

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-502276

(P2023-502276A)

(43)公表日 令和5年1月23日(2023.1.23)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Q 4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 K 39/385 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/385	
	A 6 1 P 43/00	1 2 1
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全39頁)		

(21)出願番号	特願2022-529715(P2022-529715)	(71)出願人	522172759
(86)(22)出願日	令和2年11月20日(2020.11.20)		アロペックス・インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和4年7月19日(2022.7.19)		A l o p e x x , I n c .
(86)国際出願番号	PCT/US2020/061594		アメリカ合衆国02138マサチューセ
(87)国際公開番号	WO2021/102320		ッツ州ケンブリッジ、エールワイフ・ブ
(87)国際公開日	令和3年5月27日(2021.5.27)		ルック・パークウェイ186、ナンバー
(31)優先権主張番号	62/994,130		1068
(32)優先日	令和2年3月24日(2020.3.24)	(74)代理人	100145403
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 山尾 憲人
(31)優先権主張番号	62/939,331	(74)代理人	100156144
(32)優先日	令和1年11月22日(2019.11.22)		弁理士 落合 康
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	ワイアンド, マイケル
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		アメリカ合衆国02111マサチューセ
	最終頁に続く		ッツ州ボストン、マールボロー・ストリ
			ート124
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 P N A G を含む微生物に対する持続的治療を提供するための方法

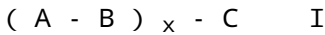
(57)【要約】

オリゴ糖 - (1 6) - グルコサミン基を含む抗菌ワクチンを開示する。

【特許請求の範囲】

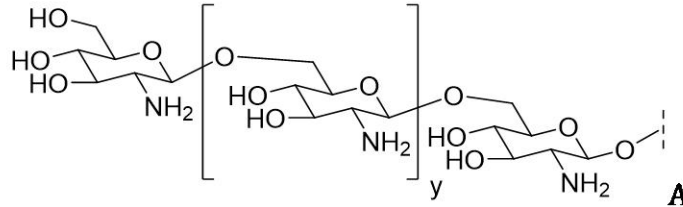
【請求項 1】

微生物感染に対する持続的防御を提供する方法であって、治療有効量のモノクローナル抗体 F - 598 および式 I :



(式中、A は 3 ~ 12 個の (1-6)-グルコサミン (炭水化物リガンド) 基またはそれらの混合物を含み、前記ワクチンの前記オリゴ糖部分は以下の式 A :

【化 1】



10

で表され、

B はリンカーであり ;

ここで、A は上記で定義されたとおりであり、C は破傷風トキソイドであり ;

x は約 30 から約 39 までの整数であり ;

y は、1 から 10 までの整数である)

のワクチンを前記患者に投与することを含む、方法。

20

【請求項 2】

式 I の前記ワクチンが、F - 598 と同時に投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

式 I の前記ワクチンが、F - 598 を投与してから約 6 時間以内に投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

式 I の前記ワクチンが、F - 598 を投与してから約 4 時間以内に投与される、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 5】

式 I の前記ワクチンが、F - 598 を投与してから約 2 時間以内に投与される、請求項 1 に記載の方法。

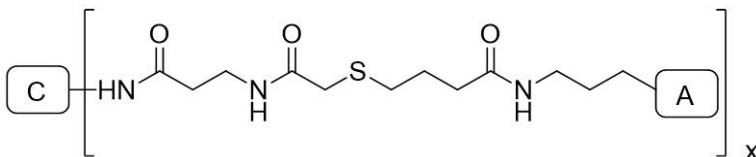
【請求項 6】

F - 598 が、全処置期間中に同時投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記リンカーが、以下の式 :

【化 2】



40

(式中、A および C は前記リンカーに含まれない)

で表される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

F - 598 が、式 I の前記ワクチンによって、前記患者を効果的に処置するのに十分な抗体力価が生成される点まで同時投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

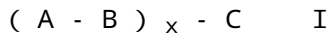
細胞壁にオリゴ糖 (1-6)-グルコサミン基を含む微生物から患者に有効な免疫

50

を提供するための方法であって、前記患者に、請求項 7 に記載のワクチンを投与することを含む、方法。

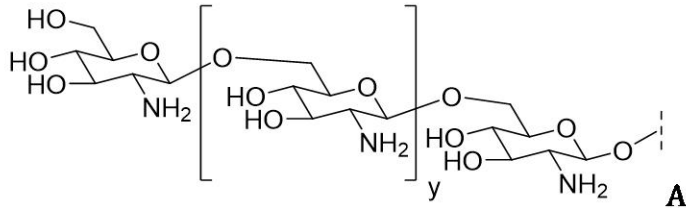
【請求項 10】

バイオフィルム形成を阻害する方法であって、治療有効量のモノクローナル抗体 F - 598 および式 I :



(式中、 A は 3 ~ 12 の (1 6) - グルコサミン (炭水化物リガンド) 基またはそれらの混合物を含み、前記ワクチンの前記オリゴ糖部分は以下の式 A :

【化 3】



10

で表され、

B はリンカーであり ;

ここで、 A は上記で定義されたとおりであり、 C は破傷風トキソイドであり ;

x は約 30 から約 39 までの整数であり ;

y は、 1 から 10 までの整数である)

のワクチンを患者に投与することを含む、方法。

【請求項 11】

式 I の前記ワクチンが、 F - 598 と同時に投与される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

式 I の前記ワクチンが、 F - 598 を投与してから約 6 時間以内に投与される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

式 I の前記ワクチンが、 F - 598 を投与してから約 4 時間以内に投与される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

式 I の前記ワクチンが、 F - 598 を投与してから約 2 時間以内に投与される、請求項 10 に記載の方法。

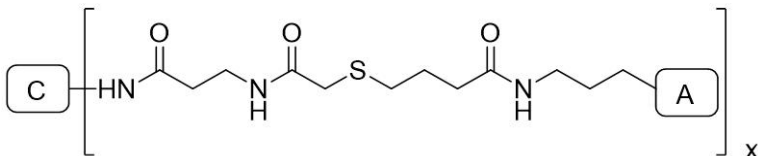
【請求項 15】

F - 598 が全処置期間中に同時投与される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 16】

前記リンカーが、以下の式 :

【化 4】



40

(式中、 A および C は前記リンカーに含まれない)

で表される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 17】

F - 598 が、式 I の前記ワクチンによって、前記患者を効果的に処置するのに十分な抗体価が生成される点まで同時投与される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 18】

50

細胞壁にオリゴ糖 - (1 6) - グルコサミン基を含む微生物によって形成されるバイオフィルムに対する有効な防御を提供するための方法であって、前記患者に、請求項 16 に記載のワクチンを投与することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年11月22日出願の米国特許仮出願第62/939,331号、および2020年3月24日出願の同第62/994,130号に対する優先権を主張し、当仮出願は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

本発明は、PNAGを含む微生物に対する持続的治療を提供するための方法に関する。特に、これらの方法は、PNAGワクチンとモノクローナル抗体の組合せを利用する。モノクローナル抗体はPNAGを標的とし、そのような微生物に対する即時の治療を提供するが、一方、PNAGワクチンは内因性免疫応答を生成し、それが有効になると、ワクチンによって生成される免疫応答が、抗体によって提供される治療の追加手段を提供する程度までモノクローナル抗体を補完する。これらの組合せにより、処置開始から持続的治療が可能になる。

【0003】

当技術分野は、オリゴ糖 - (1 6) - グルコサミン基を含む抗菌ワクチンを以前に開示しており、ここで、繰り返しグルコサミン単位の数は、1から最大300までの範囲である。そのような例の1つは、米国特許仮出願第62/892,400号に提供されており、これは、通常の特許出願への転換を申請中であり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0004】

これまでに生成されたデータは、これらのワクチンが、細胞壁にそのN - アセチルバージョンを含むそのようなオリゴ糖 - (1 6) - グルコサミン構造を含む微生物に対する防御免疫を与えることを示している。しかし、接種後、処置を受けた患者では約4週間以上後に有効な免疫が始まる。この潜伏期間中、患者は微生物感染のリスクがある。このことは、この潜伏期間中に微生物感染をすでに経験しているか、または発症する重大なリスクがある患者にとって特に面倒である。

30

【0005】

微生物感染に対する即時の防御を必要とする患者を処置するために、細胞壁がオリゴ糖N - アセチル - (1 6) - グルコサミン構造を含む微生物を標的とするモノクローナル抗体が開発された。これらのモノクローナル抗体は、そのような微生物に対して有効性を示しており、注射後即時の抗菌防御を提供する。そのようなモノクローナル抗体の1つは、米国特許第7,786,255号に開示されているF - 598であり、この特許は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。その抗体は、PNAGのいくつかのN - アセチルグルコサミン基に結合すると認識されている。このモノクローナル抗体の単回投与によって与えられる有効性は、通常、注射後約4週間程度までの範囲である。

40

【0006】

しかし、即時および長期の免疫防御を必要とする患者、特に微生物感染を経験している患者またはそのような感染のリスクがある患者の処置には問題がある。これらには、高齢患者、火傷患者、未熟児、化学療法または放射線療法を受けている患者、およびその他の関連する状態が含まれる。しかし、主治医がモノクローナル抗体による能動的防御期間中にワクチンを投与した場合、モノクローナル抗体の少なくとも一部がワクチンのオリゴ糖構造と交差反応して、ワクチンとモノクローナル抗体の両方の効果を低下させるかまたは無効にするリスクがあるという懸念がある。

【0007】

したがって、この問題を回避するには、ワクチンを投与する前に、患者がモノクローナ

50

ル抗体の存在に起因する能動免疫をもはや有していないことを確認する必要がある。さらに、ワクチン接種後の有効な免疫の達成には固有の遅延があるため、患者をモノクローナル抗体療法からワクチン接種によって提供される免疫防御に切り替えるには、かなりのインキュベーション期間が必要であり、その場合、患者には感染のリスクがあるか、または感染が、代替の、場合により効果の低い処置方法に委ねられる。ワクチン接種から生じる自然免疫は、モノクローナル抗体によって提供される免疫よりも持続可能であるため、そのような自然免疫の利点は、ワクチン接種に大いに有利となる。

【0008】

したがって、モノクローナル抗体とワクチン接種の両方を使用する場合、患者に持続的免疫防御を提供するための必要性が継続している。

10

【発明の概要】

【0009】

本発明は、モノクローナル抗体 F - 598 が、P N A G 系微生物の処置のために本明細書に開示されるワクチンに対する補完療法として機能することができるという発見に基づいている。したがって、本発明は、オリゴ糖 - (1 6) - グルコサミンワクチンおよび F - 598 モノクローナル抗体の同時投与により、P N A G 系微生物に対する持続的免疫防御を提供するための方法に関する。一態様では、ワクチンは、特定のクラスのテトラ - 、ペンタ - 、およびヘキサ - (1 6) - グルコサミン連結 - 破傷風トキソイドワクチンに関し、これらのワクチンは、微生物感染に対して患者に有効な免疫を提供し、前記微生物は、その細胞壁に P N A G 構造を含む。

20

【0010】

驚くべきことに、これらのワクチンは内因性免疫応答を生成するが、ワクチンのオリゴ糖 - (1 6) - グルコサミン基は F - 598 抗体と感知できるほどには交差反応しない。この驚くべき結果により、ワクチンと抗体の両方の同時投与が可能になる。そのような同時投与によって、臨床医が患者に継続的な相補的免疫防御を提供することがさらに可能になる。いくつかの実施形態では、相補的免疫防御は相乗的である。

【0011】

したがって、一実施形態では、本発明は、微生物感染に対して患者に有効な免疫を提供する - (1 6) - グルコサミンオリゴ糖連結 - 破傷風トキソイドワクチンを含むワクチンを使用することにより、P N A G 微生物に対する持続的免疫防御を提供する方法であって、前記微生物は、その細胞壁に - (1 6) - グルコサミン構造を含む、方法を提供する。一実施形態では、ワクチンに対する抗体は、 - (1 6) - グルコサミン構造に結合する。いくつかの実施形態では、前記ワクチンは、F - 598 モノクローナル抗体と交差反応せず、さらに、前記オリゴ糖は、3 ~ 12 個の - (1 6) - グルコサミン単位を含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、F - 598 に相補的な抗体を生成する。ここで、本明細書に開示されるワクチンは、 - (1 6) - グルコサミン構造に選択的に結合し、F - 598 は、アセチル化 - (1 6) - グルコサミン構造、すなわち、N - アセチルグルコサミンに選択的に結合する。

30

【0012】

一実施形態では、本発明は、細胞壁にオリゴ糖 - (1 6) - グルコサミン構造を含む微生物に対するワクチンを提供し、ここで、前記ワクチンは、式 I :

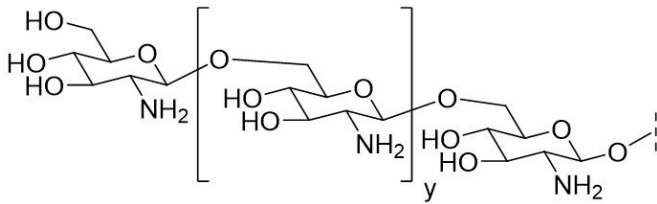
40

(A - B)_x - C I

(式中、A は 3 ~ 12 の - (1 6) - グルコサミン (炭水化物リガンド) 基またはこれらの混合物を含み、ワクチンの前記オリゴ糖部分は、以下の式 :

【0013】

【化 1】

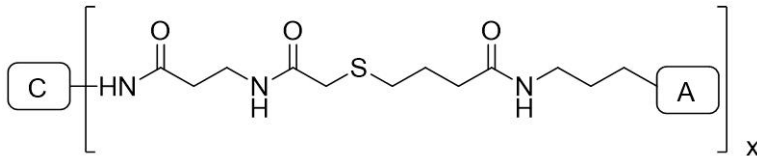


を有し、

B は、式：

【 0 0 1 4 】

【化 2】



であり、

ここで、A は上記で定義されたとおりであり、C は破傷風 (t e t a n u s) トキソイドであり；

x は約 3 0 から約 3 9 までの整数であり；

y は、1 から 1 0 までの整数である)

で表される。

【 0 0 1 5 】

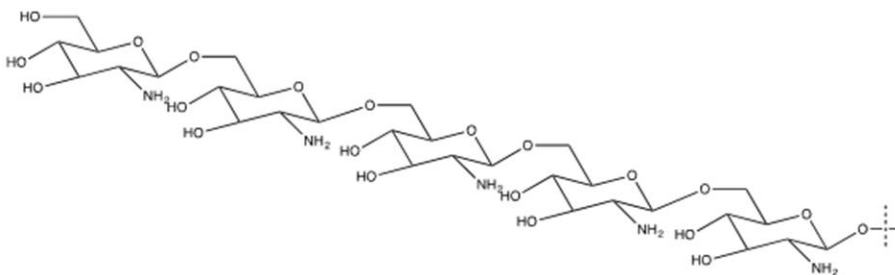
一実施形態では、本発明は、細胞壁にオリゴ糖 - (1 6) - グルコサミン構造を含む微生物に対するワクチンを提供し、ここで、前記ワクチンは、式 I I :

(A ' - B)_x - C I I

(式中、A ' は、以下の式のペンタ - (1 6) - グルコサミン (炭水化物リガンド) 基であり：

【 0 0 1 6 】

【化 3】



B、C、および x は上記で定義されたとおりである)

で表される。

【 0 0 1 7 】

一実施形態では、本発明は、薬学的に許容される希釈剤と、有効量の式 I および / または式 I I のワクチンを含む医薬組成物を提供する。

【 0 0 1 8 】

一実施形態では、本発明は、細胞壁にオリゴ糖 - (1 6) - グルコサミン基を含む微生物から患者に免疫を提供するための方法であって、前記患者に、式 I および / または式 I I の前記ワクチンを投与することを含む、方法を提供する。

【 0 0 1 9 】

一実施形態では、本発明は、細胞壁にオリゴ糖 - (1 6) - グルコサミン基を含む微生物から患者に有効な免疫を提供するための方法であって、前記患者に、本発明の医薬

