)_{p1}$ - 及び - $(CH_2)_{p1} - O - (CH_2)_{p2}$ - から選択され、

V^* 、 x 、 m 、 o 、 $p1$ 、 $p2$ 、 Ux 、 U_{x+1} 、 U_{x+2} 、 U_{x+3} 及び CRM_{197} は、本明細書で定義する意味を有する。

【0219】

また、さらに好ましくは、一般式 (XI-a) の接合体で、

$[V^* - U_6 - U_5 - U_4 - U_3 - O - L^a - L^e - NH - W]_m - CRM_{197}$
(XI-a)

この場合、

- L^a - は、- $(CH_2)_0$ -、- $(CH_2 - CH_2 - O)_0$ - C_2H_4 -、- $(CH_2 - CH_2 - O)_0$ - CH_2 - から選択され、

- L^e - は、- C_2H_4 - $(O - CH_2 - CH_2)_{p1}$ -、- CH_2 - $(O - CH_2 - CH_2)_{p1}$ -、- $(CH_2)_{p1}$ - 及び - $(CH_2)_{p1} - O - (CH_2)_{p2}$ - から選択され、

V^* 、 x 、 m 、 o 、 $p1$ 、 $p2$ 、 U_6 、 U_5 、 U_4 、 U_3 及び CRM_{197} は、本明細書で定義する意味を有する。

【0220】

また、より好ましくは、一般式 (XII-a) の接合体で、

$[S^* - U_5 - U_4 - U_3 - S - O - L^a - L^e - NH - W]_m - CRM_{197}$
(XII-a)

この場合、

- L^a - は、- $(CH_2)_0$ -、- $(CH_2 - CH_2 - O)_0$ - C_2H_4 -、- $(CH_2 - CH_2 - O)_0$ - CH_2 - から選択され、

- L^e - は、- C_2H_4 - $(O - CH_2 - CH_2)_{p1}$ -、- CH_2 - $(O - CH_2 - CH_2)_{p1}$ -、- $(CH_2)_{p1}$ - 及び - $(CH_2)_{p1} - O - (CH_2)_{p2}$ - から選択され、

S^* 、 S 、 m 、 o 、 $p1$ 、 $p2$ 、 U_5 、 U_4 、 U_3 と CRM_{197} は、本明細書で定義する意味を有する。

【0221】

また、より好ましくは、一般式 (XIII-a) の接合体で、

$[S_b^* - U_5 - U_4 - U_3 - S_b - O - L^a - L^e - NH - W]_m - CRM_{197}$

40

50

(X III - a)

この場合、

- L^a - は、 - $(CH_2)_{o_1}$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - C_2H_4 - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - CH_2 - から選択され、
- L^e - は、 - C_2H_4 - $(O - CH_2 - CH_2)_{p_1}$ - 、 - CH_2 - $(O - CH_2 - CH_2)_{p_1}$ - 及び - $(CH_2)_{p_1}$ - O - $(CH_2)_{p_2}$ - から選択され、

S_b^* 、 S_b 、 m 、 o 、 p_1 、 p_2 、 U_5 、 U_4 、 U_3 と CRM_{197} は、本明細書で定義する意味を有する。

【0222】

10

さらに好ましくは、一般式 $(X - b)$ の接合体で、

$$[V^* - U_{x+3} - U_{x+2} - U_{x+1} - U_x - O - L^a - NH - W]_m - CRM_{197}$$

7

(X - b)

この場合、

- L^a - は、 - $(CH_2)_{o_1}$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - C_2H_4 - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - CH_2 - から選択され、
- o_1 は 2、3、4、5 及び 6 から選択される整数であり、
- o_2 は 1、2、3、4、5 及び 6 から選択される整数であり、

V^* 、 x 、 m 、 U_x 、 U_{x+1} 、 U_{x+2} 、 U_{x+3} 及び CRM_{197} は、本明細書で定義する意味を有する。

【0223】

20

さらに好ましくは、一般式 $(XI - b)$ の接合体で、

$$[V^* - U_6 - U_5 - U_4 - U_3 - O - L^a - NH - W]_m - CRM_{197}$$

(XI - b)

この場合、

- L^a - は - $(CH_2)_{o_1}$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - C_2H_4 - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - CH_2 - を表わし、

o_1 は 2、3、4、5 及び 6 から選択される整数であり、

o_2 は 1、2、3、4、5 及び 6 から選択される整数であり、

V^* 、 x 、 m 、 U_6 、 U_5 、 U_4 、 U_3 及び CRM_{197} は、本明細書で定義する意味を有する。

【0224】

30

また、さらに好ましくは、一般式 $(XII - b)$ の接合体で、

$$[S^* - U_5 - U_4 - U_3 - S - O - L^a - NH - W]_m - CRM_{197}$$

(XII - b)

この場合、

- L^a - は - $(CH_2)_{o_1}$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - C_2H_4 - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - CH_2 - を表わし、

o_1 は 2、3、4、5 及び 6 から選択される整数であり、

o_2 は 1、2、3、4、5 及び 6 から選択される整数であり、

S^* 、 S 、 m 、 U_5 、 U_4 、 U_3 及び CRM_{197} は、本明細書で定義する意味を有する。

【0225】

40

さらに好ましくは、一般式 $(XIII - b)$ の接合体で、

$$[S_b^* - U_5 - U_4 - U_3 - S_b - O - L^a - NH - W]_m - CRM_{197}$$

(XIII - b)

この場合、

- L^a - は - $(CH_2)_{o_1}$ - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - C_2H_4 - 、 - $(CH_2 - CH_2 - O)_{o_2}$ - CH_2 - を表わし、

50

○ 1 は 2 、 3 、 4 、 5 及び 6 から選択される整数であり、
 ○ 2 は 1 、 2 、 3 、 4 、 5 及び 6 から選択される整数であり、
 S_b^* 、 S_b 、 m 、 U_5 、 U_4 、 U_3 及び CRM_{197} は、本明細書で定義する意味を有する。

【 0 2 2 6 】

さらに好ましくは、一般式 ($X - c$) の接合体で、

$[V^* - U_{x+3} - U_{x+2} - U_{x+1} - U_x - O - (CH_2)_o - NH - W]_m - CRM_{197}$
 $(X - c)$

この場合、

○ は、 2 、 3 、 4 、 5 及び 6 から選択される整数であり、
 V^* 、 x 、 m 、 U_x 、 U_{x+1} 、 U_{x+2} 、 U_{x+3} 及び CRM_{197} は、本明細書で定義する意味を有する。

【 0 2 2 7 】

さらに好ましくは、一般式 ($X I - c$) の接合体で、

$[V^* - U_6 - U_5 - U_4 - U_3 - O - (CH_2)_o - NH - W]_m - CRM_{197}$
 $(X I - c)$

この場合、

○ は、 2 、 3 、 4 、 5 及び 6 から選択される整数であり、
 V^* 、 x 、 m 、 U_6 、 U_5 、 U_4 、 及び U_3 と CRM_{197} は、本明細書で定義する意味を有する。

【 0 2 2 8 】

また、さらに好ましくは、一般式 ($X II - c$) の接合体で、

$[S^* - U_5 - U_4 - U_3 - S - O - (CH_2)_o - NH - W]_m - CRM_{197}$
 $(X II - c)$

この場合、

○ は、 2 、 3 、 4 、 5 及び 6 から選択される整数であり、
 S^* 、 S 、 m 、 U_5 、 U_4 、 U_3 及び CRM_{197} は、本明細書で定義する意味を有する。

また、さらに好ましくは、一般式 ($X III - c$) の接合体で、

$[S_b^* - U_5 - U_4 - U_3 - S_b - O - (CH_2)_o - NH - W]_m - CRM_{197}$
 $(X III - c)$

この場合、

○ は、 2 、 3 、 4 、 5 及び 6 から選択される整数であり、
 S_b^* 、 S_b 、 m 、 U_5 、 U_4 、 U_3 及び CRM_{197} は、本明細書で定義する意味を有する。

【 0 2 2 9 】

別の実施例で、上記の免疫原性担体は好ましくは免疫調節的な性質を持つスフィンゴ糖脂質であり、より好ましくは、 (2S , 3S , 4R) - 1 - (-D - ガラクトピラノシル) - 2 - ヘキサコサノイルアミノオクタデカン - 3 - 4 - ジオールである。本明細書で用いられる免疫調節的な性質を持つスフィンゴ糖脂質という用語は、標的の抗原に対する免疫系の応答を刺激することができるが、それ自体では上記で定義されたような免疫性を与えることはしない適切なスフィンゴ糖脂質である。

【 0 2 3 0 】

本明細書で用いられるスフィンゴ糖脂質とは、スフィンゴ脂質に 1 位結合で結合した炭水化物 (多糖体) 構成部分を含んでいる化合物のことである。好ましくは、この炭水化物部分はヘキサコサノースであり、最も好ましくは、 -D - ガラクトピラノースである。

10

20

30

40

50

当業者には、スフィンゴ脂質とはアミド結合を通じて脂肪酸に接続されている C 18 アミノアルコールを含んだ一連の脂質であることは自明であろう。この C 18 アミノアルコールは、好ましくは水酸基とモノ、ジ、あるいは多数の置換がされているのが好ましい。C 18 アミノアルコールはフィトスフィンゴシンであることが特に好ましい。この脂肪酸は、好ましくは、炭素の個数が 16 から 28 個の範囲、より好ましくは、18 から 26 個の範囲の飽和アルキル鎖を有するモノカルボン酸である。免疫調節的な性質を有するスフィンゴ糖脂質には、(2S, 3S, 4R) - 1 - (-D-ガラクトピラノシル) - 2 - ヘキサコサノイルアミノオクタデカン - 3, 4 - ジオールがあり、これはナチュラルキラーティ (NKT) 細胞によりナチュラルキラー (NT) 活性とサイトカイン生産を刺激することができ、in vivo での抗癌活性を示す。(Proc. Natl Acad Sci U.S.A., 1998, 95, 5690)。ただし、これは上に限定されるものではない。

【0231】

免疫調節的な性質を有するスフィンゴ糖脂質を有する本発明による糖類の接合体は、熱に対して安定しているという利点を有している。接合に適するようにするために、免疫調節的な性質を有するスフィンゴ糖脂質上に、1つの機能性が導入される。この機能性は本発明のリンカーの端末アミノ基と直接に反応して、上記糖類の接合体をもたらしたり、あるいは中間接続分子の機能基 Y と反応して免疫調整的属性を有する修正スフィンゴ糖脂質をもたらす傾向を有している。

【0232】

好ましくは、上記の機能性は免疫調整的特性を有するスフィンゴ糖脂質の炭水化物部分の C 6 に導入される。このようにして、免疫調整的特性を有するスフィンゴ糖脂質は1つの機能性を持って機能化され、これは上記糖類の端末アミノ基あるいは中間接続分子の機能基 Y と反応する傾向を有している。1つの機能性は、アミノ基と反応する傾向があり、活性化エステル、イソシアネート基、アルデヒド、エポキシド、イミドエステル、カルボン酸、アルキルスルホン酸、塩化スルホニルなどを含むが、これらに限らない。1つの機能性は、中間接続分子の機能基 Y と反応する傾向があるので、中間接続分子の機能基 X をもつ免疫調節特性を有する修正スフィンゴ糖脂質を提供するために、1つの機能性は、アミン、アルコール、チオール、活性化エステル、イソシアネート基、アルデヒド、エポキシド、ビニル、イミドエステル、カルボン酸、アルキルスルホン酸、塩化スルホニル、ビニル基、アルキニル基、及びアジド基を対象とするが、それだけには限定されない。

【0233】

好ましくは、免疫調節特性を有するスフィンゴ糖脂質の炭水化物部分の C - 6 位に導入された機能性は、アミン、チオール、アルコール、カルボン酸、ビニル、マレイミド、-ヨードアセチル、-プロモアセチル、N - ヒドロキシサクシンイミド・エステル (NHS)、2 - ピリジルジチオールなどを含む、あるいはそれらから構成される群から選択される。

【0234】

中間接続分子の上記機能基 X は、マレイミド、-ヨードアセチル、-プロモアセチル、N - ヒドロキシサクシンイミド・エステル (NHS)、アルデヒド、カルボン酸、エポキシド、スルホン酸アルキル、塩化スルホニル、無水物、炭酸塩などを含む、あるいはそれらから構成される群から選択される。

【0235】

好ましくは、ジ (N - サクシンイミジル) アジピン酸あるいはビス (4 - ニトロフェニル) アジピン酸を最初に一次アミノ基を有する合成糖類と反応させる。次に、活性化された糖類をスフィンゴ糖脂質で濃縮して、接合体 (図 3 (B)) を提供するために、端末アミノ機能性を有する中間接続分子により C - 6 位で修飾される。

【0236】

本明細書で用いられる場合、「中間接続分子」とは機能基 X と機能基 Y を含んでいる二重機能性分子を意味しており、この場合、機能基 X はリンカー - L - 上の端末アミノ基と

10

20

30

40

50

反応することが出来、機能基Yは免疫原性担体あるいは固体支持体上に存在している機能性と反応することができる。

【 0 2 3 7 】

O - L - NH₂ 基の窒素原子を介して免疫原性担体と共有結合で連結あるいは結合している一般式 (I)、(I - a) - (I - c)、(II)、(II - a) - (II - g)、(III)、(III - a) - (III - g)、(IV)、(IV - a) - (IV - g)、(V)、(V - a) - (V - c)、(VI)、(VI - a) - (VI - c)、(VII)、(VII - a) - (VII - c)、(VIII)、(VIII - a) - (VIII - c)、(IX)、(IX - a) - (IX - c) の糖類、言い換えれば、免疫原性担体を有する一般式 (I)、(I - a) - (I - c)、(II)、(II - a) - (II - g)、(III)、(III - a) - (III - g)、(IV)、(IV - a) - (IV - g)、(V)、(V - a) - (V - c)、(VI)、(VI - a) - (VI - c)、(VII)、(VII - a) - (VII - c)、(VIII)、(VIII - a) - (VIII - c)、(IX)、(IX - a) - (IX - c) の糖類との反応によって得られた接合体、特に、(X)、(X - a) - (X - c)、(XI)、(XI - a) - (XI - c)、(XII)、(XII - a) - (XII - c)、(XIII)、(XIII - a) - (XIII - c) の接合体はヒト及び / 又は動物宿主において免疫応答を発現させて、細菌に起因する疾病的予防、及び / 又は治療に役立ち、莢膜多糖類に以下の糖フラグメントの 1 つを含む：

- D - G 1 c p - (1 4) - - D - G a l p - (1 4) - - D - G 1
 c A p - (1 4) - - D - G 1 c p
 - D - G 1 c p - (1 4) - - D - G 1 c p - (1 4) - - D - G a
 1 p - (1 4) - - D - G 1 c A p
 - D - G 1 c A p - (1 4) - - D - G c 1 p - (1 4) - - D - G
 1 c p - (1 4) - - D - G a l p
 - D - G a l p - (1 4) - - D - G 1 c A p - (1 4) - - D - G
 1 c p - (1 4) - - D - G 1 c p

好ましくは、その莢膜多糖類内に上記の糖フラグメントの1つを含んでいる細菌は肺炎性連鎖球菌血清タイプ8である。肺炎性連鎖球菌血清タイプ8に関連した疾患には、肺炎、髄膜炎、中耳炎、慢性気管支炎の細菌性あるいは急性激化、副鼻腔炎、リュウマチ及び結膜炎などがある。

[0 2 3 8]

藥学的組成

本発明の1つの側面は薬学的組成、特に、本発明による少なくとも1つの合成糖類及び/又は薬学的に許容できるその塩を有するワクチン、及び/又は、O-L-NH₂の窒素原子を通じて免役原性担体に、薬学的に許容されるアジュバント、寒冷保護剤、凍結保護剤、賦形剤及び/又は希釈剤のうちの少なくとも1つと共に共有結合された本発明の糖類を含んだ接合体に関係している。

〔 0 2 3 9 〕

本発明の別の側面で、上記の薬学的組成物あるいはワクチンは、莢膜多糖類及び／又は莢膜多糖類フラグメント、及び／又は肺炎連鎖球菌血清タイプ4、6B、9V、14、18C、19F及び23F、より好ましくは血清タイプ1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19F及び23F、さらに好ましくは血清タイプ1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、14、15B、17F、18C、19F、19A、20、22F、23F及び33Fなどを含む、あるいはそれらから構成される群から選択される肺炎連鎖球菌のたんぱく質接合体で構成されている。

【 0 2 4 0 】

このワクチンは懸濁液の形態で調製することもできるし、凍結乾燥してもよい。懸濁液形態は凍結して保存しておいてもよい。凍結乾燥の場合、1つか複数の安定剤を付加するのが好ましい。ワクチン化はどの年齢段階でも可能である。このワクチンは皮下注射でも

、スプレーでも、注射でも、経口でも、眼球経由でも、気管経由でも、鼻腔経由でも投与することができる。ヒトや動物に対して投与される本発明の量と投与方式は、特定の抗原、アジュvant（存在しているのであれば）、年齢、性別、体重、人種、特定の動物やヒトの宿主の健康状態、あるいは投与経路などの要因を考慮に入れて薬学及び獣医学の分野で、通常の技術に通じている人々に知られている標準的な技術に従って決められる。

【0241】

本発明の別の側面は、ヒト及び／又は動物の宿主における肺炎性連鎖球菌に対して免疫応答を誘発する方法に向けられており、この方法は、上記のヒト及び／又は動物宿主に対して、-O-L-NH₂基及び／又はその薬学的組成物の混合物の窒素原子を介して免疫原性担体に共有結合で連結された本発明の糖類及び／又は塩を含む接合体を投与するステップを含んでいる。本発明に従って、ヒトや動物の宿主における肺炎性連鎖球菌によって引き起こされる疾病を治療あるいは予防するための方法は、少なくとも1つの本発明による糖類、及び／又はその塩、及び／又は-O-L-NH₂基の窒素原子を介して免疫原性担体に共有結合で連結された本発明の糖類を含んでいる接合体をヒト及び／又は動物宿主に投与するステップを含んでいる。

【0242】

静脈注射及び経口投与が好ましい。こうした組成物は適切な担体、希釈剤、滅菌水、生理食塩水、グルコースなどと混ぜ合わせていてもよい。例えば、本発明の凍結乾燥された糖類をヒト及び／又は動物宿主に投与するのに適した物質を得るために液体成分を用いて最終的に再構成することも可能である。その再構成は典型的には使用箇所で行われるであろう。従って、本発明の糖類と水中油型エマルジョンアジュvantあるいはアジュvantの緩衝液を、使用時に最終的な形態を準備するために、パッケージ化された、あるいは分散ワクチンキットに入れて個別に保管することもできる。2つの容器を含んだキットの場合、1つには再構成のための液体を入れており、二番目の容器には凍結乾燥された物質を入れておくことになるだろう。安定性を確保するために、本発明の冷凍乾燥された成分はラクトース、スクロース及び／又はマニトール、あるいはそれらの混合物などの安定剤を入れておいてもよい。スクロースとマンニトールの混合物を用いると、乾燥プロセスがスピードアップされる。冷凍乾燥された成分は塩化ナトリウムを含んでいてもよい。冷凍乾燥された物質内の可溶性成分は再構成後もその成分中にとどまるから、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むことになる。

【0243】

本発明のワクチンの形成は当業者に周知の方法を用いて行うことができる。明らかに、適切な担体とその他の添加物の選択は、正確な投与経路と特定の投与形態の性状に依存することになるであろう。

【0244】

本発明のワクチン組成物は1つかそれ以上のアジュvantを含んでいてもよい。本明細書で用いられる「アジュvant」という用語は免疫アジュvant、つまり、そのワクチン内に含まれている任意の抗原に対する免疫応答を強化するとともにそれに対して抗原的には関係性がなくそのワクチンの効果を修正あるいは補強するワクチン組成物内で用いられる物質を指している。当業者にとっては、典型的に認められている免疫アジュvantの例としては、オイルエマルジョン（例えば、フロイドアジュvant）、サポニン類、アルミニウムあるいはカルシウムの塩（例えばアルム）、非ヨード性ブロック・ポリマー表面活性剤、-ガラクトシルセラミドその他があり、上に列挙したものののみに限定されることはない。

【0245】

本発明のワクチンは、投与経路や望ましい調剤形態に応じて、加湿あるいは乳化剤、pH緩衝剤、ゲル化あるいは粘性増加用添加物、保存剤、香料、色素などの補助的な物質を含むこともできる。本発明の組成物は、特に複数の投与形態でパッケージされる場合、抗菌剤を含んでいてもよい。チオメルサル及び2-フェノキシエタノールなどの抗菌剤がワクチンでは一般的に使用されているが、水銀非含有保存剤を用いるか、あるいは保存剤は

10

20

30

40

50

用いないのが好ましい。

【0246】

さらに、本発明のワクチンは温度保護剤を含んでいてもよい。その例としては、グリセリン、プロピレン・グリコール、あるいはポリエチレン・グリコール(PEG)などがある。

【0247】

本発明の医薬品組成物は、液体製剤、例えば、等張水溶液、懸濁液、エマルジョン、あるいは目標のpHに調整することができる粘着性組成物などの形態で提供することができる。液体形状のために薬学的に許容される担体は水性あるいは非水性溶液、懸濁液、乳化剤あるいはオイルである。非水性溶剤の例としては、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のような注入可能な有機エステルがある。水性担体は水、アルコール性溶液、乳剤や懸濁液などを含み、食塩水及び緩衝液なども含まれる。

10

【0248】

再構成後の組成物のpHは好ましくは6から8の範囲であり、より好ましくは、6.5から7.5(例えば約7)の範囲である。本発明の組成物はトリス緩衝液、酢酸、グルタミン酸塩、酪酸塩、マレイン酸塩、酒石酸、リン酸塩、クエン酸塩、炭酸塩、グリシネート、ヒスチジン、グリシン、コハク酸、及びトリエタノールアミン緩衝液などの緩衝液を用いて保存することができる。従って、本発明の組成物は、緩衝液を含んでいるのが好ましい。上記の等張液は塩などのイオン性等張液であってもよいし、炭酸塩などの非イオン性等張剤であってもよい。イオン性の等張剤の例は、例えば、NaCl、CaCl₂、KCl及びMgCl₂を含むが、これだけに限定されない。非イオン性等張剤の例はソルビトールやグリセロールを含むが、これらだけには限定されない。

20

【0249】

本発明の好ましい実施形態では、上記ワクチン組成物は、無菌液で、発熱因子非含有のリン酸緩衝生理食塩水として定型化され、保存剤は含んでいてもよいし、含んでいなくてもよい。

【0250】

薬学的に許容できる保存剤を、上記組成物の保存期間を増加させるために用いることが出来る。ベンジルアルコールが適しているが、例えば、パラベン、チオメロサール、クロロブタノール、あるいは塩化ベンザルアルコニウムを用いることもできる。上記保存剤の適切な濃度は全重量に対して0.02%から2%の範囲であるが、選択された薬剤に応じて、濃度は適当に変更してもよい。

30

【0251】

本発明の薬学的組成物は一回の使用分を小ビンに入れて保存してもよいし、複数回の使用分をまとめて保存してもよいし、注射器に事前に充填しておいてもよい。

さらに好ましくは、上記の薬学組成物は凍結乾燥物あるいは液体緩衝液の形状で調製される。

【0252】

本発明のワクチンあるいは医薬品組成物は、通常知られている適切な投与量レベルで、通常の固体あるいは液体の担体あるいはその希釈物及び通常の薬学的につくられたアジュバントの形態で構成される。好ましい調剤及び形態は経口投与可能な形態で調製される。これらの投与可能な形態とは丸薬、錠剤、フィルム錠剤、コーティングされた錠剤、カプセル、粉末、及び沈殿物などである。経口投与形態以外の形態も可能である。この発明のワクチンあるいは医薬品組成物はどのような適切な手段で投与されてもよく、その手段には、上皮あるいは皮膚粘膜内層(口腔粘膜、直腸、子宮、上皮内層、腸管粘膜、鼻腔粘膜、及び腸粘膜)を通じての吸収による吸入、注射(静脈内、腹腔内、筋肉内、あるいは皮下)；経口、直腸、経皮、局所、皮内、胃内、皮内、子宮内、管内、鼻腔内、口腔内、経皮、舌下、あるいは薬学的技術において利用できるすべてのその他の手段で投与することができる。

40

【0253】

50

一般式 (I)、(I-a) - (I-c)、(II)、(II-a) - (II-g)、(III)、(III-a) - (III-g)、(IV)、(IV-a) - (IV-c)、(V)、(V-a) - (V-c)、(VI)、(VI-a) - (VI-c)、(VII)、(VII-a) - (VII-c)、(VIII)、(VIII-a) - (VIII-c)、(IX) 及び (IX-a) - (IX-c) の合成糖類の少なくとも 1 つを含んでいる本発明のワクチンあるいは医薬品組成物、好ましくは糖類 10、18、19、20、21、22、55、57、60、及び 62、あるいは、薬学的に許容できるその塩、あるいは有効成分として -O-L-NH₂ 基の窒素原子を介して免疫原性担体に共有結合で結合されている一般式 (I)、(I-a) - (I-c)、(II)、(II-a) - (II-g)、(III)、(III-a) - (III-g)、(IV)、(IV-a) - (IV-g)、(V)、(V-a) - (V-c)、(VI)、(VI-a) - (VI-c)、(VII)、(VII-a) - (VII-c)、(VIII)、(VIII-a) - (VIII-c)、(IX) 及び (IX-a) - (IX-c) の糖類を含んでいる接合体は、意図されている投与形態に合わせて適宜選択される適切な担体物質、例えば、経口錠剤、カプセル（固体充填、半固体充填、あるいは液体充填）、組成用粉末、経口ゲル、エリキシル剤、分散可能な粒、シロップ、懸濁液等と混ぜ合わせ、さらに、通常の薬学的実施方法に従って典型的に投与される。例えば、錠剤やカプセルで経口投与するためには、その有効成分は、ラクトース、澱粉、スクロース、セルロース、マグネシウム、ステアリン酸塩、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、タルク、マンニトール、エチルアルコール（液体形状）などの経口非毒性の薬学的に許容される不活性担体などと組み合わせることもできる。さらに、望ましければ、あるいは必要があれば、適切な結合剤、潤滑油、崩壊剤あるいは染色剤をその混合物に加えても差し支えない。粉末や錠剤には本発明による糖類を約 5 から約 95 パーセントの割合で加えることもできる。
10

【0254】

適切な結合剤には澱粉、ゼラチン、天然の砂糖、トウモロコシ甘味剤、アカシア、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蠍などの天然及び合成ゴムなどがある。これらの投与形態で挙げてもよい潤滑剤には、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。崩壊剤は、澱粉、メチルセルロース、グーガムなどがある。必要な場合は、甘味剤、芳香剤、保存剤を使用してもよい。上に使用した用語のなかのいくつか、つまり、崩壊剤、希釈剤、潤滑剤、結合剤などについては、以下により詳細に述べる。
20

【0255】

さらに付け加えると、本発明のワクチンあるいは医薬品組成物は、治療効果を最大にするために、1つあるいは複数の成分あるいは有効成分が制御された割合で放出されるように、持続した放出形態で定型化されてもよい。放出の持続に適した投与形態は、有効成分を含浸し崩壊速度が様々であるか、または放出が制御された高分子マトリックスを有する層を含む層状の錠剤、あるいは、そのような含浸またはカプセル化された多孔性高分子マトリックスを含むカプセルを含んでいる。

【0256】

液状形態製剤は、溶液、懸濁液、及び乳剤を含む。例として述べれば、非経口投与用の水あるいは水プロピレングリコール溶液、あるいは、経口投与用の溶液、懸濁液あるいは乳化剤のための甘味剤及び乳白剤の添加などがある。液体形状の製剤も鼻腔内投与のための液体を含んでいてもよい。
40

【0257】

吸入に適したエアゾール製剤は溶液や粉末状態の固体を含んでいてもよく、これらは例えば窒素など、不活性圧縮ガスなどの薬学的に許容される担体との組み合わせで用いることができる。

【0258】

坐薬をつくるためには、ココアバターなどのような脂肪酸グリセリドの混合物のような低温度で溶融するワックスを最初に溶かして、攪拌や同様の混合法で有効成分を均一に分
50

散する。溶融された均一の混合物は、適当なサイズの型に入れられて、冷却され、固化される。

【0259】

使用直前に経口あるいは非経口投与のための液体形状の製剤に変えられることを意図した固体形態調剤も含まれる。こうした液体形状は溶液、懸濁液、及び乳剤が含まれる。

本発明のワクチンあるいは医薬品組成物は経皮的に投与することもでき、本発明のワクチンあるいは医薬品組成物は、一般式(I)、(I-a) - (I-c)、(II)、(II-a) - (II-g)、(III)、(III-a) - (III-g)、(IV)、(IV-a) - (IV-g)、(V)、(V-a) - (V-c)、(VI)、(VI-a) - (VI-c)、(VII)、(VII-a) - (VII-c)、(VIII)、(VIII-a) - (VIII-c)の合成糖類好ましくは糖類10、18、19、20、21、22、55、57、60、及び62-80、あるいは、薬学的に許容できるその塩、あるいは-O-L-NH₂基の窒素原子を介して共有結合で免疫原性担体に結合されている連結あるいは結合されている糖類を含んだ接合体の少なくとも1つを含んでいる。経皮的組成物はクリーム、ローション、エアロゾル、及び/又は乳化剤の形態を探ることができ、この目的のために通常用いられているマトリックスあるいは容器の経皮パッチに入れておくこともできる。

【0260】

カプセルという用語は、有効成分を含んだ組成物を保持あるいは含むためにメチルセルロース、ポリビニルアルコールあるいは変性ゼラチンや澱粉などでつくられた特殊な容器あるいは梱包を意味している。表面が固いカプセルは通常はゲル強度が比較的高い骨状物質と豚皮膚ゼラチンをブレンドしたものでつくられる。カプセルそのものは少量の染料、オペーク剤、可塑剤及び保存剤を含んでいてもよい。

【0261】

錠剤とは有効成分と適切な希釈剤を合わせて含んでいる圧縮あるいは成形された固体投与形状を意味する。錠剤は、湿式造粒法あるいは乾式造粒法、当業者にはよく知られている圧縮法によってつくることができる。

【0262】

経口ゲルとは親水性の準固体基質に分散あるいは可溶化された有効成分を意味する。

構成用粉末とは有効成分と水あるいは果汁に懸濁させることができる適切な希釈剤とを含んだ粉末ブレンドを意味する。

【0263】

適切な希釈剤とは組成物あるいは投与形態の主要な部分を通常構成している物質のことである。適切な希釈剤にはラクトースやスクロース、マンニトール、ソルビトール、小麦やコーンライス及びジャガイモから得られる澱粉及び微結晶セルロースなどのセルロースなどが用いられる。この組成物内での希釈剤の量は組成物全体の約5-約95重量パーセント、好ましくは約25-約75重量パーセント、より好ましくは約30-約60重量パーセント、そして最も好ましくは約40-約50重量パーセントの範囲である。

【0264】

崩壊剤とは医薬成分の分解(崩壊)と放出を促進するためにその組成物に添加される物質を指している。適切な崩壊剤には、澱粉、カルボキシメチルナトリウム澱粉などの冷水可溶性修飾澱粉；イナゴマメ、カラヤ、ガウア、トラガント及び寒天などの天然及び合成ガム；メチルセルロース及びカルボキシセルロースナトリウム、微結晶性セルロース及びクロスカルメロースナトリウムなどの架橋微結晶セルロースのセルロース誘導体、セルロース、アルギン酸やアルギン酸ナトリウムなどのアルギン酸塩；ベントナイトなどの粘土；そして発泡性の混合物を含む。組成物中の崩壊剤の量はその組成物全体の重量に対して、約1から約40%、好ましくは約2から約30%、より好ましくは、約3から約20%、そして最も好ましくは、約5から約10%の割合である。

【0265】

結合剤とは粉末を結合あるいは糊づけして粒状を形成することでそれらを結合させ、調

10

20

30

40

50

剤での接着性に寄与する物質を意味している。結合剤は希釈剤や充填剤にすでにある結合力を追加するものである。適切な結合剤は、スクロース；コムギ、トウモロコシ、ジャガイモなどから得られる澱粉；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、アルギン酸アンモニウム、カルシウムなど海藻由来の誘導体；メチルセルロース、カルボキシセルロースナトリウム及び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物質；ポリビニルピロリドン、そしてマグネシウム・アルミニウムのケイ酸塩などの無機物を含む。組成物中の結合剤の量は、その組成物の重量に対して、約1から約30%、好ましくは約2から約20%、より好ましくは、約3から約10%、そしてさらに好ましくは、約3から約6%の割合である。

【0266】

10

潤滑剤とは、錠剤や粉粒が、例えばそれが圧縮された後に、摩擦あるいは摩損を提言されることによって鋳型やダイス型から離型されるように投与形態に添加される物質のことである。適切な潤滑剤はステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸カリウムなどの金属ステアリン酸塩；ステアリン酸；高融点ワックス、そして、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、そしてd'1ロイシンなどの水溶性潤滑剤がある。潤滑剤は通常圧縮前の最終段階で付加されるが、それは、潤滑剤が粒の表面、さらに粒と錠剤プレス機の部品との間に存在しなければならないからである。組成物内の潤滑剤の量は、組成物の重量に対して、約0.05から約15%、好ましくは約0.2から約5%、より好ましくは、約0.3から約3%、そし最も好ましくは、約0.3から1.5%の割合である。

【0267】

20

滑剤とは凝結を防いで粒の流動性を改善し、流動が滑らかに、そして均一に行われるようにするための物質である。適切な滑剤は二酸化珪素とタルクを含む。組成物中の滑剤の量は、組成物の重量に対して、約0.01から約10%、好ましくは約0.1から約7%、より好ましくは、約0.2から約5%、そし最も好ましくは、約0.5から約2%の割合である。

【0268】

発色剤とは組成物あるいは投与錠剤に発色を与える賦形剤である。こうした賦形剤は食品用染料や粘土や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を含んでいてもよい。発色剤の量は、組成物全体の重量に対して、約0.01から約10%、好ましくは約0.05から約6%、より好ましくは、約0.1から約4%、そし最も好ましくは、約0.1から1%の割合である。

30

【0269】

本発明のワクチンの形成と投与の技術は、Mack Publishing CO., Easton PAから出版されている“Remington's Pharmaceutical Sciences”に記載されている。適切なワクチン組成物は、一般式(I)、(I-a)-(I-c)、(II)、(II-a)-(II-g)、(III)、(III-a)-(III-g)、(IV)、(IV-a)-(IV-g)、(V)、(V-a)-(V-c)、(VI)、(VI-a)-(VI-c)、(VII)、(VII-a)-(VII-c)、(VIII)、(VIII-a)-(VIII-c)、(IX)及び(X-a)-(X-c)の糖類、好ましくは糖類10、18、19、20、21、22、55、57、60、及び62-89、あるいは薬学的に許容できるその塩、あるいは-O-L-NH₂基の窒素原子を介して共有結合で免疫原性担体に結合されている糖類を含んだ接合体の少なくとも1つを含んでおり、上記ワクチン組成物は、適切な液体医薬品担体中のこうした糖類の溶液でもよいし、錠剤、丸薬、フィルム錠剤、コーティングされた錠剤、糖衣錠、カプセル、粉末及び沈殿物、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液、乳化剤などの他の形態であってもよい。

40

【0270】

本発明による1つの接合体、あるいは本発明の1つの糖類の治療的に有効な投与量とは、疾病に対して少なくとも部分的にでも免疫化をもたらすその化合物の量を意味している

50

。 そうした化合物の毒性及び治療効果は細胞培養液や実験動物において、標準的な製剤学、薬学及び毒性学的手順で判定することができる。毒性効果と治療的効果との間の投与比率は治療指數である。投与される組成物の実際の量は措置の対象となる個人、その個人の体重、疾病の状況、投与形態、及び医師の判断による。

【 0 2 7 1 】

抗体及び免疫学的分析(アッセイ)

本発明は、本発明による少なくとも1つの合成糖類に対する抗体とも関係している。その抗体はモノクローナル・ハイブリドーマによってつくり出される。この抗体は、肺炎、¹⁰ 骨膜炎、中耳炎、菌血症、並びに慢性気管支炎、慢性副鼻腔炎、慢性関節炎、及び慢性結膜炎の急性悪化の診断、予防及び措置にとって有益である。本発明の別の実施形態は、肺炎連鎖球菌、好ましくは肺炎連鎖球菌血清タイプ8によって引き起こされる肺炎、骨膜炎、中耳炎、菌血症、並びに慢性気管支炎、慢性副鼻腔炎、慢性関節炎、及び慢性結膜炎の急性悪化の診断、予防及び措置のための医薬品あるいは装置を製造するための抗体の使用に関係している。

【 0 2 7 2 】

本明細書で用いられる「抗体」という用語は、ポリクローナル及びモノクローナル抗体の調剤、及びハイブリッド抗体、 $F(ab') フラグメント、 $F(ab)$ 分子、単一ドメイン抗体及びその機能性フラグメントの調製をその意味範囲に含んでおり、親抗体分子の免疫学的結合特性を示す。$

【 0 2 7 3 】

本発明による抗体はポリクローナル性あるいはモノクローナル性であってもよい。²⁰ 一般式(I)、(I-a)-(I-c)、(II)、(II-a)-(II-g)、(II)¹、(III-a)-(III-g)、(IV)、(V-a)-(V-c)、(VI)、(VI-a)-(VI-c)、(VII)、(VII-a)-(VII-c)、(VII)¹、(VIII-a)-(VIII-c)、(VIII)¹、(VIII-a)-(VIII-c)及び(X-a)-(X-c)のいずれか1つの糖類好ましくは糖類10、18、19、20、21、22、55、57、60、及び62-89、あるいは-O-L-NH₂基の窒素原子を介して共有結合で免疫原性担体に結合されている上記の糖類を含んだ接合体は、肺炎連鎖球菌、好ましくは肺炎連鎖球菌血清タイプ8によって引き起こされる疾病の治療と予防のための、医薬品組成物、特にワクチンを調製するために用いることができる。本発明の糖類、あるいは本発明の糖類に対して発生され、それを認識する抗体糖類は、肺炎連鎖球菌、好ましくは肺炎連鎖球菌血清タイプの治療と予防のために用いることができる。³⁰

【 0 2 7 4 】

さらに、本発明は、本発明による一般式(I)、(I-a)-(I-c)、(II)、(II-a)-(II-g)、(II)¹、(III)、(III-a)-(III-g)、(IV)、(V-a)-(V-g)、(VI)、(VI-a)-(VI-c)、(VII)、(VII-a)-(VII-c)、(VII)¹、(VIII-a)-(VIII-c)及び(X-a)-(X-c)の糖類による少なくとも1つの糖類、あるいは、本発明の糖類の少なくとも1つに対する少なくとも1つの抗体を肺炎連鎖球菌、好ましくは肺炎連鎖球菌血清タイプ8によって引き起こされる肺炎、骨膜炎、中耳炎、菌血症、並びに、慢性気管支炎、慢性副鼻腔炎、慢性関節炎、及び慢性結膜炎の急性悪化の診断、予防及び措置のための使用に関係している。⁴⁰

【 0 2 7 5 】

そうしたアッセイは、例えば、肺炎連鎖球菌、好ましくは肺炎連鎖球菌血清タイプ8によって引き起こされる疾病的診断に有用なミクロアレイあるいはELISAの使用を含んでいる。従って、本発明の別の側面は、肺炎連鎖球菌、好ましくは肺炎連鎖球菌血清タイプ8によって引き起こされる疾病的診断のための一般式(I)、(I-a)-(I-c)、(II)、(II-a)-(II-g)、(III)、(III-a)-(III-g)、(IV)、(V-a)-(V-g)、(VI)、(VII-a)-(VII-g)、(VII)¹、(VIII-a)-(VIII-g)及び(X-a)-(X-g)の使用である。⁵⁰

