



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101282984 B

(45) 授权公告日 2013. 05. 08

(21) 申请号 200680024358. 1

A61K 31/702 (2006. 01)

(22) 申请日 2006. 05. 08

A61P 31/04 (2006. 01)

C07H 7/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/678, 289 2005. 05. 06 US

(56) 对比文件

W0 2004067030 A2, 2004. 08. 12,

W0 2004067030 A2, 2004. 08. 12,

M. I. Torres et al. synthesis of the phosphono analogue of the dimeric subunit of neisseria meningitidis type a capsular polysaccharide. 《SYNLETT》. 2005, (第 7 期), 1147-1151 页.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2008. 01. 03

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/IB2006/001703 2006. 05. 08

Ali Berkin et al. Towards a synthetic glycoconjugate vaccine against neisseria meningitidis A. 《chem. Eur. J》. 2002, 第 8 卷 (第 19 期), 4424-4433.

(87) PCT 申请的公布数据

W02006/120576 EN 2006. 11. 16

M. I. Torres et al. synthesis of the phosphono analogue of the dimeric subunit of neisseria meningitidis type a capsular polysaccharide. 《SYNLETT》. 2005, (第 7 期), 1147-1151 页.

(73) 专利权人 诺华疫苗与诊断股份有限公司

地址 意大利锡耶纳市

专利权人 S · 奥斯卡松

P · 特奥多罗维奇

审查员 王少华

(72) 发明人 S · 奥斯卡松 P · 特奥多罗维奇

P · 科斯坦蒂诺

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 赵蓉民 路小龙

(51) Int. Cl.

C07H 11/04 (2006. 01)

C07H 13/00 (2006. 01)

C07H 15/04 (2006. 01)

A61K 39/095 (2006. 01)

权利要求书4页 说明书50页 附图4页

(54) 发明名称

A 型脑膜炎疫苗的免疫原

(57) 摘要

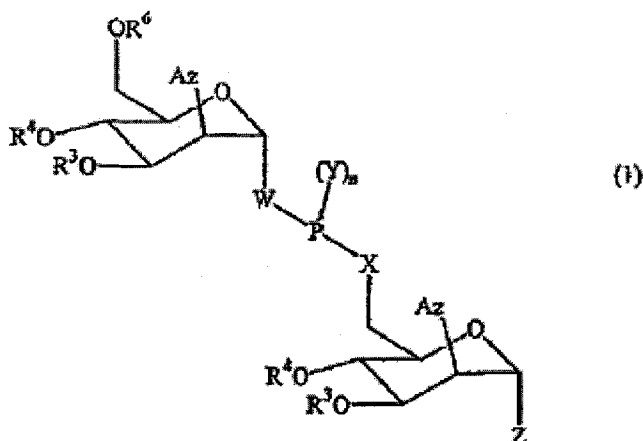
可用于 A 型脑膜炎疫苗的寡糖, 其包括在 C-1 位置具有成 α 构型的间隔区的第一甘露糖单元, 该间隔区能结合到蛋白质, 并且第一甘露糖单元通过 1,6- 键连接到第二甘露糖单元, 所述 1,6- 键将第一单元的 C-6 与第二单元的 C-1 相连接, 其中 1,6- 键包括磷酸酯。制造这类化合物、类似化合物或其中间体的相关方法也被公开。

1. 寡糖,其包括第一甘露糖单元和第二甘露糖单元,

其中所述第一甘露糖单元包括在C-1处成 α 构型的间隔区部分,该间隔区可结合到蛋白质,

其中所述第一甘露糖单元通过1,6-键结合到所述第二甘露糖单元,所述1,6-键将所述第一单元的C-6与所述第二单元的C-1相连接,

并且其中所述1,6-键包括磷酸酯,其中所述寡糖的第一甘露糖单元和第二甘露糖单元包括下式:



其中,每一个Az表示氮杂取代基;

每一 R^3 和 R^4 独立地表示H或保护基;

R^6 表示H、保护基或连接到另一糖单元的连接体;

W和X中的一个为O,并且W和X中的另一个为 CH_2 ;

n是1或2;

当n是1时, Y_n 是OR,当n是2时,一个Y是=O并且另一Y是OR,

其中R是H、C1-C6烷基、或C6-C12芳基、或C6-C12芳烷基,或者R是M,这里M是阳离子;和

Z是 OR' 、 SR' 或 NR'_2 ,其中每一 R' 独立地是H或任选地取代的烷基、酰基、芳基、芳烷基、杂烷基、杂酰基、杂芳基或杂芳烷基;