10

20

30

40

50

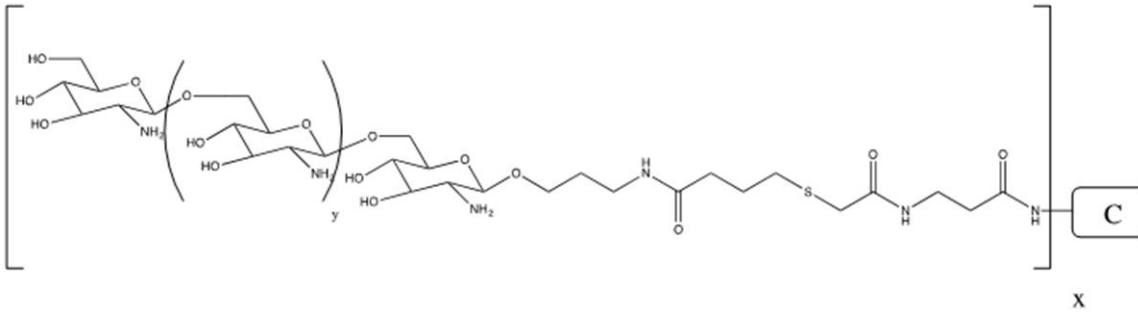
組成物を投与することを含む、方法を提供する。

【 0 0 2 0 】

本発明の代表的なワクチンを以下の表に示す。

【 0 0 2 1 】

【化 4】



10

【 0 0 2 2 】

【表 1】

例	Y	C	x
A	2	破傷風トキソイド	30-39
B	3	破傷風トキソイド	35-39
C	2	破傷風トキソイド	35-39
D	3	破傷風トキソイド	30-39
E	3	破傷風トキソイド	30-35
F	4	破傷風トキソイド	35-39
G	8	破傷風トキソイド	35-39
H	10	破傷風トキソイド	35-39

20

30

【 0 0 2 3 】

実施形態では、本発明は、細胞壁にオリゴ糖 - (1 6) - グルコサミン基を含む微生物から患者に免疫を提供するための方法であって、前記患者に、式 I および / または式 I I の前記ワクチンを、モノクローナル抗体 F - 5 9 8 と同時に投与することを含む、方法を提供する。

【 0 0 2 4 】

本明細書で使用される「同時に」は、前記ワクチンの投与前または投与中を含むことができる。いくつかの実施形態では、同時は、F - 5 9 8 を投与してから約 ± 6 時間以内、または ± 4 時間以内、または ± 2 時間以内の、式 I および / または式 I I のワクチンの投与を含み得る。実施形態では、この 2 つは、同じボラス注射の一部として投与することができる。患者が個々の構成成分に基づいて免疫応答を開始することができる限り、投与は「同時」である。F - 5 9 8 と式 I または I I のワクチンを投与する順序は重要ではない。同時投与は、2 時間または 6 時間以外の任意の期間に対応することができるが、抗体の両セット (F - 5 9 8 からのもとのワクチンから生成されたもの) が重複する期間、それぞれの標的に対し有効に抗体カバレッジを提供している限り、同時であり得る。

40

【 0 0 2 5 】

理論に拘束されるものではないが、本明細書に開示される方法は、F - 5 9 8 抗体および式 I および I I のワクチンから生成される抗体のそれぞれの選択性のために、相補的かつ相乗的である。F - 5 9 8 は微生物の細胞壁 P N A G 構造の N - アセチルリッチ領域に

50

特異的に結合することが見出されており、これは、"Structural basis for antibody targeting of the broadly expressed microbial polysaccharide poly-N-acetyl glucosamine," J. Biol. Chem. 293(14) 5079-5089 (2018)に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。式 I および II のワクチンは、P N A G 細胞壁構造の非 N - アセチル化領域に選択性を提供する。いくつかの実施形態では、抗体の両方の集団の存在は、交差反応性を最小限に抑え、P N A G を有する細胞壁構造を有する微生物に対する完全な防御を提供し得る。

【0026】

いくつかの実施形態では、F - 598 は、全処置期間中に同時投与される。

【0027】

いくつかの実施形態では、F - 598 は、式 I および / または式 II のワクチンによって、患者を効果的に処置するのに十分な抗体力価が生成される時点までのみ同時投与される。ワクチンによってそのような十分な抗体が産生される期間の後、F - 598 の投与を終了してもよい。

【0028】

いくつかの実施形態では、F - 598 は、ワクチンによって生成された抗体の十分な力価が測定された直後に、終了してもよい。実施形態では、F - 598 は、ワクチンによって生成された抗体の十分な力価が測定された1週間後に、終了してもよい。実施形態では、F - 598 は、ワクチンによって生成された抗体の十分な力価が測定された2週間後に、終了してもよい。実施形態では、F - 598 は、ワクチンによって生成された抗体の十分な力価が測定された1か月後に、終了してもよい。当業者は、患者の特定の状態 / 容態によって決定され得る正確な期間を理解するであろう。

【0029】

いくつかの実施形態では、式 I および / または式 II の前記ワクチンの投与は、1 ~ 3 回の投与のレジメンを含み得る。例えば、一部の患者では、1 回の投与で十分な場合がある。一部の患者では、2 回の投与が必要になる場合がある。一部の患者では、3 回の投与が必要になる場合がある。投与回数に寄与し得る要因の中には、患者の年齢および状態があり得る。免疫系が新たに形成された非常に若い患者には、複数回の投与が必要になる場合がある。同様に、免疫系が低下している高齢の患者は、複数回の投与が必要になる場合がある。

【0030】

いくつかの実施形態では、処置レジメンは、F - 598 の枯渇および / または抗体力価に基づくワクチンの追加投与の必要性についての患者のモニタリングを含む。例えば、火傷の犠牲者は、創傷部位での抗体の分泌のために、F - 598 の追加投与を必要とする場合がある。したがって、いくつかの実施形態では、抗体の血清濃度を、処置レジメン全体を通して適切な力価を維持するために定期的に評価する。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1は、化合物17の¹H NMRを示している(以下に記載される)。

【図2】図2は、化合物17の¹³C NMRを示している。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本発明は、免疫原性タンパク質に連結された3 ~ 12個のグルコサミン単位を有するオリゴ糖 - (1 6) - グルコサミン基を含む抗菌ワクチンを提供する。

【0033】

本発明をより詳細に説明する前に、以下の用語を最初に定義する。本明細書で使用される用語が定義されていない場合、それは一般的に受け入れられている科学的または医学的意味を有する。

【0034】

本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的とし、本

10

20

30

40

50

発明を限定する意図はない。本明細書で使用される単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈上明らかに別段の指示がない限り、複数形も含むことが意図される。

【0035】

「適宜の」または「適宜に」とは、その後に説明される事象または状況が発生してもよく、または発生しなくてもよいことを意味し、説明には、この事象または状況が発生する例および発生しない例が含まれる。

【0036】

数値指定の前に「約」という用語が使用される場合、例えば、温度、時間、量、濃度、および範囲を含むその他のものは、(+)または(-)10%、5%、1%、またはその間のいずれかの部分範囲もしくは部分値だけ変動し得る近似値を示す。好ましくは、用量

10

【0037】

「含む (comprising)」または「含む (comprises)」とは、組成物および方法が記載された要素を含むが、他のものを除外しないことを意味することを意図している。組成物および方法を定義するために使用される場合、「から本質的になる」とは、述べられた目的のために、組合せにとって本質的に重要な他の要素を除外することを意味するものとする。したがって、本明細書で定義される要素から本質的になる組成物は、特許請求された発明の基本的かつ新規な特性に実質的に影響を及ぼさない他の材料または工程を除外しないであろう。「からなる」とは、微量元素を超える他の成分および実質的な方法工程を除外することを意味するものとする。これらの移行句のそれぞれによって定義される実施形態は、本発明の範囲内である。

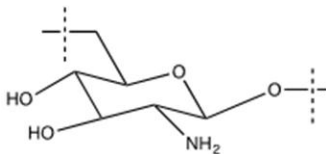
20

【0038】

「-(1-6)-グルコサミン単位」または「グルコサミン単位」という用語は、以下のような個々のグルコサミン構造を指す：

【0039】

【化5】

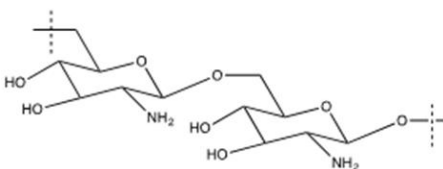


30

(式中、6-ヒドロキシル基は、前述のグルコサミン単位の1ヒドロキシル基と縮合しており、破線は前後のグルコサミン単位への結合部位を表す)。別の「-(1-6)-グルコサミン単位」と化合すると、得られる二糖の構造は以下ようになる：

【0040】

【化6】



40

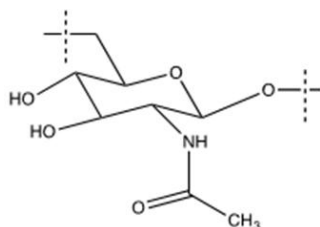
【0041】

「N-アセチル基を有する-(1-6)-グルコサミン単位」という用語は、以下の構造を指す：

【0042】

50

【化 7】



(式中、2番目の単位の6-ヒドロキシル基は、N-アセチル基がないにもかかわらず、上記のように、先行するグルコサミン単位の1-ヒドロキシル基と縮合している)。

10

【0043】

本明細書で使用される「リンカー」という用語は、破傷風トキソイドを本明細書に開示されるオリゴ糖ドメインに共有結合させる手段として機能する任意の有機断片を指す。当業者に知られている任意の好適なリンカーを使用することができるが、一般に、そのようなリンカーは、容易に切断できず、トキソイド構造への付着からオリゴ糖を分離させるように選択される。例えば、リンカーは、米国特許第4,671,958号；同4,867,973号；同5,691,154号；同5,846,728号；同6,472,506号；同6,541,669号；同7,141,676号；同7,176,185号；または同7,232,805号に開示されているリンカーの1つであり得、これらのそれぞれは参照により本明細書に組み込まれる。リンカーは、一般に、任意の数の介在するヘテロ原子、特に窒素、硫黄、および酸素を含むC₂~C₂₀アルキレン(alkylene)断片を含み得る。炭素原子は、アルキル、オキソなどで置換してもよい。オリゴ糖還元末端では、リンカーは、アノマー中心でN、O、またはS連結を介して付着することができるが、C連結も可能である。トキソイド末端で、リンカーを、トキソイド上のヘテロ原子に連結することができる。いくつかの実施形態では、連結は、トキソイドのアミン官能基を介している。いくつかのそのような実施形態では、リンカーを、トキソイドアミノ基にアミド結合を形成することによって付着させる。オリゴ糖末端の付着点とトキソイド末端の付着点の間に介在する原子は、オリゴ糖の抗原性を妨げない構造を有するのに有益である可能性があるが、一般にほとんど重要性がない。いくつかの実施形態では、リンカーはまた、分岐鎖であってもよく、それにより、リンカーを介して、トキソイド上の単位アミノ

20

30

【0044】

「(1-6)-グルコサミン基を含むオリゴ糖」という用語は、「(1-6)-グルコサミン構造」を含むオリゴ糖を含む細胞壁の一部を模倣するワクチン上のその基を指す(以下に定義されているように)。

【0045】

「(1-6)-グルコサミン構造を含むオリゴ糖」という用語は、微生物の細胞壁に見られる構造を指す。微生物壁には、多くの微生物系統にわたって保存されているこれらの構造が多数含まれている。これらの構造は微生物の細胞壁に見られ、それらの単位の大部分が(1-6)-グルコサミンであるオリゴ糖が含まれる。

40

【0046】

本明細書で使用される「ワクチン」という用語は、細胞壁に(1-6)-グルコサミン構造を有するオリゴ糖を含む任意の微生物に対して有効な免疫を提供する本発明の化合物(式IおよびII)の能力を指す。したがって、単一の細菌に対してワクチン接種する古典的なワクチンとは異なり、本明細書に記載のワクチンは、本明細書に記載のオリゴ糖構造を有する任意の微生物に対して有効な免疫を提供することができる。このような微生物には、そのような微生物が(1-6)-グルコサミン構造を含むそのようなオリゴ糖を有する場合、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、抗生物質耐性細菌(例えば、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*))、真菌などが含まれるが、これらに限定されない。

50

【 0 0 4 7 】

本明細書で使用される「有効な免疫」という用語は、微生物感染を処置、予防、または改善するのに十分なインビボでの抗体応答を生成する、有効量のワクチンの能力を指し、前記微生物は、その細胞壁に - (1 6) - グルコサミンを含むオリゴ糖を含有する。抗体応答を評価するためのアッセイは、当技術分野では従来のものであり、微生物に反応する抗体の力価を評価するアッセイを含む。

【 0 0 4 8 】

本発明のワクチンおよび中間体（「化合物」）は、溶媒和物、特に水和物として存在し得る。化合物または化合物を含む組成物の製造中に水和物が形成される場合があり、または化合物の吸湿性のために水和物が時間とともに形成される場合がある。本発明の化合物は、とりわけ DMF、エーテル、およびアルコール溶媒和物を含む、有機溶媒和物としても存在し得る。特定の溶媒和物の同定および調製は、合成有機または医薬品化学の当業者の技能の範囲内にある。

10

【 0 0 4 9 】

「対象」とは、哺乳動物を指す。哺乳動物は、ヒトまたは非ヒト動物の哺乳動物であり得る。

【 0 0 5 0 】

対象における疾患もしくは障害の「処置する」または「処置」とは、1) 素因がある、または疾患もしくは障害の症状をまだ示していない対象において、疾患もしくは障害が発生するのを予防すること；2) 疾患もしくは障害を阻害すること、またはその発症を阻止すること；あるいは3) 疾患もしくは障害を改善することまたは疾患もしくは障害の退縮を引き起こすことを指す。

20

【 0 0 5 1 】

「有効量」とは、対象を苦しめている疾患または障害を処置するのに、またはそのような疾患もしくは障害が前記対象もしくは患者に生じるのを予防するのに十分な、本発明のワクチンの量を指す。

【 0 0 5 2 】

「持続的免疫防御」という用語は、その力価が F - 5 9 8 抗体、ワクチンによって生成されたポリクローナル抗体のみ、または両方の組合せを含むかどうかにかかわらず、患者が血清中に抗体の治療力価を有することを意味する。

30

【 0 0 5 3 】

一般的な合成方法

本発明の化合物は、以下の一般的な方法および手順を使用して、容易に入手可能な出発材料から調製することができる。典型的または好ましいプロセス条件（すなわち、反応温度、時間、反応物のモル比、溶媒、圧力など）が与えられている場合、特に明記しない限り、他のプロセス条件も使用することができることが理解されよう。最適な反応条件は、使用する特定の反応物または溶媒によって異なる場合があるが、そのような条件は、当業者が定型的な最適化手順によって決定することができる。

【 0 0 5 4 】

さらに、当業者には明らかであるように、ある特定の官能基が望ましくない反応を受けるのを防ぐために、従来の変換基が必要な場合がある。種々の官能基に好適な変換基、ならびに特定の官能基を保護および脱保護するための好適な条件は、当技術分野において周知である。例えば、多数の変換基は、T. W. Greene and P. G. M. Wuts, Protecting Groups in Organic Synthesis, Third Edition, Wiley, New York, 1999、およびそこに引用されている参考文献に記載されている。

40

【 0 0 5 5 】

以下の反応の出発物質は、一般に既知の化合物であるか、または既知の手順もしくはその明らかな変更によって調製することができる。例えば、出発材料の多くは、Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)、Bachem (Torrance, California, USA)、Emka-Chemce (St.