)、(V I - a) - (V I - c)、(V I I)、(V I I - a) - (V I I - c)、(V I I I)、(V I I I - a) - (V I I I - c)、(I X)及び(I X - a) - (I X - c)の糖類による少なくとも1つの糖類使用に関係している。

【0276】

一般式(I)、(I - a) - (I - c)、(I I)、(I I - a) - (I I - g)、(I I I)、(I I I - a) - (I I I - g)、(I V)、(I V - a) - (I V - g)、(V)、(V - a) - (V - c)、(V I)、(V I - a) - (V I - c)、(V I I)、(V I I - a) - (V I I - c)、(V I I I)、(V I I I - a) - (V I I I - c)、(V I I I I)、(V I I I I - a) - (V I I I I - c)の糖類のいずれか1つ、あるいはそれらの糖類の混合物はマイクロアレイ表面あるいはその他の表面上に固定して、肺炎連鎖球菌血清タイプ8を検出するためのイン・ビトロ方法として使用することもできるであろう。肺炎連鎖球菌血清タイプ8を同定する方法は、本発明による糖類の少なくとも1つを使用することを含んでいる。さらに、一般式(I)、(I - a) - (I - c)、(I I)、(I I - a) - (I I - g)、(I I I)、(I I I - a) - (I I I - g)、(I V)、(I V - a) - (I V - g)、(V)、(V - a) - (V - c)、(V I)、(V I - a) - (V I - c)、(V I I)、(V I I - a) - (V I I - c)、(V I I I)、(V I I I - a) - (V I I I - c)、(V I I I I)、(V I I I I - a) - (V I I I I - c)の合成糖類あるいはそれらの混合物は、免疫アッセイの分析標準として用いることもできる。

【0277】

従って、一般式(I)、(I - a) - (I - c)、(I I)、(I I - a) - (I I - g)、(I I I)、(I I I - a) - (I I I - g)、(I V)、(I V - a) - (I V - g)、(V)、(V - a) - (V - c)、(V I)、(V I - a) - (V I - c)、(V I I)、(V I I - a) - (V I I - c)、(V I I I)、(V I I I - a) - (V I I I - c)の糖類は、肺炎連鎖球菌血清タイプ8に対する抗体を検出するための免疫学的アッセイにおいてマーカーとして使用することができる。

【0278】

さらに、本発明の別の側面は、本発明による糖類の少なくとも1つを含んでいる固体支持体に関係している。

この固体支持体は診断装置の一部として用いられるのが好ましい。この固体支持体及び診断装置は肺炎連鎖球菌、好ましくは肺炎連鎖球菌血清タイプ8によって引き起こされる肺炎、髄膜炎、中耳炎、菌血症、並びに；慢性気管支炎、慢性副鼻腔炎、慢性関節炎、及び慢性結膜炎の急性悪化の診断のために用いられ、本発明の糖類の少なくとも1つが好ましくは共有結合によって、その固体支持体上に固定される。

【0279】

好ましくは、上記の固体支持体はガラススライド、ガラスプレート、マイクロタイターブレート、微小球体あるいはビーズから選択される。

本発明の糖類は、好ましくは中間接続分子を使用する固体支持体に共有結合で結合されている。

【0280】

さらに、本発明は、この発明の糖類が、肺炎連鎖球菌好ましくは肺炎連鎖球菌血清タイプ8によって起こされる肺炎、髄膜炎、中耳炎、菌血症、並びに慢性気管支炎、慢性副鼻腔炎、慢性関節炎、及び慢性結膜炎の急性悪化に関する免疫学的分析検知に使えることを示している。こうした分析には、例えば、肺炎連鎖球菌好ましくは肺炎連鎖球菌血清タイプ8によって起こされる肺炎、髄膜炎、中耳炎、菌血症、並びに慢性気管支炎、慢性副鼻腔炎、慢性関節炎、及び慢性結膜炎の急性悪化に関する診断に有用なマイクロアレイ及びELISAの使用が含まれる。

【0281】

従って、本発明の別の側面は、肺炎連鎖球菌好ましくは肺炎連鎖球菌血清タイプ8によって起こされる肺炎、髄膜炎、中耳炎、菌血症、並びに慢性気管支炎、慢性副鼻腔炎、慢

10

20

30

40

50

性関節炎、及び慢性結膜炎の急性悪化に関する診断のために本発明による糖類の使用に関する記載している。

【0282】

肺炎連鎖球菌好ましくは肺炎連鎖球菌血清タイプ8によって起こされる肺炎、髄膜炎、中耳炎、菌血症、並びに；慢性気管支炎、慢性副鼻腔炎、慢性関節炎、及び慢性結膜炎の急性悪化に関する診断のために本発明の糖類が用いられる分析システムの選択にはいろいろな選択の余地がある。本発明により診断目的のために行われる分析は、固相酵素免疫アッセイ（EIA）、酵素連結免疫吸収分析（ELISA）、特に「間接」ELISAあるいは放射免疫分析（RIA）のような免疫分析が含まれる。

【0283】

好ましくは、本発明による糖類は中間接続分子を介して固体支持体に共有結合で連結されている。従って、本発明による糖類を-O-L-NH₂基の窒素原子を介して、直接あるいは間接的に上記固体支持体に共有結合で連結できる（図3（C）参照）。

【0284】

上記の固体支持体はガラススライド、マイクロタイタープレート、テストチューブ、微小球体、ナノ粒子あるいはビーズなどを含む、あるいはそれらから構成される群から選択されるのが好ましい。

【0285】

上記の固体支持体はガラス・スライドあるい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あるいはマイクロウェルプレートは、小さなテストチューブとして用いられる多数の「ウェル」を有するフラットプレートである。通常は、6個、24個、96個、384個あるいは1536個の試料ウェルを有するマイクロタイタープレートを用いることができる。マイクロプレートはPCRに用いられるマイクロプレート用のポリカーボネートなど、多くの異なった素材でつくられる。最も一般的なのは、ほとんど光学探知用のマイクロプレート用に用いられるポリスチレンである。光の吸収や発光検出するために二酸化チタンを加えて白色にしたり、蛍光生物学的分析を行うために炭素を加えて黒色にしたりすることも可能である。

【図面の簡単な説明】

【0286】

【図1A】本発明による商業的に入手可能な中間接続分子。

20

【図1B】本発明による商業的に入手可能な中間接続分子。

30

【図2】本発明による中間接続分子の機能基X。

【図3】（A）担体タンパク質によって接合された四糖類、（B）スフィンゴ糖脂質で接合された四糖類、（C）固体支持体上に接合された四糖類、の例。四糖類は単に例示として示してあり、一般式（I）のどの糖類に置き換えることもできる。

【図4A】糖類記号。

【図4B】商業的に入手可能な血清007spを用いて行われたグリカン・アレイ・分析。検出は蛍光ラベル抗ヒトIgM二次抗体（Alexa Fluor 488ヤギ抗ヒトIgM、Invitrogen A21215）を用いて行われた。

40

【図4C】商業的に入手可能な血清007spを用いて行われたグリカン・アレイ・分析。検出は蛍光ラベル抗ヒトIgG二次抗体（Alexa Fluor 647ヤギ抗ヒトIgG、Invitrogen A21445）を用いて行われた。

【図4D】SP-8特殊ウサギ・タイプ血清を用いたグリカン・アレイ分析。検出は蛍光ラベル抗ウサギIgG二次抗体（ヤギ抗ウサギIgG-FITC, abcam ab6717）を用いて行った。

【図5A】マウス1160の免疫応答。マイクロ・プリント・パターン。

【図5B】マウス1160の免疫応答（日数は0-35日目まで）。検出は蛍光ラベル抗マウスIgG二次抗体（ウサギ抗マウスIgG-FITC, F9137, Sigma）を用いて行った。

【図6】抗SP-8モノクローナル抗体の発生。検出は蛍光ラベル抗マウス二次抗体（A

50

1 e x a 6 3 5 ヤギ抗マウス IgG, Invitrogen A 3 1 5 7 4) を用いて行った。

【図 7】表面プラスモン共鳴。モノクローナル抗体 mAb 1H8 は合成糖類 18 と天然の Sp8 多糖類の両方をそれぞれ識別する。

【図 8】免疫蛍光染色の結果。接合体 59 による免疫化は天然の Sp8 多糖類及び ST8 バクテリアを識別する免疫応答を誘発する。バクテリアは FITC でラベルして、図示されている一次抗体と共に培養した。抗体結合は、A 1 e x a 6 3 5 でラベルしたヤギ抗マウス IgG 二次抗体 (A 3 1 5 7 4, Invitrogen) で培養した後、視覚化された。(A) 肺炎連鎖球菌 ST8, mAb 1H8; (B) 肺炎連鎖球菌 ST8, mAb アイソタイプ・コントロール (抗 Y ペスト LPS コア); (C) 肺炎連鎖球菌 ST1; mAb 1H8。 10

【図 9 A】蛍光ラベルした肺炎連鎖球菌のフローサイトメトリー。mAb 1H8 あるいはアイソタイプ・コントロール (比較対象) を用いてラベルした後の代表的なフローサイトメトリー結果。

【図 9 B】蛍光ラベルした肺炎連鎖球菌のフローサイトメトリー。mAb 1H8 あるいは 1F1 を用いて少なくとも 3 回、個別的にラベリング実験をした結果をまとめたもの。ヒストグラムは結合の平均値 \pm SD を示している。*** P < 0.001; **** P < 0.0001。モノクローナル抗体 1H8 及び 1F1 は両方とも肺炎連鎖球菌血清タイプ 8 と結合するが、肺炎連鎖球菌血清タイプ 1 あるいは 3 とは結合しない。モノクローナル抗体と肺炎連鎖球菌血清タイプ 8 の間の相互作用は特殊な場合で、それは、抗体アイソタイプ・コントロールあるいは肺炎連鎖球菌血清タイプ 1 あるいは 3 に対する結合性は認められないからである。 20

【図 10】mAb 1H8 の存在下での肺炎連鎖球菌血清タイプ 8 バクテリアのオプソニン貪食作用による殺菌。すなわち、アイソタイプ抗体ではなく、mAb 1H8 は、Pneumovax 23 (登録商標) ワクチン化ヒト (007sp, 1:4 希釀) 及びウサギ ST8 タイプ血清 (1:4 希釀) からプールされた血清と同様の有効性を持つすべての試験量で、食細胞により生きたバクテリアにオプソニンを作用させて殺菌する。

【図 11 A】mAb 1H8 及び 1F1 の糖類 19、49、90、60、62、55、及び 57 に対する結合のマイクロアレイ分析。ヒストグラムは、4 スポットのバックグラウンドに対して標準化された蛍光強度の平均値 \pm SD を示している。MF1: 平均蛍光強度: 三糖類 62、四糖類 19、四糖類 60、五糖類 55 及び六糖類 57 は、より小さい構造 49 及び 90 がない場合に、mAb 1H8 及び 1F1 で同様の強度が認められた。 30

【図 11 B】SP8 CPS (10 μg / mL 濃度) で予備吸着された mAb 及び 1F1 (100 μg / mL) との結合の抑制。ウェルチは正を伴うノンパラメトリック片側 t 検定。** P < 0.01; *** P < 0.001: mAb s 及び 1F1 の五糖類 55 及び六糖類 57 との結合は、天然の Sp8 多糖類による抑制で押さえられた。

【図 11 C】構造化合物 90。

【図 12】糖類 19、20、21 及び 22 への mAb 28H11 (防御的なマウス IgM) の結合に関するマイクロアレイ分析。(A) mAb 28H11 の異なる濃度での結合。(B) 天然の肺炎連鎖球菌血清タイプ 8 CPS (10 μg / mL) の付加による化合物 19 への mAb 28H11 の結合の抑制。 40

【図 13】接合体 CRM₁₉₇-18、CRM₁₉₇-60 及び CRM₁₉₇-57 の MADI-MS による特徴づけ。

【図 14】ウサギにおける接合体 CRM₁₉₇-18、CRM₁₉₇-60 及び CRM₁₉₇-57 に対する免疫応答の評価。(A) - (D) 肺炎連鎖球菌血清タイプ 8 関連グリカン (1:50 希釀) に対する免疫応答のグリカン・マイクロアレイ分析。(A) 21 日目での血清のグリカン・マイクロアレイ分析。接合体で免疫化されたすべてのウサギは肺炎連鎖球菌血清タイプ 8 関連オリゴ糖及び ST8 CPS に対して著しい免疫応答を示す。(B) CRM₁₉₇-18 あるいは CRM₁₉₇ だけで免疫化されたウサギの四糖類 19 に対する免疫応答の時間経過。(C) CRM₁₉₇-60 あるいは CRM₁₉₇ だけで 50

免疫化されたウサギの四糖類 6 0 に対する免疫応答の時間経過。 (D) C R M ₁₉₇ - 5 7 あるいは C R M ₁₉₇ だけで免疫化されたウサギ六糖類 5 7 に対する免疫応答の時間経過 (E) 多糖類 E L I S A (1 : 5 0 の希釀) で評価した場合の、免疫化されたウサギの肺炎連鎖球菌 C P S に対する免疫応答の時間経過。数値は免疫化される前の血清の数値に対して何倍かを示す。 (F) 多糖類 E L I S A で評価した場合の、 2 1 日目での肺炎連鎖球菌タイプ 8 C P S に対する免疫応答の比較。統計的比較を行い (一方向 A N O V A , B o n f e r r o n i 補正) 、アスタリスクは P 値を示す。 n . s は意味なし。 * P < 0 . 0 5 ; ** P < 0 . 0 0 5 。 (G) 希釀度を変えて多糖類 E L I S A で評価した場合の、 2 1 日目での肺炎連鎖球菌タイプ 8 C P S に対する免疫応答の比較。参照として、ウサギから誘導された肺炎連鎖球菌タイプ 8 血清が用いられた。

10

【 0 2 8 7 】

以下の実施例は本発明の好ましい実施形態を示すためのものである。当業者に理解されるべき点は、本発明者によって発見された代表的な技術とそれに続く実施例で紹介されている技術は、本発明では効果的に機能し、従って、その実践の好ましい様式 (モード) を構成すると考えることができることである。しかしながら、当業者であれば、本開示の内容に照らして、個々の実施形態では多くの変更が可能であり、本発明の精神及び範囲から逸脱せずに同様の、あるいは類似した結果が得られることを理解すべきである。

【 0 2 8 8 】

本明細書に開示されている記述の内容に照らせば、本発明の種々の側面のさらなる修正及び変更した実施形態が可能であることも、当業者には自明であろう。従って、以下の記述は説明のみを目的としたものであり、本発明の一般的な実施方法を当業者に教示するためのものである。ここに図示・説明されている本発明の諸形態は実施形態の実施例として理解されるべきである。ここに図示・説明されている要素や物質は別のものと取り替えることも可能であり、部分やプロセスは順序を逆にしてもよいし、本発明の一定の特徴は単独で用いられてもよいし、これらのこととはすべて、本発明の記述を理解した当業者には自明であろう。特許請求の範囲で述べられている本発明の精神と範囲を逸脱せずに本明細書に開示されている種々の要素は変更可能である。

20

【 発明を実施するための形態 】

【 0 2 8 9 】

実施例

30

1 . 化学合成実験

化学的合成のための一般事項

別段の記載がない限り、商業的に入手できる出発物質と試薬はそのまま用いられた。すべての反応はアルゴン雰囲気内で行われた。溶液は乾燥させた。高解像度質量スペクトル (H R M S) は A g i l e n t 6 2 1 0 E S I - T O F 質量スペクトロメータを用いて、ベルリンの F r e i e 大学で記録された。

略語

以下の説明で用いられている略語はそれぞれ以下のことを意味している。 A c (アセチル) 、 B A I B ([ビス (アセトキシ) ヨード] ベンゼン) 、 B n (ベンジル) 、 t - B u (t e r t - ブチル) 、 B z (ベンゾイル) 、 C b z (カルボキシベンジル) 、 D C M (ジクロロメタン) 、 D D Q (2 , 3 - ジクロロ - 5 , 6 - ジシアノ - 1 , 4 - ベンゾキノン) 、 I m (イミダゾール) 、 N A P (2 - ナフチルメチル) 、 N I S (N - ヨードスクシンイミド) 、 P y / P y r (ピリジン) 、 T E M P O ((2 , 2 , 6 , 6 - テトラメチル - 1 - ピペリジニル) オキシ) 、 T f (トリフルオロメタンスルホニル) 、 T H F (テトラハイドロフラン) 、 T M S (トリメチルシリル) 、 T M S O T f (トリメチルシリル・トリフルオロメタン・スルホネート) 、 p - T s (パラ - トリスルホニル) 。

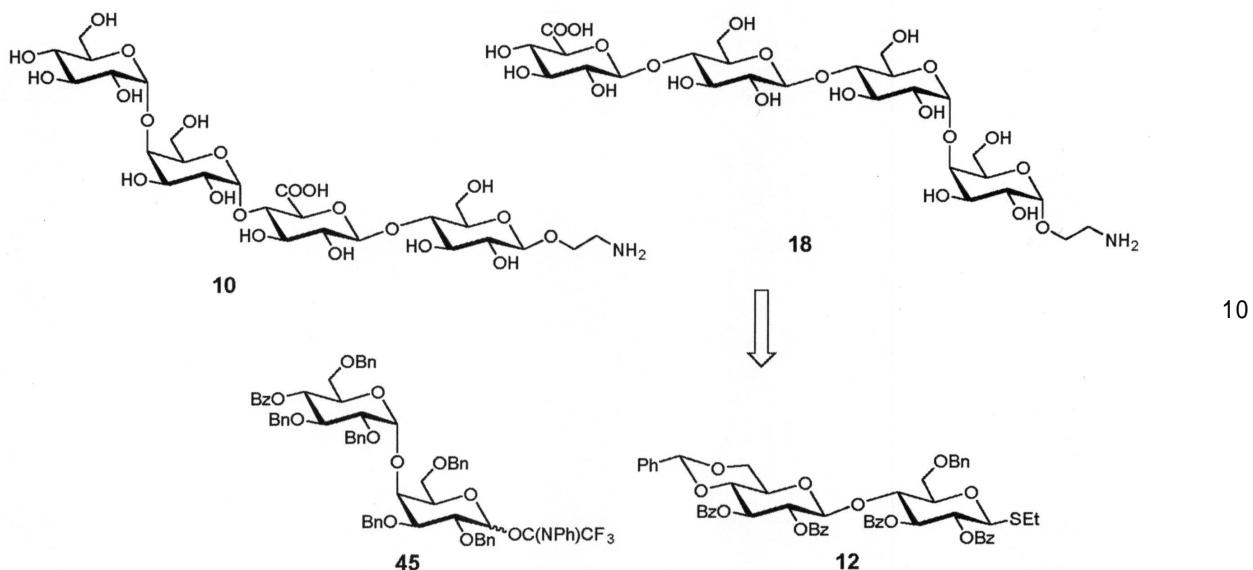
40

【 0 2 9 0 】

[2 + 2] グリコシル化方式による糖類の合成

【 0 2 9 1 】

【化48】



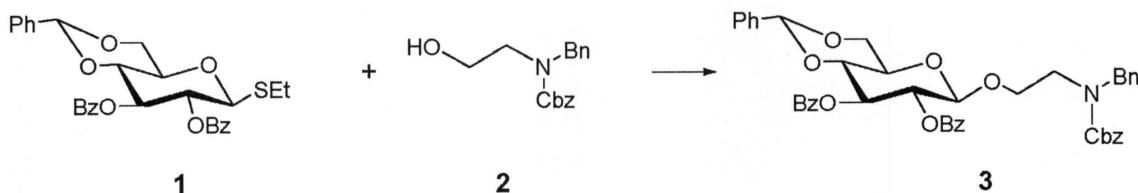
【0292】

20

実施例1-1：化合物3の合成

【0293】

【化49】



30

【0294】

チオグリコシド・ドナー基質1 (6.0 g, 11.53 mmol) とC-2リンカー2を有する受容体（ロータリーエバポレーター内でトルエンを用いて共沸状態で乾燥したものの、3.93 g, 13.83 mmol）を乾燥したDCM (100 mL) 内に入れて、それにMW乾燥4 MS 5 gを加えて室温で15分間攪拌してから、-10に冷却した。次に、NIS (3.83 g, 17.29 mmol) とTfOH (0.15 mL, 1.73 mmol) をRM（反応混合物）に加えて、-10から-5の温度で1時間攪拌した。反応の終了はTLCでモニターした。次に、RMを10%のNa₂S₂O₃水溶液 (50 mL) で冷却して、EtOAc (25 mL × 3) を用い抽出を行った。結合した有機層を次に塩水 (10 mL) で洗浄して、無水Na₂SO₄上で乾燥して、真空中で濾過・濃縮して青黄色の油状の化合物を得た。粗生成物をヘキサン内で20-30%のEtOAcを用いてシリカゲル・カラム・クロマトグラフィーで精製するとスポットが得られ、そのスポットを蒸発させると、青黄色の透明性のガム状の液体 (7.60 g, 89%) の望ましい生成物3が得られた。

40

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) = 7.97 (d d, J = 8.4, 1.2 Hz, 4 H), 7.59-6.90 (m, 21 H), 5.91-5.71 (m, 1 H), 5.62-5.41 (m, 2 H), 5.22-4.95 (m, 2 H), 4.80 (d, J = 7.7 Hz, 0.5 H), 4.67 (d, J = 7.7 Hz, 0.5 H), 4.56-4.22 (m, 3 H), 4.10-3.52 (m, 5 H), 3.50-3.33 (m, 2 H). ¹³C

50

N M R (1 0 1 M H z , C D C 1 ₃) = 1 6 5 . 7 , 1 6 5 . 4 , 1 5 6 . 3 5 , 1 5 6 . 2 , 1 3 7 . 9 , 1 3 6 . 9 , 1 3 3 . 4 , 1 3 3 . 2 , 1 2 9 . 9 , 1 2 9 . 5 , 1 2 9 . 3 , 1 2 9 . 1 , 1 2 8 . 7 , 1 2 8 . 5 , 1 2 8 . 4 , 1 2 8 . 3 , 1 2 8 . 1 , 1 2 7 . 8 , 1 2 7 . 4 , 1 2 7 . 2 , 1 2 6 . 2 , 1 0 1 . 9 , 1 0 1 . 6 , 7 8 . 9 , 7 2 . 6 , 7 2 . 1 , 6 9 . 1 , 6 8 . 7 , 6 7 . 4 , 6 7 . 2 , 6 6 . 7 , 5 1 . 7 , 4 6 . 9 , 4 5 . 8 。

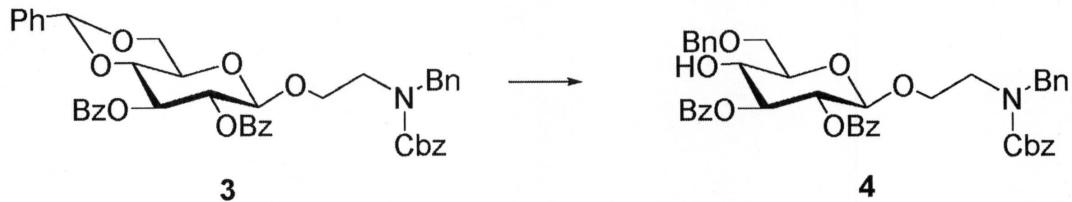
【 0 2 9 5 】

実施例 1 - 2 : 化合物 4 の合成

【 0 2 9 6 】

【 化 5 0 】

10



【 0 2 9 7 】

基質 3 (7 . 5 0 g , 1 0 . 0 8 m m o l) をアルゴン下で、活性化された 3 M S 20 と共に D C M (7 5 m L) 内に入れて、1 0 分間置き冷却して 0 にした。トリエチルシリラン (1 2 . 8 8 m L , 8 1 . 0 m m o l) を加えて、T F A (4 . 6 6 m L , 6 0 . 5 m m o l) を滴下し、1 6 時間室温でを攪拌して、水 (1 0 0 m L) で冷却した。その溶液を D C M (3 0 m L × 3) で抽出して、結合した有機物は水 (2 0 m L × 3) 及び塩水 (2 0 m L) で徹底的に洗浄して、無水 N a ₂ S O ₄ で乾燥して、濾過し、真空中で蒸発させて、無色ガム状の固体を得た。粗生成物をヘキサン内で 3 0 - 1 0 0 % の E t O A c 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、生成物 4 を得て、真空中で蒸発させて、無色のオイル (6 . 1 g , 8 1 %) を得た。

【 0 2 9 8 】

¹ H N M R (4 0 0 M H z , C D C 1 ₃) = 8 . 0 4 - 7 . 8 4 (m , 4 H) , 7 . 6 0 - 6 . 8 7 (m , 2 1 H) , 5 . 5 5 - 5 . 3 6 (m , 2 H) , 5 . 2 2 - 4 . 9 0 (m , 2 H) , 4 . 7 7 - 4 . 5 3 (m , 3 H) , 4 . 5 1 - 4 . 3 0 (m , 2 H) , 4 . 0 6 - 3 . 9 3 (m , 2 H) , 3 . 8 7 - 3 . 5 3 (m , 4 H) , 3 . 4 6 - 3 . 2 0 (m , 3 H) . ¹ ³ C N M R (1 0 1 M H z , C D C 1 ₃) = 1 6 7 . 3 , 1 6 5 . 5 , 1 3 8 . 0 , 1 3 7 . 7 , 1 3 3 . 6 , 1 3 0 . 1 , 1 2 9 . 9 , 1 2 8 . 6 , 1 2 8 . 5 , 1 2 8 . 1 , 1 2 7 . 9 , 1 2 7 . 8 , 1 2 7 . 4 , 1 0 1 . 3 , 1 0 1 . 2 , 7 6 . 7 , 7 4 . 7 , 7 3 . 9 , 7 1 . 6 , 7 1 . 5 , 7 1 . 2 , 7 0 . 0 , 6 9 . 0 , 6 7 . 4 , 6 7 . 2 , 5 1 . 7 , 4 6 . 8 , 4 5 . 8 。

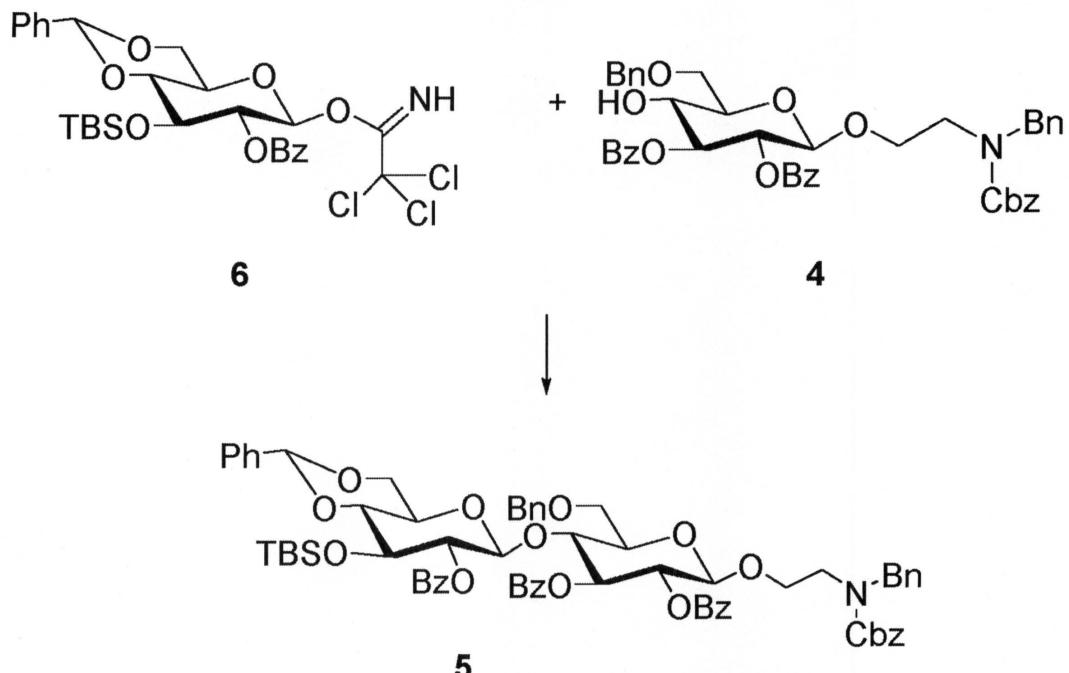
【 0 2 9 9 】

実施例 1 - 3 : 化合物 5 の合成

【 0 3 0 0 】

40

【化51】



【0301】

受容体 4 (2.0 g、2.68 mmol) を活性化 4 A W M S と共に D C M (30 mL) に入れて、30分間攪拌してから 0 に冷却した。その後、T M S O T f (0.49 μ L、0.27 mmol) を加えて、さらに D C M (5 mL) 内にイミデート・ドナー 6 (糖類 R e s 2 0 0 8, 3 4 4, 4 3 9 - 4 4 7) (2.20 g、3.89 mmol) を加え、5分間入れたものを加え、反応混合物を 0 で 30分間攪拌した。その反応混合物を E t ₃ N (1 mL) で冷却して、濾過し、真空中で溶媒を除去した。粗生成物をヘキサン内で E t O A c を用いてフラッシュ・クロマトグラフィーで精製して、生成物 5 (3.2 g、98%) を得た。

【0302】

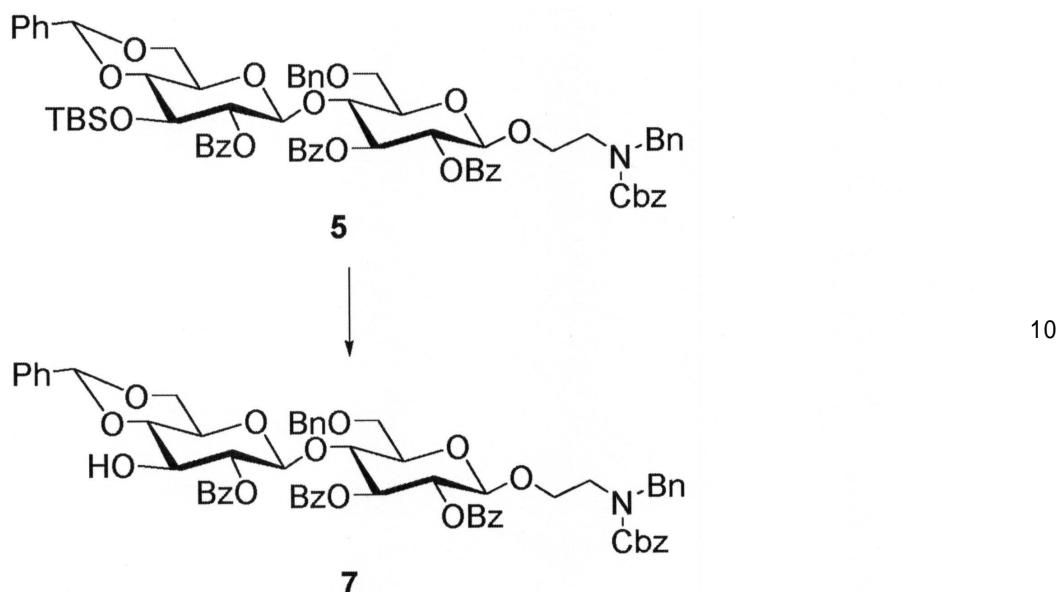
¹ H N M R (400 MHz, C D C l ₃) = 8.13-6.88 (m, 35H), 5.67-5.52 (m, 1H), 5.46-5.31 (m, 1H), 5.20 (s, 1H), 5.16-4.89 (m, 3H), 4.68 (t, J = 11.2 Hz, 1H), 4.55 (d, J = 8.1 Hz, 1.5H), 4.47-4.24 (m, 3.5H), 4.20-3.89 (m, 1.5H), 3.89-3.19 (m, 9.5H), 3.13 (t d, J = 9.7, 4.9 Hz, 1H), 2.63 (t, J = 10.2 Hz, 1H), 0.63 (s, 9H), -0.12 (s, 3H), -0.19 (s, 3H). ¹³ C N M R (101 MHz, C D C l ₃) = 165.4, 165.36, 164.7, 138.2, 137.1, 133.4, 133.2, 129.94, 129.9, 129.2, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 128.0, 127.8, 127.3, 126.4, 101.7, 101.2, 101.1, 81.2, 75.5, 75.1, 74.6, 73.7, 73.4, 73.0, 68.9, 68.0, 67.3, 66.1, 51.7, 46.9, 25.6, 18.0, -4.1, -4.8。

【0303】

実施例 1-4：化合物 7 の合成

【0304】

【化52】



【0305】

基質5(1.6 g、1.317 mmol)をピリジン(10 mL)に0で入れて、それに、HF-ピリジン(3.56 mL、39.5 nmol)を加えて、室温で24時間攪拌した。その反応混合物を水で洗浄して、DCM(20 mL × 3)で抽出を行った。結合した有機物を希釈HCl(50 mL × 2)、飽和NaHCO₃溶液(50 mL)、塩水(10 mL)で洗浄してNa₂SO₄で乾燥させて、濾過し、真空中で濃縮させて粗生成物を得て、それをヘキサン内で35-40%のEtOAcを用いてシリカ・カラム・クロマトグラフィーを用いて精製し、色のついたフォーム(1.3 g、90%)を得た。

20

【0306】

¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) = 8.15-6.92 (m, 1 H), 5.65-5.51 (m, 1 H), 5.44-5.30 (m, 1 H), 5.23 (s, 1 H), 5.11-5.04 (m, 3 H), 4.77-4.49 (m, 3 H), 4.49-4.24 (m, 4 H), 4.25-3.91 (m, 2 H), 3.91-3.59 (m, 4 H), 3.57-3.00 (m, 7 H), 2.68 (t, J = 10.3 Hz, 1 H). ¹³C NMR(101 MHz, CDCl₃) = 165.4, 165.3, 156.4, 156.2, 138.2, 136.9, 133.6, 133.2, 130.3, 130.0, 129.9, 129.4, 128.7, 128.7, 128.5, 128.5, 128.4, 128.1, 128.1, 127.8, 127.4, 126.4, 101.8, 101.2, 101.1, 80.6, 75.9, 74.9, 74.7, 73.7, 73.5, 72.6, 72.0, 71.9, 68.9, 67.9, 67.4, 67.2, 66.0, 51.7, 46.9, 45.9.

30

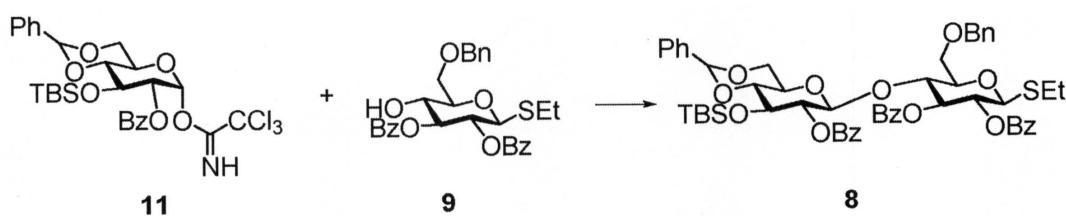
【0307】

40

実施例1-5：化合物8の合成

【0308】

【化53】



50

【0309】

(2S, 3R, 4S, 5R, 6R) - 6 - (ベンジルオキシ)メチル) - 2 - (エチルチオ) - 5 - ヒドロキシテトラヒドロ) - 2H - ピラン - 3, 4 - ジイル・ジベンゾエート9 (J Carbon hydrate Chemistry 1993, 12, 309) (4.00g、7.654mmol、1.0eq.) と (4aR, 6R, 7R, 8aR) - 8 - (tert-ブチルジメチルシリル)オキシ) - 2 - フェニル - 6 - (2, 2, 2 - トリクロロ - 1 - イミノエトキシ)ヘキサヒドロピラノ [3, 2 - d] [1, 3] ジオキシン - 7 - イルベンゾエート11 (糖質 Res, 2008, 344, 439) (6.28g、9.95mmol、1.3eq.) との混合物をアルゴン雰囲気下で30分間 10 搅拌した。その反応混合物を -20 で冷却して、TMSOTf (0.16mL, 0.880mmol, 0.115eq.) を添加した。45分間搅拌した後、その反応混合物に ET₃N (1.0mL) を添加して急冷した。その有機溶液を真空下で濃縮した。

【0310】

得られた暗黄色オイルをシリカ・ゲル (EtOAc / ヘキサン、1/3, v/v) 上でフラッシュ・クロマトグラフィーを用いて精製して、(2S, 3R, 5R, 6R) - 5 - ((4aR, 6S, 7R, 8S, 8aR) - 7 - (ベンゾイルオキシ) - 8 - ((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ) - 2 - フェニルヘキサヒドロ・ピラノフェニルヘキサヒドロピラノ [3, 2 - d] [1, 3] ジオキシン - 6 - イル)オキシ) - 6 - (ベンジルオキシ)メチル) - 2 - (エチルチオ)テトラヒドロ - 2H - ピラン - 3, 4 - ジイル・ジベンゾエート8 (6g、79%) が無色の固体で得られた。 20

【0311】

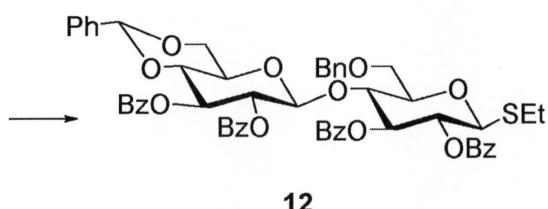
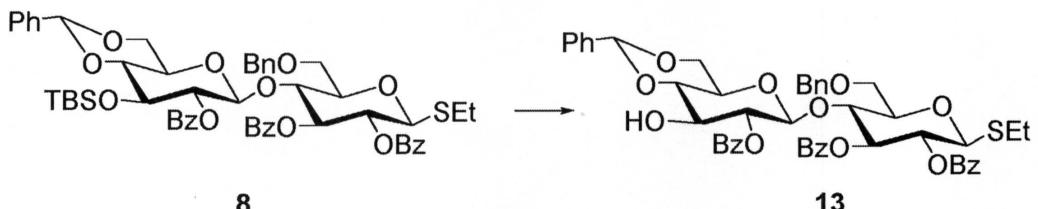
R_f = 0.5 (EtOAc / ヘキサン, 3/7, v/v). ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) = -0.19 (s, 3H), -0.11 (s, 3H), 0.63 (s, 9H), 1.20 (t, J = 7.4Hz, 3H), 2.67 (m, 2H), 3.15 (td, J = 9.7Hz, 4.9Hz, 2H), 3.28 (t, J = 9.2Hz, 1H), 3.53 - 3.37 (m, 1H), 3.74 - 3.55 (m, 1H), 3.79 (t, J = 9.0Hz, 1H), 4.19 (t, J = 9.5Hz, 1H), 4.37 (d, J = 12.2Hz, 1H), 4.57 (d, J = 10.0Hz, 1H), 4.59 (dd, J = 15.1, 9.0Hz, 2H), 4.67 (d, J = 12.2Hz, 1H), 5.12 (dd, J = 8.9, 8.2Hz, 1H), 5.21 (s, 1H), 5.41 (t, J = 9.8Hz, 1H), 5.63 (t, J = 9.3Hz, 1H), 7.29 - 7.72 (m, 19H), 7.88 - 8.03 (m, 6H). ¹³C NMR (101MHz, CDCl₃) = 165.27, 165.07, 164.45, 138.16, 137.00, 133.14, 133.10, 132.97, 130.21, 129.79, 129.77, 129.75, 129.34, 128.99, 128.51, 128.38, 128.28, 128.22, 128.05, 128.02, 127.99, 126.21, 101.57, 101.06, 83.39, 81.05, 78.70, 77.43, 77.11, 76.80, 75.41, 74.93, 74.52, 73.49, 72.90, 70.59, 67.86, 67.45, 65.97, 25.43, 24.08, 17.80, 14.85, -4.20, -4.97. 30 40

【0312】

実施例1 - 6 : 化合物12の合成

【0313】

【化 5 4】



【 0 3 1 4 】

TBS基質8(2.0g、2.018mmol、1eq.)を0でピリジン(10mL)に入れて、それに70%HF-ピリジン(5.45mL、60.5mmol、30eq.)を加え、室温で36時間攪拌した。

〔 0 3 1 5 〕

反応混合物を水(50mL)で洗浄して、DCM(50mL×3)で抽出した。結合した有機物を飽和NaHCO₃溶液(50mL)、塩水(20mL)で洗浄して、Na₂SO₄で乾燥して、真空中で濾過・濃縮して、粗生成物を得て、それを35-40%のEtOAc/ヘキサンを用いたシリカ・カラム・クロマトグラフィーを用いて精製したところ、白色のフォーム13(1.7g, 96%)が生じた。

〔 0 3 1 6 〕

¹ H NMR (400 MHz, CDCl₃) = 8.08-7.85 (m, 6 H), 7.69-7.28 (m, 19 H), 5.62 (t, J = 9.3 Hz, 1 H), 5.41 (t, J = 9.8 Hz, 1 H), 5.22 (s, 1 H), 5.08 (dd, J = 9.2, 7.9 Hz, 1 H), 4.70 (d, J = 7.8 Hz, 1 H), 4.63 (d, J = 12.1 Hz, 1 H), 4.58 (d, J = 10.0 Hz, 1 H), 4.40 (d, J = 12.1 Hz, 1 H), 4.19 (t, J = 9.5 Hz, 1 H), 3.82 (td, J = 9.2, 3.6 Hz, 1 H), 3.70 (dd, J = 11.2, 3.4 Hz, 1 H), 3.63 (dd, J = 10.6, 5.0 Hz, 1 H), 3.59-3.55 (m, 1 H), 3.54-3.48 (m, 1 H), 3.32 (t, J = 9.3 Hz, 1 H), 3.15 (td, J = 9.7, 5.0 Hz, 1 H), 2.78-2.60 (m, 3 H), 2.50 (d, J = 3.6 Hz, 1 H), 1.22 (t, J = 7.5 Hz, 3 H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) = 165.38, 165.29, 165.13, 138.02, 136.70, 133.43, 133.14, 133.09, 130.08, 129.87, 129.81, 129.71, 129.30, 129.28, 129.23, 128.50, 128.48, 128.29, 127.95, 127.86, 126.19, 101.59, 100.88, 83.42, 80.42, 78.71, 75.71, 74.67, 74.51, 73.46, 72.42, 70.48, 67.70, 67.51, 65.76, 24.11, 14.85.