或者Z表示连接到另一糖单元的连接体,或者结合到蛋白质的所述间隔区部分。

2. 权利要求1所述的寡糖,其中所述1,6-键在 α 构型中。

3. 权利要求1所述的寡糖,包括至少3个甘露糖单元。

4. 权利要求1所述的寡糖,其中所述1,6-键具有[第二甘露糖单元的C-1]- CH_2 -P-O-[第一甘露糖单元的C-6]的形式。

5. 权利要求1所述的寡糖,其中存在的每一2-氮杂取代基选自 NH_2 、 NHAc 和 N_3 。

6. 权利要求1所述的寡糖,其中第三甘露糖单元通过含磷的键结合到所述第二甘露糖单元,并且其中所述键将所述第二甘露糖单元的C-6连接到所述第三甘露糖单元的C-1。

7. 权利要求6所述的寡糖,其中将所述第二甘露糖单元的C-6连接到所述第三甘露糖单元的C-1的所述键包括磷酸酯。

8. 权利要求1所述的寡糖,进一步包括通过所述间隔区部分连接到所述寡糖的蛋白质,所述间隔区部分在所述第一甘露糖单元C-1处成 α 构型。

9. 权利要求 8 所述的寡糖, 其中所述蛋白质是选自白喉类毒素、百日咳类毒素、大肠杆菌 LT、大肠杆菌 ST、铜绿甲单胞菌外毒素 (rEPA)、或者破伤风类毒素的灭活细菌毒素, 或者其中所述蛋白质是 CRM197。

10. 权利要求 8 所述的寡糖, 其中所述间隔区部分包括羟基或胺, 它们中的任一个任选被保护, 或者任选结合到蛋白质。

11. 权利要求 1 所述的寡糖, 其中 R^3 是酰基, R^4 是 H。

12. 权利要求 1 所述的寡糖, 其中蛋白质通过酰胺键或酯键连接到所述寡糖。

13. 权利要求 1 所述的寡糖, 其中 W 是 CH_2 , X 是 O, Az 是 NHAc, 和 n 是 2。

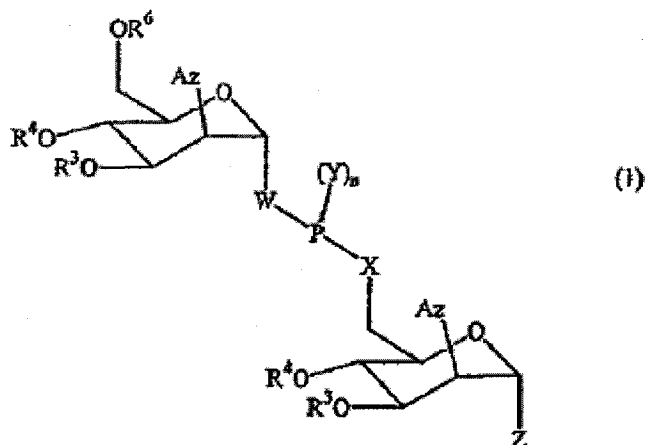
14. 权利要求 1 所述的寡糖, 其中 R 是 M, Z 包含 $-O-(CH_2)_n-NH-$, 其中 n 是 2-6。

15. 权利要求 1 所述的寡糖, 其中 R^3 和 R^4 的每一个独立地是 H 或 Ac。

16. 制造寡糖的方法, 该方法包括:

通过包含磷酸酯的 1,6- 键, 将包含至少一个氮杂取代甘露糖单元的第一部分连接到包含至少一个氮杂取代甘露糖单元的第二部分,

其中所述第一部分包括间隔区部分, 该间隔区部分被连接到 α 构型中的甘露糖单元的 C-1, 其中所述寡糖的第一甘露糖单元和第二甘露糖单元包括下式:



其中, 每一个 Az 表示氮杂取代基;

每一 R^3 和 R^4 独立地表示 H 或保护基;

R^6 表示 H、保护基或连接到另一糖单元的连接体;

W 和 X 中的一个为 O, 并且 W 和 X 中的另一个为 CH_2 ;

n 是 1 或 2;