50

Louis, Missouri, USA)などの市販の業者から入手可能である。その他のものは、Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, Volumes 1-15 (John Wiley, and Sons, 1991)、Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, Volumes 1-5, and Supplementals (Elsevier Science Publishers, 1989)、Organic Reactions, Volumes 1-40 (John Wiley, and Sons, 1991)、March's Advanced Organic Chemistry, (John Wiley, and Sons, 5th Edition, 2001)、およびLarock's Comprehensive Organic Transformations (VCH Publishers Inc., 1989)、などの標準的な参照テキストに記載されている手順またはその明らかな変更によって調製してもよい。

【0056】

10

本発明の代表的な化合物の合成

本発明のワクチンの一般的な合成は当技術分野で公知であり、米国特許出願第10/713,790号ならびに米国特許第7,786,255号および第8,492,364号に開示されており、これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、「低汚染抗菌ワクチン」と題する同時係属中の米国特許出願第62/934,925号に開示されているように、オリゴ糖をトキシソイドにコンジュゲートさせる前に、トキシソイド自体を精製して、段階的濾過によって低レベルの汚染物質を含めることができる。要約すると、トキシソイドを、最初に段階的濾過によって精製し、ダイマートキシソイドよりも高次のオリゴマーのトキシソイドを除去する。モノマーおよびダイマーは、濾液を通過する。次に、低分子量不純物を、モノマーおよびダイマートキシソイドを単離する小さなフィルターで分離し、小さな分子量の不純物が濾液とともに通過できるようになる。このようにして、主にモノマーおよびダイマートキシソイドを含むコンジュゲートワクチンの良好な収量が良好な収量で調製される。

20

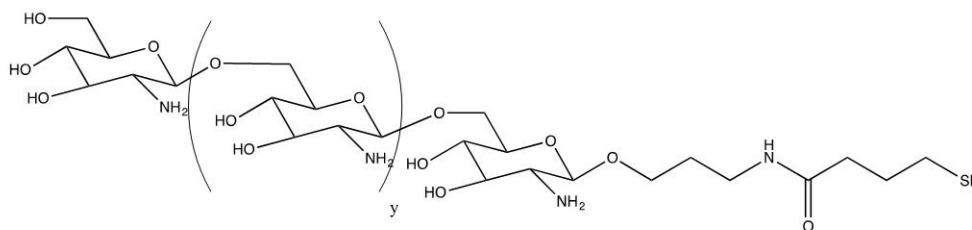
【0057】

本明細書に記載の特定のワクチンの場合、-(16)-グルコサミン基は、4~6単位、好ましくは5単位に制限される。リンカー基の形成は、限定されないが、米国特許第8,492,364号および以下の実施例に見られるものに例示される、当技術分野で認められている合成技術によって達成される。一実施形態では、アグリコンの第1の部分は、還元性-(16)-グルコサミン単位に付着し、以下の式III:

【0058】

30

【化8】



III

40

(式中、yは、2から4までの整数である)
に示されるように、チオール(-SH)基を保持する。

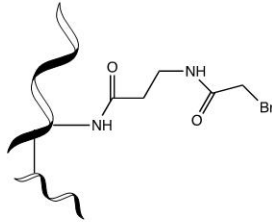
【0059】

リンカーの第2の部分を、式IVに示されるように、以下の方式で破傷風トキシソイドに付着させる。

【0060】

50

【化 9】



IV

10

【0061】

この式では、破傷風トキソイドの別個の部分は波線で示されており、本質的に例示にすぎず、トキソイドの完全な構造を提供することを意図していない。二硫化物ブリッジは、部分を接続する1本の線で表される。明確にするために、リンカーの単一の第2の部分のみが示されるが、トキソイド上に見られるアミノ基に共有結合した複数のそのような第2の部分がある。

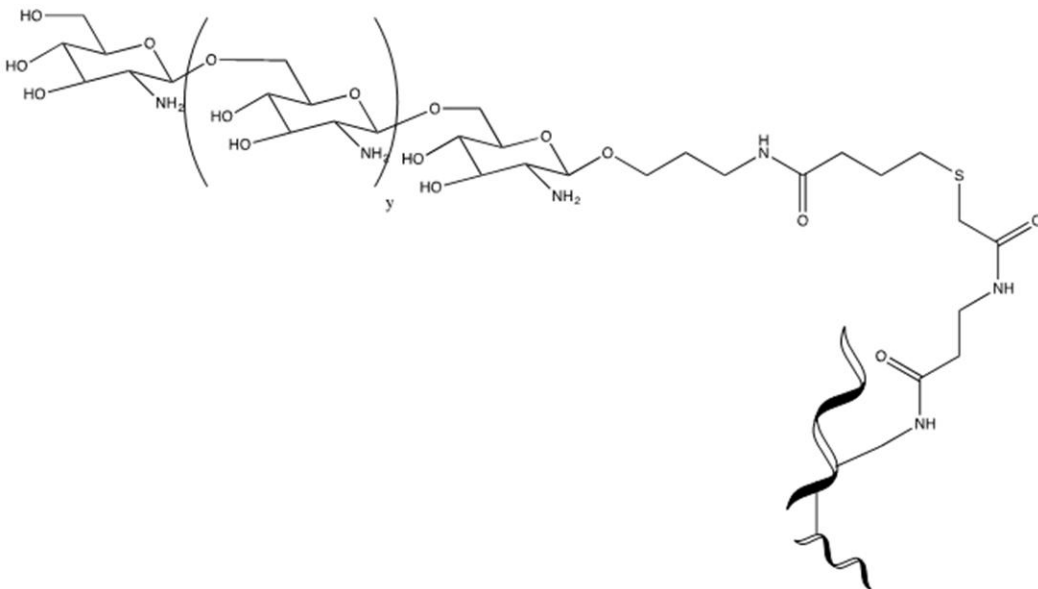
【0062】

リンカーの第1の部分と第2の部分とがカップリング条件下で化合すると、チオエーテル結合が形成される。反応は、生成された酸を除去するために、適宜塩基の存在下で不活性希釈剤中で行われる。チオエーテル結合は、リンカーの第1の部分と第2の部分とを接続し、それによって、 y が本明細書で定義されているワクチン構造について、以下に示すように、組合せリンカーを介して、破傷風トキソイドのオリゴ糖 - (1 6) - グルコサミン基への共有結合を提供する。

20

【0063】

【化 10】



30

40

【0064】

破傷風 (*tentatus*) トキソイドに付着した - (1 6) - グルコサミン基 - リンカー - 部分の数は、そのような部分の所望の量がトキソイドに結合するように化学量論的に制御され、それにより、本発明のワクチンを提供することが理解される。

【0065】

方法、有用性および医薬組成物

本発明の組合せで使用されるワクチンは、細胞壁に P N A G オリゴ糖 - (1 6) -

50

グルコサミン構造を有し、前記オリゴ糖の最大約20%がN-脱アセチル化されている、微生物に対して有効な免疫応答を開始することができる。患者への接種後、約4週間後に効果的な免疫応答が発生する。これにより、予防的または治療的にワクチンが無効になる潜伏期間が生じる。ワクチンが予防的に投与され、潜伏期間が許容可能である場合、本発明のワクチンは、問題の微生物がPNAGを含む細胞壁を有するその後の微生物感染を予防するのに有用である。

【0066】

そのように使用される場合、本発明のワクチンは、そのような微生物から生じる微生物感染のリスクのある患者に投与される。そのような患者には、一例としてのみであるが、高齢者、火傷患者、特に体全体に20%以上の範囲の火傷を負っている患者、待機手術を受ける患者、微生物感染が発生している目的地に旅行する患者などが含まれる。ワクチンは通常、免疫応答を強化するために好適なアジュバントとともに、免疫能力のある患者に筋肉内投与される。潜伏期間が経過した後、患者はそのような微生物に対する自然免疫を獲得する。

10

【0067】

別の実施形態では、本発明のワクチンは、特に微生物感染が限局性である場合および/または生命を脅かさない場合に、治療的に使用することができる。そのような場合、本発明のワクチンは、そのような微生物から生じる微生物感染に罹患している患者に投与される。ワクチンは通常、免疫応答を強化するために好適なアジュバントとともに、免疫能力のある患者に筋肉内投与される。投与すると、約4週間以内に有効な免疫が生成される。患者がまだ感染に罹患している場合は、ワクチンから生じる自然免疫が回復を促進する。

20

【0068】

明らかかなように、抗菌療法を、特に抗生物質耐性感染のためのワクチンと組み合わせることができれば、それは有益であろう。これにより、潜伏期間後ではなく、患者の感染の即時の治療的処置が可能になる。PNAGに対して生成されたモノクローナル抗体は治療上有効であることが知られている。そのような例の1つは、F-598として指定され、米国特許第7,786,255号に開示されているモノクローナル抗体であり、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0069】

本明細書に記載のワクチンとともにそのようなモノクローナル抗体を使用すると、モノクローナル抗体がPNAGに結合するように設計されているという問題が生じる。そのため、ワクチンと一緒にモノクローナル抗体を投与すると、ワクチンのポリグルコサミン部分に抗体が結合し、両方が無効になる。

30

【0070】

驚くべきことに、本明細書に記載のワクチンは、患者に内因性免疫応答を誘導しながら、F-598モノクローナル抗体とは交差反応しない。このような組合せにより、ワクチンとF-598抗体の同時投与が可能になり、これにより潜伏期間中の抗体のみに基づく即時の治療と、その後の潜伏期間後の内因性抗体産生が可能になる。これにより、ワクチンの投与と有効な免疫の発達の間の潜伏期間中に、F-598モノクローナル抗体により患者を処置することができる。本実施形態では、細胞壁にPNAGを発現する微生物によって媒介される感染に罹患している患者の治療的処置を、抗体を用いて直ちに開始し、一方で同時に、微生物に対する自然免疫を発達させるために、患者にワクチンを投与することができる。完全を期すために、自然免疫とは、抗原に対する免疫応答を指し、それによって、単独で、または免疫系の他の構成成分と組み合わせさせて、問題の微生物を殺傷する抗体を生成する。

40

【0071】

そのように使用される場合、本発明のワクチンは、同様の有用性を提供する薬剤について許容される投与様式のいずれかによって、治療有効量で投与される。本発明のワクチン、すなわち有効成分の実際の量は、処置される疾患の重症度、対象の年齢および相対的健康、使用されるワクチンの効力、投与の経路および形態、ならびに当業者に周知の他の要

50

因などの多くの要因に依存する。

【0072】

本発明の有効量または治療有効量のワクチンは、対象の症状または生存の延長を改善するために十分な力価の抗体をもたらすその量のワクチンを指す。そのようなワクチンの毒性および治療効果は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順によって決定することができる。

【0073】

本明細書に記載のワクチンは、典型的には、一例としてのみであるが、アジュバント、安定剤、防腐剤などを含む、当技術分野で周知の1つまたは複数の従来の成分を含む注射用滅菌水性組成物として投与される。

【0074】

同様に、F - 598モノクローナル抗体は、同様の有用性を提供する薬剤について許容される投与様式のいずれかによって、治療有効量で投与される。抗体の実際の量は、処置される疾患の重症度、対象の年齢および相対的健康、投与の経路および形態、ならびに当業者に周知の他の要因などの多くの要因に依存する。

【0075】

本発明の有効量または治療有効量のワクチンは、対象の症状または生存の延長を改善するために十分な力価の抗体をもたらすその量の抗体を指す。抗体は、好ましくは、一例としてのみであるが、防腐剤などを含む、当技術分野で周知の1つまたは複数の従来の成分を含む注射用滅菌水性組成物として静脈内投与される。

【0076】

いくつかの実施形態では、処置される患者は火傷患者である。そのような患者は、火傷から体液が滲出することが知られており、そのような体液には抗体が含まれている。したがって、時間の経過とともに、抗体、特にF - 598の力価が低下し、患者の抗体濃度が最適以下になる。このような場合、F - 598に対する患者の抗体力価を監視し、必要に応じてF - 598の定期投与または持続的投与によって調整することが好ましい。

【0077】

実施形態では、バイオフィルムを発症するリスクのある患者を処置する方法が提供され、この方法は、F - 598抗体とともに本明細書に開示されるワクチンの組合せを患者に投与することを含む。実施形態では、方法は、バイオフィルムを発症するリスクのある患者を特定することを含み得る。このような患者集団には、膝または股関節の置換、ステントまたはカテーテルなどのある種の外科的移植を受けている患者が含まれるが、これらに限定されない。

【0078】

実施形態では、バイオフィルムを発症するリスクのある患者を処置する方法は、任意の手術の前にF - 598抗体を投与することを含み得る。いくつかのそのような実施形態では、投与は、手術の少なくとも24時間前、または手術の少なくとも72時間前、または手術の少なくとも1週間前、または手術の少なくとも2週間前に行ってもよい。患者が緊急手術を迫られている場合、F - 598抗体は手術の直前または手術中に投与することができる。バイオフィルムを発症するリスクのある患者の処置において、P N A G ワクチンを、F - 598抗体と同時にまたは順次に投与することができる。順次に投与する場合、P N A G ワクチンは、F - 598抗体の投与から24時間以内に投与されることが好ましい。

【0079】

組合せ

本発明の組合せは、主治医によって好適であるとみなされる他の治療化合物または他の適切な薬剤と組み合わせて使用することができる。選択された場合において、本発明の組合せは、細菌感染を処置するための抗生物質、抗真菌剤などと同時に投与することができる。抗生物質の場合、適切な抗生物質または抗生物質のカクテルの選択および患者に投与する量は、問題の細菌の詳細、細菌感染の程度、年齢、体重、その他の患者の相対的な健

10

20

30

40

50

康状態に基づいて、十分に主治医のスキルの範囲内にある。抗真菌療法の場合、有効量の抗真菌薬を同時に患者に投与することができる。

【0080】

本発明のワクチンは、患者の抗原に対する免疫応答を増強する抗原とともに投与することができる。アジュバントとしては、ゲル、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムなどのアルミニウム化合物、およびフロイント完全または不完全アジュバント（例えば、抗原がパラフィン油エマルジョン中の安定化水の水相に組み込まれている）が挙げられるが、これらに限定されない。明らかなように、パラフィン油は、スクアレン油またはピーナツ油などの他のタイプの油に置き換えることができる。アジュバント特性を備えた他の材料としては、BCG（弱毒化結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）リン酸カルシウム、レバミゾール、イソプリノシン、ポリアニオン（例えば、ポリA：U）、レンチナン、百日咳毒素、リピドA、サポニン、QS-21およびペプチド、例えば、ムラミルジペプチド、および免疫刺激性オリゴヌクレオチド、例としてCpGオリゴヌクレオチドが挙げられる。希土類塩、例えば、ランタンおよびセリウムをアジュバントとして使用することもできる。使用されるアジュバントの量は、処置される対象および使用される特定の抗原に依存し、当業者が容易に決定することができる。

10

【実施例】

【0081】

本発明は、純粹に例示的であることが意図される本発明の以下の実施例を参照することによってさらに理解される。本発明は、本発明の単一の態様の例示としてのみ意図される例示された実施形態によって範囲が限定されない。機能的に同等である任意の方法は、本発明の範囲内である。本明細書に記載されるものに加えて、本発明の種々の改変が、前述の説明および付随する図から当業者には明らかであろう。そのような改変は、添付の特許請求の範囲内に入る。

20

【0082】

以下の用語が本明細書で使用され、以下の意味を有する。定義されていない場合、略語には従来認識されている定義がある。

= オングストローム

aq. = 水溶液

Biotage = Biotage, Div. Dyax Corp., Charlottesville, Virginia, USA

30

bp = 沸点

CAD = 帯電エアロゾル検出器

DCM = ジクロロメタン

deg = 度

DMSO = ジメチルスルホキシド

eq. = 当量

EtOAc = 酢酸エチル

FEP = フッ素化エチレンプロピレン

g = グラム

40

$^1\text{H-NMR}$ = プロトン核磁気共鳴

h = 時間

HDPE = 高密度ポリエチレン

HPLC = 高速液体クロマトグラフィー

MeCN = アセトニトリル

kg = キログラム

ml = ミリパー

MeOH = メタノール

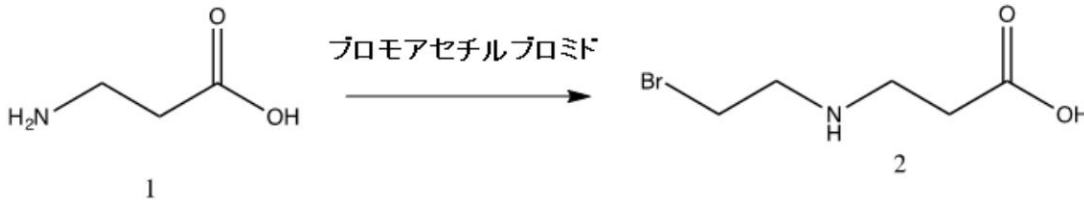
mg = ミリグラム

mL = ミリリットル

50

m M = ミリモル濃度	
m m o l = ミリモル	
N = 規定度	
N B S = N - プロモスクシンイミド	
N I S = N - ヨードスクシンイミド	
N M T = N - メチルトリプタミン	
P P = ポリプロピレン	
q H N M R = 定量的プロトン核磁気共鳴	
R B F = 丸底フラスコ	
R O = 逆浸透	10
S E C H P L C = サイズ排除クロマトグラフィー H P L C	
S I M = 二次イオン質量	
T C E P = (トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン	
T L C = 薄層クロマトグラフィー	
T M S O T f = メタンスルホン酸、 1 , 1 , 1 - トリフルオロ - 、 トリメチルシリルエステル	
T T = 破傷風トキソイド	
μ L = マイクロリットル	
μ m = ミクロン	
w / w = 重量対重量	20
w / v = 重量対体積	
[実施例 1]	
【 0 0 8 3 】	
破傷風トキソイド段階的濾過	
モノマーおよびダイマートキソイドを含む粗破傷風トキソイド調製物の試料を、最初に 3 ~ 5 ミクロンフィルターに通して、高次オリゴマーを除去する。これは、段階的にフィルター孔径を縮小させて実施することができる。したがって、トキソイド調製物を、5 ミクロンフィルター、次に 3 ミクロンフィルターに通することができる。あるいは、トキソイド調製物を、5 ミクロンフィルター、次に 4 ミクロンフィルター、次に 3 ミクロンフィルターに通することができる。5 ミクロンの濾過の有効性は、高次オリゴマーの存在を検出するために使用できる光散乱技術によって評価される。必要に応じて、段階的な濾過を追加して、さらに高次のオリゴマーを除去する。得られた濾液には、モノマーおよびダイマートキソイドが含まれている。オリゴ糖の付着の化学的性質が完全に精製された後、濾液を 2 . 5 ミクロンのフィルターに通し、フィルターケーキとしてモノマーおよびダイマートキソイドを分離し、一方、低分子量の不純物は濾液とともに通過する。各濾過工程（高分子量および低分子量）で、フィルターケーキのすすぎを実施することができる。	30
【 0 0 8 4 】	
一実施形態では、トキソイドにオリゴ糖 - (1 6) - グルコサミン構造を付着させる前に、主にモノマーおよびダイマーおよび 3 % 未満の小分子量不純物を含有するようにトキソイドを調製することができる。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許仮出願第 6 2 / 9 3 4 , 9 2 5 を参照のこと。	40
[実施例 2]	
【 0 0 8 5 】	
T T モノマーへの S B A P の付着	
工程 1 : N - B A B A の調製 :	
【 0 0 8 6 】	