【 0 3 1 7 】

基質 13 (1.6 g, 1.824 mmol, 1 eq) を 0 °C の温度で無水 DCM (10 mL) に入れて、それに、ピリジン (10 mL) と BzCl (0.635 mL, 5.47 mmol, 3 eq) を滴下して加え、その反応混合物を 16 時間攪拌した。

【 0 3 1 8 】

次に、その反応混合物を真空中で蒸発させて溶媒を取り除き、再び、DCM(25mL)

) 内に入れて、飽和 NaHCO_3 溶液 (5 mL \times 2) で洗浄した。そして、有機層を Na_2SO_4 上で乾燥して、濾過して、駿空中で蒸発させ、オフホワイトの固体 (1.2) を得るためにメタノールを用いてすりつぶし、真空中で濾過・乾燥した (1.5 g, 84%)。

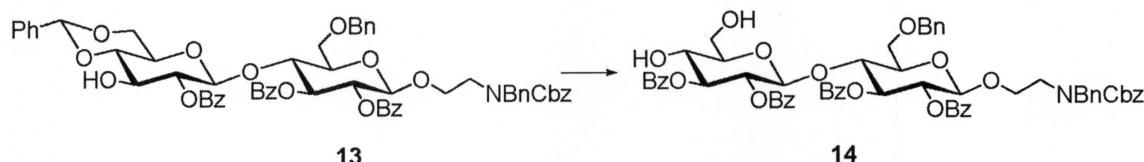
【0319】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 7.95 (ddd, $J = 16.9, 12.1, 7.3$ Hz, 8H), 7.60-7.12 (m, 22H), 5.66 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 5.58 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 5.43 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H), 5.36 (dd, $J = 9.5, 7.9$ Hz, 1H), 5.20 (s, 1H), 4.77 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.60 (t, $J = 10.3$ Hz, 2H), 4.39 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H), 4.23 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H), 3.74-3.43 (m, 5H), 3.29 (td, $J = 9.7, 4.9$ Hz, 1H), 2.83-2.55 (m, 3H), 1.22 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) 165.46, 165.25, 165.16, 164.72, 137.82, 136.62, 133.31, 133.12, 133.02, 130.05, 129.80, 129.73, 129.70, 129.27, 129.24, 128.99, 128.97, 128.63, 128.43, 128.29, 128.22, 128.17, 128.10, 127.98, 126.03, 101.12, 83.39, 78.65, 78.29, 75.85, 74.44, 73.44, 72.43, 71.96, 70.47, 67.71, 67.31, 66.16, 24.04, 14.84

実施例 1 - 7 : 2, 3 - ジ - O - ベンゾイル - 2 - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - 2, 3 - ジ - O - ベンゾイル - 6 - O - ベンジル - 2 - D - グルコイラノシル - (1 - 1) - (2 - N - ベンジル - N - ベンジルオキシカルボニルアミノ) エタノール (14) の合成

【0320】

【化55】



【0321】

アルコール 13 (400 mg, 0.36 mmol) をピリジン (5.0 mL) に混ぜて攪拌した溶液に、0 度で塩化ベンゾイル (63 μ L, 0.55 mmol) を加えた。この反応物を室温までゆっくり温めて、その温度で 16 時間攪拌した。0.5 当量 (eq) の BzCl を加えて反応を加速させて、完了させた。この混合物を室温で 2 時間攪拌して、水 (30 mL) で冷却し、 EtOAc (50 mL) で希釈した。分離後に、有機部分を 0.1 M 塩酸 (20 mL) で洗浄して、水性部分を EtOAc (50 mL) で再抽出した。結合した有機部分を飽和 NaHCO_3 (20 mL) と塩水 (10 mL) で洗浄して、 Na_2SO_4 上で乾燥させ、濃縮したところ、黄色のオイル状の中間テトラベンゾエートを得た。その中間テトラベンゾエートを CH_2Cl_2 (65 mL) に混ぜて攪拌した溶液に室温でエタンチオール (0.36 mL, 4.9 mmol) と p - トルエンスルホン酸 (1.2 mg, 0.06 mmol) を加えた。この混合物を室温で 2 時間攪拌して、 Et_3N (50 μ L) で冷却して、濃縮させた。残渣をフラッシュ・クロマトグラフィー ($\text{EtOAc}/\text{ヘキサン} 0:1$ から $1:10$ さらに $1:8$) で精製すると、ジオール 14 (38.9 mg, 0.349 mmol) が白色のフォーム形状で得られた。 $\text{C}_{64}\text{H}_{61}\text{NO}_{17}$ ($M + N$ a)⁺ 実測値 1138.3837 について HRMS (ESI) を計算したところ、113

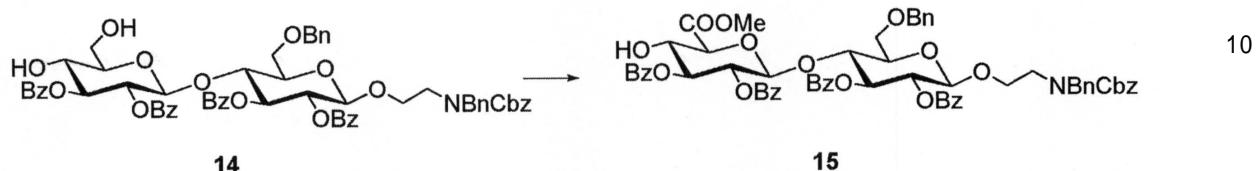
8.3850 m/z であった。

【0322】

実施例1-8：メチル(2,3-ジ-O-ベンゾイル- -D-グルコピラノシリ)ウロネート-(1-4)-2,3-ジ-O-ベンゾイル-6-O-ベンジル- -D-グルコイラノシリ-(1-1)-(2-N-ベンジル-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ)エタノール(15)の合成

【0323】

【化56】



【0324】

アルコール14(90mg、0.081mmol)をCH₂Cl₂(2.0mL)と水(0.8mL)を混ぜて攪拌した溶液に、0で、TEMPO(2.5mg、0.016mmol)とBAIB(55mg、0.170mmol)を加えた。この反応物をその温度で20分間攪拌して、室温まで温めた。この混合物をその温度で2時間攪拌して、EtOAc(20mL)と水(10mL)で希釈した。分離後に、水性部分をEtOAc(2×20mL)で抽出して、結合した有機部分はNa₂SO₄上で乾燥して、濃縮した。残渣をフラッシュ・クロマトグラフィー(EtOAc/ヘキサン1:2から1:1、ついで1:1+5%AcOH)で精製したところ、白色フォーム状の中間カルボン酸を得た。

【0325】

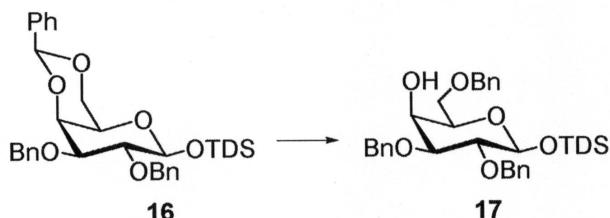
この中間カルボン酸をトルエン(1.6mL)とMeOH(0.8mL)に入れて攪拌した溶液に室温でTMS-ジアゾメタン(0.04mL、0.081mmol)を加えた。この反応物を室温で2時間攪拌した。さらに0.25当量のTMS-ジアゾメタンを加えて、反応を終了させた。この混合物を室温で1時間攪拌した後、AcOH(0.1mL)で冷却して、濃縮させた。残渣をフラッシュ・クロマトグラフィー(EtOAc/ヘキサン0:1から1:1)で精製して、メチル・エステル15(73mg、0.064mmol, 79%、2ステップ以上)が透明なオイルとして得られた。HRMS(ESI)はC₆H₆N₁O₁₈(M+Na)⁺に関して1166.3786と計算されたが、実測値では1166.3762 m/z であった。

【0326】

実施例1-9：t-ヘキシリ2,3,6-トリ-O-ベンジル- -D-ガラクトピラノシド(17)の合成

【0327】

【化57】



【0328】

活性化されたMS(3-AW)を用いてベンジルデン・アセタール16(J. Carbohydr. Chem. 1996, 15(2), 241)(1.68g、2.84mmol)と

10

20

30

40

50

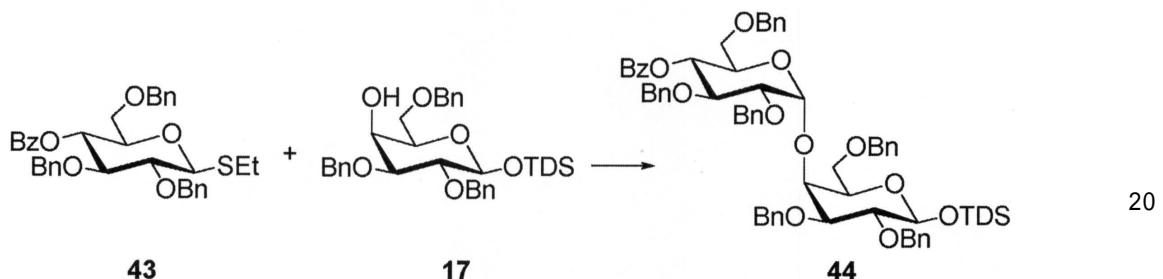
1) を CH_2Cl_2 (60 mL) に加えて攪拌した溶液に、0 °C でトリエチルシラン (2.72 mL, 17.06 mmol) とトリフルオロ酢酸 (1.81 mL, 17.06 mmol) を加えた。この反応物を室温までゆっくり加温して、その温度で 16 時間攪拌した。その反応物を Et_3N (2 mL) で急冷して、セライトで濾過して、濃縮した。その残渣をフラッシュ・クロマトグラフィー (EtOAc / ヘキサン 1 : 20 から 1 : 7) で精製して、アルコール 17 (1.46 g, 2.46 mmol, 87%) が得られた。 $\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{O}_6\text{Si} (\text{M} + \text{Na})^+$ に関して HRMS は 615.3117 と計算されたが、実測値は 615.3104 m/z であった。

【 0 3 2 9 】

実施例 1 - 10 : t ヘキシリ 4 - O - ベンゾイル - 2 , 3 , 6 - トリ - O - ベンジル 10
- - D - グルコピラノシリ - (1 4) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - ベンジル - - D -
ガラクトピラノシド (4 4) の合成

〔 0 3 3 0 〕

【化 5 8】



【 0 3 3 1 】

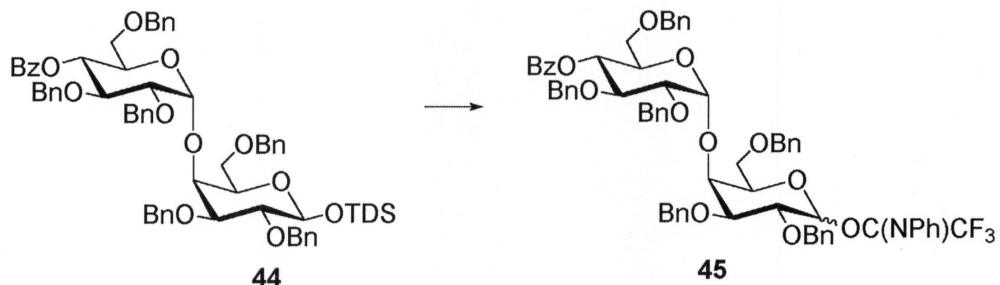
トリグリコシド43 (J. Org. Chem. 2012, 77 (1), 291) (667 mg, 1.11 mmol) とアルコール17 (550 mg, 0.93 mmol) を乾燥トルエン (3 × 10 mL) で共蒸発させて、30分間、高度の真空中に保存した。この混合物を Et_2O (14 mL) と CH_2Cl_2 (2.8 mL) 内に溶解して、活性化分子ふるい (3 - AW) 上で室温で30分間攪拌した。この溶液を -20 に冷却して、 NIS (250 mg, 1.11 mmol) とトリフリン酸 (16 μL 、0.19 mmol) で処理した。この混合物を1時間攪拌してから、-10 までゆっくりと加温した。この反応物を Et_3N (0.05 mL) で急冷して、 CH_2Cl_2 で希釈し、セライトで濾過して、濃縮した。残渣をフラッシュ・クロマトグラフィー (EtOAc / ヘキサン 0.1 から 1 : 8 さらに 1 : 6) で精製して、二糖類44 (553 mg, 0.490 mmol, 53%) が対応する - アロマー (231 mg, 0.205 mmol, 22%) と共に得られた。7 : 透明なオイルの分析データ。 $\text{C}_{6.9}\text{H}_{8.0}\text{O}_{1.2}\text{Si} (\text{M} + \text{Na})^+$ に対する計算値は 1151.5316 であったが、実測値は 1151.5293 m/z であった。

【 0 3 3 2 】

実施例 1 - 11 : 4 - O - ベンゾイル - 2 , 3 , 6 - トリ - O - ベンジル - - D - グ
ルコピラノシリ - (1 4) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - - D - ガラクトピラノシリ -
トリフルオロ - (N - フェニル) アセトイミデート (4 5) の合成 40

【 0 3 3 3 】

【化59】



【0334】

シリル・エーテル44 (470 mg, 0.416 mmol) をTHF (8.3 mL) に加えて攪拌した溶液に0 の温度で酢酸 (0.24 mL, 4.19 mmol) とTBAF (THF中に1.0 M 溶液、4.2 mL, 4.20 mmol) を0 で加えた。その反応物を室温までゆっくり加温して、その温度で2時間攪拌した。酢酸 (0.24 mL, 4.19 mmol) とTBAF (THF中に1.0 Mを加えた溶液、4.2 mL, 4.20 mmol) を加え、その反応混合物を室温で16時間攪拌した。その混合物をEt₂O (50 mL) で希釈して、水 (3×30 mL) で洗浄して、その水相をEt₂O (2×20 mL) で再抽出した。結合有機部分をNa₂SO₄上で乾燥して濃縮した。残渣をシリカ・ゲル (EtOAc/ヘキサン 1:3 から 1:1) のショートプラグを通じて濾過したところ、中間的なラクトール混合物が透明なオイルとして得られた。

10

【0335】

CH₂Cl₂ (7.8 mL) にラクトール混合物を加えた溶液を攪拌して、室温で、炭酸セシウム (318 mg, 0.975 mmol) とF₃CC(NPh)Cl (202 mg, 0.975 mmol) を加えた。その混合物をその温度で2.5時間攪拌して、ヘキサン (0.5% (v/v) Et₃N, 10 mL) で希釈して、セライトで濾過した。その残渣をフラッシュ・クロマトグラフィー (EtOAc/ヘキサン 0:1 + 0.5% Et₃N から 1:3 + 0.5% Et₃N) で精製したところ、イミデート混合物45 (404 mg, 0.349 mmol, 84%, 2ステップで) が透明なオイルとして得られた。C₆H₆F₃NO_{1.2} (M+Na)⁺に対する計算値は1180.4434であったが、実測値は1180.4458 m/z であった。

20

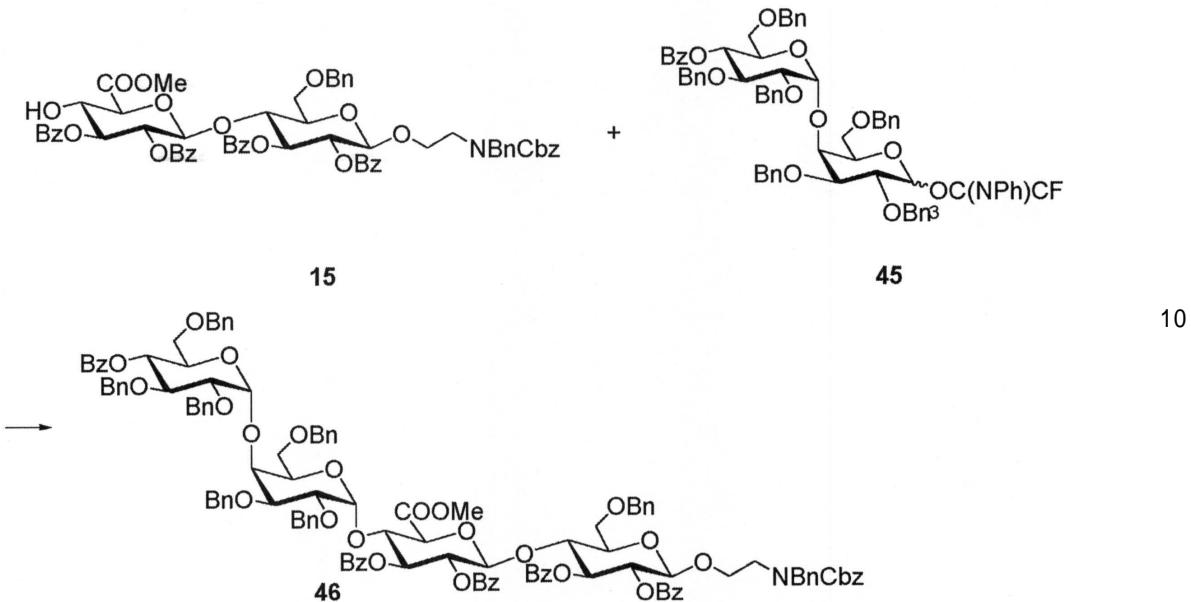
【0336】

実施例1-12: 4-O-ベンゾイル-2,3,6-トリ-O-ベンジル- -D-グルコピラノシリル- (1-4)-2,3,6-トリ-O-ベンジル- -D-ガラクトピラノシリル- (1-4)-メチル [2-3-ジ-O-ベンゾイル- -D-グルコピラノシリル] ウロネート- (1-4)-2,3-ジ-O-ベンゾイル-6-O-ベンジル- -D-グルコイラノシリル- (1-1)- (2-N-ベンジル-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ)エタノール (46) の合成

30

【0337】

【化 6 0】



【0 3 3 8】

20

アルコール **15** (100 g, 87 μmol) とイミデート **45** (121 mg, 105 μmol) を乾燥トルエン (3 × 10 mL) で共蒸発させて、高真空中に30分間置いた。この混合物を Et_2O (3.3 mL) と CH_2Cl_2 (1.1 mL) に溶解して、活性化した分子ふるい (3 - AW) 上で室温で30分間攪拌した。この溶液を -20 に冷却して、 TMSCOTf (3.2 μL , 17 μmol) で処理した。この混合物を1時間攪拌して、0 までゆっくり加温した。この反応物を飽和 NaHCO_3 溶液 (10 mL) で急冷して、 CH_2Cl_2 (3 × 20 mL) で抽出し、結合した有機物を Na_2SO_4 で乾燥して、濃縮した。残渣をフラッシュ・クロマトグラフィー (EtOAc/ヘキサン/トルエン 1 : 3 : 3 から 1 : 2 : 2) で精製して、四糖類 **46** (130 mg, 62 μmol , 71%) が透明なオイルとして得られた。 $\text{C}_{12.6}\text{H}_{12.1}\text{NO}_{2.9}$ ($M + \text{Na}$) に対する HRMS (ESI) の計算値は 2134.7921 であったが、実測値は 2134.7879 m/z であった。

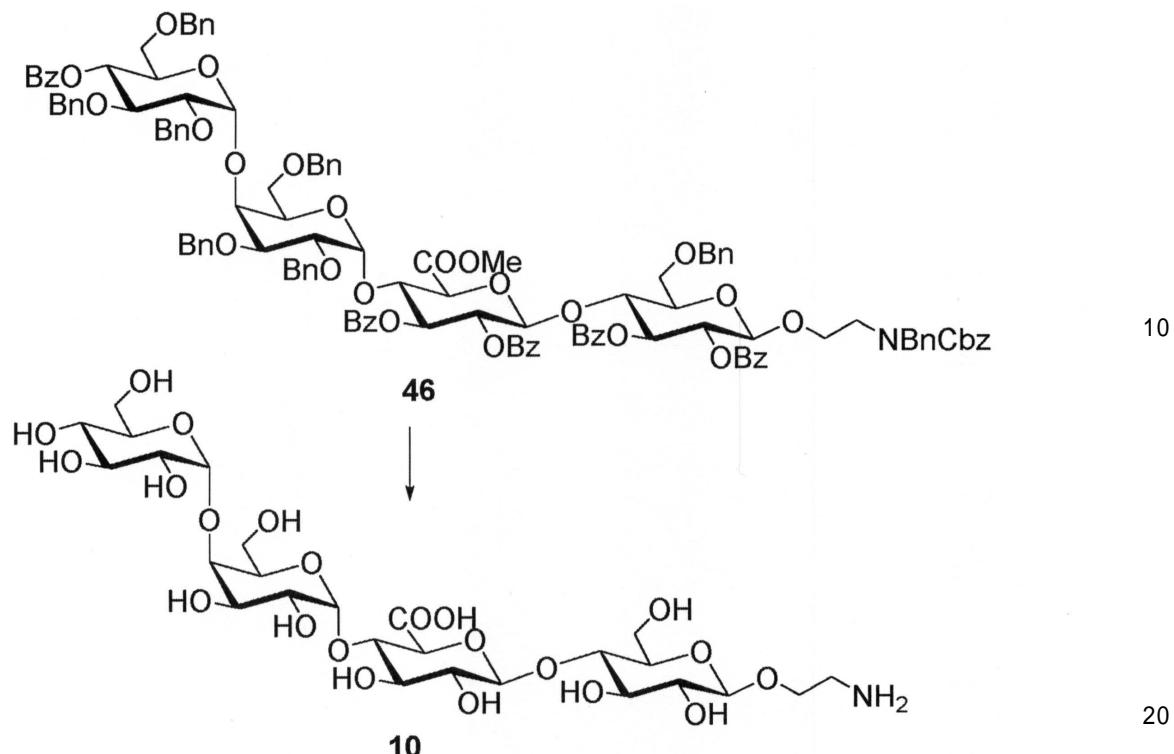
30

【0 3 3 9】

実施例 1 - 13 : - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 - 4) - - D - グルコイラノシル - (1 - 1) - (2 - アミノ)エタノール (10) の合成

【0 3 4 0】

【化61】



【0341】

エステル46 (56 mg, 26 μ mol) をTHF (5 mL) に入れたものとMeOH (1 mL) を混ぜて攪拌した溶液に0°Cで過酸化水素 (6%水溶液、265 μ L, 530 μ mol) とLiOH (1M水溶液、265 μ L, 132 μ mol) を加えた。この反応物を1時間攪拌して、室温まで加温した。その反応物を室温に保ち、2時間後に、過酸化水素 (6%水溶液、265 μ L, 530 μ mol) とLiOH (1M水溶液、265 μ L, 132 μ mol) で処理した。2時間後にNaOH (15%水溶液、1 mL) を加えて、その混合物を室温で72時間攪拌した。その溶媒を減圧状態で蒸発させて、残渣はトルエン (2 x 5 mL) で共蒸発させ、MeOH (5 mL) 内に溶かした。その溶液をナトリウムメトキシド (143 mg, 2.65 mmol) で室温で処理して、その温度で96時間攪拌した。溶媒を蒸発させて、残渣は水 (5 mL) に溶かした。その溶液を0°Cで0.5 MのNaHSO₄水溶液で中和させて、EtOAc (5 x 5 mL) で抽出させた。結合した有機物部分をNa₂SO₄で乾燥させて、中間の酸が白色フォームとして得られた。

【0342】

その中間体の酸をMeOH (2 mL) に溶かしたものを室温で、Pd/C (50 mg) をMeOH (1 mL)、水 (1 mL)、及びAcOH (5滴) を混ぜた懸濁液に加えた。その反応物をH₂雰囲気内で48時間攪拌して濾過し濃縮させた。残渣を固相抽出 (クロマボンド (Chromabond) C18, Macherey-Nagel) で精製して、凍結乾燥したところ、四糖類10 (酢酸塩、13.6 mg, 18 μ mol, 3ステップで69%) が白い固体として得られた。C₂₆H₄₅NO₂₂ (M+Na)⁺に関するHRMS (MALDI) 計算値は746.2330で、実測値は746.2323 m/z であった。

【0343】

実施例1-14: 4-O-ベンゾイル-2,3,6-トリ-O-ベンジル- -D-グルコピラノシリル- (1-4)-2,3,6-トリ-O-ベンジル- -D-ガラクトピラノシリル- (1-1)- (2-N-ベンジル-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ)エタノール (47) の合成

【0344】

10

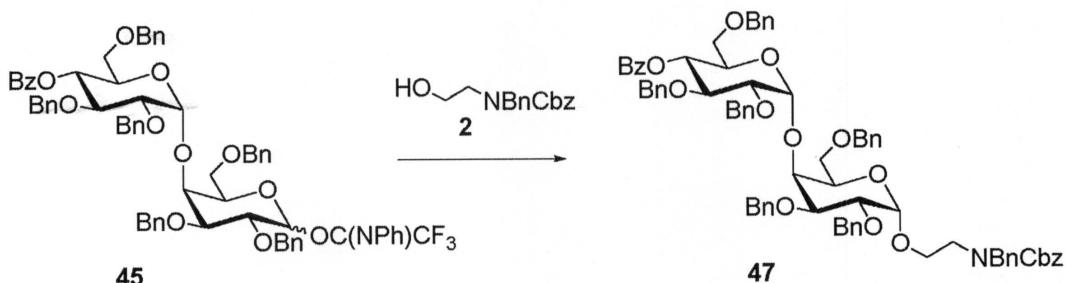
20

30

40

50

【化62】



10

【0345】

イミデート45 (200 mg、0.173 mmol) とアルコール2 (74 mg、0.259 mmol) を乾燥トルエン (2×5 mL) で共蒸発させて、高真空中に30分間置いた。この混合物をEt₂O (2.8 mL) とCH₂Cl₂ (0.7 mL) に溶解して、活性化した分子ふるい (3 - AW) 上で30分間、室温で攪拌した。この溶液を-40まで冷却して、TMSOTf (6.2 μL, 35 μmol) で処理した。この混合物をその温度で10分間攪拌して、-10までゆっくりと加温した。この反応物を飽和NaHCO₃ (5 mL) で急冷して、CH₂Cl₂ (3×20 mL) で抽出し、結合した有機物部分はNa₂SO₄ で乾燥して、濃縮させた。残渣はフラッシュ・クロマトグラフィー (EtOAc/ヘキサン 0:1から1:6更に1:4) で精製したところ、カルバメート47 (160 mg、0.128 mmol, 74%) が対応する-アノマー (32 mg、0.026 mmol, 15%) と共に得られた。47に関する分析値：透明なオイル C₇H₁₄N₂O₄ (M+Na)⁺ のHRMS (ESI) の計算値は1276.5398で、実測値は1276.5405 m/z であった。

【0346】

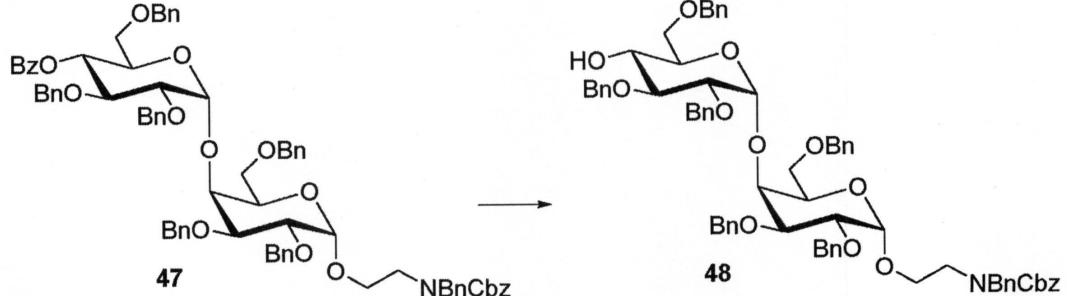
実施例1-15: 2,3,6-トリ-O-ベンジル- -D-グルコピラノシリル- (1-4)-2,3,6-トリ-O-ベンジル- -D-ガラクトピラノシリル- (1-1)- (2-N-ベンジル-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ)エタノール (48) の合成

【0347】

【化63】

20

30



40

【0348】

エステル47 (126 mg、0.100 mmol) をTHF (5 mL) とMeOH (5 mL) に入れて攪拌した溶液に0でナトリウム・メトキシド (MeOH、1 mL、0.500 mmol) 内に0.5 M) を加えて、その反応混合物を室温までゆっくり加温して、その温度で24時間保存した。ナトリウム・メトキシド (MeOH、1 mL、0.500 mmol) 内に0.5 M) を加えて、その反応物を37に加温した。その混合物をその温度で7時間攪拌し、アンバーライトIR120 (H⁺形状) で中和して、濾過し、濃縮した。残渣をフラッシュ・クロマトグラフィー (EtOAc/ヘキサン 0:1から1:6更に1:4) で精製したところ、アルコール48 (98 mg、85 μmol, 85%) が透

50

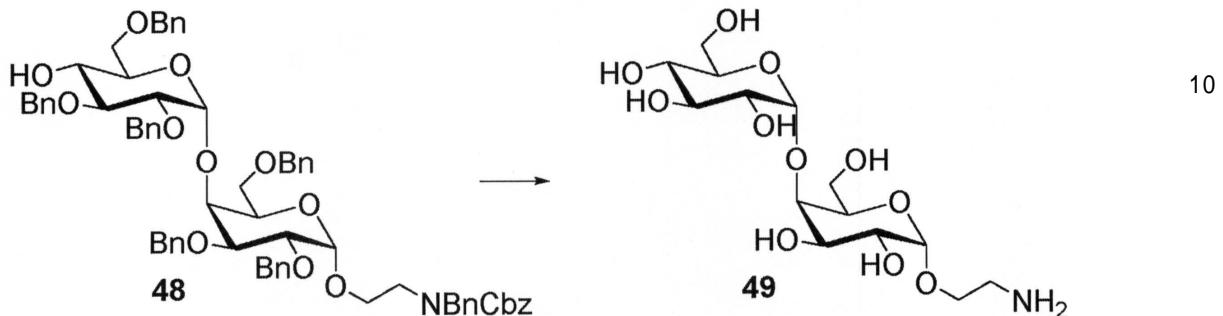
明らかなオイル形状で得られた。C₇₁H₇₅NO₁₃(M+Na)⁺のHRMS(ESI)の計算値は1172.5136で、実測値は1172.5103m/zであった。

【0349】

実施例1-16: -D-グルコピラノシリル-(1-4)- -D-ガラクトピラノシリル-(1-1)-(2-アミノ)エタノール(49)の合成

【0350】

【化64】



【0351】

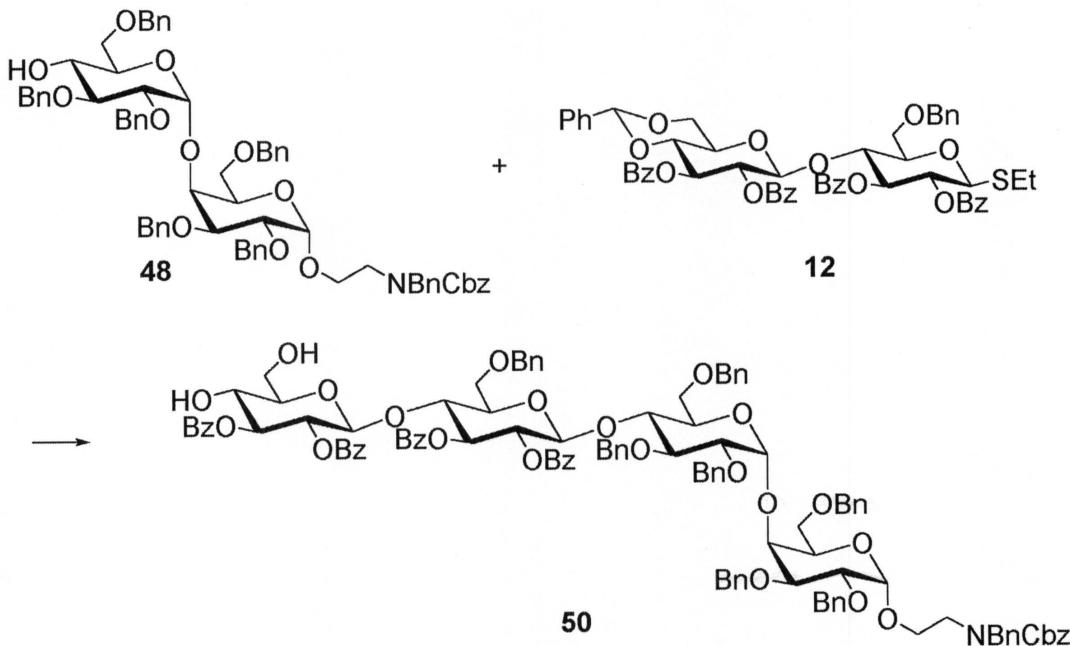
ベンジル・エーテル48をEtOAc(1mL)に加えたものを室温で、Pd/C(30mg)をMeOH(1mL)に加えたもの、水(0.5mL)及びAcOH(3滴)を懸濁させたものに加えた。その反応混合物をH₂の雰囲気下で24時間攪拌して、濾過・濃縮したところ、二糖類49(2.9mg, 18μmol, 87%)が白色の固体として得られた。C₁₄H₂₇NO₁₁(M+Na)⁺のHRMS(ESI)の計算値は408.1481で、実測値は408.1499m/zであった。

【0352】

実施例1-17: 2,3-ジ-O-ベンゾイル- -D-グルコピラノシリル-(1-4)-2,3,6-トリ-O-ベンジル- -D-グルコピラノシリル-(1-4)-2,3,6-トリ-O-ベンジル- -D-ガラクトピラノシリル-(1-1)-(2-N-ベンジル-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ)エタノール(50)の合成

【0353】

【化65】



【0354】

アルコール48 (4.7 mg、4.1 μ mol) とチオグリコシド12 (6.0 mg、6.1 μ mol) を乾燥トルエン (2 \times 5 mL) で共蒸発させ、高真空下で30分間保存した。この混合物を CH_2Cl_2 (2 mL) に溶解して、活性化された分子ふるい (3 - AW) 上で室温で30分間攪拌した。この溶液を -10 に冷却して、NIS (13.8 mg、6.1 μ mol) とトリフリン酸 (1 μ L、11 μ mol) で処理した。この混合物をその温度で1時間保存してから、0 までゆっくり加温した。この反応物を Et_3N (50 μ L) で急冷して、濾過・濃縮したところ、中間体のベンジリデン・アセタールが黄色のオイルとして得られた。

【0355】

この中間体ベンジリデン・アセタールを CH_2Cl_2 (2 mL) に入れて攪拌した溶液に、室温で、エタンチオール (0.3 mL、4.06 mmol) と p -トルエンスルホン酸 (1.0 mg、0.053 mmol) を加えた。この混合物をその温度で1時間攪拌してから、 Et_3N (20 μ L) で急冷して、濃縮させた。残渣をフラッシュ・クロマトグラフィー (EtOAc / ヘキサン 0 : 1 から 1 : 3 更に 1 : 2) で精製したところ、ジオール50 (7.8 mg、3.9 μ mol、9.6%) が透明なオイルとして得られた。 $\text{C}_{11.8}\text{H}_{11.7}\text{NO}_{2.7} (\text{M} + \text{Na})^+$ の HRMS (ESI) の計算値は 2002.7710 で、実測値は 2002.7731 m/z であった。

【0356】

実施例 1 - 18 : 2, 3 - ジ - O - ベンゾイル - - D - グルコピラノシリルウロネート - (1 - 4) - 2, 3 - ジ - O - ベンゾイル - 6 - O - ベンジル - - D - グルコイラノシリル - (1 - 4) - 2, 3, 6 - トリ - O - ベンジル - - D - グルコピラノシリル - (1 - 4) - 2, 3, 6 - トリ - O - ベンジル - - D - ガラクトピラノシリル - (1 - 1) - (2 - N - ベンジル - N - ベンジルオキシカルボニルアミノ) エタノール (51) の合成