【化 1 1】



[1] 市販のベータアラニン、すなわち化合物 1 は、少なくとも化学量論量の市販のブromoアセチルブロミドと反応させることにより、N - B A B A (ブromoアセチル - アラニン)、すなわち化合物 2 に変換される。第 1 の容器中では、 - アラニンを重炭酸ナトリウムまたは他の好適な塩基と一緒に水に合わせて、反応中に生成される酸を除去する。溶液が得られるまで、水溶液を約 20 ± 5 で混合する。その後、溶液を約 5 ± 5 に維持する。別の容器に、必要量の臭化ブromoアセチルを加えた後、ジクロロメタンを加える。両方の容器の内容物を合わせる。反応完了後、6 N H C l を加え、p H がおよそ 2 になるまで混合する。得られた N - B A B A を、酢酸エチルなどの好適な溶媒によって溶液から抽出する。有機層を、60 などの高温で減圧下などの従来の条件下で濃縮する。次にヘプタンを加えて N - B A B A を沈殿させ、フィルター上で収集して、40 の真空オープン内で乾燥させる。本生成物を、次の工程でそのまま使用する。

10

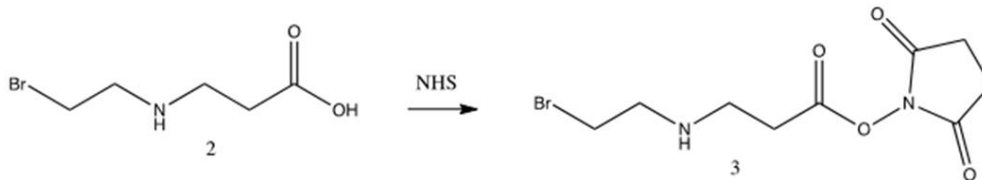
【 0 0 8 7】

工程 2 : S B A P の調製 :

20

【 0 0 8 8】

【化 1 2】



N - B A B A、すなわち化合物 2 を、当技術分野で周知の従来の条件下で N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) と反応させて、S B A P、すなわち化合物 3 を生成する。特に、N - B A B A を、メタノール、エタノール、イソプロパノールなどの好適な不活性溶媒中で、少なくとも化学量論量の N H S と合わせる。得られた溶液を、透明な溶液が得られるまで約 20 ± 5 で攪拌する。次に、N - ジイソプロピルカルボジイミドを反応混合物に加え、混合して固体を生成する。次に、系を 0 ± 5 に冷却し、得られる S B A P を濾過によって提供する。さらなる精製には、イソプロパノールとヘプタンの混合物を予冷し、フィルターケーキを洗浄した後、約 30 の真空オープンでウェットケーキを乾燥させる必要がある。得られた S B A P を、T T モノマーとのカップリング反応にそのまま使用する。

30

【 0 0 8 9】

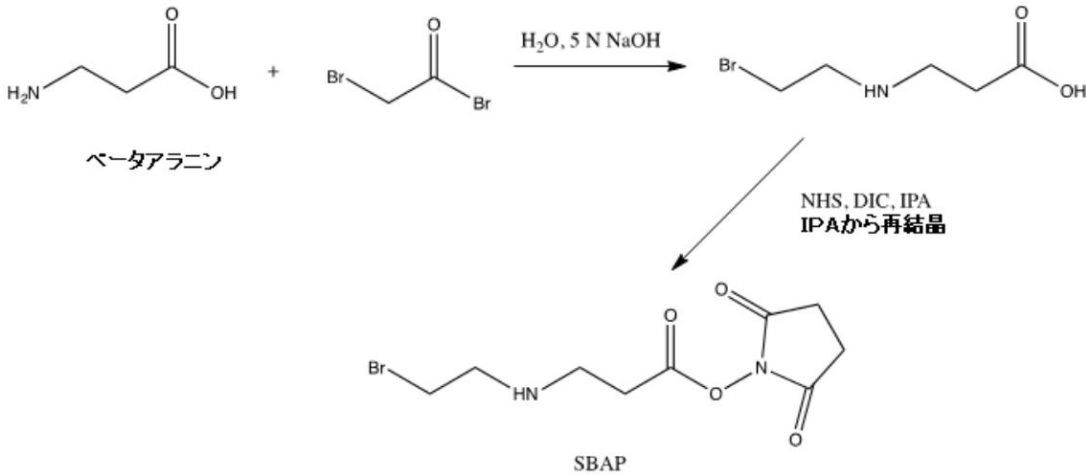
あるいは、S B A P は、米国特許第 5 , 2 8 6 , 8 4 6 号に記載される方式で調製することができ、この特許は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。具体的には、そこに記載される方法は、以下の合成スキームによって提供される。

40

【 0 0 9 0】

50

【化 1 3】



10

【0091】

工程 3：コンジュゲーション

上記のように、精製 TT モノマーは、遊離アミンアッセイによって定量化されるように、43 個のリジン残基 / モルを含有する。TT モノマーと濃度を 0 から 170 モル当量まで増加させた SBAP との反応により、SBAP の 15 ~ 110 モル当量の範囲で遊離アミン含有量が対応して減少した。定常状態の変換は、> 110 当量の SBAP を充填することにより達成した。遊離アミンの損失が SBAP リンカーの負荷に正比例すると仮定すると、飽和時のリンカー密度は 43 モルの SBAP / TT モノマーであると推定された。リンカー TT / モノマー中間体のモノマー / 凝集体含有量および各滴定点でのタンパク質濃度も評価した。リンカー添加前のモノマー含有量は 99.7% であり、SBAP リンカーの量を増加させても、モノマーレベルは大幅に変化しなかった（凝集体は検出されなかった）。また、滴定工程全体でのタンパク質の回収も同様であった。この集合的なデータに基づいて、周囲温度で 1 時間の 110 モル当量の SBAP の値を、その後のすべての合成の適切な反応条件として選択した。

20

【実施例 3】

30

【0092】

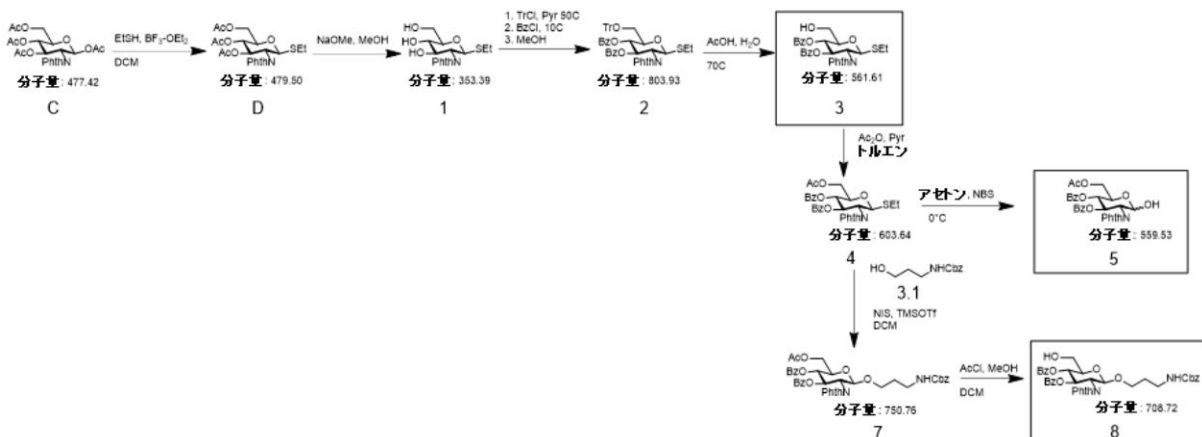
オリゴ糖の合成

ビルディングブロックの合成

以下の反応スキームは、以下に詳述される化合物 3、5 および 8 を調製するために使用される合成工程について説明する。

【0093】

【化 1 4】



40

【0094】

50

化合物 D の合成 .

市販の 1, 3, 4, 6 - テトラ - O - アセチル - 2 - デオキシ - 2 - N - フタルイミド - D - グルコピラノシド、すなわち化合物 C (120.6 g、252.6 mmol) およびトルエン (200 mL) を、1 L のビュッヒフラスコに入れ、溶解するまで 40 で回転させた (< 5 分) 。溶媒を蒸発させ、発泡体を得た。トルエン (200 mL) をフラスコに充填し、溶解するまで 40 で回転させた (< 5 分) 。溶媒を、乾燥するまで再び蒸発させた。結晶性固体が形成され、壁に固着した。ジクロロメタン (800 mL) をフラスコに入れ、溶解するまで周囲で回転させ ; 得られた暗褐色の溶液を 5 L のジャケット付き反応器に充填し、フラスコを追加のジクロロメタン (200 mL) ですすいで反応させた。加熱 / 冷却ジャケットを 20 に設定し、反応器の内容物を機械的に攪拌した。エタンチオール (40 mL、540 mmol) を 50 mL のジクロロメタンに溶解し、容器に加え、フラスコを 50 mL のジクロロメタンですすいで容器に入れた。三フッ化ホウ素ジエチルジエチルエーテラート (50 mL、390.1 mmol) をジクロロメタン (50 mL) に溶解し、反応器に加え、ジクロロメタン (50 mL) ですすぎ、容器に加えた。混合物を 20 で 2 時間攪拌した。反応を、TLC によって残留 C についてチェックした。移動相は、トルエン : 酢酸エチル (3 : 1、v / v)、生成物 R_f 約 0.45、C R_f 約 0.3、UV 可視化、であった。かなりの量の C が存在する場合、反応時間を延長する必要があった。

10

【 0095 】

攪拌は、高速に設定して、4 M 酢酸ナトリウム水溶液 (1.25 L、5100 mmol) を加えた。相を 30 分間よく混合した。水層の pH をディップスティックでチェックし、約 pH = 7 であることを確認した。攪拌を止め、反応混合物を 70 分間放置した。

20

【 0096 】

層を分離して収集した。有機層 (下層、1.2 L) およびエタノール (840 mL、14400 mmol) を、反応器に充填した。ジャケットを 60 に設定し、大気圧下で溶媒蒸留した (ジクロロメタン b.p. 40 およびエタンチオール b.p. 35、氷浴中の受けフラスコ) 。蒸留が遅くなると、ジャケットの温度を 70 に上昇させた。1300 mL の留出物を収集した後、容器の内容物の試料を収集し、ジクロロメタンのエタノールに対する比を ¹H - NMR で測定し、10 mol % 未満のジクロロメタンであることを確認した。より多くのジクロロメタンが存在する場合は、さらに蒸留する必要がある。追加のエタノール (400 mL) を加え、続いて D の種結晶を加えた。ジャケットを、30 分かけて 5 に冷却した。結晶スラリーを 5 で 3 日間攪拌した。固体を焼結漏斗に収集し、石油エーテル (60 ~ 80) で洗浄した : 1 x 500 mL スラリー、1 x 300 mL プラグ。固体を 500 mL RBF に移し、ロータリーエバポレーター (浴温 45) で一定重量 (約 4 時間超) まで乾燥させて、オフホワイトの固体を得た。予想収量 : 約 86 g (C から 71 %) 。

30

【 0097 】

化合物 1 の合成

無水メタノール (33 mL) を 50 mL の丸底フラスコに充填した。メタノール中のナトリウムメトキシド (30 % 溶液、25 μL、0.135 mmol) を加え、得られた溶液を周囲温度で 5 分間攪拌した。エチル 3, 4, 6 - テトラ - O - アセチル - 2 - デオキシ - 2 - N - フタルイミド - チオ - D - グルコピラノシド (化合物 D) (3.09 g、6.44 mmol) を、添加中に固体が溶解することができる速度で、10 分にわたって少しずつ加えた (約 200 mg) 。反応物を周囲温度で 2.5 時間攪拌した。TLC (EtOAc) は、化合物 D (R_f = 0.9) の完全な消費および 1 つのより極性の高いスポットの形成を示した : R_f = 0.5。試料を採取し、HPLC による反応完了 IPC (0.8 mL のアセトニトリルおよび 0.2 mL の水中の 2.5 μL の反応混合物) にかけて、合格条件は NMT 1.00 面積 % 化合物 D であった。酢酸を加えた (8 μL、0.1397 mmol) 。pH をディップスティックでチェックし、約 pH = 5 ~ 6 であることを確認した。混合物をロータリーエバポレーター (50) でほぼ乾固するまで濃縮した

40

50

。EtOAc (15 mL) を加え、大部分を蒸発させた。残留物を 15 mL の EtOAc に溶解 / スラリー化し、ロータリーエバポレーターから取り出した。2 mL の石油エーテルを加え、混合物を周囲温度で攪拌した。結晶スラリーを一晩攪拌した。固体を焼結漏斗に収集し、ガソリン (2 x 10 mL) で洗浄し、ロータリーエバポレーター (45 の浴温) で恒量になるまで乾燥させた。予想収量: 1.94 g (化合物 D から 85%)。

【0098】

化合物 2 の合成

化合物 1 (2.040 g) をピリジン (28 mL) に溶解し、溶液を 40 の浴温でロータリーエバポレーターにて約半分の体積 (約 14 mL) に濃縮して、黄色の溶液を得た。さらにピリジンを加え (14 mL)、同じ方式で溶液をおよそ 14 mL に濃縮した。溶液をアルゴン下に置き、塩化トリチル (2.299 g、1.36 当量) を加えた後、空冷式冷却管を取り付け、溶液を攪拌しながら 50 に加熱した。4 時間後、IPC を実行した (HPLC; 800 μ L の MeCN に 5 μ L、残留化合物 1 NMT 3.00 面積%)。IPC が満たされるとすぐに、反応物を 10 ~ 15 に冷却した。塩化ベンゾイル (1.60 mL、2.34 当量) を、反応温度を 20 未満に保ちながら、20 分間かけて滴加した。添加が完了したら、反応物を周囲温度まで温め、少なくとも 3 時間攪拌した。この時点で、IPC を実行した (HPLC; 1500 μ L の MeCN に 5 μ L、化合物 1 の残留モノ B z 誘導体 合計 NMT 3.00 面積%)。IPC が満たされるとすぐに、反応物を 0 に冷却し、メタノール (0.8 mL) をゆっくりと加えることによってクエンチし、反応温度が 20 未満に保たれるようにする。次に、クエンチした反応物を周囲温度に温めた。

10

20

【0099】

生成物の混合物をトルエン (20 mL) で希釈し、周囲温度で 1 時間攪拌した後、焼結漏斗により濾過して沈殿物を除去した。次に、トルエン溶液をクエン酸 (20% w/w、4 x 20 mL) で洗浄し、続いて飽和 NaHCO₃ (9% w/v、20 mL) で洗浄すると、存在する残留クエン酸との反応はわずかであった。次に、トルエン (上) 層をブライン (20 mL) で洗浄した後、ロータリーエバポレーターで 40 の浴温で蒸発させて、黄色 / オレンジ色のシロップ (6.833 g) を得た。シロップは IPC にかけた (H¹ NMR、合格条件 NMT 30 wt% 残留トルエン)。予想収量: 約 6.833 g (14.7%)。

30

【0100】

化合物 3 の合成

氷酢酸 (648 mL) および超純水 (72 mL) を一緒に混合して、90% 酢酸溶液を得た。酢酸溶液の一部 (710 mL) を、攪拌棒とともに粗化合物 2 (111 g) に加えた。空冷冷却管をフラスコに取り付け、次に混合物を 70 に加熱した。2 は粘稠であるため、混合物は 1 時間 20 分後にようやく完全に溶解し、その時点で攪拌を開始した。2 時間後、IPC を実行した (HPLC; 800 μ L の MeCN に 5 μ L、残留化合物 2 NMT 3.00 面積%)。IPC が仕様を満たすとすぐに、反応物を周囲温度に冷却した。混合物を焼結漏斗に移し、沈殿したトリチルアルコール (31.09 g) をハウスキュームを使用して濾別した。フラスコをさらに 90% 酢酸 (40 mL) ですすぎ、洗浄液全体を混合容器に移した。トルエン (700 mL) と水 (700 mL) を加えて完全に混合した。水 (下) 層は濁った白い溶液であり、pH について試験した (< 2 であると予想された)。水でさらに 2 回洗浄を繰り返した (2 x 700 mL; それぞれ約 2.4 および約 3 の pH、無色透明溶液)。飽和 NaHCO₃ (9% w/v、700 mL) を混合容器に加えると、わずかな反応 (ガスの放出) が発生した。次に、トルエン (上) 層をブライン (700 mL) で洗浄した後、ロータリーエバポレーターで 40 の浴温にて蒸発させて、黄色 / オレンジ色の固液混合物 (86 g) を得た。この混合物を、400 mL のトルエン (300 mL + 100 mL の洗浄液) に溶解し、3 カラム容積 (CV) の石油エーテル: トルエン (1: 1、v: v) で平衡化されたシリカカラム (450 g シリカ) に充填した。カラムは段階的な勾配を使用して溶出され、1 CV (790 mL) の画分を収集

40

50

した。使用した勾配は次のとおりである：

石油エーテル中の4 vol % 酢酸エチル：トルエン（1：1 v：v、4 CV）

石油エーテル中の8 vol % 酢酸エチル：トルエン（1：1 v：v、12 CV）

石油エーテル中の15 vol % 酢酸エチル：トルエン（1：1 v：v、4 CV）

石油エーテル中の20 vol % 酢酸エチル：トルエン（1：1 v：v、4 CV）

石油エーテル中の30 vol % 酢酸エチル：トルエン（1：1 v：v、1 CV）

【0101】

生成物を、14画分にわたって溶出した。TLCを使用して、画分を含有する生成物の位置を特定した。すべての画分を、IPCにかけた（HPLC、10.14分でのNMT 1.50面積%のピークおよび10.94分でのNMT 1.50面積%のピーク）。IPCを満たさない画分は、化合物4への処理のために取っておいた。合わせた画分を45の浴温でロータリーエバポレーターで蒸発させ、無色のシロップを得た。予想収量：約60g（78%）。

10

【0102】

化合物4の合成

粗化合物3（39.54g、約21gの化合物3、約37mmolを含有、3のクロマトグラフィーの直前に採取）をトルエン（7.2mL）に溶解し、乾燥ピリジン（14.2mL、176mmol、約4.8当量）を加え、均質な溶液を得た。無水酢酸7.2mL（76mmol、約2.1当量）を加え、混合物を25で18時間攪拌した。反応固体の沈殿中に、この沈殿物の一部は化合物4である可能性が高かった。反応をIPC用にサンプリングし、検出された化合物3の量が>1.00面積%である場合は、乾燥ピリジン（1.4mL、17当量）をさらに充填し、残留化合物3が液相で1.00面積%になるまで反応を続けた。

20

【0103】

反応物をジクロロメタン（112mL）で希釈し、次に水（2.8mL）およびメタノール（2.8mL）を加えた。混合物を25で3時間攪拌した。この攪拌期間は、過剰な無水酢酸をクエンチするのに十分であることが示された。混合物を、クエン酸一水和物/水20/80w/w（112mL）で洗浄した。水相をジクロロメタン（50mL）で逆抽出した。逆抽出に使用されたジクロロメタンは取っておき、残りのクエン酸洗浄液から水相を逆抽出するために使用した。主なジクロロメタン抽出物を容器に戻し、水相のpHが2になるまでクエン酸洗浄プロセスを繰り返した（通常はさらに2回洗浄する）。合わせたクエン酸洗浄液を逆抽出した。次に、逆抽出物と主なジクロロメタン抽出物を合わせた。得られたジクロロメタン溶液を5%w/v NaHCO₃（100mL）で洗浄し、ジクロロメタン相を採取し、水（100mL）で洗浄した。ジクロロメタン相を蒸発容器に移し、酢酸エチル（50mL）を加え、溶液をシロップに濃縮した。

30

【0104】

酢酸エチル（150mL）を加え、攪拌しながら55に加熱することにより生成物を溶解させた。石油エーテル60-80（200mL）を加え、溶液を55に再加熱して5分間保持した。溶液を45に冷却し、種結晶（30mg）を加え、次に攪拌しながら3時間かけて18に冷却し、18で少なくとも1時間保持した。結晶を濾過により収集し、酢酸エチル/石油エーテル（1/2v/v、60mL）で洗浄した。減圧下で乾燥させると、化合物4（16.04g、2から77%）が得られた。予想収量：16.0g（化合物2から77%）。

40

【0105】

化合物3.1の合成

3-アミノプロパン-1-オール（7.01g、93mmol）をDCM（70mL）に溶解し、0に冷却した。クロロギ酸ベンジル（5.40mL、32mmol）をDCM（20mL）に溶解し、内部反応温度を10未満に保ちながら滴加した。完了したら、フラスコを室温で2時間攪拌した。NMR分析のために取り出された試料（IPC：20μL+0.6mL d₆-DMSO）は、クロロギ酸ベンジル試薬が消費されたことを

50

示していた。次に、生成物の混合物をクエン酸（10% w/w、2 × 90 mL）、水（90 mL）、およびブライン（90 mL）で洗浄した。次に、DCM（下）層を40 ℃の浴温にてロータリーエバポレーターで蒸発させ、わずかに濁った油/液体（6.455 g）を得た。この油を酢酸エチル（7 mL）に溶解し、必要に応じて40 ℃に温めて沈殿した固体を溶解し、次に室温まで冷却した。石油エーテル（4 mL）を種結晶と一緒に攪拌溶液にゆっくりと加え、その時点で生成物はゆっくりと結晶化し始めた。生成物の大部分が沈殿したら、石油エーテルの最後の部分（17 mL）をゆっくりと加えた（加えた全溶媒：酢酸エチル：石油エーテル1：3、21 mL）。次に、生成物を減圧下にて濾過し、石油エーテル（5 mL）で洗浄して、生成物を微細な白色の粉末（4.72 g）として得た。予想収量：約4.7 g（61%）。

10

【0106】

化合物5の合成

化合物4（1.05 g、1.73 mmol）を、乾燥アセトン（12 mL、0.06% w/w水）および水（39 μL、2.15 mmol、1.3当量）に周囲温度で溶解した。次に、溶液を-10 ℃に冷却した。NBS（0.639 g、3.59 mmol、2.08当量）を一度に加えた。およそ+7 ℃の発熱が予想され、次いで溶液を直ちに-10 ℃に再冷却した。NBS添加の15分後、反応混合物をIPCにかけた（HPLC、合格条件2.00面積%未満の化合物4が残っている）。反応が完了しなかった場合、1.00当量のNBS（0.307 g、1.73 mmol、1.00当量）を一度に加え、-10 ℃でさらに15分間反応を保持し、さらにIPCを実行した。NaHCO₃水溶液（5% w/v、5 mL）を加えることにより反応をクエンチし、冷却を停止し、以下の添加中に混合物を10~20 ℃に温めた。3~5分間攪拌した後、さらにNaHCO₃水溶液（5% w/v、5 mL）を加え、攪拌を5分間続けた。NaHCO₃水溶液（5% w/v、10 mL）の最終アリコートを手続きしながら加え、続いてチオ硫酸ナトリウム（20% w/v、5 mL）を加えた。混合物を20分間10~20 ℃で攪拌し、次に固体を濾過によって収集した。容器をNaHCO₃（5% w/v、25 mL）によりフィルターパッド上ですすぎ、このすすぎ液を濾別した。次に、フィルターケーキをNaHCO₃（5% w/v、25 mL）、次に水（25 mL）で連続的にすすいだ。（まだ湿っている）フィルターケーキをDCM（20 mL）に溶解し、2ロットのNaHCO₃（5% w/v、20 mL）で洗浄し、次に水（20 mL）で1回洗浄した。ジクロロメタン層を回転蒸発により乾燥させた後、65 ℃で酢酸エチル（36 mL）に溶解した。次に、石油エーテル60-80（10 mL）を攪拌しながらゆっくりと加え、混合物を45 ℃に冷却し、45 ℃で30分間攪拌した。追加の石油エーテル60-80（22 mL）を攪拌しながら加え、攪拌混合物を2時間かけて15 ℃に冷却した。生成物を濾過により収集し、石油エーテル/酢酸エチル2/1 v/v（20 mL）で洗浄し、次に減圧下にて乾燥させて、化合物5（0.805 g、83%収量、HPLCによる および アノマーの合計純度は98%であった）を得た。

20

30

【0107】

化合物7の合成

化合物4（500 mg）および中間体3.1（211 mg、1.2当量）を乾燥フラスコに量り入れ、トルエン（5 mL）を加え、溶液をロータリーエバポレーター（45 ℃の浴温）で濃縮した。これをもう一度繰り返した後、出発材料を無水DCM（5 mL）から濃縮した。すべての溶媒を除去したら、残りの固体を減圧下にて10分間乾燥させた。乾燥後、出発材料をアルゴン下に置き、無水DCM（5.0 mL）に溶解し、活性化4分子篩（450 mg、ペレット状）を加えた。この時点で、NIS試薬を高減圧下に置いて乾燥させた。10分後、乾燥NIS（400 mg、2.0当量）を加え、溶液を室温で30分間攪拌した。次に、TMSOTf（8 μL、5 mol%）をすばやく加え、これにより、溶液が赤/オレンジから濃い赤/褐色に変化した。反応温度も22 ℃から27 ℃に上昇した。TMSOTfを加えるとすぐに、参考までにIPCを実行した（HPLC；1 mL MeCN-H₂O（8：2）に10 μL）。次に、ピリジン（20 μL、0.245

40

50

mmol)を加えて反応をクエンチし、周囲温度で5分間攪拌した。DCM溶液を濾過して分子篩を除去し、10%Na₂S₂O₃(3×5mL)、ブライン(5mL)で洗浄し、ロータリーエバポレーター(40 浴温)で濃縮して、粗化合物7を発泡状の黄色い油(616mg)として得た。予想収量：約616mg、(99%)。

【0108】

化合物8の合成

粗化合物7(16.6g)を、トルエン(2×30mL)から、次に無水DCM(30mL)からの蒸発によって乾燥させて、黄色の発泡体/油を生成した。次に、フラスコをアルゴン雰囲気下に置いてから、無水DCM(100mL)および乾燥MeOH(260mL)を加え、混合物を攪拌した。次に、フラスコを0 に冷却した。内部温度を10 未満に維持しながら、塩化アセチル(3.30mL、2.0当量)を滴加した。添加が完了すると、混合物を周囲温度で16時間攪拌した。この時点でIPCを実行した(HPLC; 1mL MeCNに20μL、残留化合物7は3面積%以下)。次にフラスコを0 に冷却し、N-メチルモルホリン(合計7.0mLが必要)を加えることにより、生成物溶液のpHをpH6.5~7.5に調整した。生成物の混合物をDCM(50mL)で希釈し、H₂O(2×200mL)で洗浄した。2回目のH₂O洗浄物は濁っており、TLCによる標的材料が含まれていたため、これをDCM(50mL)で逆抽出した。次に、合わせたDCM層をブライン(8mL)で洗浄した後、40 の浴温にてロータリーエバポレーターで蒸発させて、オフホワイトの発泡体/油(約16.8g)を得た。この混合物を、140mLのトルエン(100mL+40mLの洗浄液)に溶解し、3カラム容積(CV)の石油エーテル中の30vol%酢酸エチルで平衡化されたシリカカラム(85gシリカ)に充填した。カラムは段階的な勾配を使用して溶出され、1CV(140mL)の画分を収集した。使用した勾配は次のとおりである：

石油エーテル中の30vol%酢酸エチル(3CV)

石油エーテル中の35vol%酢酸エチル(4CV)

石油エーテル中の40vol%酢酸エチル(9CV)

石油エーテル中の50vol%酢酸エチル(4CV)

石油エーテル中の60vol%酢酸エチル(3CV)

生成物を、12画分にわたって溶出した。すべての画分を、IPCにかけた(HPLC、230nmでのNMT1.50面積%の不純物ピーク)。合わせた画分を40 の浴温でロータリーエバポレーターで蒸発させ、オフホワイトの発泡体を得、これを固化させて8をカリカリした固体(10.45g)として得た。予想収量：10.45g(66%)。

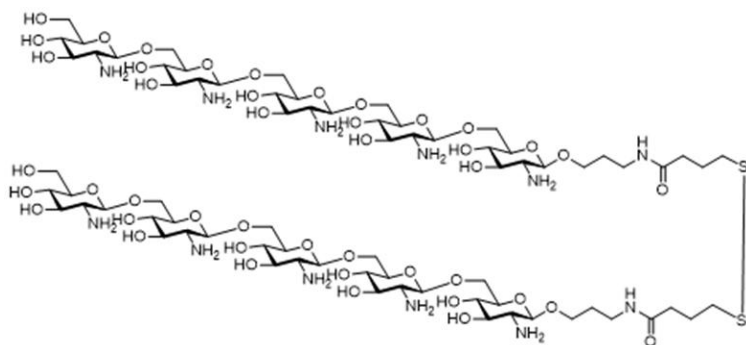
[実施例4]

【0109】

ジスルフィドの合成(化合物17)

【0110】

【化15】



【0111】

化合物17

化合物17を合成するための全体的な合成手順は、以下の合成スキームに記載される。

10

20

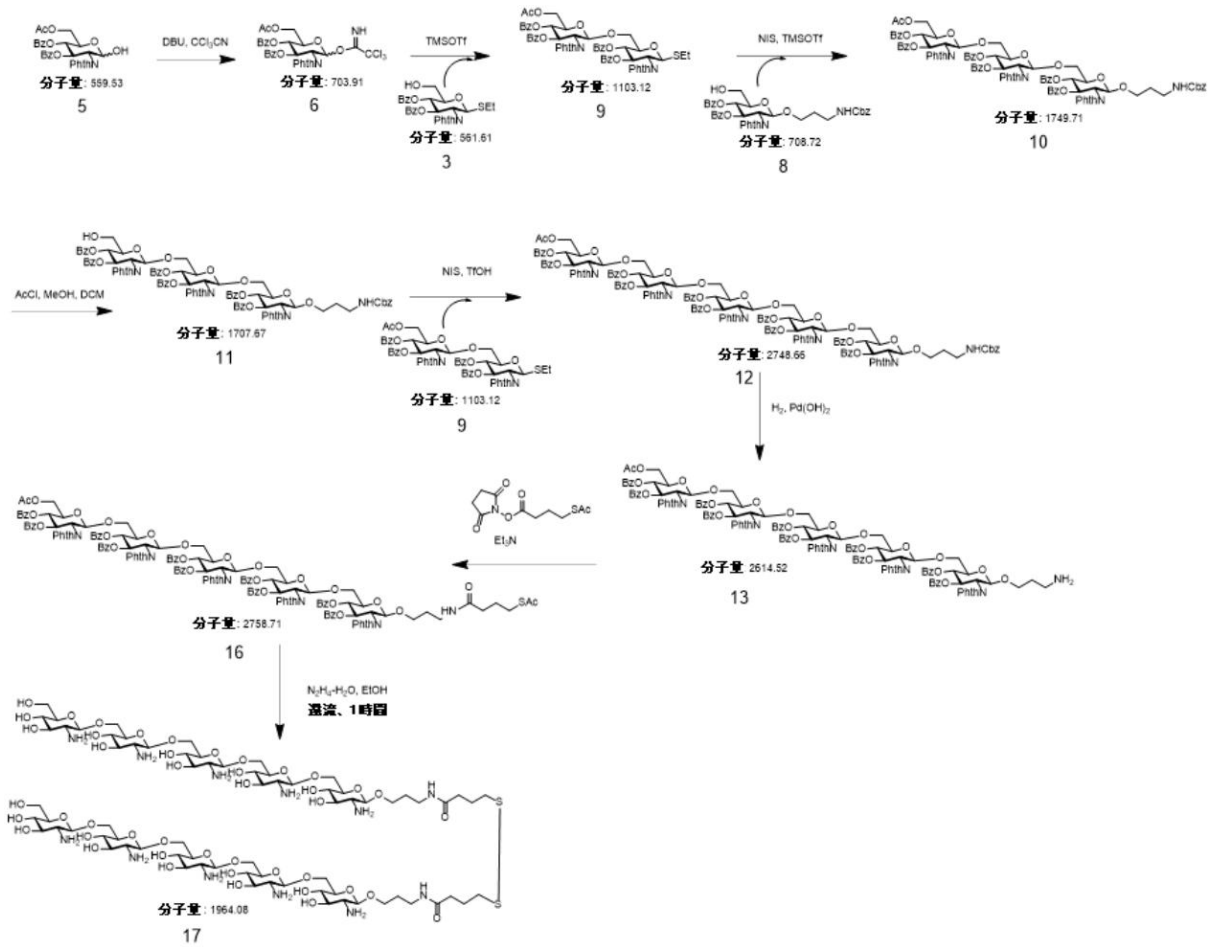
30

40

50

【 0 1 1 2 】

【 化 1 6 】



10

20

【 0 1 1 3 】

化合物 9 の合成

化合物 5 (1 6 2 0 g、 1 . 1 8 当量) およびトルエン (1 8 k g) を、この順序で 5 0 L のビュッヒボウルに充填した。ボウルを、 5 0 ± 1 0 に設定された水浴にて 3 0 分間温めた。溶媒が蒸留されなくなるまで、 5 0 ± 1 0 の水浴温を使用して減圧下にて蒸発を行った。水浴を 2 0 ± 1 0 に冷却した。トリクロロアセトニトリル (7 . 1 k g、 2 1 当量) および乾燥 D C M (6 . 5 k g) を、窒素雰囲気下でボウルに充填した。乾燥 D C M (2 5 0 g) 中の水素化ナトリウム (5 . 6 g、 0 . 0 6 0 当量) の懸濁液を、窒素雰囲気下でボウルに充填した。ボウルの内容物を、 2 0 ± 1 0 の水浴温で 1 ~ 2 時間回転させて混合した。化合物 5 を、反応中に溶解させた。ボウルの内容物をサンプリングし、反応完了 I P C (H ¹ N M R、 6 . 3 5 p p m (出発材料) のトリプレットと比較して 6 . 4 2 p p m (生成物) のトリプレットピークを統合 ; 合格条件 5 % の残留出発材料) にかけた。化合物 3 (1 3 6 0 g、 2 . 3 5 m o l)、乾燥 D C M (1 2 . 3 k g)、粉末分子篩 4 (1 3 6 g) をこの順序で 5 0 L 反応器に充填した。反応器の内容物を 2 4 時間混合した。反応器の内容物をシリンジフィルターでサンプリングし、カールフィッシャー (A M - G E N - 0 1 1、合格条件 0 . 0 3 % w / w) で分析した。水分閾値に達した後 (約 2 4 時間)、反応器の内容物を 0 ± 5 に調整した。ビュッヒボウルの内容物を、容量が許す限り反応器ヘッダーに移した。乾燥 D C M (1 2 5 0 g) 中のトリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート (1 0 0 g、 0 . 1 8 当量) の溶液を、窒素雰囲気下で反応器に充填した。ヘッダーの内容物を反応器に排出し、添加中、反応器の内容物を 0 ± 1 0 に維持した。添加には 1 5 ~ 2 0 分かかった。乾燥 D C M (1 2 5 0 g) をビュッヒボウルに充填し、反応器ヘッダーに移した。ヘッダーの内容物を反応器に排出し、添加中、反応器の内容物を 0 ± 1 0 に維持した。反応器の内容物を 0 ± 5 で