【0357】

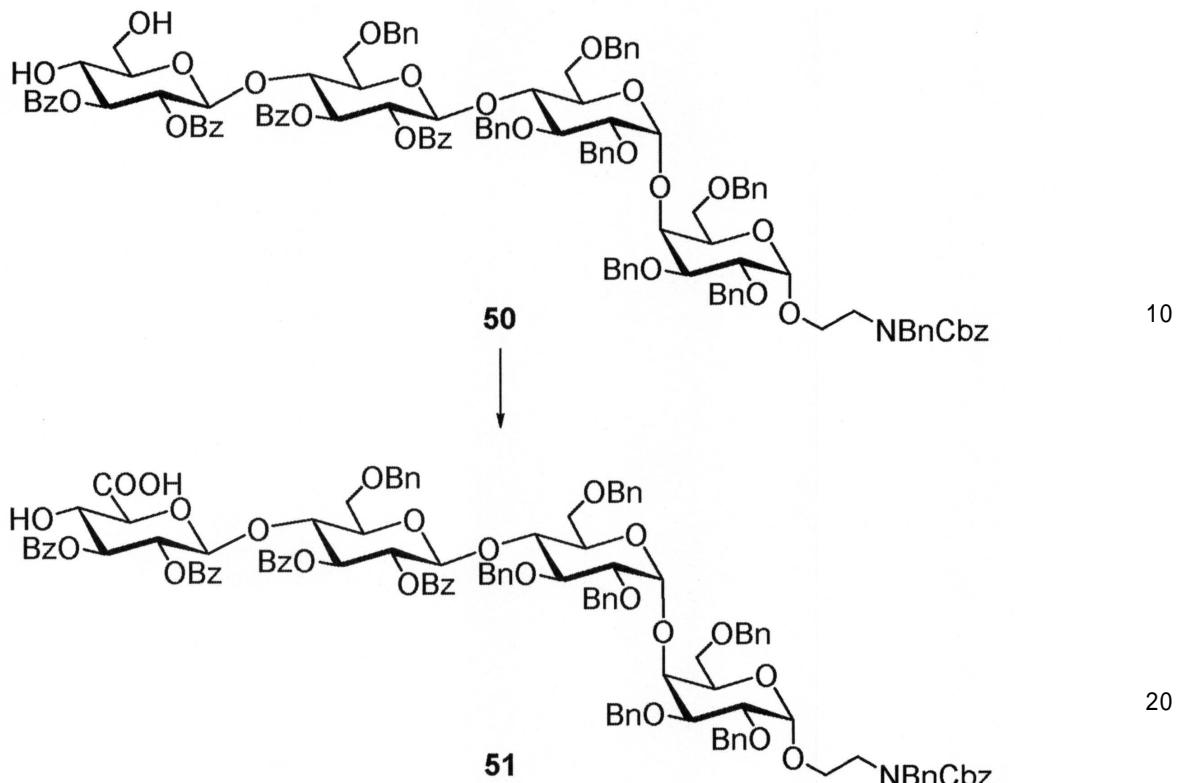
10

20

30

40

【化66】



【0358】

アルコール50 (45 mg、23 μ mol、73%) を CH_2Cl_2 (2 mL) と水 (0.8 mL) に溶かしたものに、0 の温度で、TEMPO (3 結晶) と BAIIB (15.4 mg、48 μ mol) を加えた。この反応混合物をその温度で 20 分間攪拌して、室温までゆっくり加温した。1 時間後、TEMPO (2 結晶) と BAIIB (10 mg、31 μ mol) を加えて、その混合物を室温で 2 時間攪拌した。その反応混合物を CH_2Cl_2 (5 mL) で希釈し、10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液 (5 mL) で急冷した。分離後に、その水相を EtOAc (2 × 10 mL) で抽出し、結合した有機物部分を Na_2SO_4 上で乾燥し、濃縮させた。その残渣をフラッシュ・クロマトグラフィーで 2 回 (EtOAc / ヘキサン 0 : 1 から 1 : 2 更に 8 : 1、次に EtOAc / ヘキサン 1 : 1 + 1% AcOH) 精製してから、ヘプタンで繰り返し共蒸発させたところ、酸 51 (33 mg、17 μ mol、74%) が透明なオイルとして得られた。HRMS (ESI) は $\text{C}_{118}\text{H}_{115}\text{NO}_{28} (\text{M} + \text{Na})^+$ に関して 2016.7503 と計算されたが、実測値では 2016.7558 m/z であった。

30

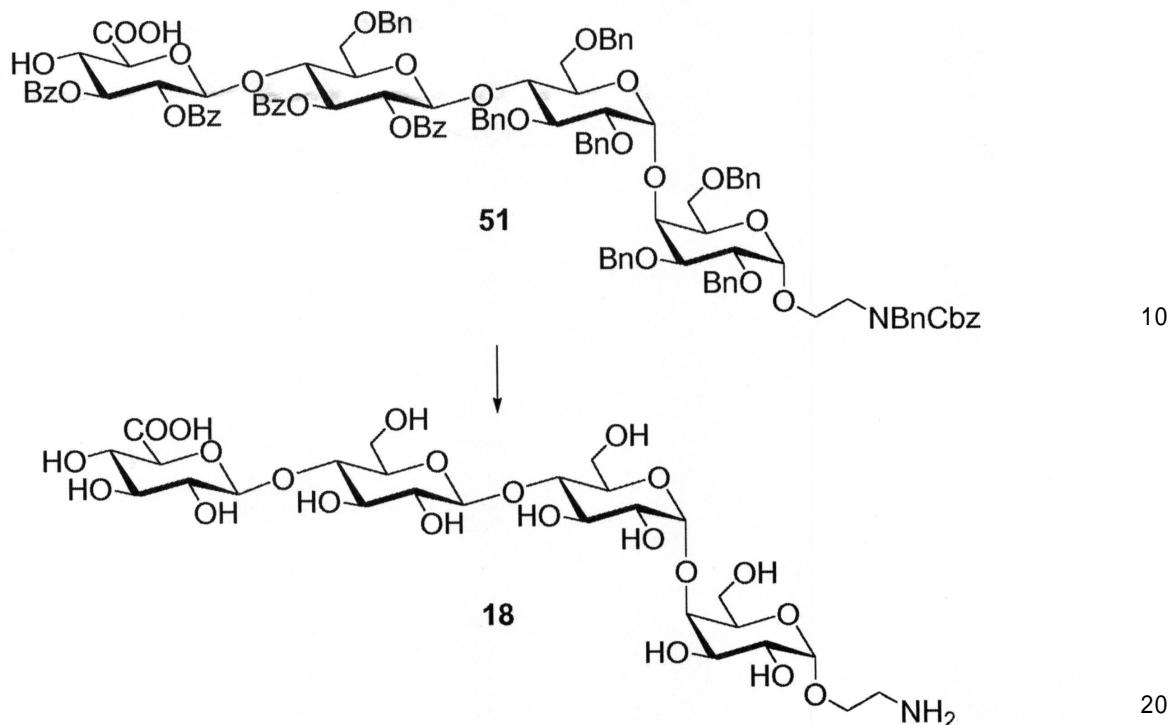
【0359】

実施例 1-19 : -D-グルコピラノシリルウロン酸 - (1-4) - -D-グルコイ
ラノシリル - (1-4) - -D-グルコピラノシリル - (1-4) - -D-ガラクトピラ
ノシリル - (1-1) - (2-アミノ)エタノール (18) の合成

40

【0360】

【化67】



【0361】

T H F (4 m L) と M e O H (0 . 5 m L) に エステル 51 (4 5 m g 、 2 3 μ m o l) を加えて攪拌した溶液に、 0 の温度で N a O H (1 M 水溶液、 1 m L) を加えた。その反応混合物を室温までゆっくり加温して、その温度で 1 6 時間攪拌した。その溶液を 0 . 5 M N a H S O 4 水溶液で中和して、 E t O A c (5 \times 5 m L) で抽出を行った。結合した有機部分を N a 2 S O 4 で乾燥して、濃縮したところ、中間体アルコールが白色フォームとして得られた。

【0362】

30

この中間体アルコールを M e O H (3 m L) に溶かしたものを室温で P d / C (2 0 m g) を M e O H (6 m L) 、水 (6 滴) 及び A c O H (3 滴) の懸濁液に加えた。この反応混合物を H 2 霧囲気内で 9 6 時間攪拌して、濾過・濃縮した。反応が完了しなかったので、残渣を同じ条件下に置いて、室温で 7 2 時間攪拌した。この反応混合物を固相抽出 (クロマボンド (C h r o m a b o n d) C 1 8 , M a c h e r e y - N a g a l) で精製して、凍結乾燥したところ、四糖類 18 (1 1 . 3 m g 、 1 6 μ m o l 、 2 ステップで 6 8 %) が白色の固体として得られた。 H R M S (M A L D I) は C 2 6 H 4 5 N O 2 2 (M + N a) ⁺ に関して 7 4 6 . 2 3 3 0 と計算されたが、実測値では 7 4 6 . 2 4 1 6 m / z であった。

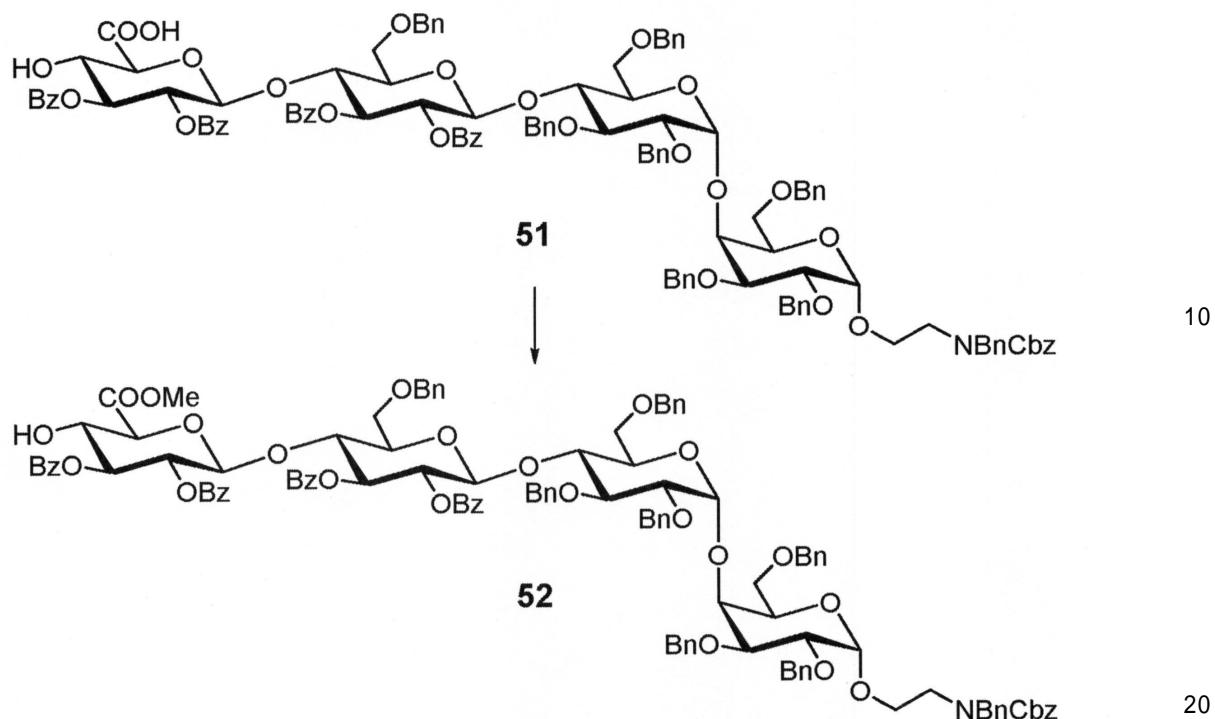
【0363】

40

実施例 1 - 2 0 : メチル [2 , 3 - ジ - O - ベンゾイル - - D - グルコピラノシリル] ウロネート - (1 - 4) - 2 , 3 - ジ - O - ベンゾイル - 6 - O - ベンジル - - D - グルコイラノシリル - (1 - 4) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - ベンジル - - D - グルコピラノシリル - (1 - 4) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - ベンジル - - D - ガラクトピラノシリル - (1 - 1) - (2 - N - ベンジル - N - ベンジルオキシカルボニルアミノ) エタノール (5 2) の合成

【0364】

【化 6 8】



【0365】

カルボン酸 51 (100 mg、50 μmol) を D M F (2.5 mL) に入れて攪拌した溶液に、室温で、 Cs_2CO_3 (24.5 mg、75 μmol) とヨウ化メチル (10.7 mg、75 μmol) を室温で加えて、その反応混合物をその温度で攪拌した。2時間後に、ヨウ化メチル (10.7 mg、75 μmol) を加えて、その混合物を室温でさらに2時間攪拌した。この反応物を飽和 NH_4Cl 水溶液 (5 mL) で急冷して、 EtOAc (4 \times 10 mL) で抽出し、結合した有機性抽出物を Na_2SO_4 上で乾燥して、濃縮した。残渣をフラッシュ・クロマトグラフィーで (EtOAc / ヘキサン 0 : 1 から 2 : 3) で精製したところ、メチル・エステル 52 (81 mg、40 μmol 、80%) が白色のフォームとして得られた。HRMS (MALDI) は $\text{C}_{119}\text{H}_{117}\text{NO}_{28}$ ($\text{M} + \text{Na}$)⁺ に関して 2030, 7659 と計算されたが、実測値では 2030.7660. m/z であった。

【0366】

実施例 1 - 2 1 : 2, 3, 4, 6 - テトラ - O - ベンジル - - D - ガラクトピラノシル - (1 - 4) - メチル [2, 3 - ジ - O - ベンゾイル - - D - グルコピラノシル] ウロネート - (1 - 4) - 2, 3 - ジ - O - ベンゾイル - 6 - O - ベンジル - - D - グルコイラノシル - (1 - 4) - 2, 3, 6 - トリ - O - ベンジル - - D - グルコピランシル - (1 - 4) - 2, 3, 6 - トリ - O - ベンジル - - D - ガラクトピラノシル - (1 - 1) - (2 - N - ベンジル - N - ベンジルオキシカルボニルアミノ) エタノール (53) の合成

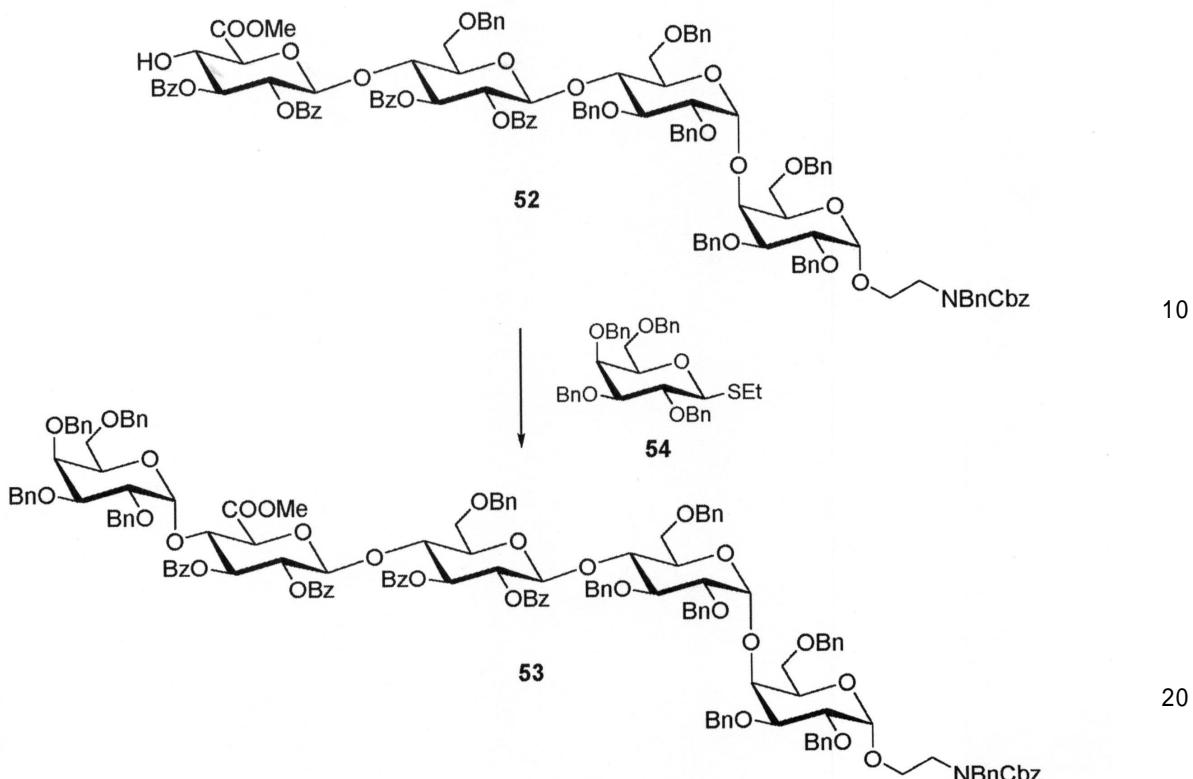
【0367】

30

30

40

【化69】



【0368】

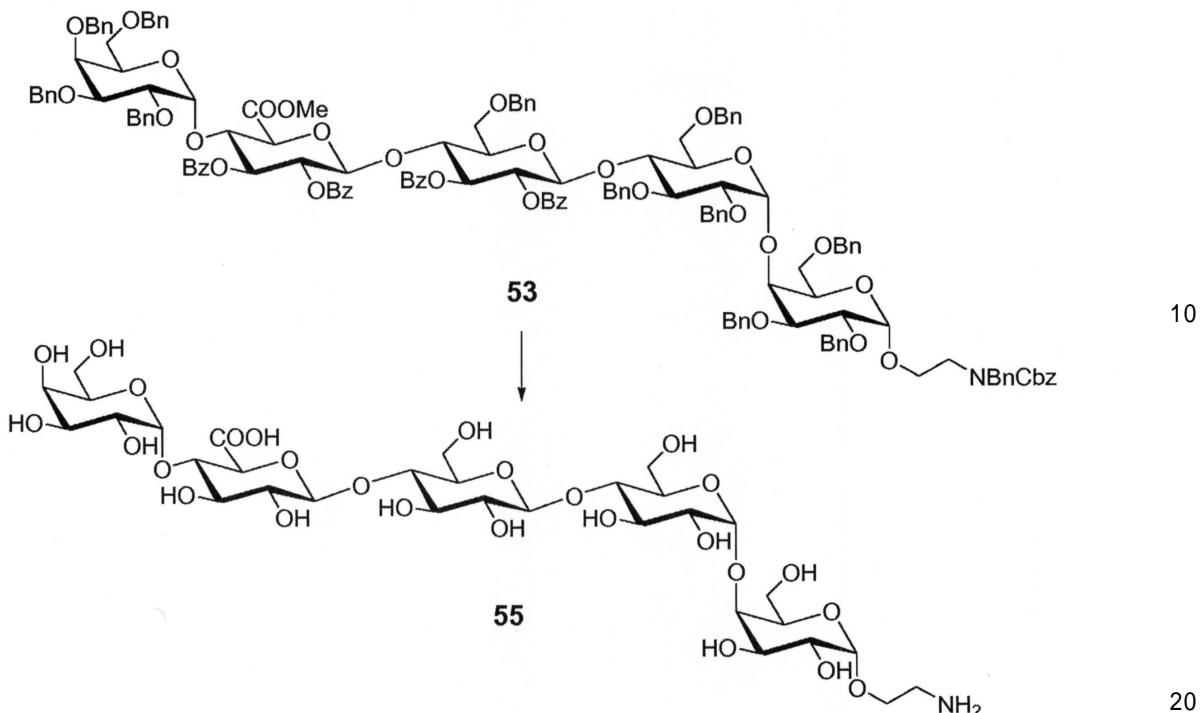
アルコール52 (14 mg、7 μ mol) とチオグリコシド54 (J Org Chem 1990, 55, 2860) (16.3 mg、28 μ mol) を乾燥トルエン (3 x 10 mL) で共蒸発させて、高度の真空中で30分間保存した。この混合物を Et_2O (1.05 mL) と CH_2Cl_2 (0.35 mL) に溶解して、活性化された分子ふるい (3 - AW) で室温で30分間攪拌した。この溶液を -20 に冷却して、NIS (6.3 mg、28 μ mol) と TMSOTf (1 μ L、5.5 μ mol) で処理した。この混合物を、1時間攪拌して、0 までゆっくり加温した。この反応混合物を飽和 NaHCO_3 水溶液 (10 mL) と 10% (w/v) Na_2SO_3 (5 mL) の 1:1 (v/v) 混合物で急冷して、 CH_2Cl_2 (4 x 10 mL) で抽出を行った。結合した有機部分を Na_2SO_4 で乾燥し、濃縮した。残渣をフラッシュ・クロマトグラフィーで (EtOAc/ヘキサン 0:1 - 1:4 - 1:3) で精製したところ、五糖類53 (12.5 mg、4.9 μ mol、71%) が透明なオイルとして得られた。HRMS (MALDI) は $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{NO}_{10}$ ($\text{M} + \text{Na}$)⁺ に関して 2553.0066 と計算されたが、実測値では 2553.0066 m/z であった。

【0369】

実施例 1 - 22 : -D-ガラクトピラノシリル-(1-4)- -D-グルコピラノシリウロネート-(1-4)- -D-グルコイラノシリル- -D-グルコピラノシリル-(1-4)- -D-ガラクトピラノシリル-(1-1)-(2-アミノ)エタノール (55) の合成

【0370】

【化70】



【0371】

エステル53 (26 mg、10.3 μ mol) をTHF (1 mL) 及びMeOH (1 mL) に入れた溶液を攪拌して、それに0 の温度で過酸化水素 (6% (v/v) 水溶液、397 μ mol) とLiOH (0.5 M 水溶液、113 μ mol) の1:1 (v/v) 混合液 (450 μ L) を加えた。この反応混合物を室温まで加温して、その温度で1時間攪拌した。反応混合物をNaOH (0.5 M 水溶液、1 mL) で処理し、室温で16時間攪拌した。溶媒を減圧状態で蒸発させて、残渣をトルエン (2 x 5 mL) で共蒸発させて、MeOH (1 mL) 内に溶解した。この溶液を室温でNaOMe (MeOH、1 mL 内に0.5 M) で室温で処理して、その温度で16時間攪拌した。反応混合物を水 (0.5 mL) とCH₂Cl₂ (0.5 mL) で希釈し、アンバーライト (Amberlite) IR-120 (H⁺形態) で中和して、濾過・濃縮した。残渣をフラッシュ・クロマトグラフィー (EtOAc/ヘキサン 0:1 から 1:4 更に 1:2 更に 1:2 + 1% (v/v) AcOH 更に 1:1 + 1% (v/v) AcOH) で精製したところ、中間体カルボン酸が透明なオイルとして得られた。

【0372】

CH₂Cl₂ / tBuOH / 水 (1:16:8、1 mL) 内に中間体カルボン酸をアルゴンでバージして0 の温度で、Pd(OH)₂ を炭素 (20% (w/w、20 mg) 上に負荷したもの) 同じ溶媒混合体 (0.5 mL) に入れた懸濁液で処理した。この懸濁液を水素でバージして、水素雰囲気内で16時間攪拌して、濾過・濃縮した。反応が完了しなかったので、残渣を同じ状態に入れて、室温で24時間攪拌した。この混合物を濾過・濃縮して、残渣を固相抽出 (クロマボンド (Chromabond) C18, Marcherrey-Nagel) で精製して凍結乾燥したところ、五糖類55 (8.1 mg、9.1 μ mol、2ステップで88%) が白色の固体として得られた。HRMS (MALDI) はC₃₂H₅₅NO₂₇ (M+Na)⁺ に関して 884.2883 と計算されたが、実測値では 884.2942 m/z であった。¹HNMR (400 MHz, D₂O) 5.48 (d, J = 3.5 Hz, 1 H), 5.02 (d, J = 3.2 Hz, 1 H), 4.88 (d, J = 3.9 Hz, 1 H), 4.51 (m, 2 H), 4.20 (d, J = 9.9 Hz, 1 H), 4.04 (m, 1 H), 4.02-3.52 (m, 26 H), 3.43-3.50

30

40

50

. 19 (m, 4H)。

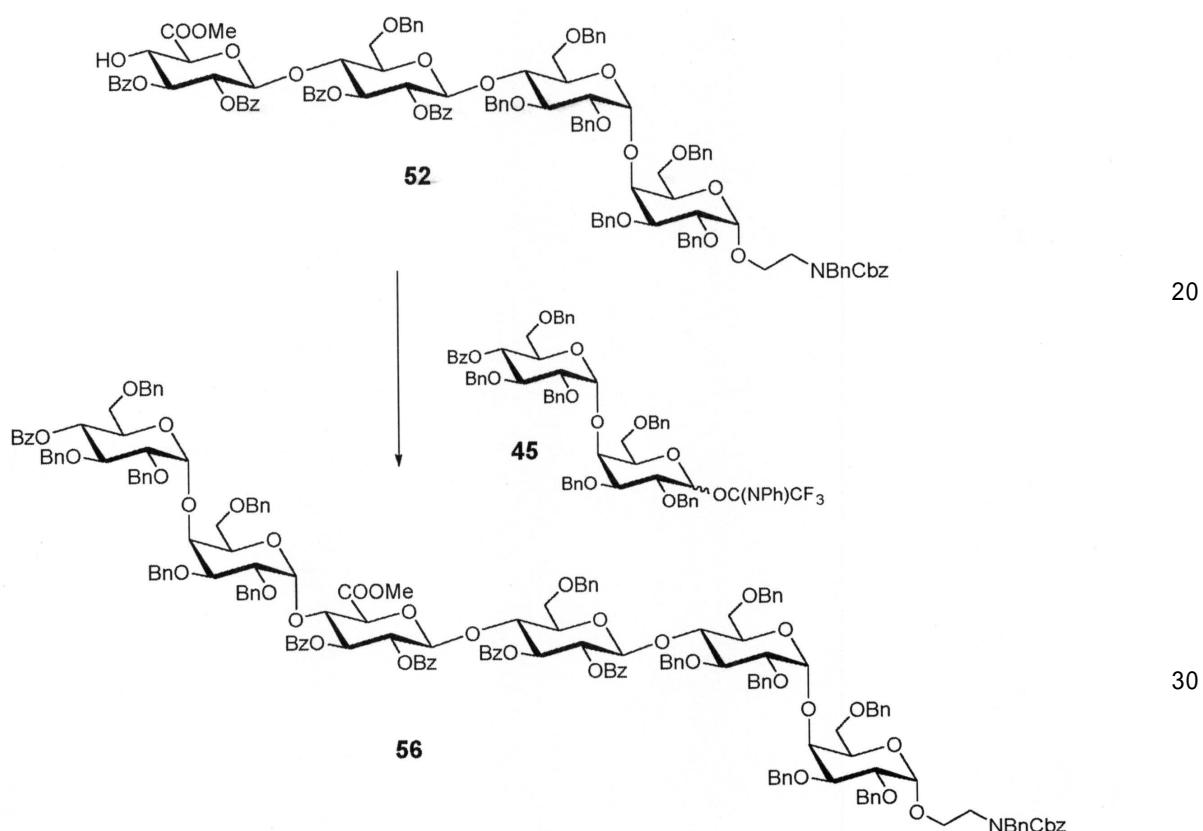
【0373】

実施例1-23: 4-O-ベンゾイル-2,3,6-トリ-O-ベンジル- -D-グルコピラノシリル-(1-4)-2,3,6-トリ-O-ベンジル- -D-ガラクトピラノシリル-(1-4)-メチル[2,3-ジ-O-ベンゾイル- -D-グルコピラノシリル]ウロネート-(1-4)-2,3-ジ-O-ベンゾイル-6-O-ベンジル- -D-グルコイラノシリル-(1-4)-2,3,6-トリ-O-ベンジル- -D-グルコピラノシリル-(1-4)-2,3,6-トリ-O-ベンジル- -D-ガラクトピラノシリル-(1-1)-(2-N-ベンジル-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ)エタノール(56)の合成

10

【0374】

【化71】



【0375】

アルコール52(50mg、25μmol)とイミデート45(72.1mg、62mol)を乾燥トルエン(3×10mL)で共蒸発させて、高真空下に30分間保存した。この混合物をEt₂O(2mL)とCH₂Cl₂(0.67mL)に溶解して、活性化された分子ふるい(3-AW)上で、室温で30分間攪拌した。その溶液を-20℃に冷却して、TMSOTf(2μL, 11μmol)で処理した。この混合物を1時間攪拌して、0℃までゆっくり加温した。その反応混合物を飽和NaHCO₃水溶液(10mL)で急冷して、CH₂Cl₂(4×10mL)で抽出を行った。結合した有機物部分はNa₂SO₄上で乾燥・濃縮した。残渣をフラッシュ・クロマトグラフィー(EtOAc/ヘキサン0:1から1:3更に3:7更に1:2)で精製したところ、六糖類56(51mg、17μmol、69%)が透明なオイルとして得られた。HRMS(MALDI)はC₁₈₀H₁₇₇NO₃₉(M+2Na)²⁺に関して1511.0847と計算されたが、実測値では1511.0576m/zであった。

40

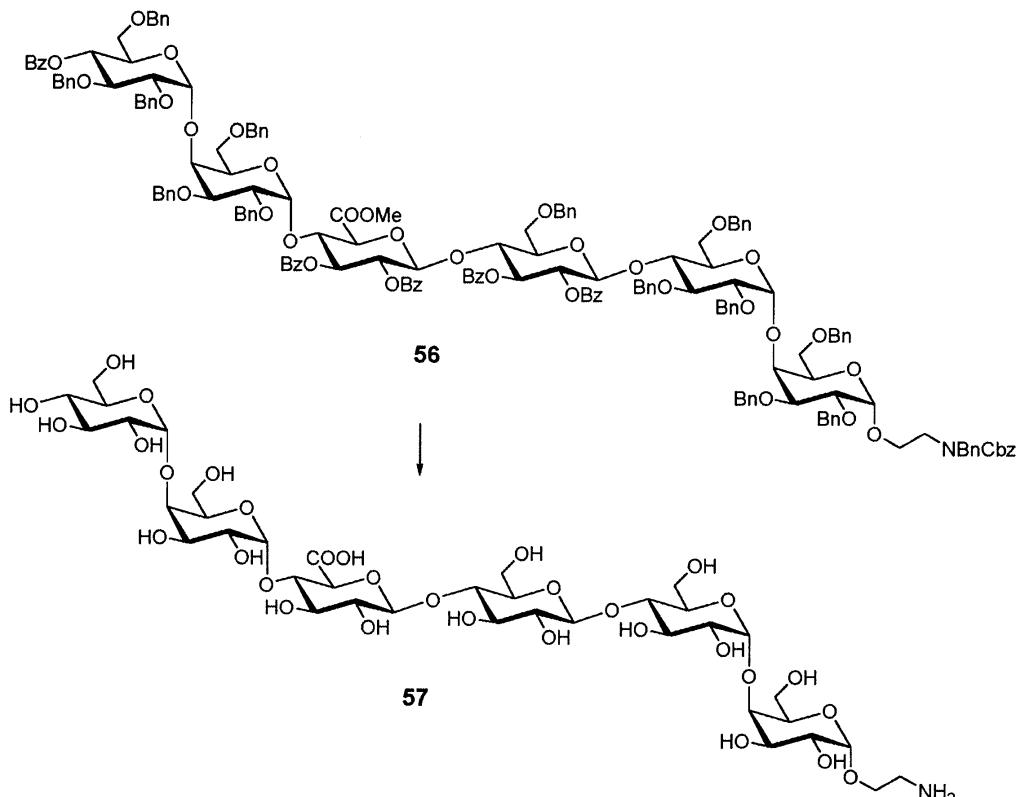
【0376】

50

実施例 1 - 2 4 : - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシルウロネート - (1 4) - - D - グルコイラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 1) - (2 - アミノ) エタノール (5 7) の合成

【 0 3 7 7 】

【 化 7 2 】



【 0 3 7 8 】

エステル 5 6 (2 2 m g 、 7 . 4 μ m o l) を T H F (1 m L) 及び M e O H (1 m L) に加えて攪拌した溶液に、 0 度で、過酸化水素 (6 % (v / v) 水溶液、 2 9 5 μ m o l) と L i O H (0 . 5 M 水溶液、 7 4 μ m o l) の 1 : 1 (v / v) 混合物 (2 9 6 μ L) を加えた。この反応混合物を室温まで加温して、 2 9 4 μ L の同じ L i O O H 溶液で、それぞれ 2 時間後と 4 時間後に処理した。この混合物を室温で 1 6 時間攪拌してから、 N a O H (1 M 水溶液、 0 . 5 m L) と M e O H (0 . 5 m L) で処理した。この反応混合物をその温度で 2 0 時間攪拌して、 1 0 % N a 2 S O 3 水溶液 (0 . 8 m L) で急冷して、減圧下で濃縮した。残渣を水 (4 m L) に溶解し N a H S O 4 水溶液 (0 . 5 M 水溶液) で中和して、 E t O A c (4 x 1 0 m L) で抽出した。結合した有機部分は N a 2 S O 4 上で乾燥され、濃縮された。残渣を N a O M e (M e O H の 0 . 5 M 溶液、 1 m L) で処理して、 4 0 度に加温し、その温度で 5 時間攪拌した。その反応混合物を室温まで冷却して、その温度でさらに 1 6 時間攪拌し、水 (0 . 5 m L) で処理した。その混合物をアンバーライト (A m b e r l i t e) I R - 1 2 0 (H ⁺ 形態) で中和して、濾過・濃縮させた。残渣をフラッショ・クロマトグラフィー (E t O A c / ヘキサン 0 : 1 : 0 から 1 : 4 + 2 % (v / v) A c O H 更に 1 : 1 + 2 % (v / v) A c O H) で精製して、中間体カルボン酸を透明なオイルとして得た。

【 0 3 7 9 】

CH ₂ C l ₂ / B u O H / 水 (1 . 5 : 1 6 : 8 、 3 m L) 内の中間体カルボン酸をアルゴンでバージして、同じ溶媒混合体 (1 m L) 内の炭素 (2 0 % (W / W) 装填、 3 0 m g) 上の P d (O H) ₂ の懸濁液で 0 度で処理した。この懸濁液を水素でバージして、

10

20

30

40

50

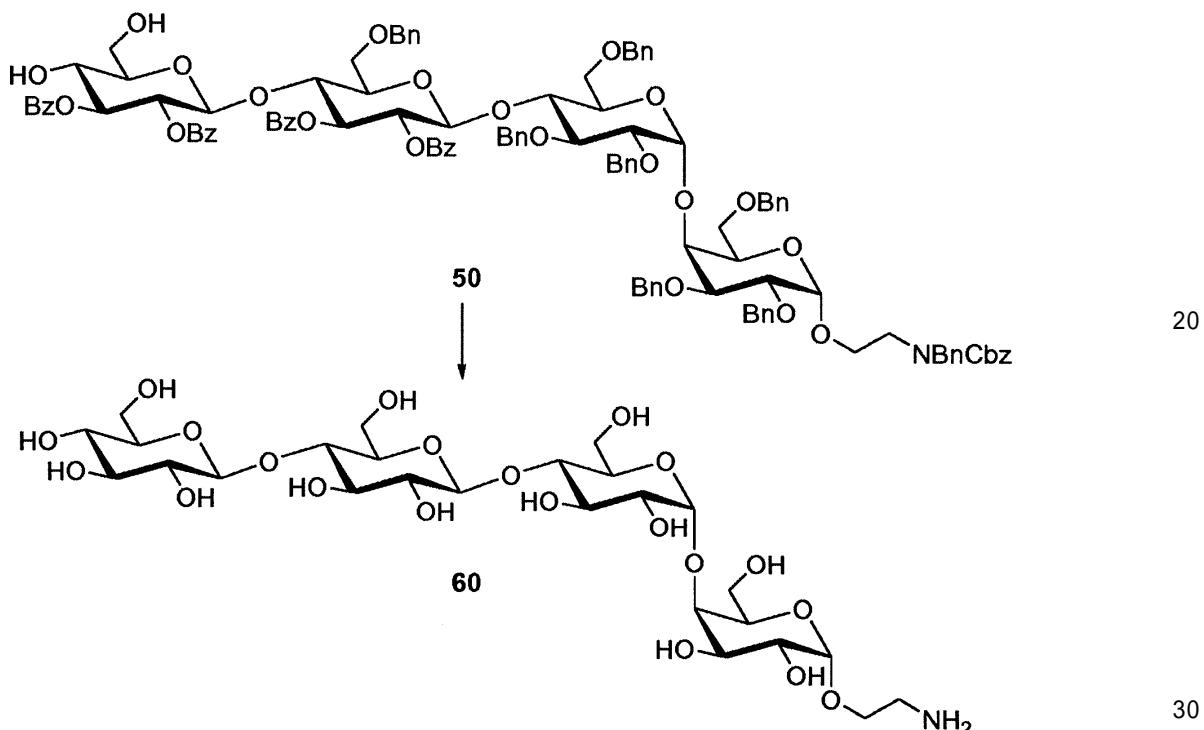
水素雰囲気下で 18 時間攪拌し、濾過・濃縮した。残渣を固相抽出（クロマバンド（Chromabond）C18, Macherrey-Nagel）で精製して、冷凍乾燥したところ、六糖類 57 (7 mg, 6.7 μ mol, 3ステップで 86%) を白色の固体で得た。HRMS (ESI) は $C_{38}H_{65}NO_{32}$ ($M + Na$)⁺ に関して 1070.3387 と計算されたが、実測値では 1070.3391 m/z であった。

【0380】

実施例 1-25: -D-グルコピラノシリル-(1-4)- -D-グルコイラノシリル-(1-4)- -D-グルコピラノシリル-(1-4)- -D-ガラクトピラノシリル-(1-1)- (2-アミノ)エタノール (60) の合成

【0381】

【化73】



【0382】

エステル 50 (20 mg, 10.1 μ mol) を THF (1 mL) 及び MeOH (0.33 mL) に加えて攪拌した溶液に、室温で NaOMe (MeOH 中の 0.5 M 溶液、0.5 mL) を室温で加えた。この反応混合物を 40 まで加温して、その温度で 5 時間攪拌した。この混合物を室温まで冷やして、その温度で 16 時間攪拌した。この反応混合物を Amberlite IR-120 (H⁺ 形態) で中和し、濾過・濃縮した。残渣をサイズ排除クロマトグラフィー (Sephadex, LH-20 CH₂Cl₂ / MeOH 2 : 1) で精製したところ、中間体ヘキサオールが白色フォームとして得られた。

【0383】

CH₂Cl₂ / tBuOH / 水 (1 : 16 : 8, 1 mL) 内に中間体ヘキサオールを加えたものをアルゴンでバージして、0 の温度で、同じ溶媒混合物 (1 mL) の炭素 (20% (w/w) 装填、20 mg) 上の Pd(OH)₂ の懸濁液で処理した。この懸濁液を水素でバージして、水素雰囲気内で 18 時間攪拌して、濾過・濃縮した。残渣を固相抽出 (Chromabond C18, Macherrey-Nagel) で精製して、冷凍乾燥したところ、四糖類 60 (6.8 mg, 9.0 μ mol, 2ステップで 89%) が白色固体として得られた。HRMS (ESI) は $C_{26}H_{47}NO_{21}$ ($M + Na$)⁺ に関して 732.2538 と計算されたが、実測値では 732.2504 m/z であった。

【0384】

10

20

30

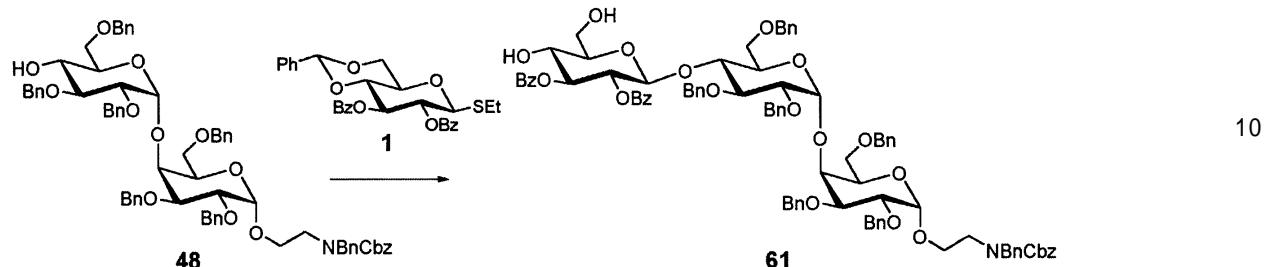
40

50

実施例 1 - 2 6 : 2 , 3 - ジ - O - ベンゾイル - - D - グルコイラノシル - (1 4) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - ベンジル - - D - グルコピラノシル - (1 4) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - ベンジル - - D - ガラクトピラノシル - (1 1) - (2 - N - ベンジル - N - ベンジロキシカルボニルアミノ) エタノール (61) の合成

〔 0 3 8 5 〕

【化 7 4】



【 0 3 8 6 】

アルコール 4.8 (15 mg, 13 μ mol) とチオグリコシド 1 (20.4 mg, 3.9 μ mol) を乾燥トルエン (2 x 5 mL) で共蒸発させて、高真空中に 10 分間置いた。この混合物を CH_2Cl_2 (1.3 mL) に溶解して活性化した分子ふるい (3 - AW) 上で室温で 30 分間攪拌した。この溶液を -20 に冷却して、NIS (8.8 mg, 3.9 μ mol) と TfOH (1 μ L, 11 μ mol) で処理した。この混合物をその温度で 1 時間攪拌してから 0 までゆっくり加温した。この反応混合物を飽和 NaHCO_3 水溶液 (10 mL) と 10% (w/v) Na_2SO_3 (5 mL) の 1:1 (v/v) 混合物で急冷して、 CH_2Cl_2 (4 x 10 mL) で抽出した。結合した有機性抽出物 Na_2SO_4 で乾燥させて、濃縮した。残渣はフラッシュ・クロマトグラフィー (EtOAc/ヘキサン 1:5 から 1:4 更に 1:3) で精製して、ベンジリデン・アセタールが黄色のオイルとして得られた。