30

40

50

60分間攪拌した。反応器の内容物を、IPC (HPLC、合格基準 5% 出発物質) を使用して反応完了のためにサンプリングした。N-メチルモルホリン (85 g、0.36 当量) を反応器に充填することにより、反応をクエンチした。反応器の内容物を、IPC (湿潤pH紙、合格基準 pH7) を使用してクエンチ完了のためにサンプリングした。シリカゲル (4.9 kg) をビュッヒポウルに充填した。反応器の内容物を、ビュッヒポウルに移した。溶媒が蒸留されなくなるまで、 40 ± 10 の水浴温を使用して減圧下にて蒸発を行った。シリカゲル (1.4 kg) をビュッヒポウルに充填し、続いてジクロロメタン (7.0 kg) を使用して反応器をすすいだ。ポウルの内容物を回転させて、固体がポウルの表面に付着しないようにした。溶媒が蒸留されなくなるまで、 40 ± 10 の水浴温を使用して減圧下にて蒸発を行った。ポウルの内容物を、シリカゲルクロマトグラフィのために3つの部分に分割した。150 L KP-SILカートリッジをBiota 10 g システムに設置した。酢酸エチル (7.8 kg) および石油エーテル (22 kg) を、シリカゲルに吸着した反応混合物の1/3とともに、50 L 反応器に充填し、完全に混合してから、Biota g 溶媒リザーバーに移した。溶媒リザーバーの内容物を、カラムに通して溶出して、カラムを調整した。溶出液を20 Lのジェリー缶に収集し、廃棄した。カラムは3つのバッチで実行して、それぞれを以下に説明するように酢酸エチル/石油エーテルで溶出した。

【0114】

酢酸エチル (1.6 kg) および石油エーテル (4.4 kg) をBiota g 溶媒リザーバーに充填し、完全に混合してから、カラムから溶出した。カラムの流出液を20 L 20 のジェリー缶に収集した。

【0115】

酢酸エチル (25 kg) および石油エーテル (26 kg) を50 L 反応器に充填し、完全に混合し、2つのBiota g 溶媒リザーバーに移し、次に、カラムに通して溶出した。カラムの流出液を20 Lのジェリー缶に収集した。

【0116】

酢酸エチル (31 kg) および石油エーテル (22 kg) を50 L 反応器に充填し、完全に混合し、2つのBiota g 溶媒リザーバーに移し、次に、カラムに通して溶出した。カラムの流出液を5 Lのガラスボトルに収集した。

【0117】

酢酸エチル (16 kg) をBiota g 溶媒リザーバーに充填し、次に、カラムから溶出した。カラムの流出液を20 Lのジェリー缶に収集した。

【0118】

乾燥負荷シリカの残りの2つの部分を用意して、上記のようにカラムを繰り返した。

【0119】

カラム画分を生成物純度 (TLC [トルエン中10% アセトン、Rf 0.5]) でサンプリングして、生成物を含む画分を同定した。受け入れられたカラム画分を合わせて、100 L ビュッヒポウルに入れた。トルエンを使用して、受け入れられた画分容器から結晶性材料をすすいでポウルに入れた。溶媒が蒸留されなくなるまで、 40 ± 10 の水浴温を使用して減圧下にて蒸発を行った。トルエン (1.7 kg) をポウルに充填し、固体が溶解するまで内容物を回転させた。t-ブチルメチルエーテル (4.4 kg) を、20~40分かけてポウルに充填した。ポウルの内容物を、 20 ± 5 の温度で12~24時間回転させた。ポウルの内容物を6 L ヌツェフィルターに移し、減圧濾過によって溶媒を除去した。t-ブチルメチルエーテル (620 g) をポウルに充填し、ヌツェフィルターに移し、フィルターケーキに通した。フィルターケーキをフィルター内で風乾した後、真空オープンに移し、30 の設定で減圧下にて乾燥させて残留溶媒を除去した。分析および保持のために固体をサンプリングした。固体をねじ蓋付きナルゲン容器に移し、-15 以下で保存した。予想収量：1.68~1.94 kg 化合物9 (65~75%)。

【0120】

化合物10の合成

10

20

30

40

50

試薬を以下のように調製した：N - ヨードスクシンイミド (2 4 1 g、2 . 2 0 当量) を、3 0 に設定した真空オープン内で減圧下にて2 4 時間乾燥させた。水 (3 0 0 0 g) 中の塩化ナトリウム (3 0 0 g) 溶液を、5 L のラボボトルで調製した。水 (6 0 0 0 g) 中のチオ硫酸ナトリウム (1 1 0 0 g) の溶液を、5 0 L の反応器で調製し、2 つの部分に分配した。

【 0 1 2 1 】

化合物 8 (3 5 5 g、0 . 4 8 6 m o l) および化合物 9 (6 3 4 g、1 . 1 0 当量) を、2 0 L ビュッヒポウルに充填し、続いてトルエン (1 5 0 0 g) を入れ、溶解するまで $4 0 \pm 5$ で加熱した。溶媒が蒸留されなくなるまで、 $3 5 \pm 1 0$ の水浴温を使用して減圧下にて蒸発を行った。トルエン (1 5 0 0 g) をビュッヒポウルに充填した。溶媒が蒸留されなくなるまで、 $3 5 \pm 1 0$ の水浴温を使用して減圧下にて蒸発を行った。乾燥ジクロロメタン (4 0 0 0 g) をビュッヒポウルに充填した。固体が溶解するまでポウルを回転させ、溶液をジャケット温度 $2 0 \pm 5$ の 5 L 反応器に移した。乾燥ジクロロメタン (7 1 0 g) をビュッヒポウルに充填した。ポウルを回転させてポウル表面をすすぎ、溶液を 5 L 反応器に移した。反応器の内容物を、試薬比 I P C (H^1 N M R) のためにサンプリングした。乾燥 N - ヨードスクシンイミドを窒素雰囲気下で反応器に入れ、反応器を 5 ~ 1 5 分間攪拌した。反応器の内容物を、 $2 0 \pm 3$ に調整した。乾燥 D C M (6 0 g) 中のトリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート (5 . 9 4 g、0 . 0 5 5 当量) を、内容物の温度を $2 0 \pm 3$ に維持しながら 5 ~ 1 5 分かけて反応器に充填した。反応混合物を、 $2 0 \pm 3$ で $2 0 \pm 3$ 分間攪拌した。反応器の内容物を、反応完了 (H P L C) のためにサンプリングした。N - メチルモルホリン (9 8 g、2 当量) を反応器に充填し、完全に混合した。上で調製したチオ硫酸ナトリウム溶液の一部の 1 つを 5 0 L 反応器に充填した。5 L の反応器の内容物を、チオ硫酸ナトリウム溶液を含有する 5 0 L の反応器に移し、完全に混合した。最下層を、H D P E ジェリー缶に排出した。

10

20

【 0 1 2 2 】

D C M (5 7 0 g) を、5 0 L 反応器からの最上層とともに 5 L 反応器に充填し、完全に混合した。最下層を、H D P E ジェリー缶の前の最下層と合わせた。最上層を別の H D P E ジェリー缶に移し、収量が確認されるまで保持した。合わせた有機相 (下層) を 5 0 L の反応器に入れ、続いてチオ硫酸ナトリウムの別の部分を入れ、完全に混合した。最下層を、H D P E ジェリー缶に排出した。最上層を、収量が確認されるまで H D P E ジェリー缶に保持した。塩化ナトリウム溶液を有機相 (下層) とともに 5 0 L 反応器に充填し、完全に混合した。シリカゲル (1 3 0 0 g) をビュッヒポウルに充填し、ロータリーエバポレーターを取り付けた。反応器の最下層を、ビュッヒポウルに充填した。ポウルの内容物を回転させてポウルへの吸着を防ぎ、固体が蒸留されなくなるまで $4 0 \pm 5$ の水浴温を使用して減圧下にて蒸発を行った。ポウルの内容物を、2 つの等しい部分に分割した。シリカゲル (2 0 0 g) をビュッヒポウルに充填し、続いてジクロロメタン (7 0 0 g) を充填した。ポウルの内容物を回転させて、固体がポウルの表面に付着しないようにした。溶媒が蒸留されなくなるまで、ポウルを、 $4 0 \pm 1 0$ の水浴温で減圧下にて蒸発させた。ポウルの内容物を、2 つの部分に分割し、前のシリカゲル試料のそれぞれに一部を加えた。

30

40

【 0 1 2 3 】

各部分を、以下の手順を使用してシリカゲル上で独立して精製した (精製を待つ間、試料を $1 5$ 以下で保存した) : 1 5 0 L K P - S I L カートリッジを B i o t a g e システムに設置した。酢酸エチル (1 5 . 5 k g) および石油エーテル (1 6 . 5 k g) を 5 0 L 反応器に充填し、完全に混合し、次に 2 つの B i o t a g e 溶媒リザーバーに移した。溶媒リザーバーの内容物を、カラムに通して溶出して、カラムを調整した。溶出液を 2 0 L のジェリー缶に収集し、廃棄した。上記からの乾燥充填シリカの一部を B i o t a g e S a m p l e - I n j e c t i o n M o d u l e (S I M) に充填し、以下のよう酢酸エチル / 石油エーテルで溶出した。

50

【0124】

酢酸エチル(6.2kg)および石油エーテル(6.6kg)を50L反応器に充填し、完全に混合し、次にBiotage溶媒リザーバーに移した。カラムの流出液を20Lのジェリー缶に収集した。

【0125】

酢酸エチル(19.5kg)および石油エーテル(19.2kg)を50L反応器に充填し、完全に混合し、2つのBiotage溶媒リザーバーに移し、次に、カラムに通して溶出した。カラムの流出液を20Lのジェリー缶に収集した。

【0126】

酢酸エチル(13.6kg)および石油エーテル(12.3kg)を50L反応器に充填し、完全に混合し、2つのBiotage溶媒リザーバーに移し、次に、カラムに通して溶出した。カラムの流出液を20Lのジェリー缶に収集した。

【0127】

酢酸エチル(14.2kg)および石油エーテル(11.9kg)を50L反応器に充填し、完全に混合し、2つのBiotage溶媒リザーバーに移し、次に、カラムに通して溶出した。カラムの流出液を20Lのジェリー缶に収集した。

【0128】

酢酸エチル(29.7kg)および石油エーテル(22.9kg)をBiotage溶媒リザーバーに充填し、次にカラムから溶出した。カラムの流出液を、画分11まで20Lのジェリー缶に、次に5LのHDPEジェリー缶に収集した。

【0129】

酢酸エチル(15.5kg)および石油エーテル(11.0kg)をBiotage溶媒リザーバーに充填し、次にカラムから溶出した。カラムの流出液を5LのHDPEジェリー缶に収集した。

【0130】

酢酸エチル(29.7kg)および石油エーテル(13.2kg)をBiotage溶媒リザーバーに充填し、次にカラムから溶出した。カラムの流出液を5LのHDPEジェリー缶に収集した。

【0131】

酢酸エチル(15.5kg)をBiotage溶媒リザーバーに充填し、次に、カラムから溶出した。カラムの流出液を5LのHDPEジェリー缶に収集した。

【0132】

カラム画分を、生成物純度についてサンプリングした(生成物を含む画分を同定するためのTLC)。最初の2つのカラムからの75~95%の面積の化合物10である画分を、シリカゲル(400g)を充填したビュッヒポウル内で合わせ、溶媒が蒸留されなくなるまで、 40 ± 10 の水浴温を使用して減圧下にて蒸発を行った。ポウルの内容物を以下のように精製した: 150L KP-SILカートリッジをBiotageシステムに設置した。酢酸エチル(15.5kg)および石油エーテル(16.5kg)を50L反応器に充填し、完全に混合し、次に2つのBiotage溶媒リザーバーに移した。溶媒リザーバーの内容物を、カラムに通して溶出して、カラムを調整した。溶出液を20Lのジェリー缶に収集し、廃棄した。ポウルの内容物をBiotage Sample-Injection Module (SIM)に充填し、以下のように酢酸エチル/石油エーテルで溶出した:

【0133】

酢酸エチル(6.2kg)および石油エーテル(6.6kg)を50L反応器に充填し、完全に混合し、次にBiotage溶媒リザーバーに移した。カラムの流出液を20Lのジェリー缶に収集した。

【0134】

酢酸エチル(19.5kg)および石油エーテル(19.2kg)を50L反応器に充填し、完全に混合し、2つのBiotage溶媒リザーバーに移し、次に、カラムに通し

10

20

30

40

50

て溶出した。カラムの流出液を20Lのジェリー缶に収集した。

【0135】

酢酸エチル(13.6kg)および石油エーテル(12.3kg)を50L反応器に充填し、完全に混合し、2つのBiotaqe溶媒リザーバーに移し、次に、カラムに通して溶出した。カラムの流出液を20Lのジェリー缶に収集した。

【0136】

酢酸エチル(14.2kg)および石油エーテル(11.9kg)を50L反応器に充填し、完全に混合し、2つのBiotaqe溶媒リザーバーに移し、次に、カラムに通して溶出した。カラムの流出液を20Lのジェリー缶に収集した。

【0137】

酢酸エチル(29.7kg)および石油エーテル(22.9kg)をBiotaqe溶媒リザーバーに充填し、次にカラムから溶出した。カラムの流出液を、画分11まで20Lのジェリー缶に、次に5LのHDPEジェリー缶に収集した。

【0138】

酢酸エチル(15.5kg)および石油エーテル(11.0kg)をBiotaqe溶媒リザーバーに充填し、次にカラムから溶出した。カラムの流出液を5LのHDPEジェリー缶に収集した。

【0139】

酢酸エチル(29.7kg)および石油エーテル(13.2kg)をBiotaqe溶媒リザーバーに充填し、次にカラムから溶出した。カラムの流出液を5LのHDPEジェリー缶に収集した。

【0140】

酢酸エチル(15.5kg)をBiotaqe溶媒リザーバーに充填し、次に、カラムから溶出した。カラムの流出液を5LのHDPEジェリー缶に収集した。

【0141】

3つのカラムすべてから受け入れられたカラム画分をビュッヒポウル内で合わせ、溶媒が蒸留されなくなるまで、 40 ± 10 の水浴温を使用して減圧下にて蒸発を行った。分析および保持のために、ポウルの内容物をサンプリングした。ポウルを密封し、-15の保存場所に移した。予想収量：440~540kg(52~64%の収量)。