【 0 3 8 7 】

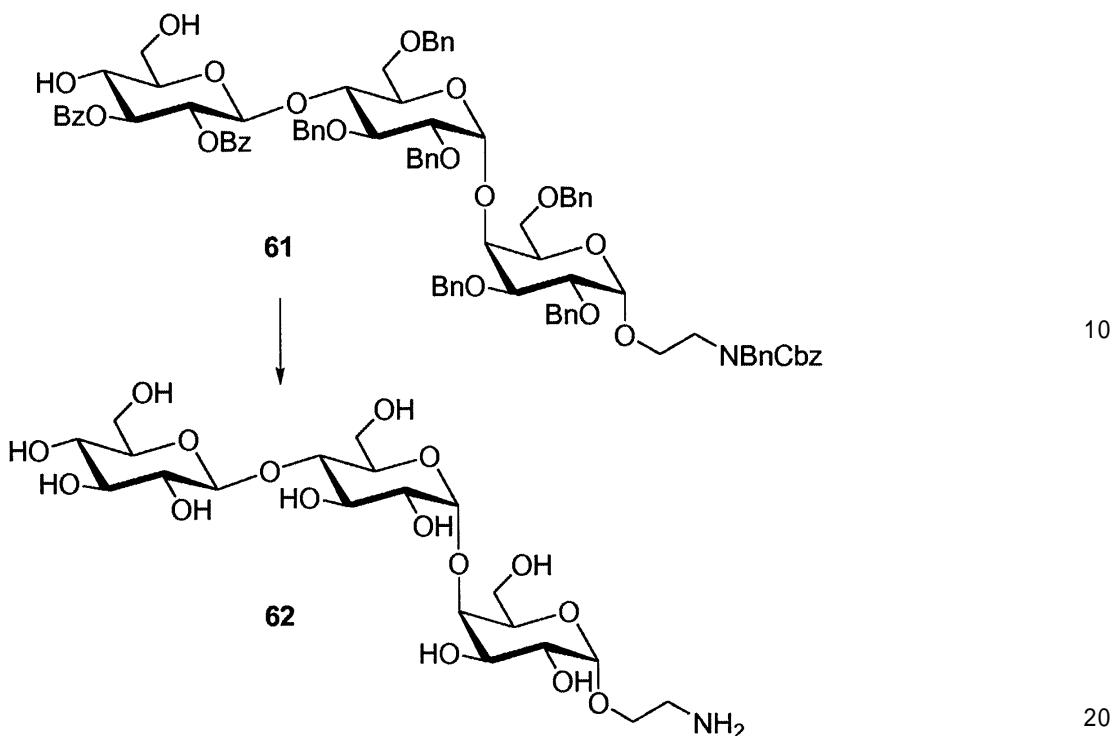
中間体ベンジリデン・アセタールを CH_2Cl_2 (2 mL) に入れて攪拌した溶液に、室温でエタンチオール (0.2 mL, 2.8 mmol) と *p*-トルエンスルホン酸 (6 mg, 32 μmol) を加えた。この混合物をその温度で1時間攪拌してから、Et₃N (100 μL) で急冷して、濃縮した。残渣をフラッシュ・クロマトグラフィー (EtOAc / ヘキサン 0 : 1 - 1 : 3 - 2 : 3) で精製して、ジオール 61 (14.7 mg, 9.7 μmol) を透明なオイルとして得た。HRMS (MALDI) は $\text{C}_{26}\text{H}_{47}\text{NO}_2$ ₁ ($\text{M} + \text{Na}$)⁺ に関して 1542.6188 と計算されたが、実測値では 1542.6145 m/z であった。

〔 0 3 8 8 〕

実施例 1 - 27 : - D - グルコイラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 1) - (2 - アミノ) エタノール (6 2) の合成

【 0 3 8 9 】

【化75】



【0390】

エステル61(26mg、17μmol)をCH₂Cl₂(1mL)とMeOH(1mL)に入れて攪拌した溶液に、室温でNaOMe(MeOH内に0.5M、0.5mL)を室温で加えた。この反応混合物を室温で2時間攪拌して、アンバーライト(Amberlite)IR-120(H⁺形態)で0で中和して、濾過・濃縮した。残渣をフラッシュ・クロマトグラフィー(EtOAc/ヘキサン1:3から2:1)で精製して、テトラオールが白色のフォームとして得られた。

【0391】

この中間体テトラオールをCH₂Cl₂/tBuOH/水(1:6:2, 5mL)に入れて、アルゴンでバージし、0の温度で、同じ溶媒混合物(1mL)内で炭素(20% (w/w)負荷、30mg)上のPd(OH)₂で処理した。この懸濁液を水素でバージし、水素雰囲気内で24時間攪拌して、濾過・濃縮した。反応が終了しなかったので、残渣を同じ条件下に再度置いて、室温で48時間攪拌した。この混合物を濾過・濃縮して、残渣を固相抽出(クロマボンド(Chromabond)C18, Macherey-Nagel)で精製して、凍結乾燥を行ったところ、三糖類62(7.3mg、13μmol, 2ステップで78%)が白色の固体として得られた。HRMS(ESI)はC₂₆H₄₇NO₂₁(M+Na)⁺に関して570.2010と計算されたが、実測値では570.2000m/zであった。

【0392】

段階的に自動化されたグリコシル化による糖類の合成

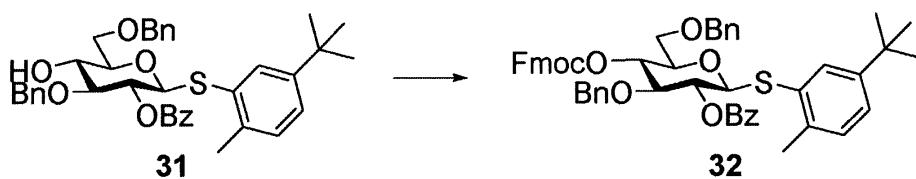
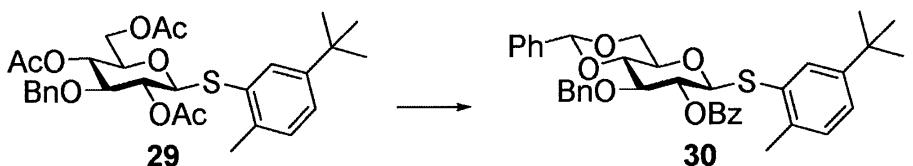
実施例1-28：グルコース構成ブロック32の合成

【0393】

30

40

【化76】



10

【0394】

(2 - メチル - 5 - t e r t - ブチルフェニル) 2 - O - ベンゾイル - 3 - O - ベンジル - 4 , 6 - O - ベンジリデン - 1 - チオ - - D - グルコピラノース (30) (2 - メチル - 5 - t e r t - ブチルフェニル) 2 , 4 , 6 - トリ - O - アセチル - 3 - O - ベンジル - 1 - チオ - - D グルコピラノース (29) を MeOH に溶解して、
NaOMe (1.0 eq) を加え、その反応混合物を一晩攪拌した。この混合物を IR - 120 - H⁺ アンバーライト樹脂で中和して、濾過・濃縮して、トルエンで共蒸発させた。その粗トリオールを DMF に溶解した。ベンズアルデヒド・ジメチル・アセタール (2 . 0 eq) と触媒的な量のパラ トルエンスルホン酸を加えて、その混合物を 80 の温度で 2 時間攪拌した。この混合物が室温まで冷却された後、飽和 NaHCO₃ 水溶液を加えた。相分離後に、有機相を酢酸エチルを用いて三度抽出した。結合した有機層を塩水で洗浄して、MgSO₄ で乾燥し、濾過・濃縮した。この粗製物を DCM に溶解して、O
まで冷却し、Bz₂O (2.0 eq)、DMAP (0.5 eq) とトリエチルアミン (4 . 0 eq) を加えた。変換が完全に終了した後、この反応混合物を飽和 NaHCO₃ 水溶液で急冷し、結合した有機層は塩水で洗浄して、MgSO₄ で濾過・濃縮した。残渣はシリカ・ゲル上でフラッシュ・クロマトグラフィーで精製したところ、化合物 (3ステップ
で 88%) が得られた。R_f : 0 . 25 (ヘキサン : EtOAc = 9 : 1) . [a] D = 68 . 96 (c = 3 . 18, CHCl₃) . ; IR (薄層、クロロフォルム) : = 2962, 1729, 1265, 1093 cm⁻¹; 1H - NMR (400 MHz, CDCl₃) = 8 . 01 (ddd, J = 5 . 8, 5 . 3, 0 . 8 Hz, 2H, HAr), 7 . 60 (ddd, J = 7 . 1, 2 . 6, 1 . 3 Hz, 1H, HAr), 7 . 51 (ddd, J = 6 . 0, 5 . 6, 2 . 3 Hz, 3H, HAr), 7 . 49 - 7 . 43 (m, 2H, HAr), 7 . 43 - 7 . 35 (m, 3H, HAr), 7 . 19 (dt, J = 6 . 3, 3 . 1 Hz, 1H, HAr), 7 . 13 (dd, J = 6 . 7, 4 . 0 Hz, 3H, HAr), 7 . 10 - 7 . 04 (m, 3H, HAr), 5 . 63 (s, 1H CHO₂Ph), 5 . 42 - 5 . 32 (m, 1H, H-2), 4 . 82 (d, J = 11 . 9 Hz, 1H, CHHP
h), 4 . 81 (d, J = 10 . 2 Hz, 1H, H-1), 4 . 69 (d, J = 12 . 0 Hz, 1H, CHHP), 4 . 39 (dd, J = 10 . 5, 5 . 0 Hz, 1H, H-6'), 3 . 94 - 3 . 86 (m, 3H, H-3, H-4, H-6), 3 . 56 (dt, J = 14 . 6, 4 . 9 Hz, 1H, H-5), 2 . 19 (s, 3H), 1 . 27 (s, 9H) . 13C - NMR (100 MHz, CDCl₃) 165 . 23 (C=O), 149 . 66, 137 . 84, 137 . 28, 137 . 03, 133 . 34, 132 . 37, 130 . 07, 130 . 04, 129 . 93, 129 . 90, 129 . 19, 128 . 51, 128 . 43, 128 . 29, 128 . 22, 127 . 71, 126 . 13, 125 . 38 (Ar), 101 . 44 (CHO₂Ph), 88 . 03 (C-1), 81 . 64 (C-3), 79 . 43 (C-4), 74 . 36 (CH₂Ph), 72 . 25 (C-2), 70

30

40

50

. 6 6 (C - 5) , 6 8 . 8 1 (C - 6) , 3 4 . 5 6 (C q t B u チオ) , 3 1 . 3 6 (t B u) , 2 0 . 3 6 (C H 3 チオ) ; M S E S I + - H R M S m / z [M + N a] ^ + は、 C₃₈H₄₀O₆SNa について 6 4 7 . 2 4 6 2 と計算されたが、実測値では、 6 4 7 であった。

【0395】

(2 - メチル - 5 - t e r t - ブチルフェニル) 2 - O - ベンゾイル - 3 , 6 - ジ - O - ベンジル - 1 - チオ - - D - グルコピラノース (3 1)

化合物 1 の溶液をトルエンで共蒸発させて、アルゴン雰囲気下で D C M (6 . 5 m L) 内に溶解した。トリエチルシラン (0 . 6 2 m L , 3 . 8 8 m m o l) とトリフルオロ酢酸無水物 (0 . 2 7 m L , 1 . 9 4 m m o l) を加え、溶液を 0 に冷却した。トリフルオロ酢酸 (0 . 3 0 m L , 3 . 8 8 m m o l) を滴下で加えて、反応混合物を攪拌して、室温まで加温した。出発物質が完全に転換された後、溶液を D C M で希釈し、飽和 N a H C O₃ 水溶液で急冷した。結合有機層は M g S O₄ 上で乾燥して、溶媒を真空中で除去した。残渣をシリカ・ゲル (ヘキサン / 酢酸エチル、 9 : 1 - 7 : 3) 上でカラム・クロマトグラフィーで精製して、白色フォーム (9 2 %) を得た。 M S E S I + - H R M S m / z [M + N a] ^ + は、 C₃₈H₄₂O₆SNa について 6 4 9 . 2 6 0 0 と計算されたが、実測値では 6 4 9 . 2 5 8 5 であった。

【0396】

(2 - メチル - 5 - t e r t - ブチルフェニル) 2 - O - ベンゾイル - 3 , 6 - ジ - O - ベンジル - 4 - O - フルオレニルメトキシカルボニル - 1 - チオ - - D - グルコピラノシド (3 2)

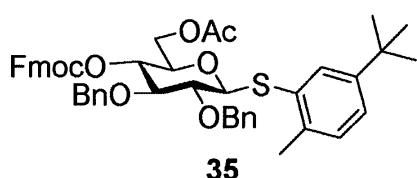
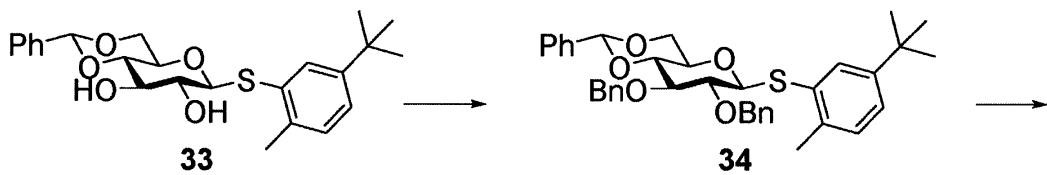
化合物 3 1 をアルゴン雰囲気下で D C M (6 . 5 m L) 内に溶解した。フルオレニルメチル・クロロフォルメート (8 . 3 g , 3 1 . 9 m m o l) とピリジン (3 . 4 4 m L , 4 2 . 5 m m o l) をその溶液に 0 の温度で加えた。出発物質が完全に転換された後、その溶液を D C M で希釈して、 1 M H C l 水溶液及び飽和 N a H C O₃ 水溶液で抽出した。結合有機相は M g S O₄ 上で乾燥して、真空中で溶剤を除去した。その粗生成物をシリカ・ゲル・フラッシュ・カラム・クロマトグラフィーで精製したところ、標記の化合物が得られた。 M S E S I + - H R M S m / z [M + N a] ^ + は C₅₃H₅₂O₈SNa について 8 7 1 . 3 2 8 1 と計算されたが、実測値では 8 7 1 . 3 3 1 1 であった。

【0397】

実施例 1 - 2 9 : グルコース構成ブロック 3 5 の合成

【0398】

【化77】



【0399】

(2 - メチル - 5 - t e r t - ブチルフェニル) 2 , 3 - ジ - O - ベンジル - 4 , 6 - O - ベンジリデン - 1 - チオ - - D - グルコピラノシド (3 4)

(2 - メチル - 5 - t e r t - ブチルフェニル) 4 , 6 - O - ベンジリデン - 1 - チ

10

20

30

40

50

オ - - D - グルコピラノシド (33) をアルゴン雰囲気下で DCM (6.5 mL) に溶解した。その溶液に、臭化ベンジルと NaH を 0 の温度でその溶液に加えた。出発物質が完全に転換された後、反応混合物をメタノールで急冷して、エーテルで希釈し、飽和 NaHCO_3 で抽出させた。結合された有機相を MgSO_4 で乾燥して、溶媒は真空中で取り除いた。この粗生成物をシリカ・ゲル・フラッシュ・カラム・クロマトグラフィーで精製して、標記の化合物を得た。MS ESI+ - HRMS m/z [M + Na]⁺ は $\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{O}_5\text{SNa}$ に関して 633.2651 と計算されたが、観測値では 633.2644 であった。

【0400】

(2 - メチル - 5 - tert - ブチルフェニル) 6 - O - アセチル - 2 , 3 - ジ - O - ベンジル - 4 - O - フルオレニルメトキシカルボニル - 1 - チオ - - D - ガラクトピラノシド (35) 10

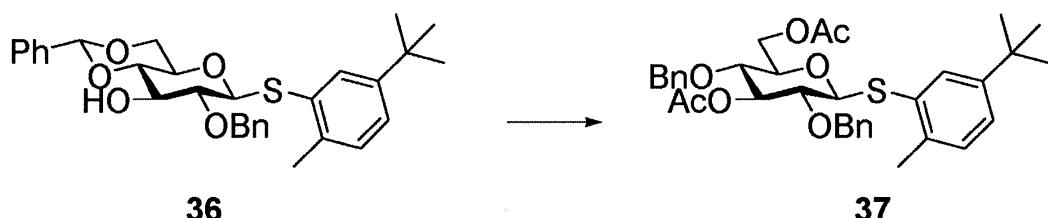
(2 - メチル - 5 - tert - ブチルフェニル) 2 , 3 - ジ - O - ベンジル - 4 , 6 - O - ベンジリデン - 1 - チオ - - D - グルコピラノシド (34) を DCM に溶かした溶液に、TFA と水を加えた。完了後、粗生成物をヘキサンで上澄みを移して、副産物を取り除いた。粗生成物は次の反応に用いた。粗生成物の溶液に -15 の温度で、酢酸、2 - クロロ - 1 - メチルピリジウムヨウ化物及び DABCO を加えた。出発物質が完全に転換された後、その溶液を DCM で希釈し、1M NaHCO_3 水溶液と飽和 NaHCO_3 水溶液で抽出を行った。結合有機相は MgSO_4 上で乾燥され、溶媒は真空中で取り除かれた。粗生成物をシリカ・ゲル・カラム・クロマトグラフィーで精製したところ、標記の化合物が得られた。粗生成物をアルゴン雰囲気内で DCM (6.5 mL) に溶解した。その溶液に、0 の温度で、9 - フルオレニルメチル・クロロ炭酸塩 (8.3 g, 31.9 mmol) とピリジン (3.44 mL, 42.4 mmol) を加えた。出発物質が完全に転換した後、その溶液を DCM で希釈し、1M 塩酸水溶液と飽和 NaHCO_3 水溶液で抽出した。結合有機相は MgSO_4 上で乾燥させ、溶媒は真空中で取り除いた。粗生成物をシリカ・ゲル・フラッシュ・カラム・クロマトグラフィーで精製したところ、標記の化合物が得られた。MS ESI+ - HRMS m/z [M + Na]⁺ は $\text{C}_{48}\text{H}_{50}\text{O}_8\text{SNa}$ に関して 809.3124 と計算されたが、実測値では 809.3137 であった。

【0401】

実施例 1 - 30 : (2 - メチル - 5 - tert - ブチルフェニル) 3 , 6 - ジ - O - アセチル - 2 , 4 - ジ - O - ベンジル - 1 - チオ - - D - ガラクトピラノシド (37) 30

【0402】

【化78】



40

【0403】

(2 - メチル - 5 - tert - ブチルフェニル) 4 , 6 - O - ベンジリデン - 2 - O - ベンジル - 1 - チオ - - D - グルコピラノシド (36) (Tetrahedron Lett, 1999, 40 6523) をトルエンで共蒸発させて、アルゴン雰囲気下で DCM (170 mL) 内に溶解した。 BH_3 を THF (108 mL, 108 mmol) に溶かした 1M 溶液を加えて、その溶液を 0 に冷却した。10 分後に、トリメチルシリル・トリフレート (1.66 mL, 9.2 mmol) を加えて、反応混合物を攪拌した。完了後、その溶液を DCM で希釈し、飽和 NaHCO_3 水溶液を滴下して急冷した。有機相は MgSO_4 で乾燥して、溶剤は真空中で取り除いた。粗生成物はさらに精製せず、そ 50

のまま次のステップで使用した。

【0404】

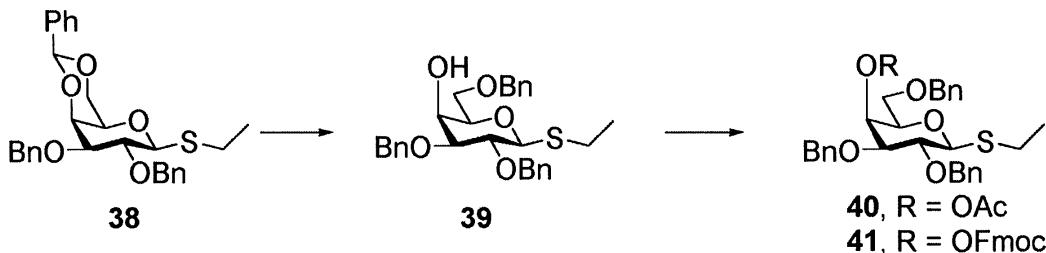
その粗生成物を DCM に溶かした溶液に、無水酢酸 (8.3 g, 31.9 mmol) とピリジン (3.44 mL, 42.5 mmol) を加えた。出発物質が完全に転換された後に、その溶液を DCM で希釈して、飽和 NaHCO_3 水溶液で抽出した。結合した有機相は MgSO_4 で乾燥し、溶媒は真空中で取り除いた。粗生成物をシリカ・ゲル・フラッシュ・カラム・クロマトグラフィーで精製したところ、標記の化合物 (37) が得られた。MS ESI + - HRMS m/z [M + Na]⁺ は $\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{SNa}$ に関して 629.2546 と計算されたが、実測値では 629.2552 であった。

【0405】

実施例 1-31：保護されたガラクトース構成ブロックの合成

【0406】

【化79】



10

20

【0407】

エチル 2,3-ジ-O-ベンジル-4,6-O-ベンジリデン-1-チオ- - D - ガラクトピラノシド (38) をトルエンで共蒸発させ、アルゴン雰囲気内で DCM (6.5 mL) 内に溶解した。トリエチルシラン (0.62 mL, 3.88 mmol) とトリフルオロ酢酸無水物 (0.27 mL, 1.94 mmol) を加えて、その溶液を 0 まで冷却した。トリフルオロ酢酸 (0.30 mL, 3.88 mmol) を滴下で加えて、その反応混合物を攪拌し、室温に戻るまで放置した。出発物質が完全に転換された後、その溶液を DCM で希釈し、飽和 NaHCO_3 水溶液で急冷した。結合有機層を MgSO_4 上で乾燥して、溶媒は真空中で取り除いた。残渣をシリカ・ゲル (ヘキサン / 酢酸エチル、9:1 - 7:3) 上でカラム・クロマトグラフィーで精製したところ、白色のフォームが得られた (94%)。[Christopher E. Martin, Markus W. Weishaupl 及び Peter H. Seeberger, Chem. Commun., 2011, 47, 10260 - 10262]。

30

【0408】

エチル 2,3,6-トリ-O-ベンジル-1-チオ- - D - ガラクトピラノシドをアルゴン雰囲気内で DCM (6.5 mL) 内に溶解した。無水酢酸 (8.3 g, 31.9 mmol) とピリジン (3.44 mL, 42.5 mmol) を 0 の温度でその溶液に加えた。出発物質が完全に転換された後、その溶液を DCM で希釈し、1 M HCl 水溶液と飽和 NaHCO_3 で抽出した。結合した有機相は MgSO_4 上で乾燥し、溶媒は真空中で取り除いた。粗生成物をシリカ・ゲル・フラッシュ・クロマトグラフィーで精製して、標記の化合物 (40) を得た。(Chem. Commun. 2011, 47, 10260)

40

エチル 2,3,6-トリ-O-ベンジル-4-O-フルオレニルメトキシカルボニル-1-チオ- - D - ガラクトピラノシド (41)

化合物 (39) の溶液に 9-フルオレニルメチル・クロロギ酸エステル (8.3 g, 31.9 mmol) とピリジン (3.44 mL, 42.5 mmol) を 0 で加える。出発物質が完全に転換された後、その溶液を DCM で希釈して、1 M HCl 水溶液と NaHCO_3 飽和水溶液で抽出を行った。結合した有機相は MgSO_4 上で乾燥され、溶媒は真

50

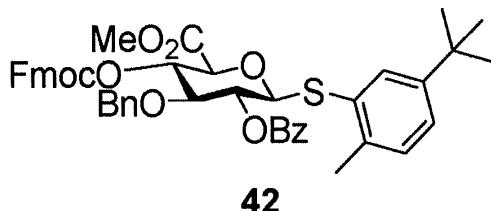
空中に取り除かれた。粗生成物をシリカ・ゲル・フラッシュ・クロマトグラフィーで精製して、標記の化合物を得た。MS ESI + - HRMS m/z [M + Na]⁺ は C₄₄H₄₄O₇SNa に関して 739.2705 と計算されたが、実測値では 739.2673 であった。

【0409】

実施例 1-32：グルクロン酸構成ブロック 42 の調製

【0410】

【化80】



10

【0411】

メチル(2-メチル-5-tert-ブチル-フェニル)-2-O-ベンゾイル-3-O-ベンジル-4-O-フルオレニルメトキシカルボニル-1-チオ- -D-グルコピラノシル・ウロネート(42)は *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 5858 に述べられている手順に従って合成された。

20

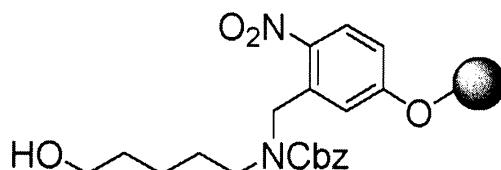
【0412】

実施例 1-33：機能化された固体支持体の合成

機能化された樹脂は *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 5858 8 に述べられている手順に従って合成された。

【0413】

【化81】



30

機能化樹脂

【0414】

実施例 1-34：基本手順 1：オートメーション・モジュール

保存液の調製

活性剤溶液：N-ヨードサクシンイミド(1.48 g、6.66 mmol)及びTfOH(60 μ L、0.66 mmol)をDCM(20 mL)とジオキサン(20 mL)の混合物に溶解した。

40

Fmoc 脱保護溶液：DMF(v/v)内にトリエチルアミンを20%の割合で溶かした溶液を調製した。

チオグリコシド構成ブロック溶液：0.25 mM の構成ブロックを 2 mL の DCM に溶解した。

【0415】

モジュール 1：グリコシル化：樹脂を 2 mL DCM 内で膨張させて、反応容器の温度を T₁ に調整する。グリコシル化反応の場合、DCM は排出され、構成ブロックの溶液(1.0 mL の DCM 内に 5 eq)の溶液だけが反応容器に送られる。設定された温度に到達したら、活性剤(1.0 mL の溶液に 5 eq)を加えることによって、反応が開始される。このグリコシル化は温度 T₁ で 5 分間、T₂ で 45 分間行われる。この手順は 2 度繰

50

り返される。反応が完了すると、その溶液を排出して、樹脂を D C M (6 回、各回 2 m L で 2 5 秒間)。この手順をさらに 2 回繰り返す。

【 0 4 1 6 】

モジュール 2 : F m o c 脱保護 : 樹脂を D M F で洗浄し (6 回) 、 2 m L D M F 内で膨張させ、反応容器の温度は 2 5 に調整する。 F m o c 脱保護のために、 D M F を排出して、 D M F 内に 2 0 % のトリエチルアミンの溶液 2 m L を反応容器に移した。 5 分後に、反応溶液をオリゴ糖合成器のフラクション・コレクターに集めて 2 m L の 2 0 % トリエチルアミンを D M F に入れた溶液を、その樹脂に与えた。この手順を 3 回繰り返す。次のグリシル化のために、その樹脂を D M F 、 T H F 、 D C M で洗浄する (それぞれ 6 回)。 F m o c 定量のためには、反応溶液を集め、 1 0 0 μ L 画分を D M F にトリエチルアミンを 2 0 % 含む溶液で希釈して 5 m L とし、 $\lambda = 2 9 4 \text{ nm}$ での紫外線吸収を判定する。 10

【 0 4 1 7 】

固体支持体からの裂開 (A n g e w C h e m . I n t . E d . 2 0 1 3 , 5 2 , 5 8 5 8 - 5 8 6 1) :

継続的光切断フロー・リアクター - 基本手順 : フロー・リアクターのセットアップは、反応温度を 2 5 に維持するための冷却器に接続された石英ガラス冷却システム内において、アーケ長が 2 7 . 9 c m で電力が 4 5 0 W の中間圧力水銀ランプ (H a n o v i a) を紫外線フィルター (P y r e x 、 3 0 5 n m で 5 0 % の透過率) によって取り囲ませることを含んでいる。フッ化エチレン・プロピレン (F E P) チューブ (内径 : 0 . 0 3 インチ、体積 : 1 2 m L) がこの冷却システムの周りに巻き付けられている。注入ポンプがこの F E P チューブに接続されていて、リアクターを通じて取り入れ口経由で溶媒と樹脂をフラッシングするのに用いられる。固体支持体はフリットによって濾過・除外され製品溶液はプールされ、溶媒は真空中で除去される。紫外線ランプがファンで追加的に冷却されるボックス内に配置されている。 20

【 0 4 1 8 】

この自動化された合成プロセスを終了させるためには、樹脂を D C M で洗浄し (6 回) 、 2 m L D C M 内で膨張させ、使い捨て注射器 (2 0 m L) に移される。光リアクターを用意するために、 F E P チューブを 1 5 m L M e O H で洗浄して、その後、 1 5 m L D C M で毎分 4 m L の流速で洗浄する。裂開を行うために、樹脂を使い捨て注射器 (2 0 m L) からリアクター内に注入して、 1 5 m L D C M をチューブを通じて押し入れる (流量 : 每分 5 0 0 μ L)。残った樹脂を洗い出すために、チューブを 2 0 m L D C M で洗浄する (流量 : 每分 5 0 0 m L)。リアクターを出た懸濁液はフィルターに入り、そこで、樹脂がフィルタリングで取り出され、 D C M で洗浄される。チューブは 1 5 m L の D C M を用いて流量毎分 4 m L で再均衡化される。全体の手順は、 2 回行われる。得られた溶液は真空中で蒸発させられ、粗生成物は H P L C (カラム : L u n a s i l i c a 、流量毎分 5 m L) で精製される。 30

【 0 4 1 9 】

基本手順 2 : 広域的な脱保護

精製された糖類を T H F と M e O H (1 . 2 m L , v / v = 4 : 1) の混合物に入れた溶液に、 1 M L i O H - 3 5 % H ₂ O ₂ (1 5 0 μ L , v / v = 2 : 1) を 0 の温度で加えた。この反応混合物を室温まで加温して、その状態で保存した。 4 時間後、 1 M K O H (0 . 5 m L) を加えて、その混合物を攪拌した。反応終了後、その混合物を I R - 1 2 0 - H ⁺ アンバーライト樹脂で中和し、濾過し、濃縮した。粗生成物を M e O H 、酢酸エチル、及び酢酸 (5 m L : 0 . 7 5 m L : 0 . 2 5 m L) 内に溶解し、その後で P d / C (2 0 m g) で処理した。この混合物をアルゴン雰囲気下で 3 0 分間、次に H ₂ 雰囲気下で 1 2 時間泡立てさせ、濾過・濃縮した。残渣を H P L C (H y p e r c a r b o n) で精製して凍結乾燥したところ、糖類 (蟻酸塩) が白色の固体として得られた。 40

【 0 4 2 0 】

自動化を行うための基本手順

実施例 1 - 3 3 の機能化された樹脂 (6 5 m g ; 装填 0 . 3 8 5 m m o l / g ; 0 . 0 50

25 mmol)を合成器の反応容器内に入れて、2 mL DCM内で膨張させた。合成シーケンスを開始するために樹脂をDMF、THF、そしてDCM(3回、各2 mLで25秒間)連続的に洗浄した。各構成ブロックに対するモジュール1とEmoc脱保護のためのモジュール2を行って、各糖構造を作成した。

[0 4 2 1]

HPLC 上での精製

所望の化合物を合成した後、その樹脂を固体支持体から開裂した。粗生成物は半予備的HPLC (カラム: Luna - Silica (21 x 250 mm, 5 μ m) を用いて流量5 mL / 分で精製し、溶出液はヘキサン / エチル酢酸塩で、勾配は 20 % (5 分間) → 60 % (45 分間) → 100 % (5 分間)、検出は 210 及び 280 nm) で行われ、目標の二糖類を得た。

10

(0 4 2 2)

所望の化合物の広域脱保護を実施した後、その粗生成物を半予備的HPLC（カラム：Luna-Hyper-Carbon (21×250 mm; 5 μm) を用いて流量5 mL/分で精製し、溶出液は0.1蟻酸水溶液/蟻酸のアセトニトリル溶液で、勾配は10%（5分間） 40%（30分間） 100%（5分間）、検出はELSD）で行われ、目標のオリゴ糖が得られた。

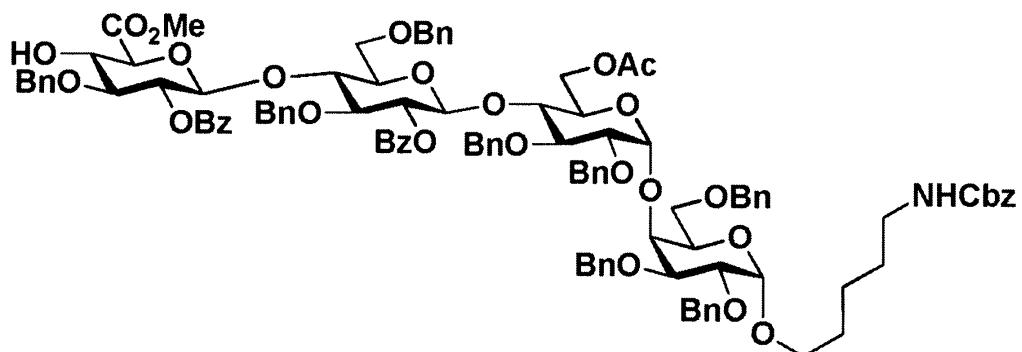
〔 0 4 2 3 〕

実施例 1 - 3 4 : N - ベンジルオキシカルボニル - 5 - アミノ - ペンタニル・メチル
 2 - O - ベンゾイル - 3 - O - ベンジル - - D - グルコピラノシリウロネート - (1
 4) - 2 - O - ベンゾイル - 3 , 6 - ジ - O - ベンジル - - D - グルコピラノシリル - (1
 4) - 6 - O - アセチル - 2 , 3 - ジ - O - ベンジル - - D - グルコピラノシリル -
 (1 - 4) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - ベンジル - - D - ガラクトピラノシド (19 a)

20

[0 4 2 4]

【化 8.2】



30

〔 0 4 2 5 〕

四糖類 2-1-a は以下の反応シーケンスで調製された。

[0 4 2 6]

【表1】

シーケンス	モジュール	詳細	条件
I	1	構成ブロック41	T1 = -30°C, T2 = -10°C
	2	Fmoc除去	室温で5分間
II	1	構成ブロック35	T1 = -30°C, T2 = 0°C
	2	Fmoc除去	室温で5分間
III	1	構成ブロック32	T1 = -40°C, T2 = -20°C
	2	Fmoc除去	室温で5分間
IV	1	構成ブロック42	T1 = -30°C, T2 = 0°C
	2	Fmoc除去	室温で5分間

10

【0427】

樹脂から8%。MS ESI+ - HRMS m/z [M + Na]⁺ は C₁₁₀H₁₁₇NO₂₇ に関して 1906.7711 と計算されたが、実測値は 1906.7590 であった。

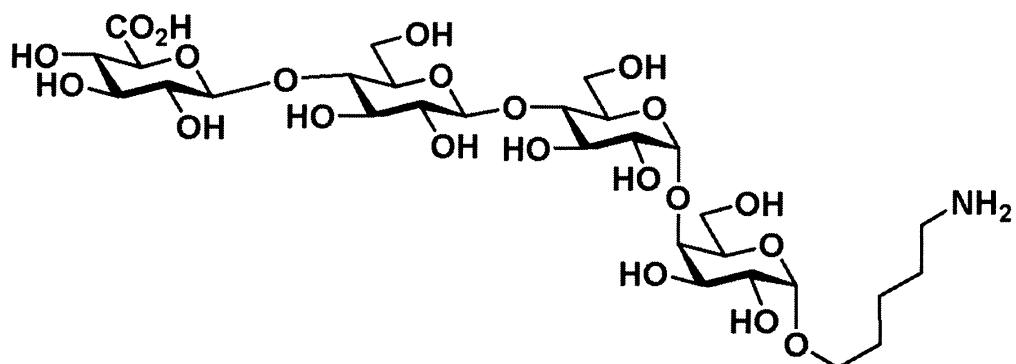
【0428】

実施例 1-35 : 5-アミノ-ペントニル- - D-グルコピラノシル-ウロン酸- (1-4) - - D-グルコピラノシル- (1-4) - - D-グルコピラノシル- (1-4) - - D-ガラクトピラノシド (19) の調製

20

【0429】

【化83】



30

【0430】

四糖類 19a を一般的な脱保護手順に処したところ、四糖類 19 が得られた。36%、MS ESI+ - HRMS m/z [M + H]⁺ は C₂₉H₅₂NO₂₂ に関して 766.2975 と計算されたが、実測値は 766.2988 であった。

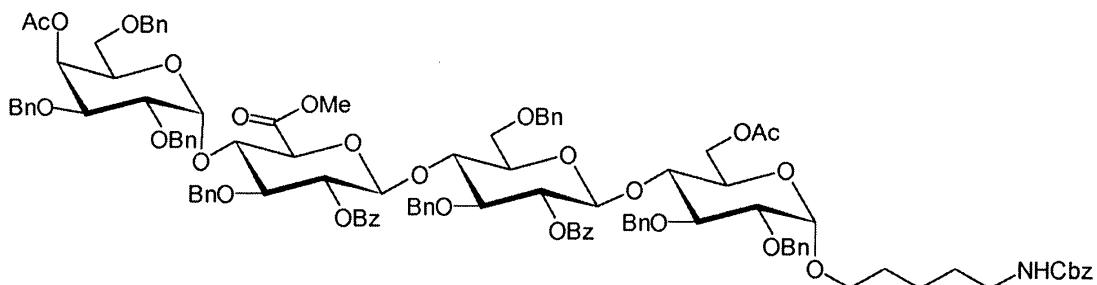
40

【0431】

実施例 1-36 : N-ベンジルオキシカルボニル-5-アミノ-ペントニル-4-O-アセチル-2,3,6-トリ-O-ベンジル- - D-ガラクトピラノシル- (1-4) -メチル-2-O-ベンゾイル-3-O-ベンジル- - D-グルコピラノシル-ウロネート- (1-4) -2-O-ベンゾイル-3,6-ジ-O-ベンジル- - D-グルコピラノシル- (1-4) -6-O-アセチル-2,3-ジ-O-ベンジル- - D-グルコピラノシド (20a) の合成

【0432】

【化 8 4】



【0 4 3 3】

10

四糖類 20 a は以下の反応シーケンスに従って調製された。

【0 4 3 4】

【表 2】

シーケンス	モジュール	詳細	条件
I	1	構成ブロック 35	T1 = - 30 °C, T2 = 0 °C
	2	Fmoc 除去	室温で 5 分間
II	1	構成ブロック 32	T1 = - 30 °C, T2 = -10 °C
	2	Fmoc 除去	室温で 5 分間
III	1	構成ブロック 42	T1 = - 30 °C, T2 = 0 °C
	2	Fmoc 除去	室温で 5 分間
IV	1	構成ブロック 40	T1 = - 40 °C, T2 = - 20 °C
	2	Fmoc 除去	室温で 5 分間

20

【0 4 3 5】

樹脂から 16%。MS ESI+ - HRMS m/z [M + Na]⁺ は C₁₁₁₂H₁₁₁₉NO₈Na に関して 1948.7816 と計算されたが、実測値は 1948.7796 であった。