【0142】

化合物11の合成

ジクロロメタンを、化合物10(635g、0.345mol)(PN0699)を含有するビュッヒポウルに充填し、溶解するまで 30 ± 10 で加熱した。メタノール(3.2kg)をポウルに充填した。ポウルの内容物を、 0 ± 3 に調整した。内容物の温度を 0 ± 10 に維持しながら、ジクロロメタン(660g)中の塩化アセチル(54.1g、2当量)を、ポウルに充填した。ポウルの内容物を 20 ± 3 に調整し、混合物を40~48時間攪拌した。ポウルの内容物を、反応完了IPC(HPLC、合格)のためにサンプリングした。ポウルの内容物を、 0 ± 3 に調整した。N-メチルモルホリン(139g、4当量)をポウルに充填し、完全に混合した。ポウルの内容物を、クエンチ完了IPC(pH紙、合格pH7)のためにサンプリングした。ポウルの内容物を、 35 ± 10 の水浴で減圧下にて濃縮した。酢酸エチル(4.8kg)および水(5.5kg)をビュッヒポウルに充填し、回転させてポウルの内容物を溶解させた。ポウルの内容物を、50Lの反応器に移し、完全に混合した。最下層を、HDPEジェリー缶に排出した。最上層をロータリーエバポレーターを取り付けたビュッヒポウルに移し、内容物を、 35 ± 10 の水浴で減圧下にて濃縮した。HDPEジェリー缶の最下層を、酢酸エチル(1.5kg)を入れた50L反応器に充填し、完全に混合した。最下層を、HDPEジェリー缶に排出し、収量が確認されるまで保持した。最上層をロータリーエバポレーターを取り付けたビュッヒポウルに移し、内容物を、 35 ± 10 の水浴で減圧下にて濃縮した。分析および保持のために、ポウルの内容物をサンプリングした。ポウルを密封し、-15の保存場所に移した。予想収量：518~633kg(90~110%の収量)。

10

20

30

40

50

【0143】

化合物12の合成

試薬を以下のように調製した：N-ヨードスクシンイミドの2つの部分（143 g、3.90当量）を、30 に設定した真空オープン内で減圧下にて24時間乾燥させた。水（1850 g）中の塩化ナトリウム（450 g）の溶液を、5 Lのラボボトルで調製し、2つのほぼ等しい部分に分配した。水（2080 g）中のチオ硫酸ナトリウム（230 g）の溶液を、5 Lのラボボトルで調製し、4つのほぼ等しい部分に分配した。

【0144】

化合物9（504 g、1.30当量）を、化合物11（607 g、0.327 mol）、続いてトルエン（1500 g）を含有する50 Lのビュッヒポウルに充填し、溶解するまで40 ± 5 で加熱した。溶媒が蒸留されなくなるまで、35 ± 10 の水浴温を使用して減圧下にて蒸発を行った。トルエン（1500 g）をビュッヒポウルに充填した。溶媒が蒸留されなくなるまで、35 ± 10 の水浴温を使用して減圧下にて蒸発を行った。乾燥DCM（2400 g）を、ビュッヒポウルに充填した。固体が溶解するまでポウルを回転させ、溶液の半分をジャケット温度20 ± 5 の5 L反応器に移した。溶液の残りの半分を、5 Lのラボボトルに移した。乾燥DCM（710 g）を、ビュッヒポウルに充填した。ポウルを回転させてポウル表面をすすぎ、溶液の半分を5 L反応器に移した。残りの半分を、上記の5 Lラボボトルに充填し、第2のバッチで使用するために窒素下で保存した。乾燥N-ヨードスクシンイミドの一部を、窒素雰囲気下で反応器に充填した。反応器の内容物を、-40 ± 3 に調整した。乾燥ジクロロメタン（90 g）中のトリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート（9.09 g、0.25有効当量）を、内容物の温度を-40 ± 5 に維持しながら15分かけて反応器に充填した。反応混合物を、-40 ± 3 で30 ± 5分間攪拌し、次に、-30 ± 3 に調整し、150分間攪拌した。反応器の内容物を、反応完了のためにサンプリングした。N-メチルモルホリン（33.1 g、2有効当量）を反応器に充填し、完全に混合した。上で調製したチオ硫酸ナトリウム溶液の部分の1つを5 L反応器に充填し、完全に混合した。最下層を、5 Lのラボボトルに排出した。DCM（400 g）を、5 L反応器に充填し、完全に混合した。最下層を、5 Lのラボボトルの前の最下層と合わせた。合わせた有機相を5 Lの反応器に充填し、続いてチオ硫酸ナトリウムの別の部分を入れ、完全に混合した。最下層を、5 Lのラボボトルに排出した。上の塩化ナトリウム溶液の部分の1つを反応器に充填し、続いて前のラボボトルの内容物を入れた。反応器の最下層を、ビュッヒポウルに充填し、溶媒が蒸留されなくなるまで、40 ± 10 の水浴温を使用して減圧下にて蒸発させた。反応器を洗浄して乾燥させた。

【0145】

化合物9と化合物11の第2の部分の部分を反応器に充填し、第1のバッチと同じように処理した。第2のバッチの有機抽出に続いて、反応混合物を反応器内で合わせた。塩化ナトリウム溶液の部分の1つを反応器に充填し、完全に混合した。シリカゲル（1700 g）をビュッヒポウルに充填し、rotavaporを取り付けた。反応器の最下層を、ビュッヒポウルに充填し、溶媒が蒸留されなくなるまで、40 ± 10 の水浴温を使用して減圧下にて蒸発させた。ポウルの内容物を、2つの等しい部分に分割し、シリカゲルで独立して精製した。150 L KP-SILカートリッジをBiotageシステム（Dyax Corporation、Charlottesville、Virginia、USAの一部門であるBiotageから市販されている）に設置した。酢酸エチル（7.7 kg）および石油エーテル（22.0 kg）を50 L反応器に充填し、完全に混合し、次に2つのBiotage溶媒リザーバーに移した。溶媒リザーバーの内容物を、カラムに通して溶出して、カラムを調整した。溶出液を20 Lのジェリー缶に収集し、廃棄した。上記からの乾燥充填シリカの一部をBiotage Sample-Injection Module（SIM）に充填し、以下のように酢酸エチル/石油エーテルで溶出した。

【0146】

酢酸エチル（1.5 kg）および石油エーテル（4.4 kg）をHDPEジェリー缶に

充填し、完全に混合し、次にB i o t a g e 溶媒リザーバーに移した。カラムの流出液を20Lのジェリー缶に収集した。

【0147】

酢酸エチル(18.6kg)および石油エーテル(8.8kg)を50L反応器に充填し、完全に混合し、2つのB i o t a g e 溶媒リザーバーに移し、次に、カラムに通して溶出した。カラムの流出液を20Lのジェリー缶に収集した。

【0148】

酢酸エチル(19.2kg)および石油エーテル(8.4kg)を50L反応器に充填し、完全に混合し、2つのB i o t a g e 溶媒リザーバーに移し、次に、カラムに通して溶出した。カラムの流出液を20Lのジェリー缶に収集した。

10

【0149】

酢酸エチル(29.7kg)および石油エーテル(11.9kg)を50L反応器に充填し、完全に混合し、2つのB i o t a g e 溶媒リザーバーに移し、次に、カラムに通して溶出した。カラムの流出液を20Lのジェリー缶に収集した。

【0150】

酢酸エチル(15.5kg)をB i o t a g e 溶媒リザーバーに充填し、次に、カラムから溶出した。カラムの流出液を5Lのガラスラボボトルに収集した。

【0151】

カラム画分を、生成物純度についてサンプリングした(生成物を含む画分を同定するためのTLC)。最初の2つのカラムからの75~95%の面積の化合物12である画分を、シリカゲル(400g)を充填したビュッヒポウル内で合わせ、溶媒が蒸留されなくなるまで、 40 ± 10 の水浴温を使用して減圧下にて蒸発を行った。酢酸エチル(7.7kg)および石油エーテル(22.0kg)を50L反応器に充填し、完全に混合し、次に2つのB i o t a g e 溶媒リザーバーに移した。溶媒リザーバーの内容物を、カラムに通して溶出して、カラムを調整した。溶出液を20Lのジェリー缶に収集し、廃棄した。不純生成物を含む乾燥充填シリカを、B i o t a g e S a m p l e - I n j e c t i o n M o d u l e (S I M) に充填し、以下に詳述するように溶出した：

20

【0152】

酢酸エチル(1.5kg)および石油エーテル(4.4kg)を50L反応器に充填し、完全に混合し、次にB i o t a g e 溶媒リザーバーに移した。カラムの流出液を20Lのジェリー缶に収集した。

30

【0153】

酢酸エチル(19.2kg)および石油エーテル(8.4kg)を50L反応器に充填し、完全に混合し、2つのB i o t a g e 溶媒リザーバーに移し、次に、カラムに通して溶出した。カラムの流出液を20Lのジェリー缶に収集した。

【0154】

酢酸エチル(18.6kg)および石油エーテル(8.8kg)を50L反応器に充填し、完全に混合し、2つのB i o t a g e 溶媒リザーバーに移し、次に、カラムに通して溶出した。カラムの流出液を20Lのジェリー缶に収集した。

【0155】

酢酸エチル(29.7kg)および石油エーテル(11.9kg)を50L反応器に充填し、完全に混合し、2つのB i o t a g e 溶媒リザーバーに移し、次に、カラムに通して溶出した。カラムの流出液を20Lのジェリー缶に収集した。

40

【0156】

酢酸エチル(15.5kg)をB i o t a g e 溶媒リザーバーに充填し、次に、カラムから溶出した。カラムの流出液を5Lのガラスラボボトルに収集した。

【0157】

カラム画分を、生成物純度についてサンプリングした(生成物を含む画分を同定するためのTLC、HPLC合格基準 95%化合物12、および>2.5% 単一不純物なし)。3つのカラムすべてから受け入れられたカラム画分をビュッヒポウル内で合わせ、溶

50

媒が蒸留されなくなるまで、 40 ± 10 の水浴温を使用して減圧下にて蒸発を行った。分析および保持のために、ポウルの内容物をサンプリングした。ポウルを密封し、 -15 の保存場所に移した。予想収量： $494 \sim 584$ kg ($52 \sim 64\%$ の収量)。

【0158】

化合物13の合成

氷酢酸 (7.5 kg) および酢酸エチル (6.5 kg) を、好適な容器内で合わせ、「GAA/EA溶液」とラベル付けした。重炭酸ナトリウム (0.5 kg) を、RO水 (10 kg) に溶解し、「 5% w/w重炭酸ナトリウム溶液」とラベル付けした。活性炭素上のパラジウム (100 g、具体的にはJohnson Matthey、Aliso Viejo、California、USA、製品番号A402028-10) およびGAA/EA溶液 (335 g) を、この順序で反応容器に充填した。化合物12 (270 g) をGAA/EA溶液 (1840 g) に溶解し、 50 Lの反応容器に移した。溶液を窒素で 10 バールまで加圧することにより酸素をパージし、次に解放した。これをさらに 2 回繰り返した。反応器の内容物を水素下で 10 バールまで加圧し、次に解放した。反応混合物を 1.5 日間 20 バール H_2 で水素化した。次に圧力を解放し、窒素で 10 バールまで加圧して溶液から水素をパージし、次に解放した。これを 1 回繰り返した。反応混合物をセライトパッド (300 g) で濾過した。セライトケーキをGAA/EA溶液 (2×5.5 kg) で洗浄した。濾液を合わせ、減圧下にて蒸発させた (浴温 40 ± 5)。残留物を酢酸エチル (2.3 kg) と 2 回に分けて共蒸発させた。粗生成物の予想重量は約 316 gであった。Biotaqeシステムに、 5 LのSample Injection Module (SIM) を備えた 150 MKP-SILカートリッジを取り付けた。酢酸エチル (10.6 kg) および氷酢酸 (1.4 kg) を 50 L反応器に充填し、完全に混合し、次にBiotaqe溶媒リザーバーに移した。溶媒リザーバーの内容物を、カラムに通して溶出して、カラムを調整した。溶出液を廃棄した。粗生成物を酢酸エチル (422 g) および氷河酢酸 (55 g) に溶解した。得られた溶液をSIMに充填し、カラムに通した。反応混合物を、以下のようにクロマトグラフ処理した：

10

20

【0159】

酢酸エチル (13.8 kg) および氷酢酸 (1.8 kg) を 50 L反応器に充填し、完全に混合し、次にBiotaqe溶媒リザーバーに移した。

【0160】

溶媒リザーバーの内容物を、SIMを介してカラムに通して溶出して、溶出液を 20 Lのジェリー缶に収集した。

30

【0161】

酢酸エチル (10.3 kg)、氷酢酸 (1.3 kg) およびメタノール (206 g) を 50 L反応器に充填し、完全に混合し、次にBiotaqe溶媒リザーバーに移した。

【0162】

溶媒リザーバーの内容物を、カラムに通して溶出して、溶出液を 5 Lのジェリー缶に収集した。

【0163】

酢酸エチル (6.6 kg)、氷酢酸 (0.9 kg) およびメタノール (340 g) を 50 L反応器に充填し、完全に混合し、次にBiotaqe溶媒リザーバーに移した。

40

【0164】

溶媒リザーバーの内容物を、カラムに通して溶出して、溶出液を約 2.5 Lの画分で 5 Lのジェリー缶に収集した。

【0165】

酢酸エチル (31.4 kg)、氷酢酸 (4.1 kg) およびメタノール (3.40 kg) を 50 L反応器に充填し、完全に混合し、次にBiotaqe溶媒リザーバーに移した。

【0166】

溶媒リザーバーの内容物を、カラムに通して溶出して、溶出液を 5 Lのジェリー缶に収

50

集した。

【0167】

化合物13を含む画分を合わせ、減圧下にて蒸発させた(浴温 40 ± 5)。残留物を酢酸エチル(3.1kg)に溶解し、5%w/w重炭酸ナトリウム溶液(9.3kg)で洗浄して、水性媒体のpHが8になるようにした。酢酸エチル相を、減圧下にて蒸発させた(浴温 40 ± 5)。分析および保持のために、ポウルの内容物をサンプリングした。予想収量: 182~207g(71~81%)。

【0168】

化合物16の合成

乾燥ジクロロメタン(2.5kg)を、化合物13(211g、76.5mmol、1.00当量)を含有するピュッヒポウルに充填し、溶解するまで加熱せずに回転させた。乾燥ジクロロメタン(200g)中の(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)4-アセチルスルファニルブタノエート(25.8g、99.4mmol、1.30当量)溶液を、ピュッヒポウルに加えた。ポウルを周囲温度で1時間回転させた後、 40 ± 5 の水浴温で減圧下にて濃縮した。トルエン(0.8kg)をポウルに加え、 40 ± 5 の水浴温で2回減圧下にて除去した。残留物にトルエン(0.8kg)を加えて溶解させた。シリカゲル(557g)を反応容器に入れ、 40 ± 5 の水浴温で減圧下にて溶媒を除去した。Biota Systemに、5LのSample Injection Module(SIM)を備えた150M KP-SILカートリッジを取り付けた。トルエン(10.1kg)およびアセトン(1.0kg)を50Lの反応器に充填し、完全に混合し、次にBiota溶媒リザーバーに移した(溶媒A)。反応混合物を、以下のように精製した:

【0169】

溶媒Aを、カラムに通して溶出して、カラムを調整した。溶出液を廃棄した。

【0170】

乾燥充填シリカゲルをSIMに移した。

【0171】

トルエン(9.6kg)およびアセトン(1.5kg)を50Lの反応器に充填し、完全に混合し、次にBiota溶媒リザーバーに移した(溶媒B)。

【0172】

溶媒Bを、カラムに通して溶出して、溶出液を5Lのジェリー缶に収集した。

【0173】

トルエン(53.6kg)およびアセトン(12.2kg)を50Lの反応器に充填し、完全に混合し、次にBiota溶媒リザーバーに移した(溶媒C)。

【0174】

溶媒Cを、カラムに通して溶出して、溶出液を5Lのジェリー缶に収集する。

【0175】

トルエン(8.4kg)およびアセトン(2.6kg)を50Lの反応器に充填し、完全に混合し、次にBiota溶媒リザーバーに移した(溶媒D)。

【0176】

溶媒Dを、カラムに通して溶出して、溶出液を5Lのジェリー缶に収集した。

【0177】

トルエン(23.4kg)およびアセトン(9.2kg)を50Lの反応器に充填し、完全に混合し、次にBiota溶媒リザーバーに移した(溶媒E)。

【0178】

溶媒Eを、カラムに通して溶出して、溶出液を5Lのジェリー缶に収集した。

【0179】

化合物16を含有する画分(合格基準 90%化合物16および $> 2.5\%$ 単一不純物なし)を合わせ、減圧下にて蒸発させた(浴温 40 ± 5)。残留物をテトラヒドロフラン(4.4kg)に溶解し、 40 ± 5 の水浴温で減圧下にて濃縮した。分析および保