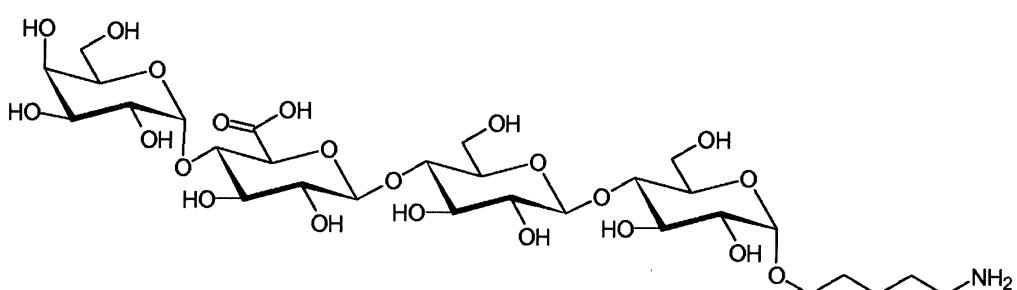
30

【0 4 3 6】

実施例 1-37 : 5 - アミノ - ペンタニル - - D - ガラクトピラノシリル - (1-4) - - D - グルコピラノシリル・ウロン酸 - (1-4) - - D - グルコピラノシリル - (1-4) - - D - グルコピラノシド (20) の調製

【0 4 3 7】

【化 8 5】



40

【0 4 3 8】

四糖類 20 a を一般的な脱保護手順で処理したところ、四糖類 20 が得られた。40% MS ESI+ - HRMS m/z [M + H]⁺ は C₂₉H₅₂NO₂₂ に関して 766

50

. 2975 と計算されたが、実測値は 766.2964 であった。

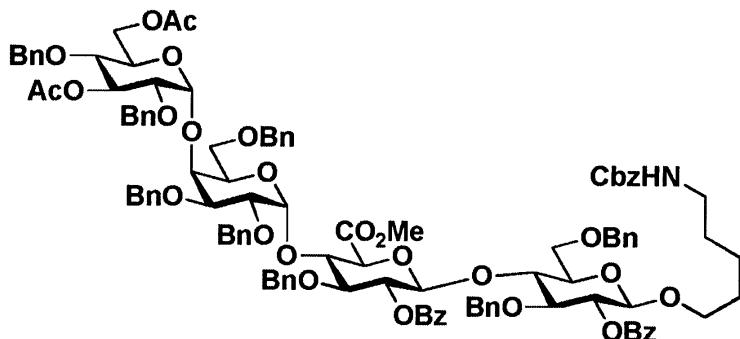
【0439】

実施例 1-38 : N-ベンジルオキシカルボニル-5-アミノ-ペントニル-3,6-ジ-O-アセチル-2,4-ジ-O-ベンジル- -D-グルコピラノシリル-(1-4)-2,3,6-トリ-O-ベンジル- -D-ガラクトピラノシリル-(1-4)-メチル-2-O-ベンゾイル-3-O-ベンジル- -D-グルコピラノシリル・ウロネート-(1-4)-2-O-ベンゾイル-3,6-ジ-O-ベンジル- -D-グルコピラノシリド(21a)の調製

【0440】

【化86】

10



20

【0441】

【表3】

シーケンス	モジュール	詳細	条件
I	1	構成ブロック 32	T1 = -30 °C, T2 = -10 °C
	2	Fmoc 除去	室温で 5 分間
II	1	構成ブロック 42	T1 = -30 °C, T2 = 0 °C
	2	Fmoc 除去	室温で 5 分間
III	1	構成ブロック 41	T1 = -40 °C, T2 = -20 °C
	2	Fmoc 除去	室温で 5 分間
IV	1	構成ブロック 37	T1 = -30 °C, T2 = 0 °C
	2	Fmoc 除去	室温で 5 分間

30

【0442】

樹脂から 20%。MS ESI+ - HRMS m/z [M+Na]⁺ は C₁₁₂H₁₁₁N₉O₂₈ について 1948.7816 と計算されたが、実測値は 1950.7906 であった。

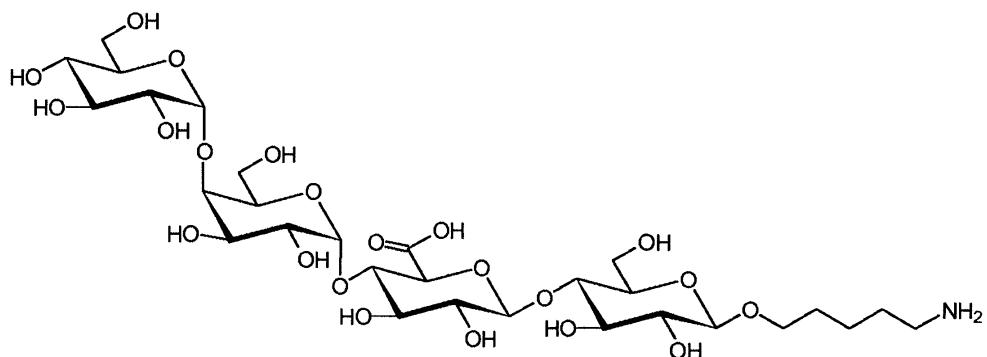
【0443】

実施例 1-39 : 5-アミノ-ペントニル- -D-グルコピラノシリル-(1-4)- -D-ガラクトピラノシリル-(1-4)- -D-グルコピラノシリル・ウロニ酸-(1-4)- -D-グルコピラノシリド(21)の調製

40

【0444】

【化 8 7】



10

【 0 4 4 5 】

四糖類 2 1 a を一般的な脱保護手順で処理したところ、四糖類 2 1 が得られた。4 2 % MS ESI + - HRMS m/z [M + H] + は C₂₉H₅₂NO₂₂ に関して 7666.2975 と計算されたが、実測値は 7666.2977 であった。

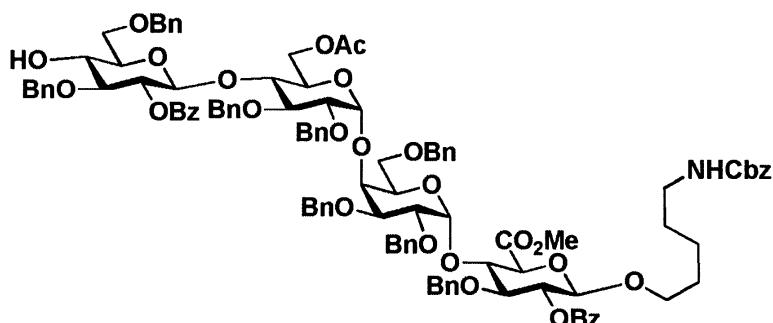
[0 4 4 6]

実施例 1 - 4 0 : N - ベンジルオキシカルボニル - 5 - アミノ - ペンタニル 2 - O - ベンゾイル - 3 , 6 - ジ - O - ベンジル - - D - グルコピラノシリル - (1 4) - 6 - O - アセチル - 3 , 4 - ジ - O - ベンジル - - D - グルコピラノシリル - (1 4) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - ベンジル - - D - ガラクトピラノシリル - (1 4) - メチル 2 - O - ベンゾイル - 3 - O - ベンジル - - D - グルコピラノシリル・ウロネート (2 2 a) の合成

20

〔 0 4 4 7 〕

【化 8 8】



30

[0 4 4 8]

四糖類 22a は以下の反応シーケンスで合成された。

(0 4 4 9)

【表4】

シーケンス	モジユ ル	詳細	条件
I	1	構成ブロック 42	T1 = - 30 °C, T2 = 0 °C
	2	Fmoc 除去	室温で 5 分間
II	1	構成ブロック 41	T1 = - 40 °C, T2 = - 20 °C
	2	Fmoc 除去	室温で 5 分間
III	1	構成ブロック 35	T1 = - 30 °C, T2 = 0 °C
	2	Fmoc 除去	室温で 5 分間
IV	1	構成ブロック 32	T1 = - 30 °C, T2 = - 10 °C
	2	Fmoc 除去	室温で 5 分間

[0 4 5 0]

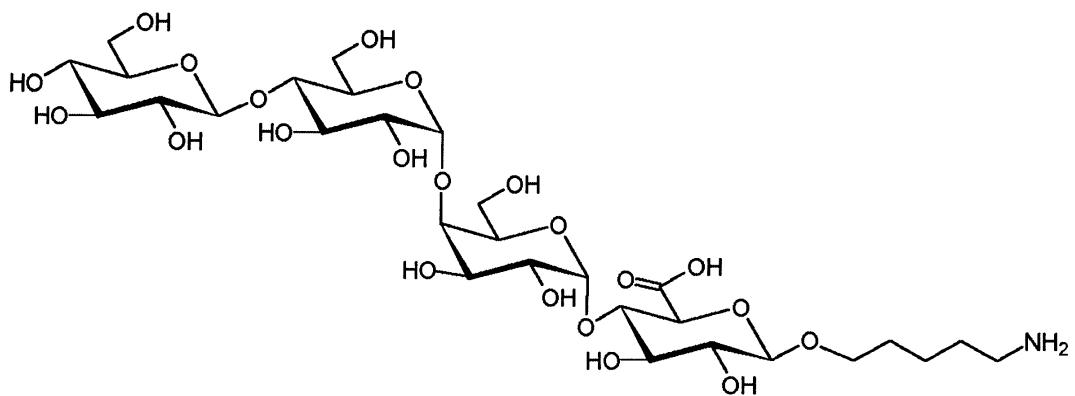
樹脂から 21%。MS ESI + - HRMS m/z [M + Na]⁺ は C₁₁H₁₇NO₂Na について 1906.7711 と計算されたが、実測値は 1906.7624 であった。

【 0 4 5 1 】

実施例 1 - 4 1 : 5 - アミノ・ペンタニル - D - グルコピラノシル - (1 4) -
- D - グルコピラノシル - (1 4) - D - ガラクトピラノシル - (1 4) -
- D - グルコピラノシルウロン酸 (2 2) の合成

【 0 4 5 2 】

【化 8 9】



【 0 4 5 3 】

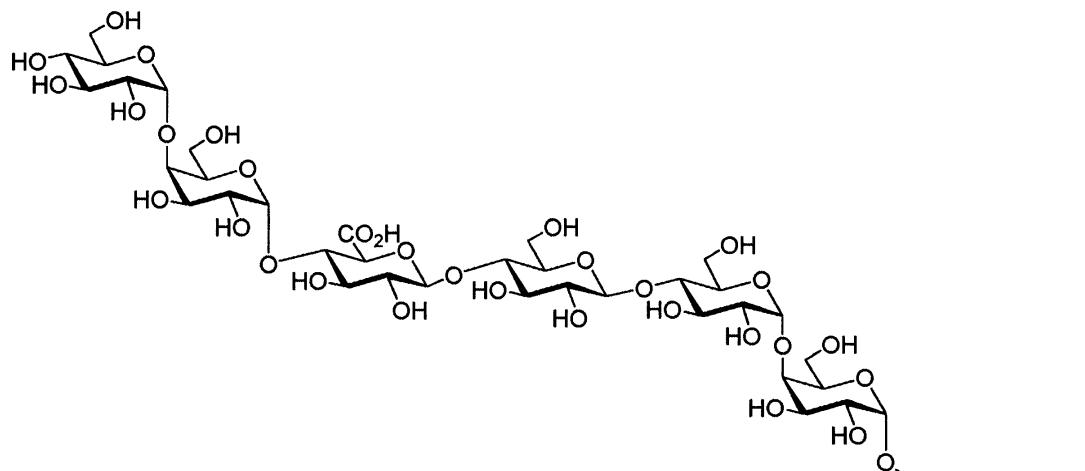
四糖類 2 2 a を一般的な脱保護手順で処理したところ、四糖類 2 2 が得られた。 5 2 % MS ESI + - HRMS m/z [M + H]⁺ は C₂₉H₅₂NO₂₂ に関して 7 6 6 . 2 9 7 5 と計算されたが、実測値は 7 6 6 . 2 9 8 8 であった。

【 0 4 5 4 】

実施例 1 - 28 から 1 - 34 までに述べられた本発明による糖類のさらなる実施例：

【 0 4 5 5 】

【化 9 0 】



10

63

【 0 4 5 6 】

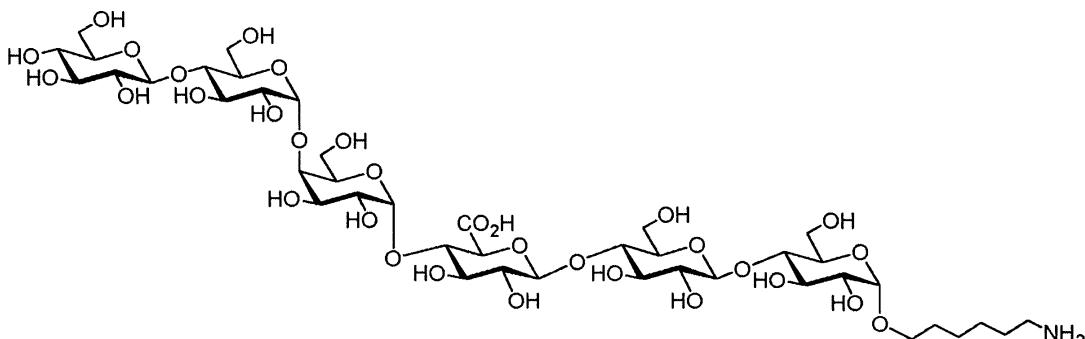
C₄H₇NO₃に関するMS/EI+ - HRMS m/z [M+H]⁺ 計算値は、1090.3959

20

5 - アミノ・ペントニル - - D - グルコピラノシル - (1 4) - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - D - グルコピラノシル - (1 4) - D - グルコピラノシル - (1 4) - D - ガラクトピラノシド

【 0 4 5 7 】

【化 9 1】



30

64

【 0 4 5 8 】

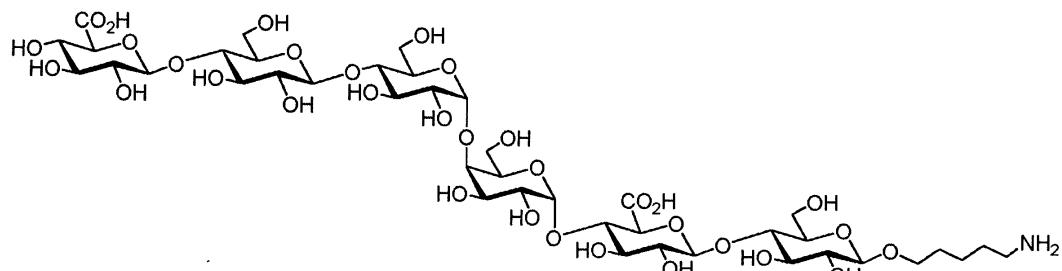
$C_{4.2}H_{7.5}NO_{3.1}$ に関する MS ESI + - HRMS $m/z [M + H]^+$ 計算値は、 1104.4116

40

5 - アミノ・ペントニル・ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル
ウロン酸 - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド

【 0 4 5 9 】

【化92】



65

10

【0460】

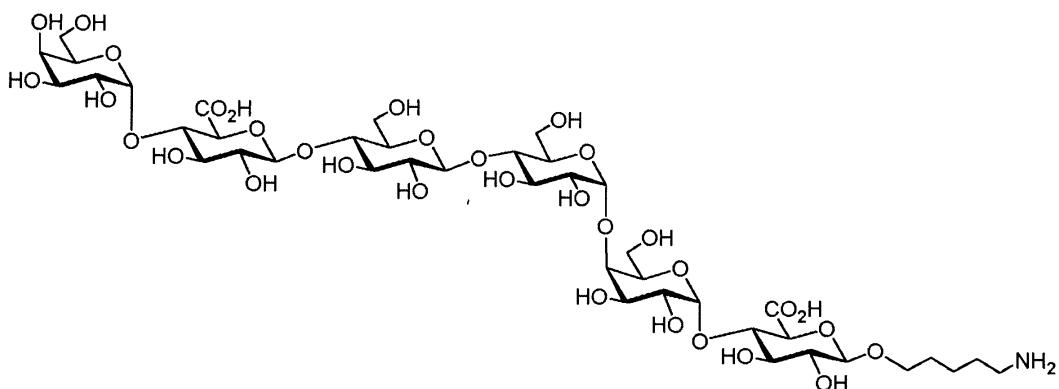
$C_{41}H_{69}NO_{33}$ に関する MS ESI+ - HRMS $m/z [M + H]^+$ 計算値
は 1104.3752

5 - アミノ・ペンタニル - D - グルコピラノシリルウロン酸 - (1 - 4) - - D -
グルコピラノシリル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシリル - (1 - 4) - - D - ガラ
クトピラノシリル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシリルウロン酸 - (1 - 4) - - D
- グルコピラノシド

【0461】

【化93】

20



66

30

【0462】

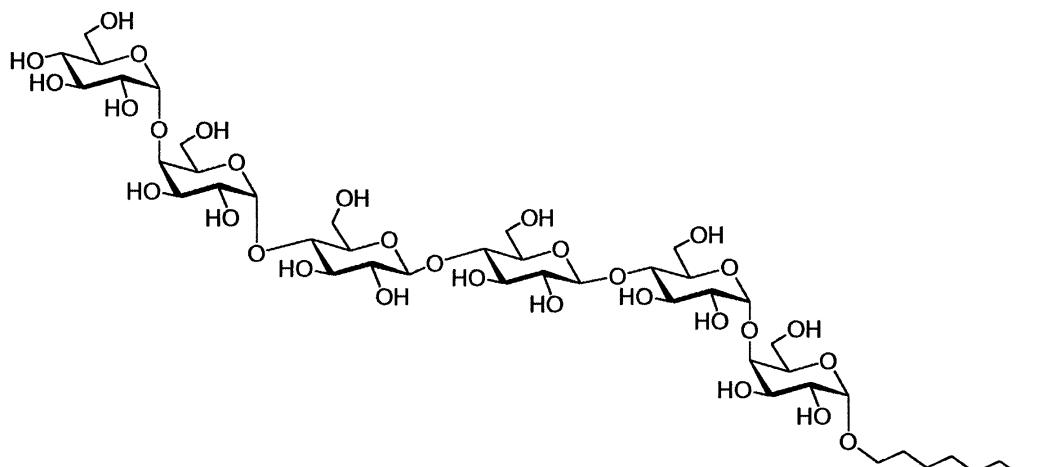
$C_{41}H_{69}NO_{33}$ に関する MS ESI+ - HRMS $m/z [M + H]^+$ 計算値
は、 1104.3752

5 - アミノ・ペンタニル - D - ガラクトピラノシリル - (1 - 4) - - D - グルコ
ピラノシリルウロン酸 - (1 - 4) - - D - グルコピラノシリル - (1 - 4) - - D - グ
ルコピラノシリル - (1 - 4) - - D - ガラクトピラノシリル - (1 - 4) - - D - グル
コピラノシリルウロン酸

【0463】

40

【化94】



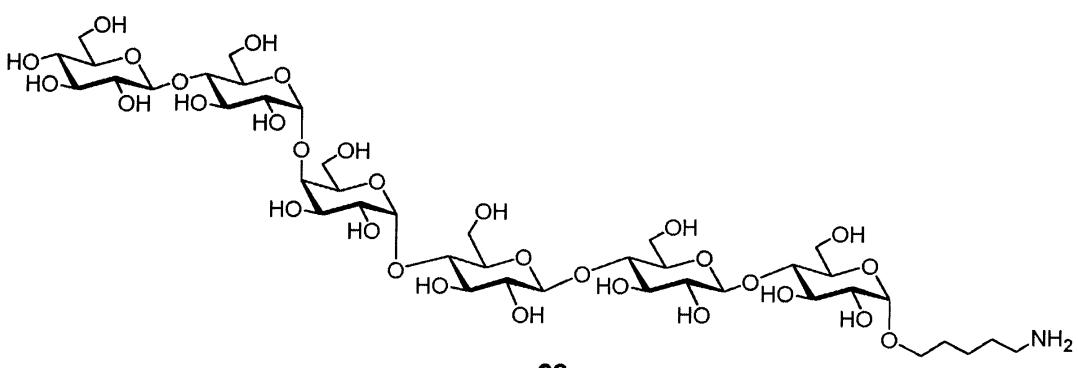
【0464】

$C_{42}H_{75}NO_{31}$ に関する MS ESI+ - HRMS m/z [M+H]⁺ 計算値
は、1090.4323

5 - アミノ・ペンタニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - D - ガラクト
ピラノシル - (1 4) - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 4) - D - グ
ルコピラノシル - (1 4) - D - グルコピラノシル - (1 4) - D - ガラク
トピラノシド

【0465】

【化95】



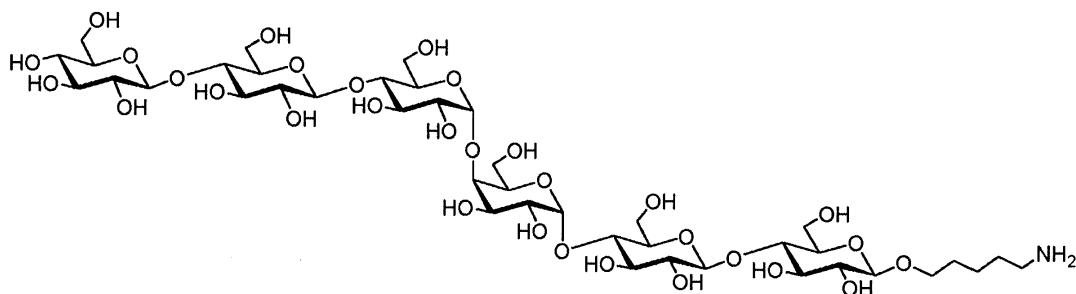
【0466】

$C_{41}H_{73}NO_{31}$ に関する MS ESI+ - HRMS m/z [M+H]⁺ 計算値
は、1076.4167

5 - アミノ・ペンタニル - D - グルコピラノシル - (1 4) - D - グルコピ
ラノシル - (1 4) - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - D - グルコピラ
ノシル - (1 4) - D - グルコピラノシル - (1 4) - D - グルコピラノシ
ド

【0467】

【化96】



69

10

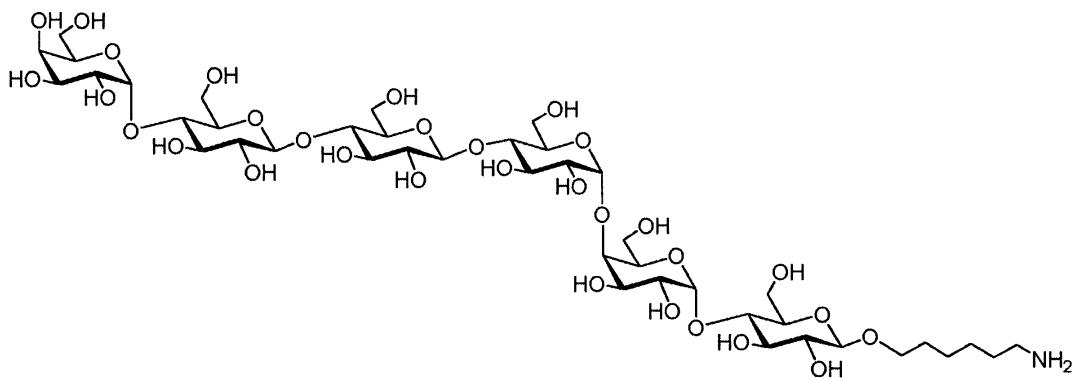
【0468】

$C_{41}H_{73}NO_{31}$ に関する MS ESI+ - HRMS $m/z [M + H]^+$ 計算値は、1076.4167

5 - アミノ - ペンタニル - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシド

【0469】

【化97】



70

20

30

【0470】

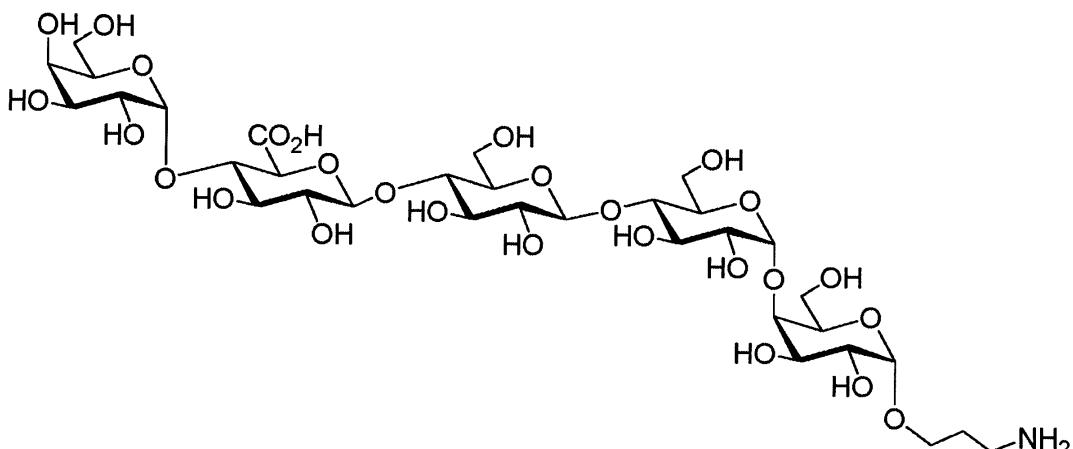
$C_{42}H_{75}NO_{31}$ に関する MS ESI+ - HRMS $m/z [M + H]^+$ 計算値は、1090.4323

5 - アミノ - ペンタニル - D - ガラクトピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシド (70)

【0471】

40

【化98】



71

10

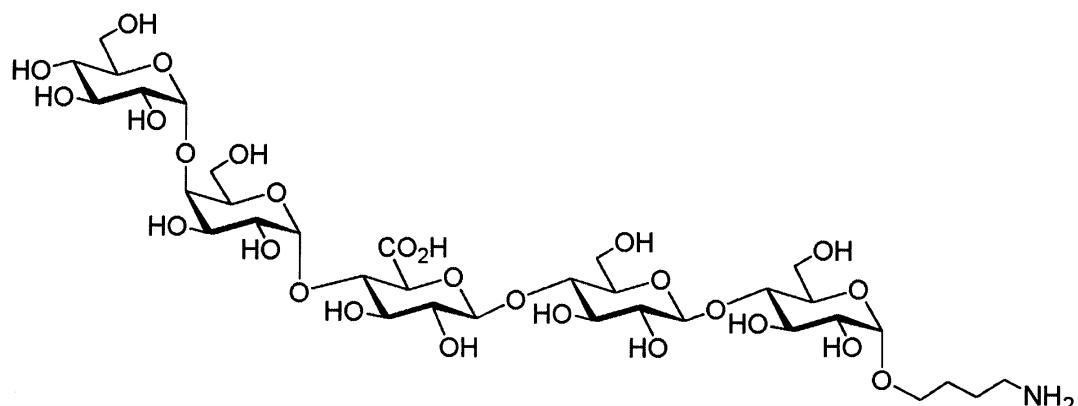
【0472】

$C_{33}H_{57}NO_{27}$ に関する MS ESI+ - HRMS $m/z [M + H]^+$ 計算値
は、890.3118

3 - アミノプロピル - D - ガラクトピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラ
ノシルウロン酸 - (1 - 4) - - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコ
ピラノシル - (1 - 4) - - D - ガラクトピラノシド

【0473】

【化99】



72

30

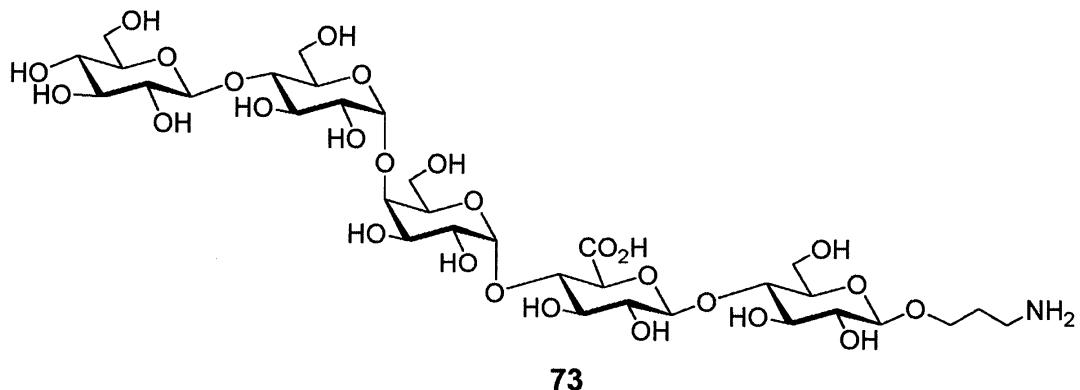
【0474】

$C_{34}H_{59}NO_{27}$ に関する MS ESI+ - HRMS $m/z [M + H]^+$ 計算値
は 914.3274

5 - アミノペンタニル - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - - D - ガラクトピ
ラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシルウロン酸 - (1 - 4) - - D - グル
コピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシド

【0475】

【化100】



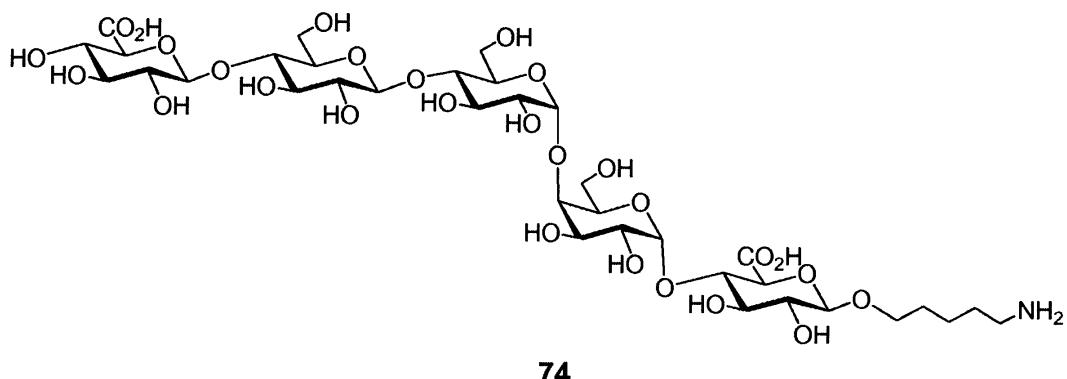
【0476】

$C_{33}H_{57}NO_{27}$ に関する MS ESI+ - HRMS m/z [M+H]⁺ 計算値は、890.3118

3-アミノプロピル - D-グルコピラノシリル - (1-4) - D-グルコピラノシリル - (1-4) - D-ガラクトピラノシリル - (1-4) - D-グルコピラノシリルウロン酸 - (1-4) - D-グルコピラノシド

【0477】

【化101】



【0478】

$C_{35}H_{59}NO_{28}$ に関する MS ESI+ - HRMS m/z [M+H]⁺ 計算値は、942.3224

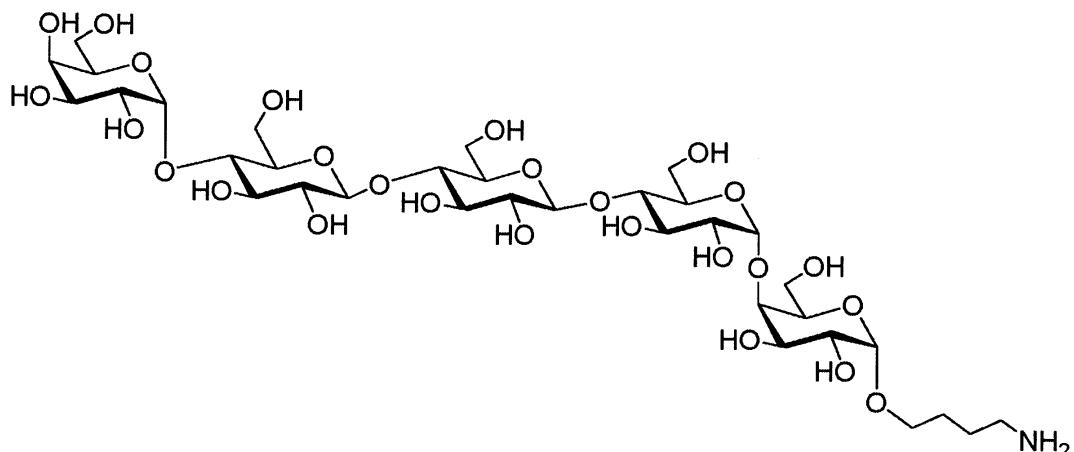
5-アミノ・ペンタニル - D-グルコピラノシリルウロン酸 - (1-4) - D-グルコピラノシリル - (1-4) - D-グルコピラノシリル - (1-4) - D-ガラクトピラノシリル - (1-4) - D-グルコピラノシリルウロン酸

【0479】

30

40

【化102】



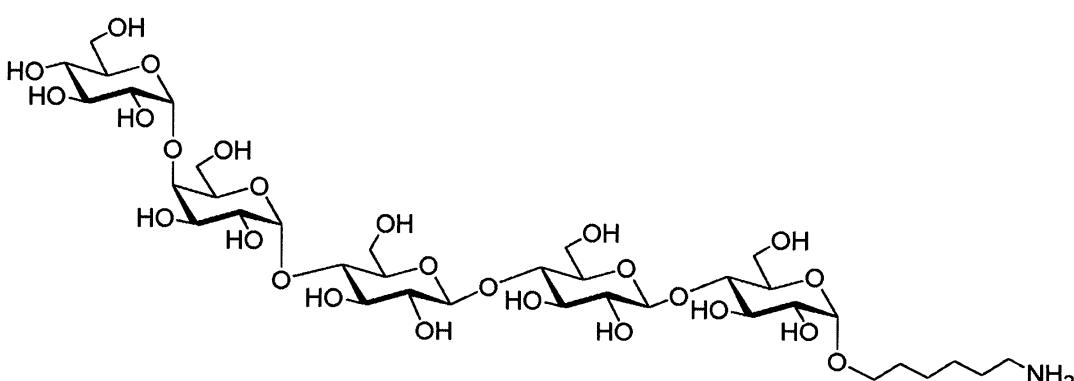
【0480】

$C_{34}H_{61}NO_{26}$ に関する MS ESI+ - HRMS $m/z [M + H]^+$ 計算値
は、890.3482

4 - アミノブチル - D - ガラクトピラノシル - (1 - 4) - D - グルコピラノ
シル - (1 - 4) - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - D - グルコピラノシル
- (1 - 4) - D - ガラクトピラノシド

【0481】

【化103】



【0482】

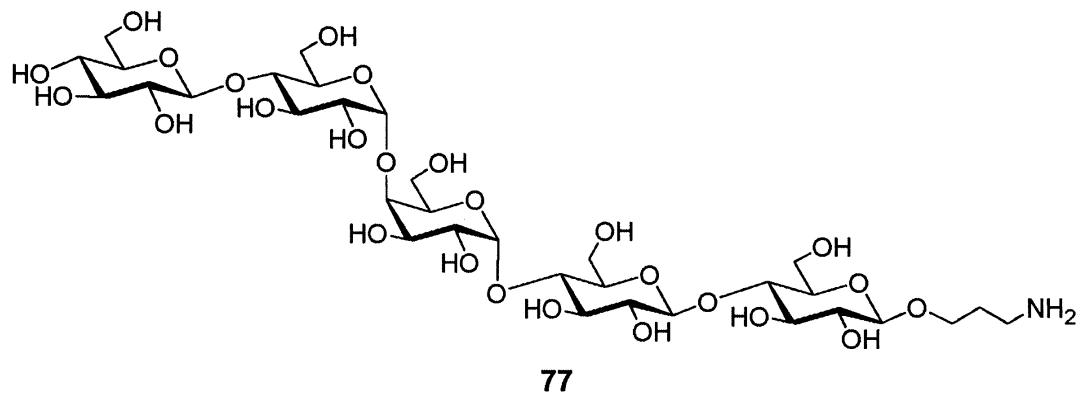
$C_{36}H_{65}NO_{26}$ に関する MS ESI+ - HRMS $m/z [M + H]^+$ 計算値
は、928.3795

6 - アミノ - ヘキサニル - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - D - ガラクト
ピラノシル - (1 - 4) - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - D - グルコピラ
ノシル - (1 - 4) - D - グルコピラノシド

【0483】

40

【化104】



10

【0484】

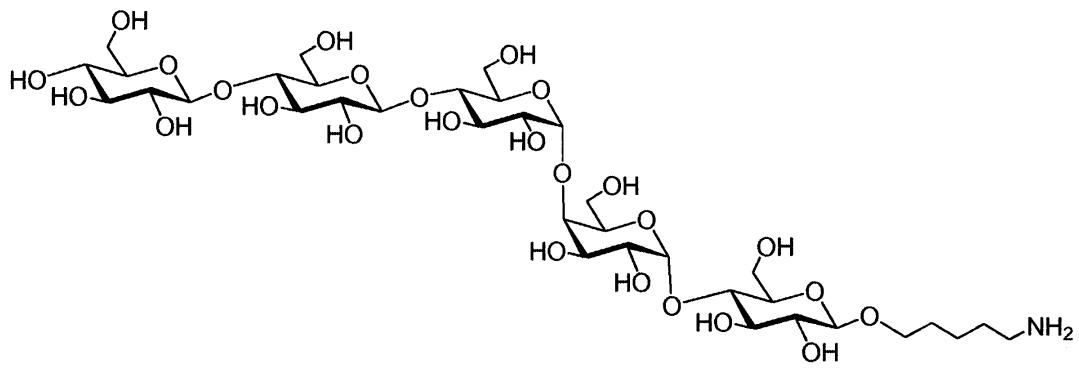
$C_{33}H_{59}NO_{26}$ に関する MS ESI+ - HRMS m/z [M+H]⁺ 計算値
は、 886.3325

3 - アミノプロピル - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノ
シル - (1 - 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシ
ル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシド

【0485】

20

【化105】



30

【0486】

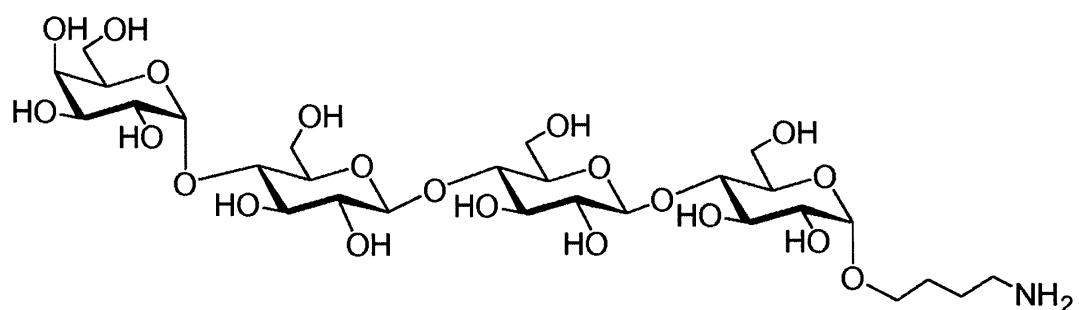
$C_{35}H_{63}NO_{26}$ に関する MS ESI+ - HRMS m/z [M+H]⁺ 計算値
は、 914.3638

5 - アミノ・ペンタニル - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピ
ラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - - D - ガラクトピラ
ノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシド

【0487】

40

【化106】



79

10

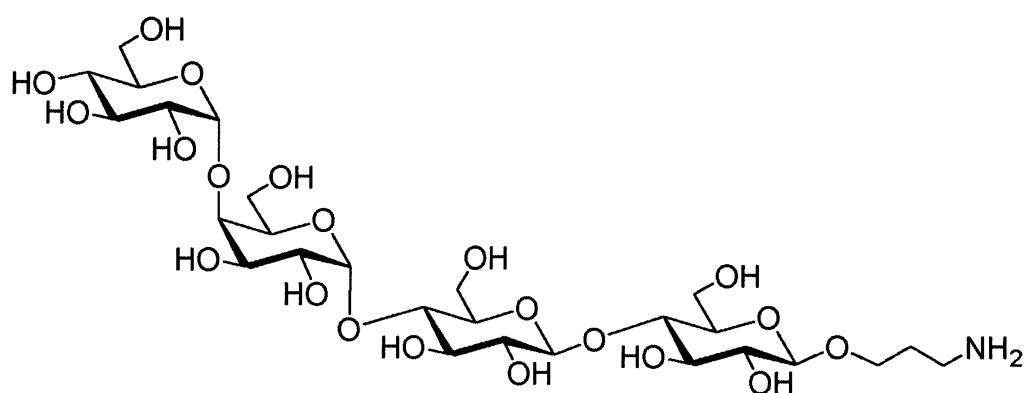
【0488】

$C_{28}H_{51}NO_{21}$ に関する MS ESI+ - HRMS $m/z [M + H]^+$ 計算値は、738.2954

4 - アミノブチル - - D - ガラクトピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシド

【0489】

【化107】



80

20

30

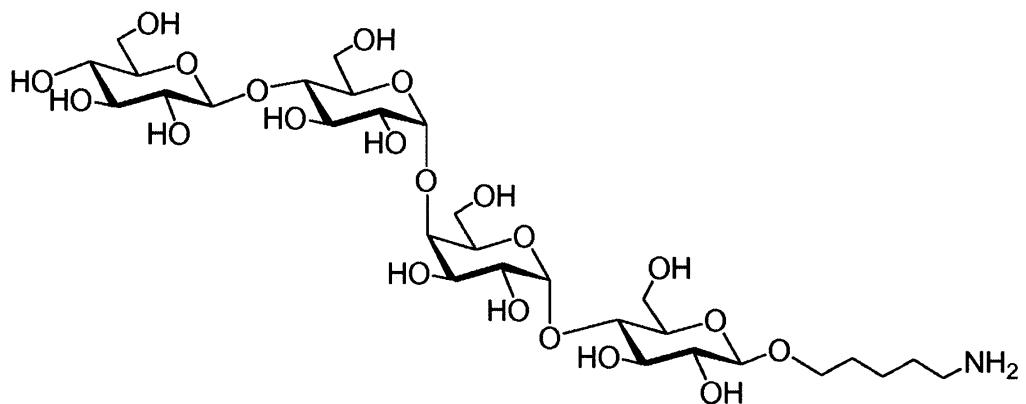
【0490】

$C_{27}H_{49}NO_{21}$ に関する MS ESI+ - HRMS $m/z [M + H]^+$ 計算値は、724.2797

3 - アミノプロピル - - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシド

【0491】

【化108】



81

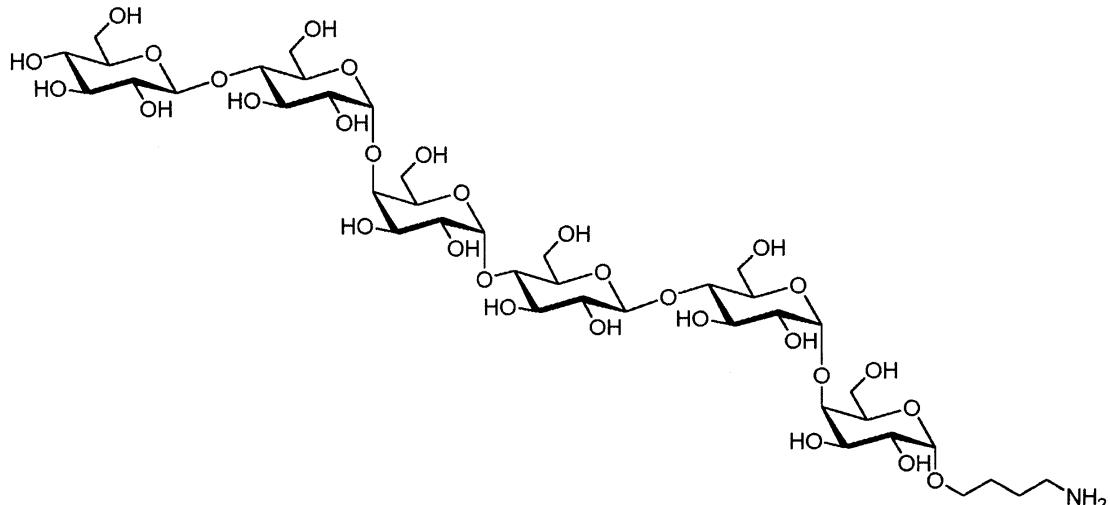
【0492】

$C_{29}H_{53}NO_{21}$ に関する MS ESI+ - HRMS $m/z [M + H]^+$ 計算値は、752.3110

6 - アミノ - ヘキサニル - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - D - ガラクトピラノシル - (1 - 4) - D - グルコピラノシド

【0493】

【化109】



82

【0494】

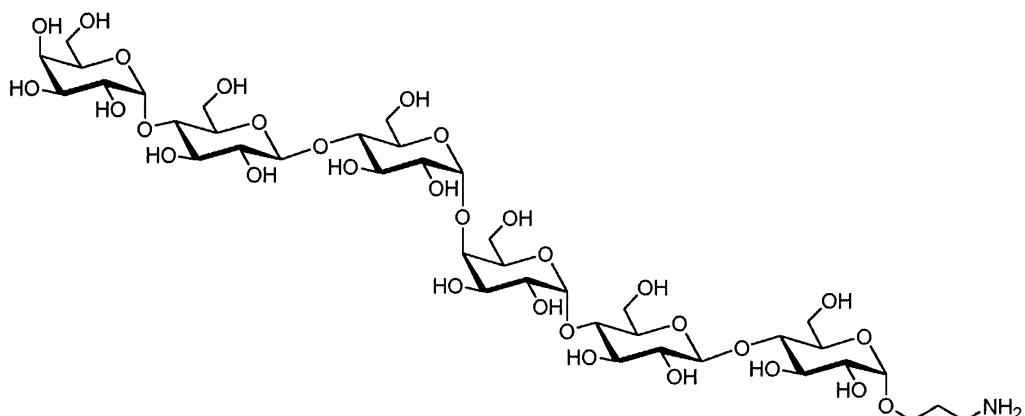
$C_{40}H_{71}NO_{31}$ に関する MS ESI+ - HRMS $m/z [M + H]^+$ 計算値は、1062.4010

4 - アミノ - ブチル - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - D - ガラクトピラノシル - (1 - 4) - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - D - グルコピラノシル - (1 - 4) - D - ガラクトピラノシド

【0495】

40

【化110】



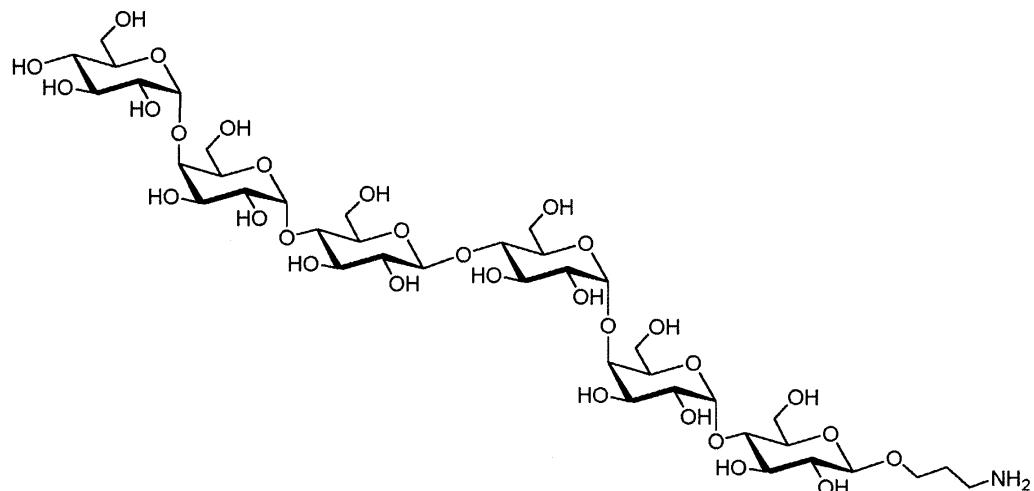
【0496】

$C_{39}H_{69}NO_{31}$ に関する MS ESI+ - HRMS m/z [M+H]⁺ 計算値は、1048.3854

3 - アミノプロピル - - D - ガラクトピラノシリル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシリル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシリル - (1 - 4) - - D - ガラクトピラノシリル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシリル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシド

【0497】

【化111】



【0498】

$C_{39}H_{69}NO_{31}$ に関する MS ESI+ - HRMS m/z [M+H]⁺ 計算値は、1048.3854

3 - アミノプロピル - - D - グルコピラノシリル - (1 - 4) - - D - ガラクトピラノシリル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシリル - (1 - 4) - - D - ガラクトピラノシリル - (1 - 4) - - D - グルコピラノシド

【0499】

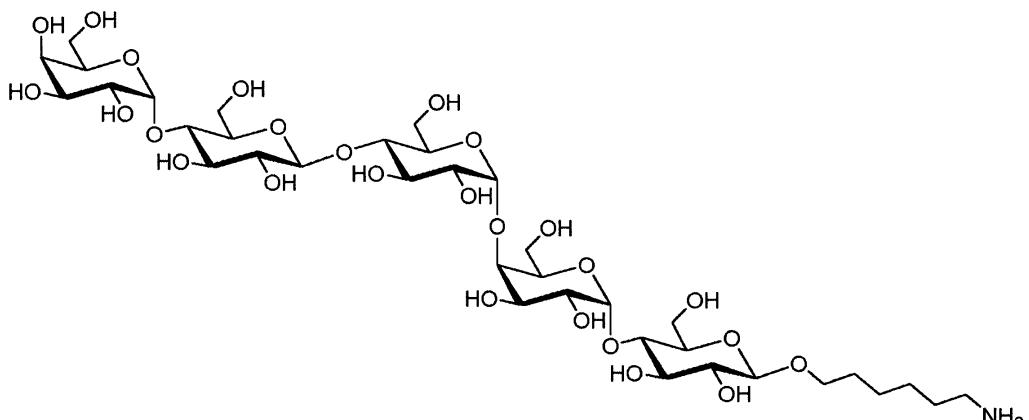
10

20

30

40

【化112】



85

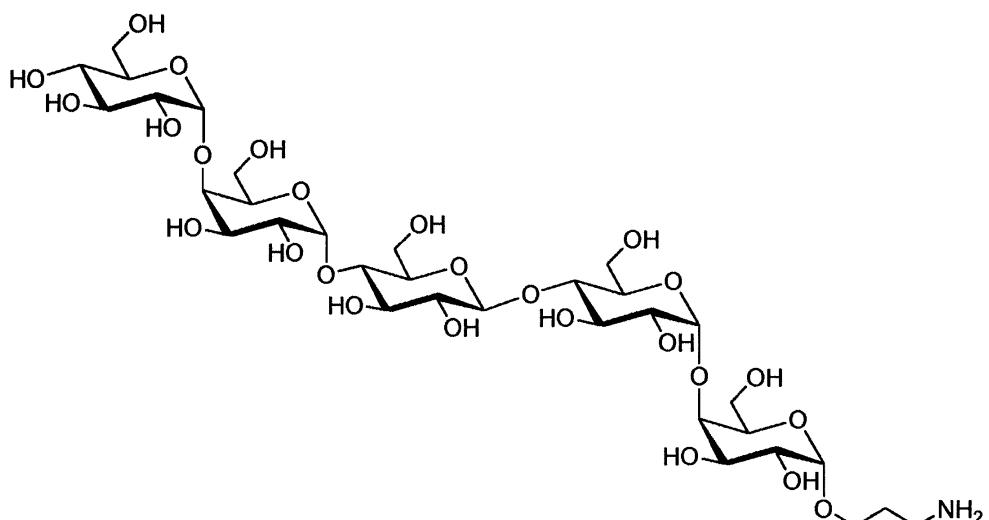
【0500】

$C_{36}H_{65}NO_{26}$ に関する MS ESI+ - HRMS $m/z [M + H]^+$ 計算値
は、 928.3795

6 - アミノ・ヘキサニル - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコ
ピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピ
ラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド

【0501】

【化113】



86

【0502】

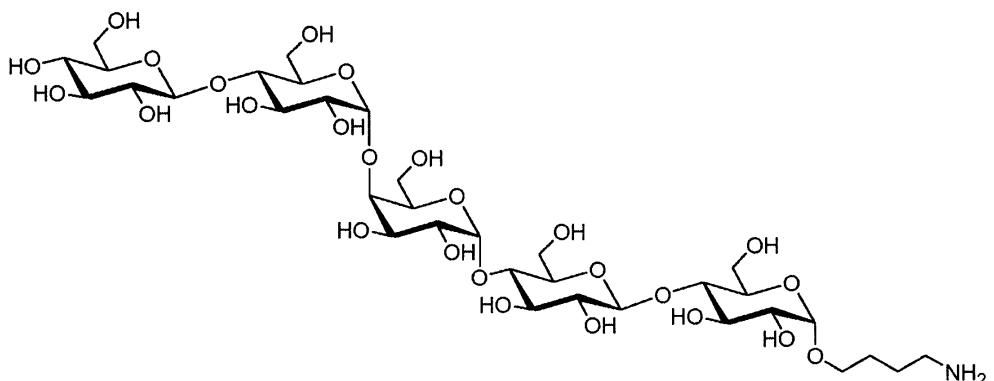
$C_{33}H_{59}NO_{26}$ に関する MS ESI+ - HRMS $m/z [M + H]^+$ 計算値
は、 886.3325

3 - アミノプロピル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラ
ノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシ
ル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシド

【0503】

40

【化 1 1 4 】



10

87

〔 0 5 0 4 〕

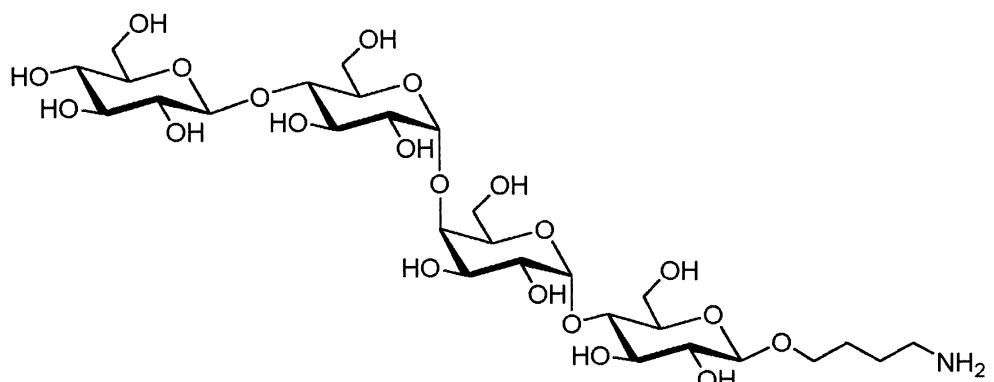
C₃H₆O₂に関するMS/EI+-HRMS m/z [M+H]⁺計算値は、900.3482

4 - アミノブチル - D - グルコピラノシル - (1 4) - D - グルコピラノシル - (1 4) - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - D - グルコピラノシル - (1 4) - D - グルコピラノシド

20

〔 0 5 0 5 〕

【化 1 1 5 】



30

88

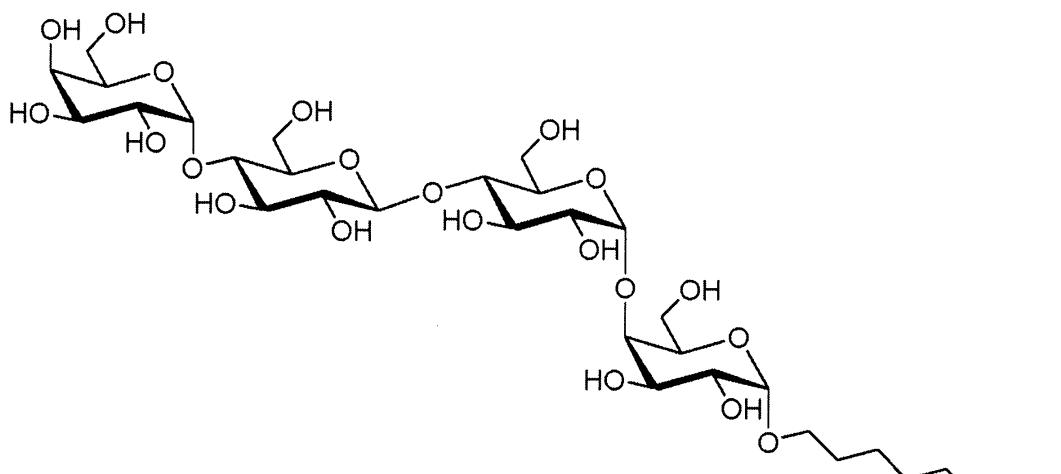
〔 0 5 0 6 〕

C₂H₅NO₂に関するMS/EI+-HRMS m/z [M+H]⁺計算値は、738.2954

4 - アミノブチル - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド

40

【化116】



89

【0508】

$C_{30}H_{55}NO_{21}$ に関する M S E S I + - H R M S $m/z [M + H]^+$ 計算値
は、 766.3267

6 - アミノヘキサニル - D - ガラクトピラノシリル - (1 - 4) - D - グルコビ
ラノシリル - (1 - 4) - D - グルコピラノシリル - (1 - 4) - D - グルコピラ
ノシリド

生物学的実験

実施例 2 - 1 : コードリンク (CodeLink) N H S スライドを用いたマイクロアレイの合成

自動圧電整列口ボット (Sciencion社, ベルリン, ドイツ) を用いて、コードリンク (CodeLink) N H S スライド上に意図されたグリカンをスポットし、室温で 24 時間 (PBS 内で 1% w/v) 培養した。スライドをブロック用緩衝液 (100 mM エタノールアミンを 50 mM NapipH > 9 に入れたもの) 内で室温で 30 分間培養し、毎回水とエタノールを用いて洗浄し、乾燥した。1% (w/v) のウシ血清アルブミンを有するスライドをリン酸緩衝食塩水で 1 時間、37°でブロッキングして、3 回洗浄してから乾燥した。

【0509】

実施例 2 - 2 : 実施例 2 - 1 で述べた手順により合成されたマイクロアレイを用いての結合実験

一般式 (I) の糖類をウサギ抗 S P 8 タイプ血清あるいはヒト肺炎球菌基準血清 007 s p (英国の国立生物製品基準規制機構 (National Institute for Biological Standards and Control)) から購入した Pneumovax (登録商標) ワクチンで免疫化した 287 人からプールされた血清) のいずれかで被覆したマイクロアレイ・スライドを培養することで、天然の S P 8 多糖類が存在している状態と不在の状態のいずれかで、そして、蛍光的にラベルした抗ウサギ (ヤギ抗ウサギ IgG - FITC, abcam ab6717) あるいは抗ヒト二次抗体 (Alexa Fluor 488 ヤギ抗ヒト IgM, Invitrogen A21215, Alexa Fluor 647 ヤギ抗ヒト IgG, Invitrogen A21445)) を用いて結合実験を行った。

【0510】

実施例 2 - 3 : アジピン酸ジサクシンイミジルを用いた合成四糖類 10 及び 18 の C R M₁₉₇ への接合

【0511】

10

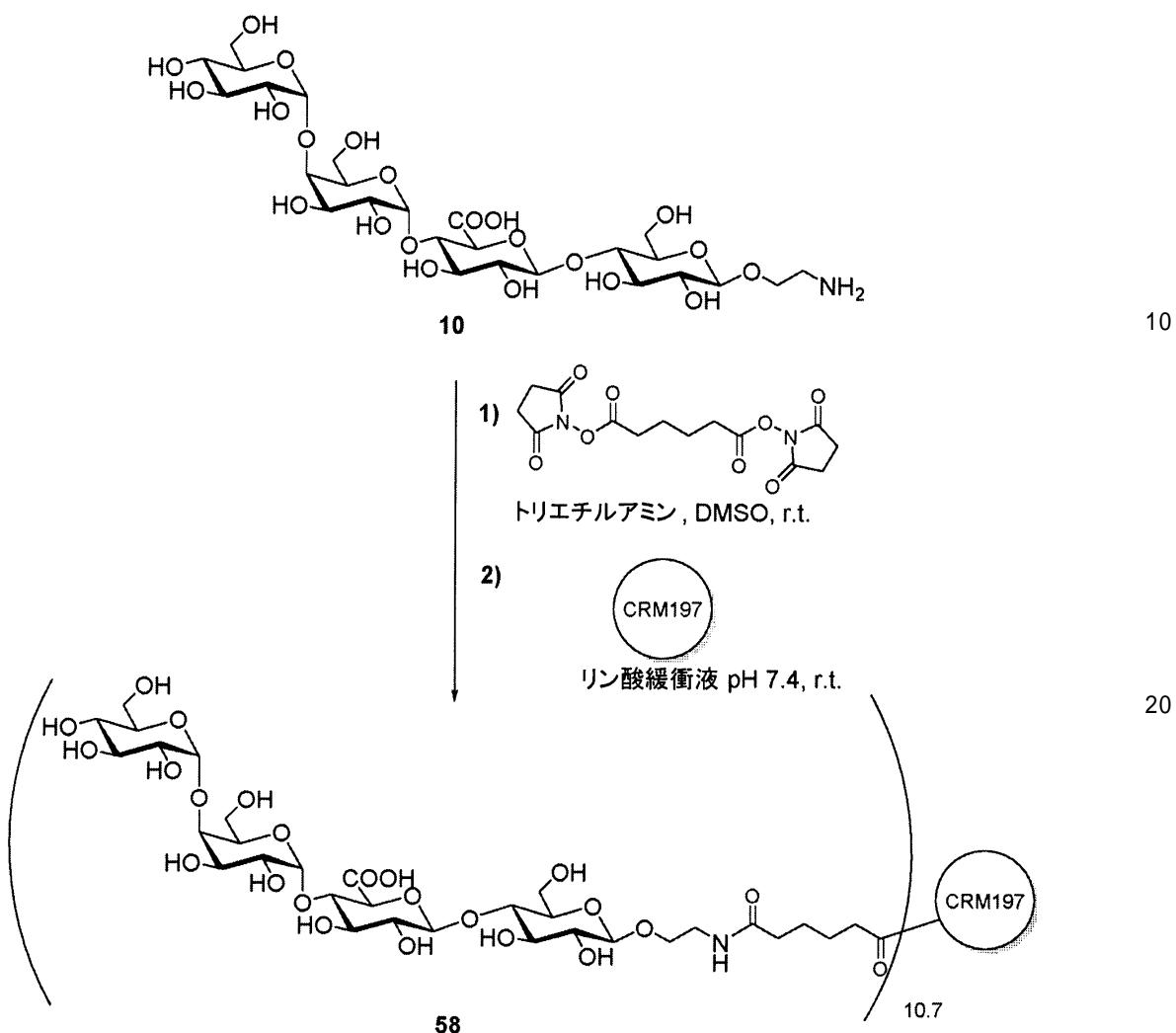
20

30

40

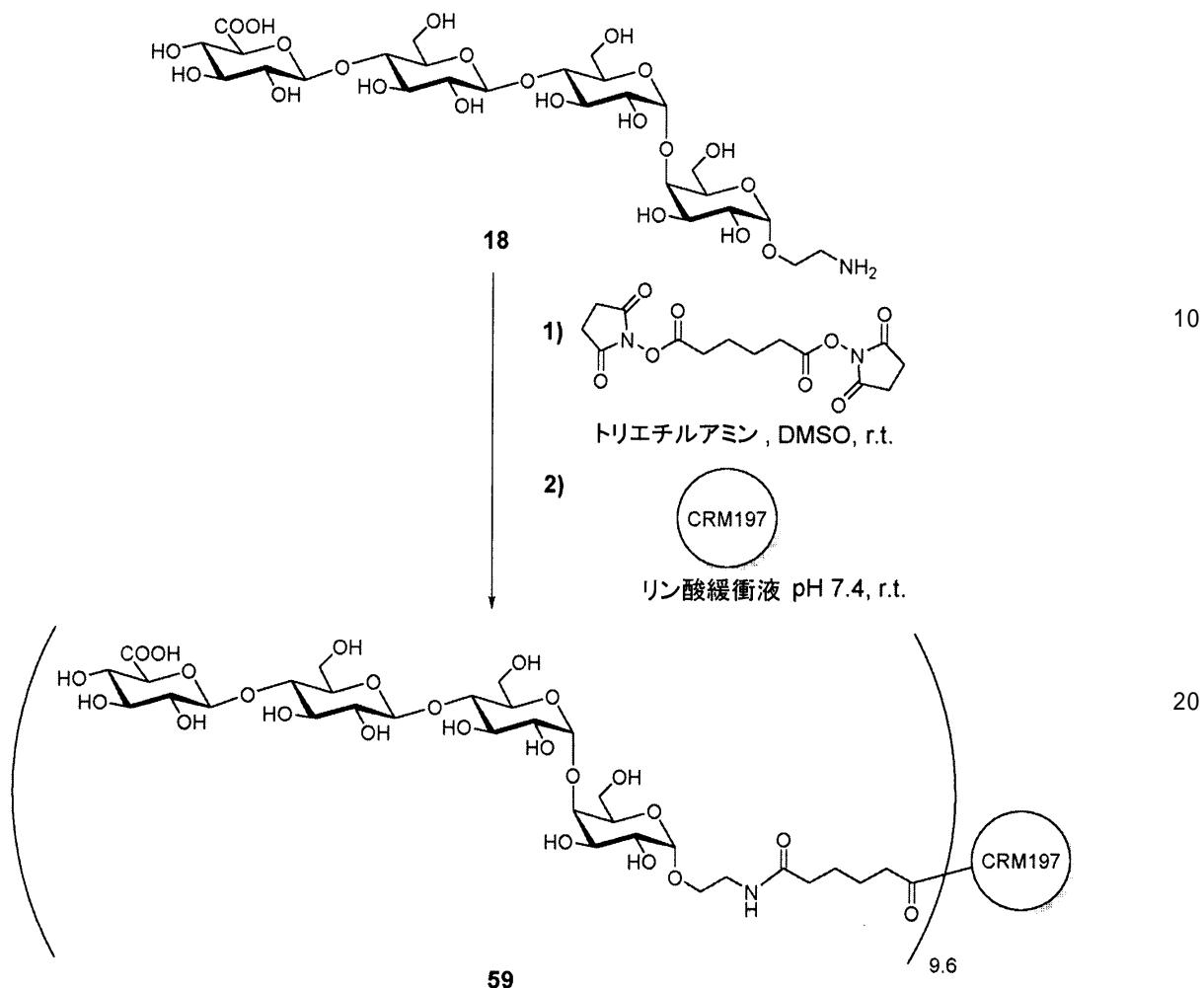
50

【化117】



【0512】

【化118】



【0513】

アジピン酸ジサクシンイミジル (10 mg, 29 μ mol) とトリエチルアミン (10 μ L, 72 μ mol) を無水DMSO (150 μ L) に入れて攪拌した溶液に、四糖類 10あるいは18 (約2 mg, 2.8 μ mol) を無水DMSO (150 μ L) に加えた懸濁液を加えた。この反応混合物をその温度で、アルゴン雰囲気下で2時間攪拌して、100 mMリン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.4 (Napi, 200 μ L) で処理した。この混合物をクロロホルム (10 mL) で抽出して、遠心分離法 (2分、1800 g、室温) で相分離した。有機相は廃棄して、抽出ステップを2度繰り返した。水相は1.5 mL反応チューブ内で遠心分離され (1分、14500 g、室温)、CRM197 (1 mg, 17.3 nmol) をNapi (1 mL) に加えて攪拌した溶液に加えた。この混合物を室温で16時間攪拌して、遠心フィルター (10 kDa MWCO, ミリポア社, ダルムシユタット、ドイツ) を用いて透析乾燥した。この接合体をMALDI-MSで解析した。

接合体58: 約67000 m/z (平均で10.7個の四糖分子の混和)

接合体59: 約66000 m/z (平均で9.6個の四糖分子の混和)

実施例2-4: 免疫化手順

マウス (生後6-8週間の雌Balb/cマウス、Charles River) を、フロイントアジュバント (シグマアルドリッヂ社、セントルイス、米国)、Alum (ミヨウバン) (Alhydrogel, Benntag) を用いるか、あるいはアジュバントを用いないで、100 μ Lの総体積で、0、14、28日目に、実施例2-3で得られたCRM-Sp8接合体 (4 μ g合成グリカンに相当) を用いて免疫化した。免疫応答をグリカン・アレイで観察した。接合体59は、フロイントアジュバントを用いて調製された上記接合体を受領したマウスに、オリゴ糖特有の免疫応答を誘発した。重要なことは

30

40

50

、天然の S p 8 多糖類に対して、マウス # 1 1 6 0 からの免疫血清に強い免疫応答が観察されたことである（図 5 参照）。

【 0 5 1 4 】

実施例 2 - 5 : モノクローナル抗体の発生

B M - C on d i med H 1 (R o c h e 社、ペンツベルク、ドイツ)を用いて、製造者の指示に従ってモノクローナル抗体を作成した。融合した後、限定希釈を行い、続いて 2 回のサブクローニングを行って、単一クローニングを発生させた。グリカン・アレイと E L I S A によって、抗体生成を観察した。3 3 個のクローニングが最終的に分離され、これらは四糖類 1 9 と S p 8 天然多糖類の両方を識別する m A b s を生成した。

【 0 5 1 5 】

クローニング 1 H 8 及び 1 F 1 を血清を含まない媒体内で増殖させた。M A b 1 H 8 は、タンパク質 G 抗体洗浄キット (P ro c h e m 社、リトルトン、米国) を用いて、細胞培養上澄み液から分離された（図 6 参照）。M a b 1 F 1 は、H i L o a d 1 6 / 6 0 S uper d e x カラム (G E H e a l t h c a r e 社、リトルチャルフオント、英国) を用いた P S B を緩衝液として用いるゲル濾過クロマトグラフィによって精製・分離された。

10

【 0 5 1 6 】

実施例 2 - 6 : 酵素結合免疫吸収分析 (E L I S A)

高結合ポリブチレン 9 6 ウエル・プレート (C o r n i n g 社、コーニング、米国) を用いて E L I S A を行った。濃度 1 0 μ g / m L の濃度で P B S に入れた天然 S p 8 多糖類 (S S I D i a g n o s t i c a 社、コペンハーゲン) を用いて、4 の温度で 2 0 時間、プレートをコーティングした。仔ウシ血清 1 0 % (v / v) を P B S に入れたもので 3 7 の温度で 1 時間プロッキングを行い、0 . 1 (v / v) T w e e n 2 0 (P B S - T) を含む P S B で洗浄した。抗 S p 8 m A b s (5 0 μ L) の細胞培養上澄み液を用いた。プレートを 3 7 の温度で 1 時間培養して、P B S - T で 3 回洗浄した後、セイヨウウサギ・ペロキシダーゼ (H R P) でラベルした二次抗体 (ヤギ抗マウス I g G H R P 接合体、d i a n o v a 社、ハンブルク、ドイツ) で処理した。プレートを P B S - T で 3 回洗浄して、製造者の指示に従って、T M B 基質 (B D B i o s c i e n c e s 社、サンノゼ、米国) を用いて、H R P 活性を測定した。E L I S A で検査したところ、# 1 1 6 0 から発生したモノクローナル抗体は、合成糖 1 9 と天然 S p d 多糖類の両方を個別的に識別した。

20

【 0 5 1 7 】

実施例 2 - 7 : 表面プラズモン共鳴

B i a c o r e T 1 0 0 測定器 (G E H e a l t h c a r e 社) で、表面プラズモン共鳴を行った。不導体化に関して、マウス抗体捕捉キットとアミン結合キット (A m i n e C o u p l i n g キット) (G E H e a l t h c a r e 社) を用いて分析を行った。捕捉抗体の約 1 0 0 0 0 応答単位が不導体化された。市場で入手できるマウス I g G (c a t . N o 0 2 6 5 0 2 , I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , U S) を比較セル内でダミーとして固定した（約 1 0 0 0 0 R U ）。毎回の実験の前に、5 0 μ g / m L の m A b 濃縮物を用いて、約 8 0 0 R U の m A b 1 H 8 を捕捉した。毎回の実験操作は P B S を実験用緩衝液として用い、流速を 3 0 μ L として、結合時間を 6 0 秒、分離時間を 1 2 0 時間にそれぞれ設定して行った。多糖類は 1 0 μ g / m L の濃度で、そして糖類 1 8 は P B S に 2 0 μ M で溶解して用いた。モノクローナル抗体 m A b 1 H 8 は合成糖類 1 8 と天然の S p 8 多糖類の両方をそれぞれ個別的に識別した（図 7 参照）。

30

【 0 5 1 8 】

実施例 2 - 8 : 紫外線不活性化肺炎連射球菌の免疫蛍光

肺炎連鎖球菌血清タイプ 8 (A T C C 6 3 0 8) あるいは血清タイプ 1 (A T C C 6 3 0 1) (約 4 \times 1 0 8 C f u / m L) を、P B S 内で室温で 1 0 分間 2 5 4 n m の照射で不活性化した。細胞を遠心分離で集めて、P B S で一度洗浄した後、0 . 5 % (w /

40

50

v) イースト抽出物と20% (v/v) グリセロールを含んでいる Todd Hewitt Broth 内で凍結させた。免疫蛍光を調べるために、バクテリア (8×10^8 cfu ST8、あるいは 4×10^8 cfu ST1) を解凍させて、遠心分離 (16800g、室温で15分間) で集めて、緩衝液A (50mM NaHCO₃, 100mM NaCl, pH: 7.5) で1度洗浄した。細胞を緩衝液A (1mL) 内に再懸濁して、フルオレセイン イソチオシアネート (FITC, Sigma-Adrich) 溶液 (DMSO内で10mg/mL) で処理して、最終濃度を0.1mg/mLとした。バクテリアを暗闇で37℃の温度で1時間ラベルして、遠心分離で採取し、0.25% (w/v) BSAをPBS (1mL) に溶解したもので2度洗浄した。ラベリングは、LSM700共焦点レーザー・スカニング顕微鏡 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, イエナ, ドイツ) を備えた Axio Imager.M2システムを用いて、モニターした。1% (w/v) でPBS (ST8に対して1mL, ST1に対して0.5mL) にBSAを溶解した溶液に細胞を懸濁させ、懸濁液を2つの画分に分けた。これらの懸濁液をアイソタイプ・コントロールとして *Yersinia pestis* リポ多糖類コア三糖類に対するmAb 1H8あるいはmAb 1E12 (IgG1) を用いて処理し、最終mAb濃度を10μg/mLとした。バクテリアを攪拌しながら暗闇で4℃の温度で16時間培養して、1% (w/v) BSAをPBS (0.5mL) に入れたもので洗浄した。これらの細胞をヤギ抗マウスIgG-Alexa635接合体 (PBS内に200μLの1% (w/v) で、1:100に希釈したもの、Invitrogen) の溶液内で懸濁して、暗闇で、室温下1.5時間培養して、PSB内に1% (w/v) で入れたBSAとPBS (各0.5mL) で洗浄した。蛍光的にラベルされたバクテリアを蛍光顕微鏡で視覚化して、Zen 2011ソフトウェア (Carl Zeiss Microscopy GmbH) を用いて画像を処理した。図8に示されているように、接合体59による免疫化は天然のSP-8多糖類とST8バクテリアを識別する抗体の形成を誘発する。

【0519】

実施例2-9: mAbs 1H8と1F1の肺炎連鎖球菌血清タイプ8バクテリアに対するフロー・サイトメトリー (細胞数測定) によるアセスメント

肺炎連鎖球菌血清タイプ8 (ATCC 6308)、あるいは血清タイプ1 (ATCC 6301) あるいは血清タイプ3 (PN36, NCTC7978) を、UV不活性化し、FITCでラベルして、蛍光性二次抗体 (抗マウスIgG-Alexa635接合体あるいは抗マウスIgM-Alexa680接合体、Invitrogen) で前記の通り処理した (実施例2-8参照)。フロー・サイトメトリーは、FACSCantoIIフロー・サイトメーター (BD Pharmingen社, ハイデルベルク, ドイツ) を用いて行われ、FlowJoソフトウェア (Tree Star Inc., アッシュランド, オレゴン, 米国) を用いて分析が行われた。両方のモノクローナル抗体IH8及び1F1は肺炎連鎖球菌血清タイプ8と結合したが、肺炎連鎖球菌血清タイプ1あるいは3とは結合しなかった (図9参照)。モノクローナル抗体と肺炎連鎖球菌血清タイプ8との相互作用は特殊なものであるが、それはアイソタイプ・コントロール抗体により、あるいは肺炎連鎖球菌血清タイプ1あるいは3に対して結合が観察されないからである。

【0520】

実施例2-10: オプソニン化貪食作用による殺菌アッセイ

オプソニン化貪食作用による殺菌アッセイは、Romero-Steiner, などによる, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 1997, 4. に述べられているように行った。簡単に言うと、HL-60細胞を、報告されている手順に従って (Romero-Steiner等, 1997)、N,N-ジメチルホルムアミドを用いて一週間差別化し、OPKA緩衝液 (Hank緩衝液、0.1% (w/v) ゼラチン含有) で2回洗浄し、使用の直前に同じ緩衝液内で 10^7 細胞数/mLに希釈した。バクテリアは成長培地 (Todd-Hewitt broth + 0.5% (w/v) イースト抽出物) 内で、5% CO₂下、37℃で対数期 (OD 0.2-0.3) まで成長させ、冷凍媒

体 (15% (v/v) グリセロールを含む成長培地) 内で、約 10^6 細胞 / mL の密度まで希釈し、-80°の温度で、0.5 mL 画分内で凍結させた。バクテリアはOPKA緩衝液で希釈して、96ウェル・プレートに分画した (各 $20\mu\text{L}$ に1000個の細胞)。バクテリア懸濁物を適切な抗体あるいは抗血清 (1:4) 希釈液で処理して、37°の温度で、15分間培養した。補足物ソース (生まれたばかりのウサギ補足物、Cedar Lane、 $10\mu\text{L}$) と変異HL-60細胞懸濁物 ($40\mu\text{L}$ 、食菌細胞/バクテリア比率400:1) を加えて、それらの懸濁物を振動 (220 rpm) を加えながら、37°の温度で45分間培養した。オプソニン化貪食作用は3回行われた。各ウェルの内容物の10%をColumbia Agarプレートに入れて、37°/5% CO₂の条件下でコロニー数をカウントした。コントロール (比較対象) ウェルには抗体や補足物ソースを用いなかった。

【0521】

モノクローナル抗体1H8は合成肺炎連鎖球菌血清タイプ8に対して四糖類18を発生増殖させたが、アイソタイプ・コントロールmAbではそうした現象は起きず、補助物と変異HL-60細胞の存在下では、テストされたすべての濃度 (ウサギ肺炎連鎖球菌タイプ8タイプ血清 (1:4希釈) とヒト抗血清007sp (1:4希釈)) で、コントロール血清と同様のオプソニン化貪食作用による殺菌能力を示した (図10参照)。

【0522】

実施例2-11: モノクローナル抗体mAbs 1H8及び1F1を用いたグリカン・アレイ分析

化合物19, 49、90、60、62、55及び57を含めてSP8莢膜多糖類が存在している場合と不在の場合の両方で、実施例2-1に示した様に合成されたマイクロアレイ・スライドを培養して、結合実験を行った。

【0523】

図11に示すように、三糖類62、四糖類19、四糖類60、五糖類55及び六糖類57はmAbs 1H8と1F1によって同様の強度で認識されたが、より小さな構造49と90は識別されなかった。

【0524】

図11に示すように、五糖類55と六糖類57に対するmAbs 1H8及び1F1の結合は、天然のSP8多糖類による抑制でなくなり、これらの糖類が重なっているエピトープを天然の多糖類と共に内包していることを示している。

【0525】

実施例2-12: マイクロアレイによる本発明の糖類に対するmAb 28H11の結合のアセスメント

天然SP8多糖類 (Yano and Pirofski (2011), Clin, Vaccine Immunol, 18(1), 59-66) に対して発生させたマウス・モノクローナル抗体28H11 (IgM) を結合のために、異なる希釈度で、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ の肺炎連鎖球菌タイプ8CPSを加える場合と加えない場合で用いたことを除けば、上に述べた様に (実施例2-1及び2-2参照) 作製した。検出用に二次抗体として、口バ抗マウスIgM Alexa Fluor (登録商標) 594接合体 (dianova社, ハンブルク, ドイツ) を用いた。