持のために、ボウルの内容物をサンプリングした。予想収量：169～192 g（76～86%）。

【0180】

化合物17の合成

反応器には、始動する前に、2.5 L、3.5 L、および3.9 Lのレベルに印をつけ、これを真空コントローラに取り付けた。ジクロロメタンを140 gの化合物16を含有するビュッヒボウルに充填し、Reactor Ready容器に移した。DCM（333 g）で2回すすいで、ビュッヒボウルの内容物をReactor Ready容器に移した。エタノール（2.50 kg）をReactor Readyに加え、反応混合物を2.5 Lの印まで濃縮した（目標減圧 250 mbar）。エタノール（1.58 kg）をReactor Readyに加え、3.5 Lの印まで濃縮した。反応物を、エタノールで3.9 Lの印まで希釈した。不完全真空を適用し、窒素を放出することにより、反応器の内容物を不活性ガス下に置いた。反応中、緩徐な窒素の流れを維持した。ヒドラジン水和物（1.13 kg、1.11 L）を窒素雰囲気下で5 L Reactor Ready容器に充填した。温度勾配を、以下のように設定した：初期温度20、最終温度60、50分（0.8度/分）を超える線形温度勾配、および反応器の内容物の能動制御。容器の温度を、60で45分間保持した。冷却勾配温度を-2度/分に設定し、最終温度は20であった。内容物を、好適なHDPEジャグに排出し、重量を決定した。等量をFEPカプセル化シール付きの8つのポリプロピレン遠心分離容器に移した。各遠心分離容器にエタノール（750 g）を充填し、周囲温度で30分間攪拌した。容器を遠心分離にかけた（5300 RCF、15、30分）。ヒュームフードから取り出す前に、ボトルの外側をアセトン、次に水ですすぐことにより、容器の外側にある残留ヒドラジンを除去した。遠心分離容器の上清をデカントし、残留ペレットを低エンドトキシ水（LE水）（1960 g）に溶解し、5 L Reactor Ready容器に移した。1.5時間ごとにおよそ15～20分、分散管を使用して溶液に通気しながら内容物を中速で攪拌した。次に、反応物を密閉容器内で20にて一晩攪拌した。IPCにより、遊離ペンタマー組成が3%（報告された全体の面積%）未満であると示されたら、反応は完了したとみなされた。反応混合物に不溶性材料が存在する場合は、濾過（P3焼結ガラス漏斗および5 Lプフナーフラスコを使用）が必要であった。反応器の内容物を、2つのLyoguardトレイ内で凍結乾燥した。棚温度は16～20時間-0.5に設定し、次に乾燥するまで20に設定した。凍結乾燥製品をLE水（840 g）に溶解し、6つの遠心分離ボトルに均等に分けた。15分間攪拌した各容器に、アセトン（630 g）を加えた。イソプロパノール（容器あたり630 g）を各容器に加え、20分間攪拌を続けた。内容物を5300 RCF、15で1時間遠心分離にかけた。上清を廃棄し、LE水（140 g）を各容器に加え、ペレットが溶解するまでオービタルシェーカーを使用して周囲で混合物を攪拌することにより、各ペレットを水に溶解した。アセトン（630 g）を各容器に加え、15分間攪拌した。イソプロパノール（容器あたり630 g）を各容器に加え、20分間攪拌を続けた。内容物を5300 RCF、15で1時間遠心分離にかけた。上清を廃棄し、LE水（100 g）を加えて周囲で攪拌することにより、各ペレットを水に溶解した。溶液をLyoguardトレイに移し、ボトルをさらにLE水（各66 g）ですすぎ、すすぎ液を同じトレイに移した。棚温度は16～20時間-0.5に設定し、次に乾燥するまで20に設定して、生成物を凍結乾燥した。分析および保持のために凍結乾燥生成物をサンプリングした。Lyoguardトレイは二重包装にして、ラベル付けし、冷凍庫（-15）内で保存した。凍結乾燥生成物の効力を、qHNMRを使用して決定した。この手順により、粗ペンタダイマー（Penta Dimer）17が得られた。予想収量：26.1～35.5 g（61～83%）。

【0181】

化合物17の同一性を、500 MHz機器を使用する¹Hおよび¹³C NMRによって決定した。t-ブタノールの参照溶液は、D₂O中25 mg/mLで調製した。試料は、D₂O中13 mg/mLで調製し、参照溶液を試料に加える。最終試験試料の組成は、

ペンタダイマー 10 mg/mL および t - ブタノール 5 mg/mL であった。¹H および ¹³C スペクトルを取得し、統合した。得られた化学的シフトを、理論的シフトとの比較によって割り当てた。¹H NMR および ¹³C NMR スペクトルをそれぞれ図 1 および 2 に示す。

[実施例 5]

【 0 1 8 2 】

粗ペンタダイマーの遊離塩基形態への変換。

Amberlite FPA91 (1.46 kg; 40 g/g の粗ペンタダイマー - 効力を補正) を、大カラムに充填した。10 L の Schott ボトル内の LE 水 (8.00 kg) に、NaOH (32 g) を加えることにより、8 L の 1.0 M NaOH の溶液を調製した。この溶液を、1 時間かけて Amberlite 樹脂に通した。LE 水 (40.0 kg) を Amberlite 樹脂に通した。フロースルーで pH が < 8.0 になるまで、樹脂を追加の LE 水 (約 10 kg のアリコート) でフラッシングした。Lyoguard トレイに保存した粗ペンタダイマー (49 g、PN0704) を、周囲温度まで温めた。LE 水 (400 g) を、粗ペンタダイマー (49 g) を含有する Lyoguard トレイに加え、完全に溶解させた後、1 L Schott ボトルに移した。トレイをさらに充填した LE 水 (200 g) ですすぎ、これらの洗浄液を Schott ボトルの内容物に加えた。粗ペンタダイマー溶液を、樹脂の上部に注意深く注いだ。1 L の Schott ボトルを LE 水 (200 g) ですすぎ、これを樹脂に加えた。Amberlite タップを開けて、粗ペンタダイマー溶液を約 5 分かけてゆっくりと樹脂に移動させた。タップを停止し、材料を樹脂上に約 10 分間放置した。LE 水を、樹脂の上部に注いだ。タップを開けて LE 水で溶出し、500 mL のおよそ 16 画分を収集した。各画分を、TLC 炭化 (charring) (EtOH 中の 10% H₂SO₄) によって分析した。すべての炭水化物含有画分を合わせ、0.2 μm ナイロンフィルターメンブレンを使用して Millipore フィルターで濾過した。溶液を、5 ~ 6 個の Lyoguard トレイに均等に分割した。濾過容器を LE 水 (100 g) ですすぎ、トレイ間で分割した。材料を、トレイ内で凍結乾燥した。棚温度は 16 ~ 20 時間 - 10 に設定し、次に、材料が乾燥するまで + 10 に設定した。LE 水 (150 g) を Lyoguard トレイの 1 つを除くすべてに充填し、これを、乾燥材料を含有する残りの 1 つのトレイに移した。空の各トレイをさらに LE 水 (100 g) ですすぎ、このすすぎ量を最終の Lyoguard トレイに加えた。最終の Lyoguard トレイを、凍結乾燥した。棚温度は 16 ~ 20 時間 - 10 に設定し、次に、材料が乾燥するまで + 10 に設定した。分析および保持のために生成物をサンプリングした。乾燥材料を HDPE または PP 容器に移し、- 15 で保存した。予想収量: 31 ~ 34 g (86 ~ 94%)。

【 0 1 8 3 】

ダイマーにおける二硫化物結合の TCPEP 還元は迅速で、かつ、ほぼ化学量論的である。TCPEP による化学量論的還元を使用すると、約 2 当量のグルコサミン五糖モノマーが得られた。具体的には、五糖ダイマーを、1 モル当量の TCPEP を含有する反応緩衝液 (50 mM HEPES 緩衝液 (pH 8.0)) に溶解した。周囲温度で 1 時間後、反応を、CAD 検出を用いた HPLC によって分析した。これらの条件下で、ペンタグルコサミンモノマーへの変換 (ピークは約 10 分) はほぼ完了した (ペンタグルカミンダイマーのピークは約 11.5 分) - 図 4 を参照のこと。残りの注釈のないピークを、試料マトリックスから得た。平衡化学方程式に基づいて、加えられた TCPEP は主に TCPEP 酸化物に変換され、残留 TCPEP は、共役反応に加える前に、空気の酸化を阻害してダイマーに戻した。簡単にするために、グルコサミン五糖は、投入ダイマーに基づいて、これらの条件下でモノマーへの > 95% の変換を想定して加えることができる。

【 0 1 8 4 】

ペンタダイマーの同一性を、500 MHz 機器を使用する ¹H および ¹³C NMR によって決定した。t - ブタノールの参照溶液は、D₂O 中 25 mg/mL で調製した。試料は、D₂O 中 13 mg/mL で調製し、参照溶液を試料に加えた。最終試験試料の組成

は、ペンタダイマー 10 mg / mL および t - ブタノール 5 mg / mL であった。 ¹H および ¹³C スペクトルを取得し、統合した。得られた化学的シフトを、理論的シフトとの比較によって割り当てる。 ¹H NMR および ¹³C NMR スペクトルをそれぞれ図 1 および 2 に示す。

[実施例 5]

【 0 1 8 5 】

本発明のワクチン（化合物 18）を提供するための、実施例 2 の TT - リンカーを用いた実施例 4 の五糖モノマーへの変換

実施例 2 の TT モノマー - リンカー中間体を、周囲温度で 4 時間、濃度を増加させた 4 ~ 70 ペンタマーグルコサミンモル当量（2 ~ 35 五糖ダイマーモル当量）と反応させた。各滴定点からの粗コンジュゲートは、30 kDa MWC O メンブレンを介して分配することにより精製した。精製された各コンジュゲート試料について、タンパク質含有量、SEC - MALS によるペイロード密度、および SEC HPLC によるモノマー / 凝集体含有量を分析した。データは、50 のペンタマーグルコサミン当量でペイロード密度の飽和を示した。SEC HPLC 分析に基づくと、凝集体の含有量は、五糖モノマーの電荷が増加するにつれて増加し、30 のペンタマーグルコサミン当量から開始しておよそ 4 % の増加の定常状態レベルに達するように見えた。これらの結果に基づいて、その後の共役反応のために選択された五糖ダイマー電荷は、ペンタマーグルコサミンの理論電荷の 50 モル当量に対応する 25 モル当量であった。

【 0 1 8 6 】

一連の 3 つの試験合成とそれに続く化合物 18 の GMP 合成を、上記のように調製した。得られた各生成物の効力（ELISA アッセイによる）およびペイロード密度（ペンタマーグルコサミンの破傷風トキソイドに対するモル比）を評価した。以下表に結果を示す。

【 0 1 8 7 】

【表 2】

	試験 番号1	試験 番号2	試験 番号3	GMP実行
化合物18のペイロード 密度	35	38	36	35
化合物18の効力	94%	101%	87%	98%

【 0 1 8 8 】

これらの結果は、本発明の化合物の非常に高い担持量を証明している。前述の説明は、単に本発明を説明するために記載されており、限定することを意味するものではない。本発明の精神および実体を組み込んだ記載された実施形態の改変が、当技術分野の当業者に起こり得るので、本発明は、特許請求の範囲およびその同等物の範囲内のすべての変形を含むと広く解釈されるべきである。

[実施例 6]

【 0 1 8 9 】

モノクローナル抗体 F - 598

F - 598 として指定されているモノクローナル抗体は、米国特許第 7,786,255 号に開示されており、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。また、このモノクローナル抗体は、Creative Biolabs、Shirley、New York、USA から TAB - 799CL および AFC - 765CL として市販されている。F - 598 のアミノ酸配列は配列番号 1 ~ 5 に記載されている。

[実施例 7]

【 0 1 9 0 】

4 5 歳、体の 4 5 % 以上を火傷した 1 7 5 ポンドの消防士

患者は、敗血症を発症するリスクが高いと直ちに識別される。そのリスクを最小限に抑えるために、患者には最初に、治療用量のモノクローナル抗体 (m A b) F - 5 9 8 を投与する。この抗体は、患者に即時の免疫療法を与える。およそ 2 時間後、患者に、本明細書に開示される式 I のワクチンを投与する。

【 0 1 9 1 】

患者の血清中に治療レベルのモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体が残っていることを確認するために、患者を監視する。必要に応じて、治療用血清濃度が維持されるように、モノクローナル抗体の追加処置を投与する。同様に、本明細書に記載の化合物によって生成されるポリクローナル抗体力価を測定する。必要に応じて、治療用血清濃度が維持されるように、追加のワクチンを患者に投与することができる。患者にそのようなリスクがなくなるまで、治療を継続する。

10

【 図 面 】

【 図 1 】

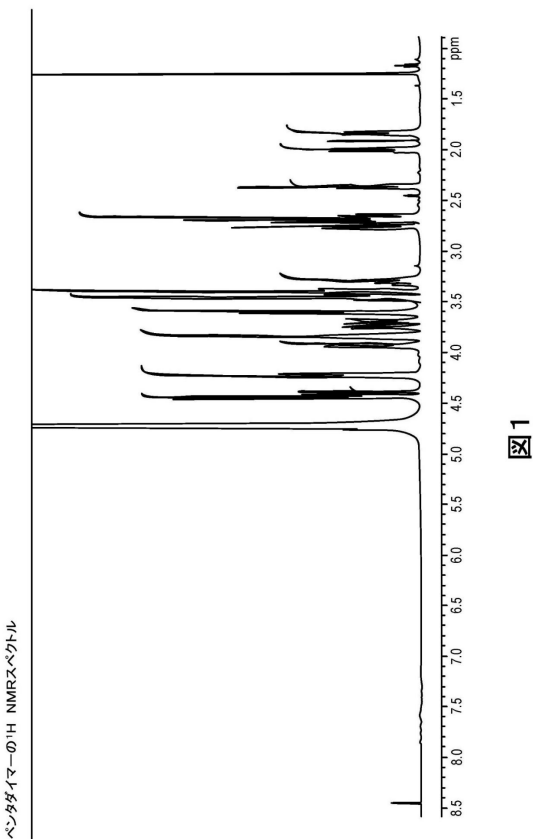


図 1

【 図 2 】

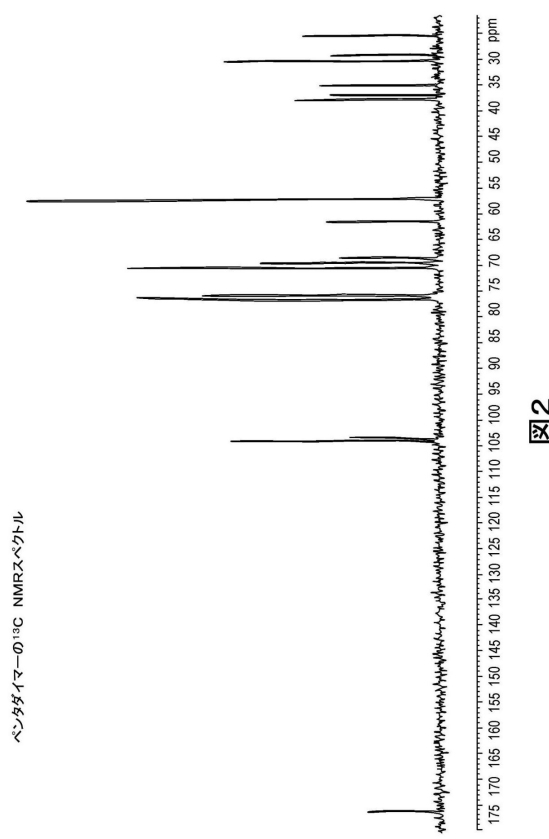


図 2

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/61594

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC - A61K 39/02; A61K 39/08; A61K 39/395; A61K 47/36 (2021.01)		
CPC - A61K 39/02; A61K 39/08; A61K 39/395; A61K 47/36; A61K 47/6415		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 10,034,927 B2 (The Brigham and Women's Hospital, Inc.) 31 July 2018 (31.07.2018) Col 2, In 10-13; Col 5, In 65 to Col 6, In 2; Col. 6, In 24-25; Col 8, In 17-22; Col 14, In 1-17; Col 15, In 5-20; Col 19, In 40-44; Col. 23, first structure; Col 29, Scheme 8; Col 30, In 66-67; Col 32, In 46-52	1-18
Y	- ALOPEXX Pharmaceuticals, LLC. 'Antibody Targeting of Poly N-acetyl Glucosamine (PNAG), A conserved surface polysaccharide on Multiple microbial pathogens, Potential as a broad-spectrum biological therapeutic', Presentation presented at PAHO, World Health Organization, Washington, D.C., 14 November 2014, pg. 1-22. Downloaded from: https://www.alopexx.com ; pg. 2; pg.12; pg. 13; pg. 21	1-18
A	WO 2011/133227 A2 (ANCORA PHARMACEUTICALS INC.) 27 October 2011 (27.10.2011) ENIRE DOCUMENT	1-18
A	US 2006/0115486 A1 (PIER et al.) 01 June 2006 (01.06.2006) ENTIRE DOCUMENT	1-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
25 January 2021	APR 05 2021	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Lee Young Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,
LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,
RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,Z
W

(72)発明者 スイス, ジェラルド エフ

アメリカ合衆国 0 2 1 1 1 マサチューセッツ州ボストン、 マールボロー・ストリート 1 2 4

Fターム(参考) 4C085 AA03 AA14 AA27 BB24 CC23 DD62 EE03 GG01