【0526】

天然の肺炎連鎖球菌タイプ8CPSに対して発生させたマウスIgMであるMab 28H11は、その性質が良く理解されており、種々の状況で生きている肺炎連鎖球菌血清タイプ8による感染からマウスの感染を防ぐ (Yano and Pirofski (2011), Clin, Vaccine Immunol, 18(1), 59-66)。グリカン・マイクロアレイ分析を行ったところ、mAb 28H11の糖類19との強力な相互作用が明らかになり、これは、天然の肺炎連鎖球菌タイプ8CPSによる最大 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ までの結合のアブレーション (融解) に示されるような肺炎連鎖球菌タイプ8固有の現象である (図12参照)。

10

20

30

40

50

【0527】

実施例2-13：アジピン酸ビス(4-ニトロフェニル)を用いたCRM₁₉₇へのオリゴ糖類の接合

オリゴ糖(量は以下に記す通り。通常0.2 μmol)を無水DMSOと無水ピリジン(100-200 μL)の1:3(v/v)混合物に加えて攪拌した溶液に、アジピン酸ビス(4-ニトロフェニル)(糖分の量に対して12当量、通常2.4 μmol)とトリエチルアミン(10 μL)を加えた。この反応混合物をアルゴン雰囲気下で室温で2時間攪拌した。この混合物をショック凍結し、凍結乾燥した。残渣をクロロフォルム(4×0.5 mL)とジクロロメタン(4×0.5 mL)と共に粉碎し、溶媒としてDMSOを用いて新しい反応チューブに移し、再度凍結乾燥を行った。CRM₁₉₇(3 mg、52 nmol)は、遠心フィルター(10 kDa MWCO、Millipore社、ダムシュタット、ドイツ)を用いて0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液pH 8.0に対して2回透析し、約300 μLに濃縮し、活性化されたオリゴ糖に加えた。この混合物を室温で16時間攪拌して、水に対して4回透析を行った(上記参照)。解析のために1つの画分を取り出して、その混合物をリン酸緩衝生理食塩水に対して3回透析を行った。この複合糖質をMALDI-TOF MS(図13参照)、SDS-PAGE及びWestern Blotで解析した。

【0528】

使用オリゴ糖類の正確な量

四糖類18: 2.6 μmol (1.9 mg)

20

四糖類60: 2.1 μmol (1.5 mg)

六糖類57: 1.9 μmol (2.0 mg)

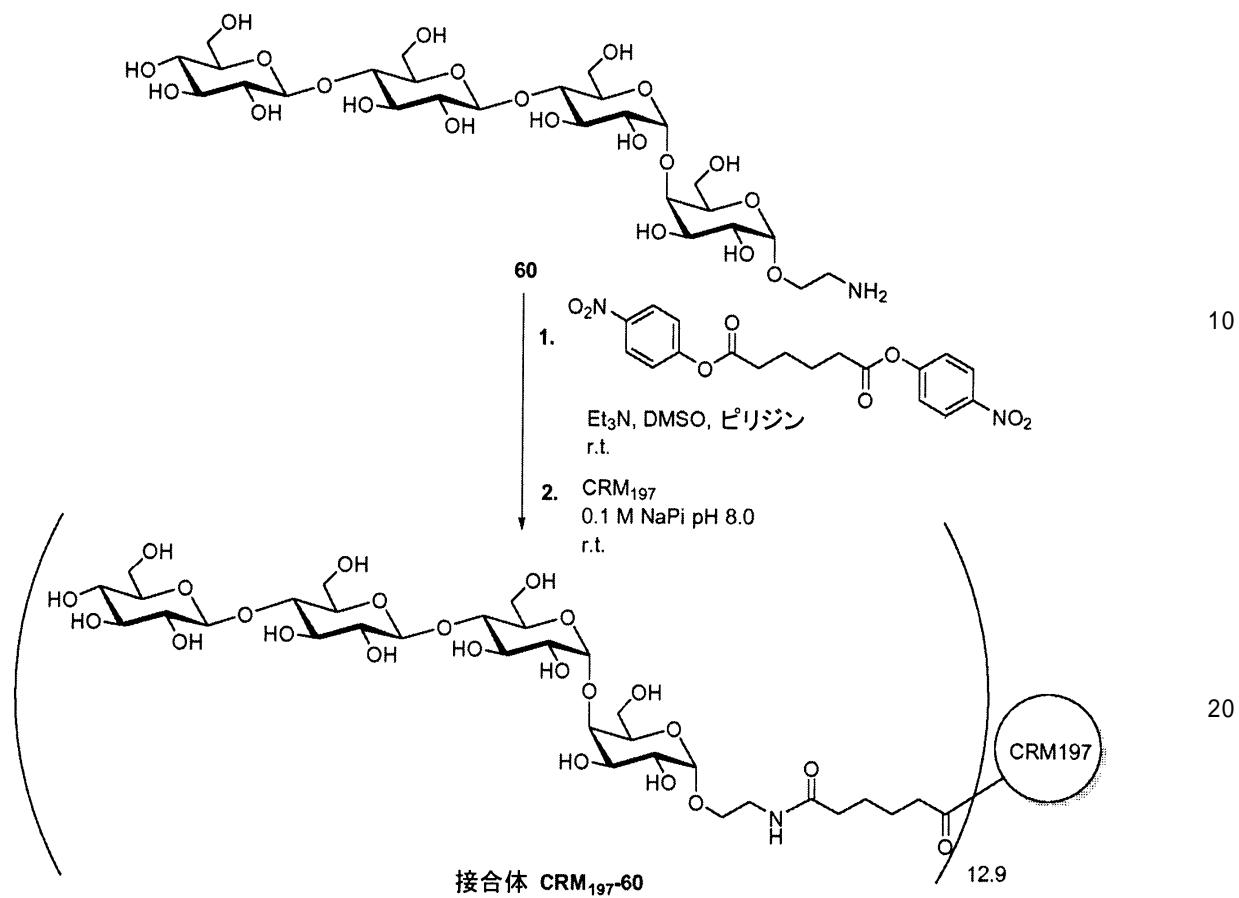
接合体CRM₁₉₇-18: 約65503 m/z (平均で8.8個の四糖類分子の混和)

接合体CRM₁₉₇-60: 約68281 m/z (平均で12.9個の四糖類分子の混和)

接合体CRM₁₉₇-57: 約63535 m/z (平均で4.6個の六糖類分子の混和)

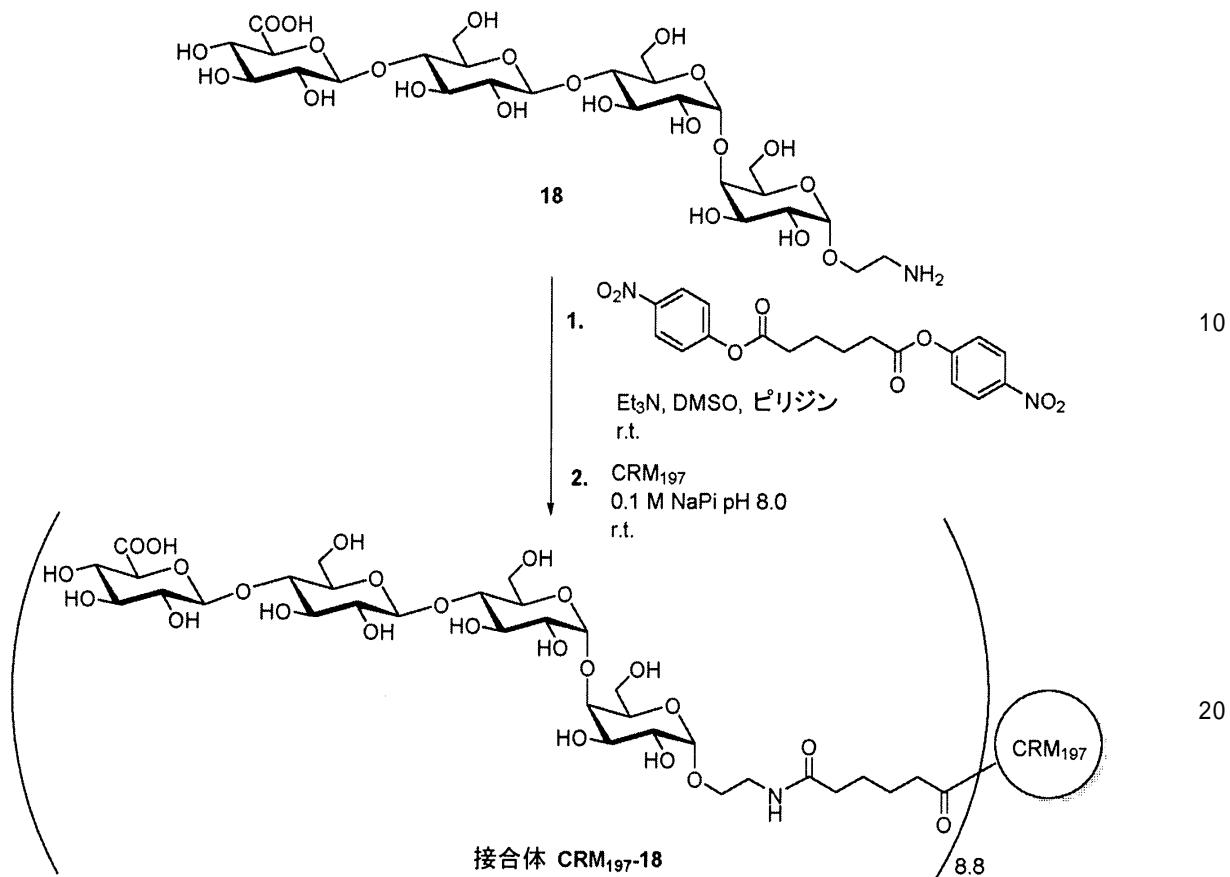
【0529】

【化119】



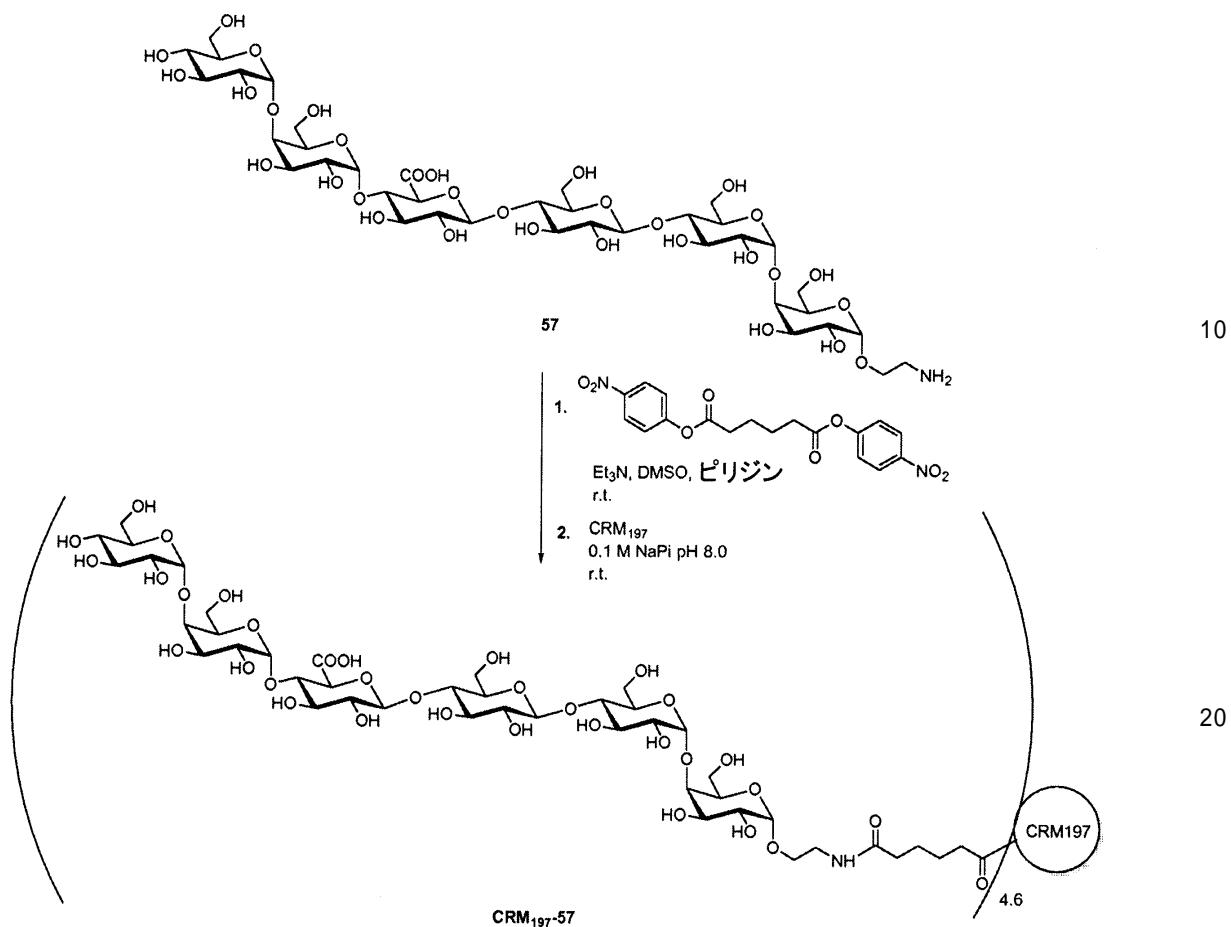
【0530】

【化120】



【0531】

【化121】



【0532】

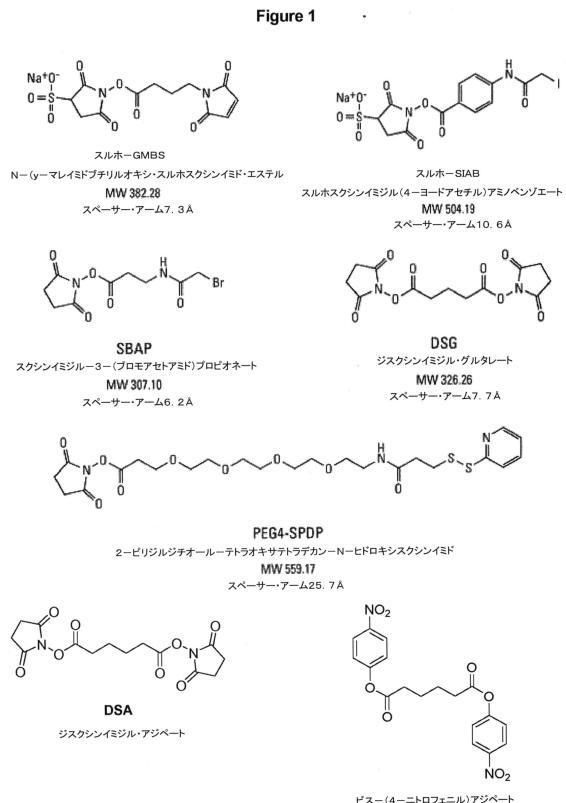
実施例2-14：ウサギにおける実施例2-13の接合体に対する免疫応答の評価

ウサギ（グループあたりn=3）を0日目と14日目に複合糖質CRM197-18、CRM197-60あるいはCRM197-57（1回の投与量：10μgグリカン）あるいはCRM₁₉₇（100μg）を用いて複数箇所に皮下注射で免疫化を行った。血清は0、14、21日に採取された。免疫化検査の結果は図25に要約して示す。

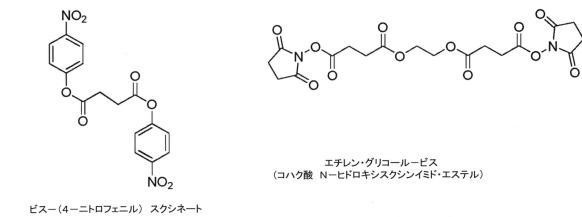
【0533】

接合体で免疫化されたすべてのウサギは、肺炎連鎖球菌タイプ8 CPS関連オリゴ糖及び肺炎連鎖球菌タイプ8 CPSに対して著しい免疫応答を示した。このように、全ての接合体はウサギにおける肺炎連鎖球菌に対する免疫性を誘発した。

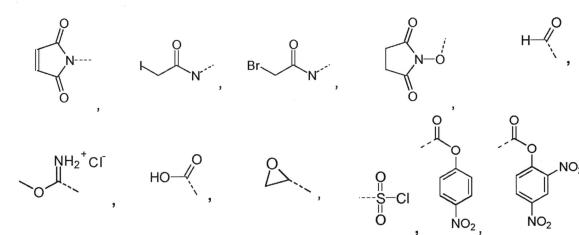
【 1 A 】



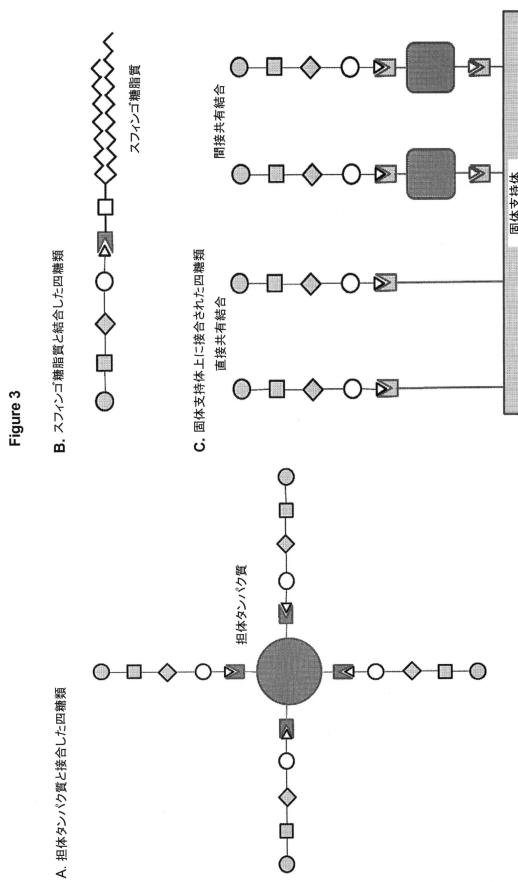
【 义 1 B 】



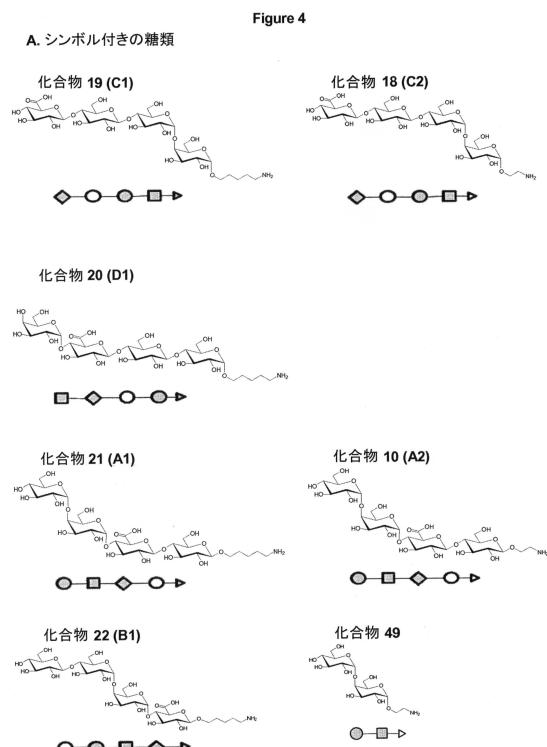
【圖 2】



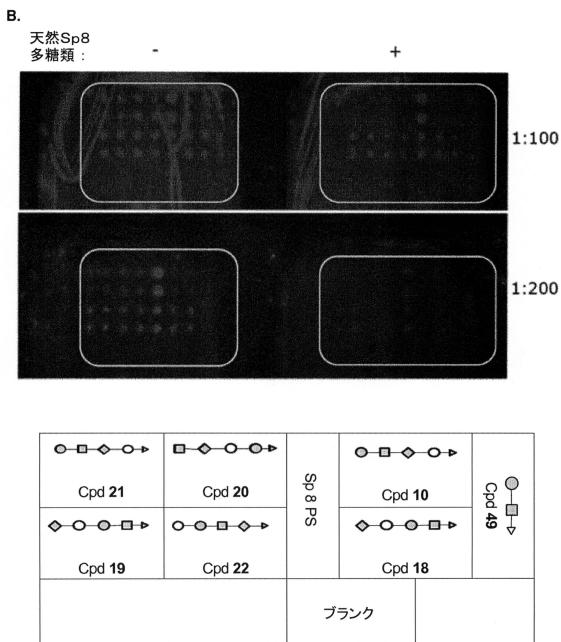
(3)



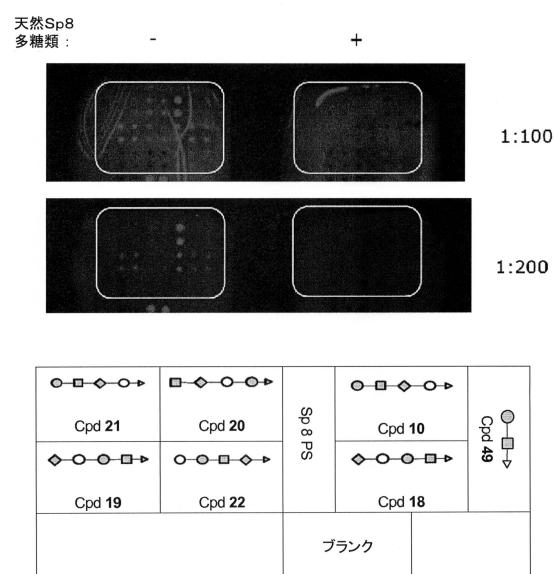
【 4 A 】



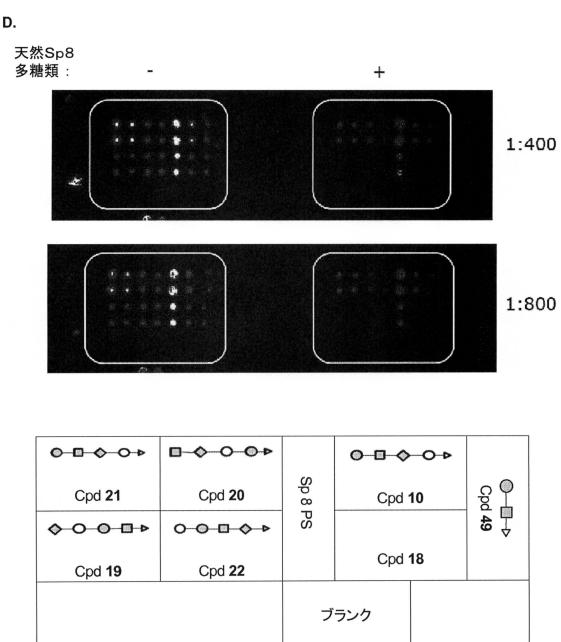
【図4 B】



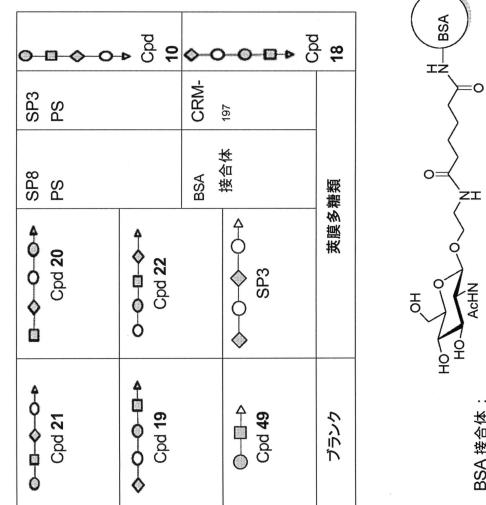
【図4 C】



【図4 D】

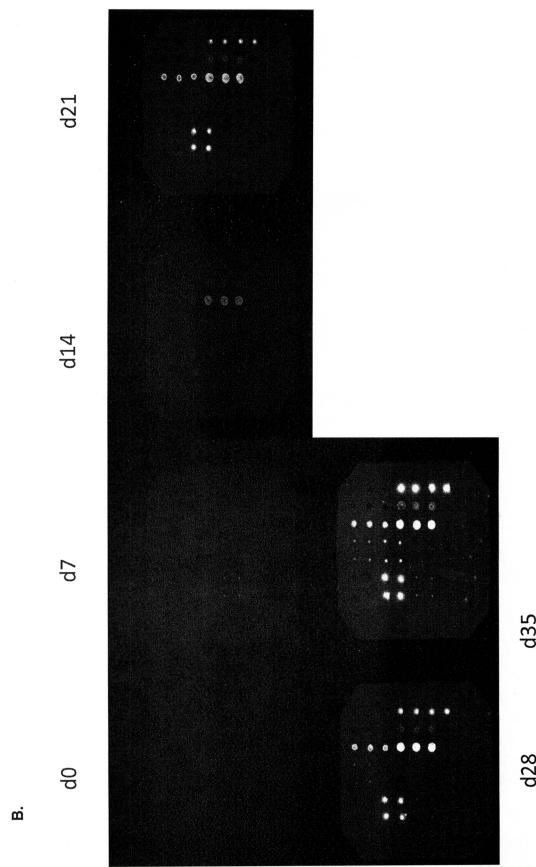


【図5 A】

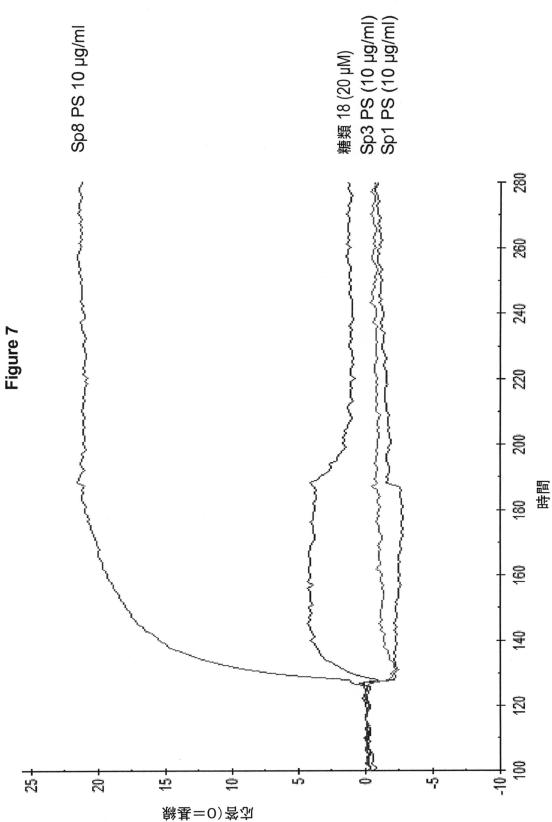


A.

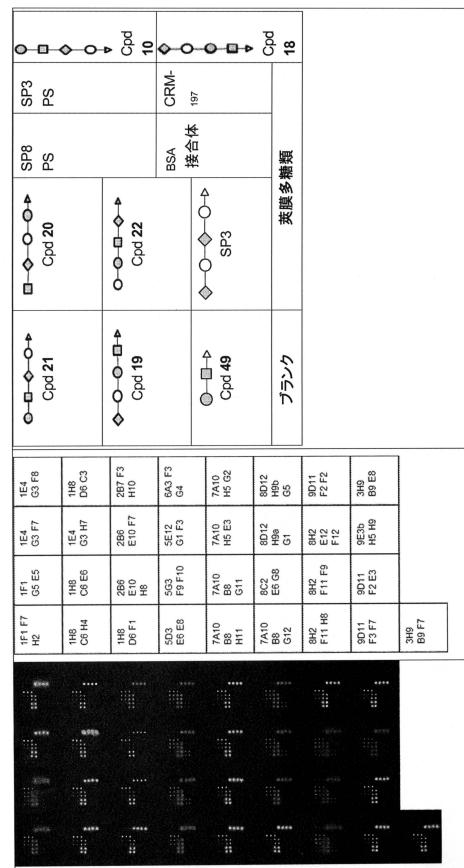
【図5B】



【図7】

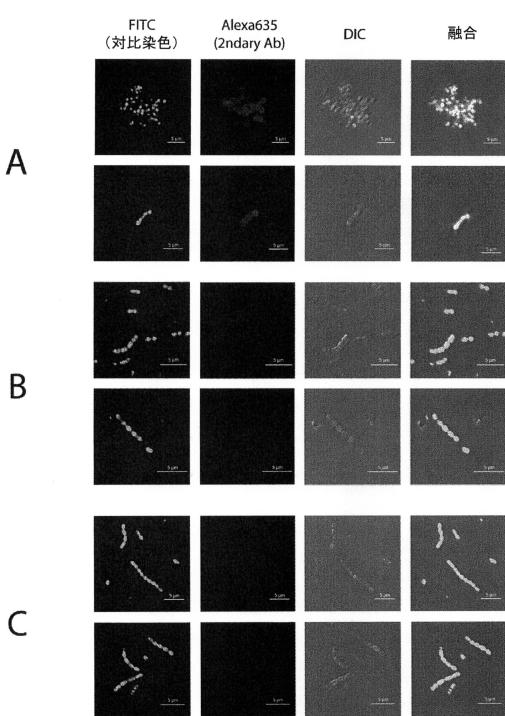


【 四 6 】



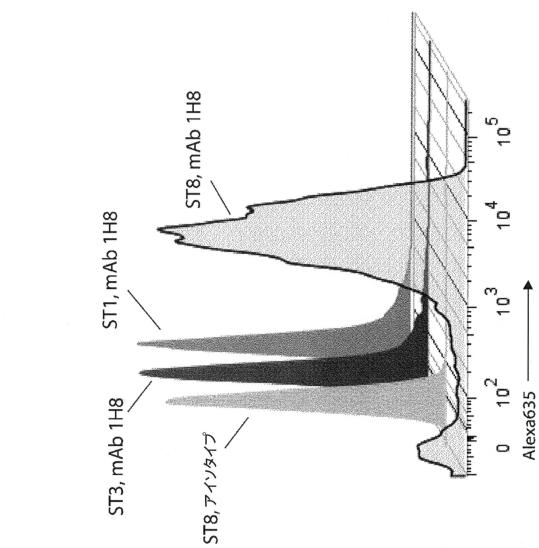
【図8】

Figure 8



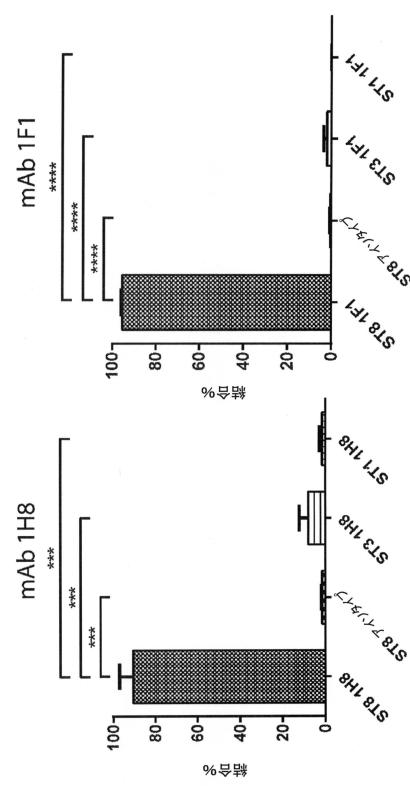
A:肺炎連鎖球菌ST8: mAb 1H8
B:肺炎連鎖球菌ST8: mAb アイソタイプ・コントロール(抗ペスト菌 LPSコア)
C:肺炎連鎖球菌ST1: mAb 1H8

【図 9 A】



A

【図 9 B】



B

【図 10】

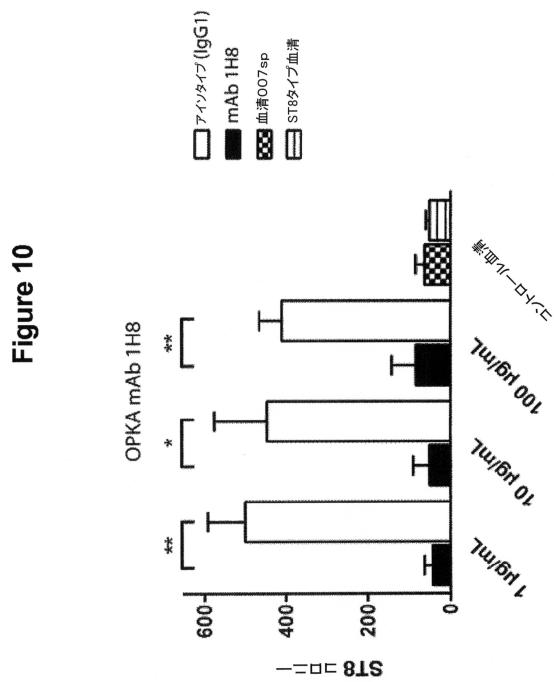


Figure 10

【図 11 A】

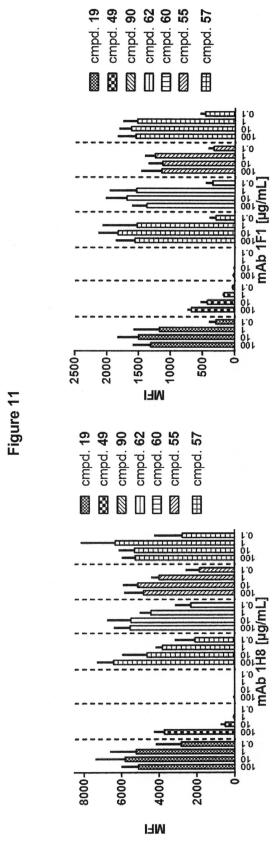
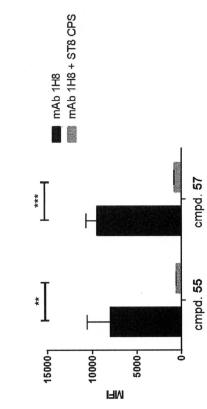
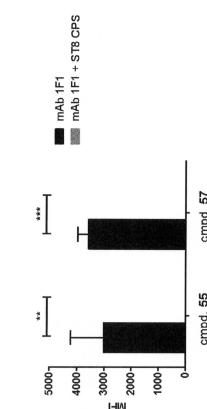


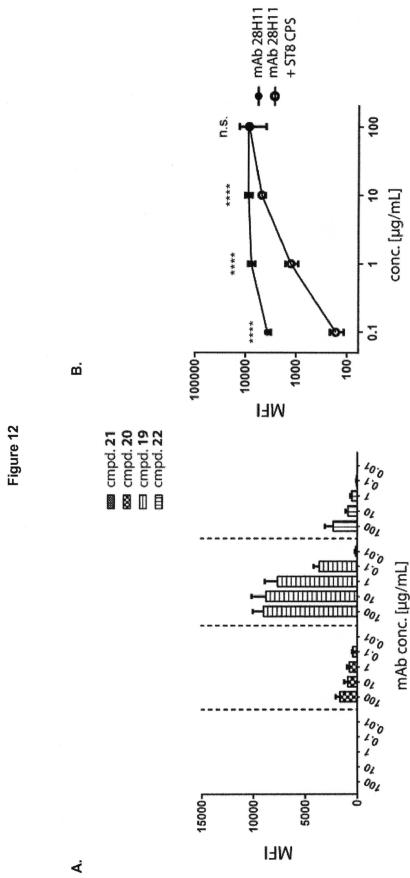
Figure 11

A.

【図 1 1 B】

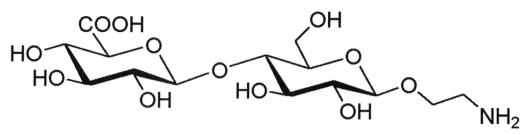


【図 1 2】



【図 1 1 C】

Figure 11 continued



Cmpd 90

【図 1 3】

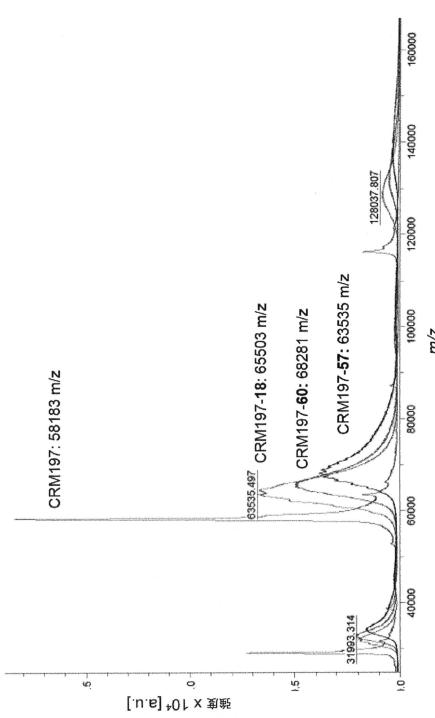
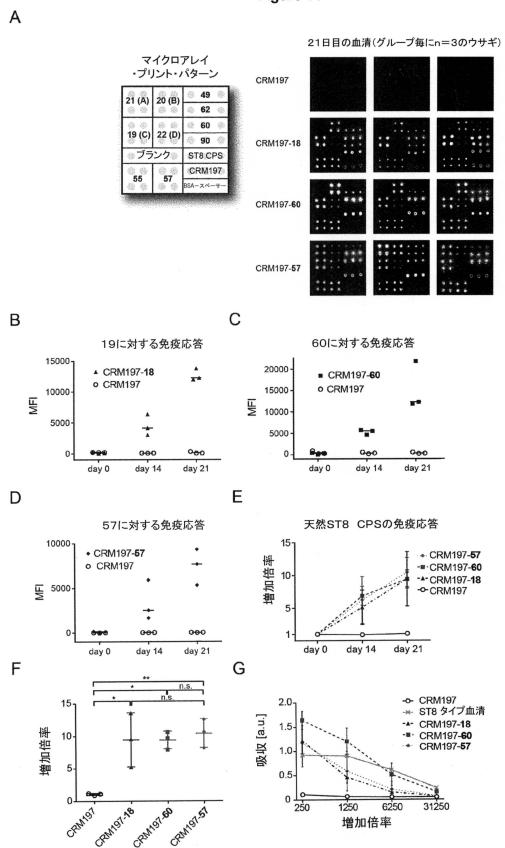


Figure 13

【図14】

Figure 14



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P	11/00	(2006.01) A 6 1 P 11/00
A 6 1 P	25/00	(2006.01) A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	27/16	(2006.01) A 6 1 P 27/16
A 6 1 P	11/02	(2006.01) A 6 1 P 11/02
A 6 1 P	19/02	(2006.01) A 6 1 P 19/02
A 6 1 P	27/14	(2006.01) A 6 1 P 27/14
A 6 1 K	47/61	(2017.01) A 6 1 K 47/61

(72)発明者 アニッシュ チャックムカル
オランダ国 エヌエル-2592エーアール デン ハーグ フラスカンプ594

(72)発明者 シューマン ベンジャミン
ドイツ国 10405 ベルリン コルヴィッツシュトラーセ 12

(72)発明者 パラメシュワラッパ シャラヴァティ ガドホールイー
ドイツ国 12203 ベルリン ホルテンジエンシュトラーセ 66

(72)発明者 ハン ヒョン シク
アメリカ合衆国 バージニア州 22903 シャーロットビル ファリッシュ サークル 45
4 アパートメント ビ-24

(72)発明者 ガバイダン サブラマニアン
インド国 600100 タミル ナードゥ チェンナイ メダバッカム バダックカバトゥ メ
イン ロード サーベンガダム ナガ- 4ス ストリート ニュー ナンバー 1/999

審査官 西澤 龍彦

(56)参考文献 特表平11-506110 (JP, A)
特表2010-531331 (JP, A)
国際公開第2013/178236 (WO, A1)
J. K. N. JONES AND M. B. PERRY, The Structure of the Type VIII Pneumococcus Specific Polysaccharide, Journal of the American Chemical Society, 1957年, Vol.79 No.11, pp. 2787-2793

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 H
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)