当 n 是 1 时, Y_n 是 OR, 当 n 是 2 时, 一个 Y 是 $=O$ 并且另一 Y 是 OR,

其中 R 是 H、C1-C6 烷基、或 C6-C12 芳基、或 C6-C12 芳烷基, 或者 R 是 M, 这里 M 是阳离子; 和

Z 是 OR' 、 SR' 或 NR'_2 , 其中每一 R' 独立地是 H 或任选地取代的烷基、酰基、芳基、芳烷基、杂烷基、杂酰基、杂芳基或杂芳烷基;

或者 Z 表示连接到另一糖单元的连接体, 或者结合到蛋白质的所述间隔区部分。

17. 权利要求 16 所述的方法, 其中使用 Mitsunobu 反应将所述第一部分的甘露糖单元的 C-6 连接到所述第二部分的甘露糖单元的 C-1。

18. 权利要求 16 所述的方法, 其中所述 1,6 键是 1,6- α 键。

19. 权利要求 16 所述的方法, 其中 X 是 CH_2 , W 是 O。

20. 权利要求 16 所述的方法, 其中在甘露糖单元上至少一个氮杂取代基是通过还原氮化物 (N_3) 取代基得到的胺或取代胺。

21. 权利要求 20 所述的方法, 其中所述胺或取代胺在甘露糖单元的位置 2 上。

22. 权利要求 16 所述的方法, 其中位于异头中心的 Z 或所述间隔区部分包括胺取代的烷氧基。

23. 权利要求 16 所述的方法, 进一步包括通过在式 (1) 中的 OR^6 的氧和另外的糖之间形成键, 将所述第二甘露糖单元连接到所述另外的糖。

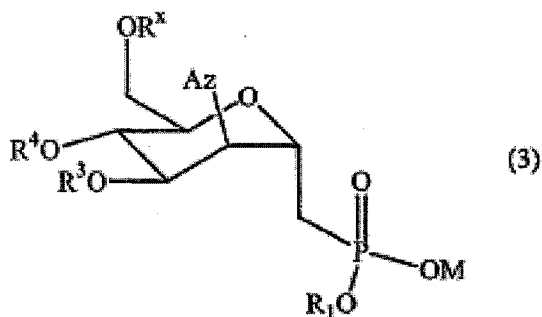
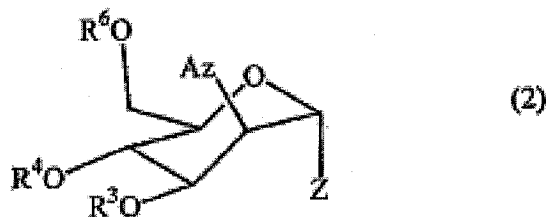
24. 权利要求 23 所述的方法, 其中所述另外的糖包括至少一个甘露糖单元。

25. 权利要求 23 或 24 所述的方法, 其中所述另外的糖通过 1,6- α 键被连接到所述第二甘露糖单元。

26. 权利要求 23 所述的方法, 其中 R^6 是 H 或 Ac, 并且存在的每一个甘露糖单元的异头中心是在 α 构型中。

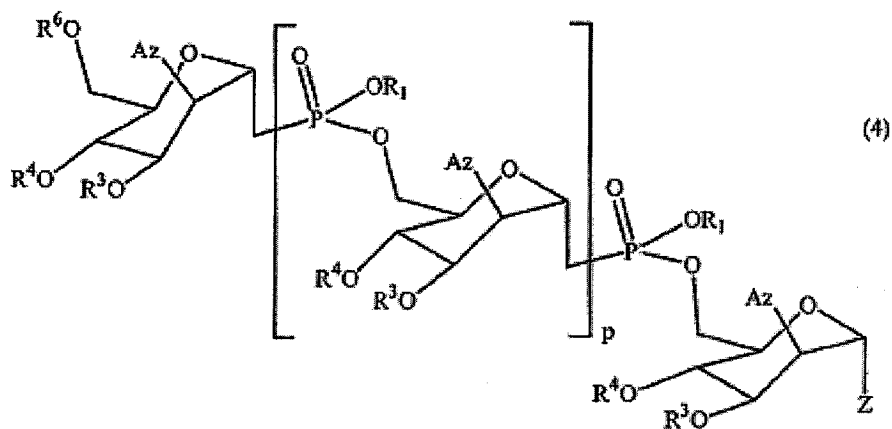
27. 合成 α -连接甘露糖单元的寡糖的方法, 所述方法包括:

将含有式 (2) 的甘露糖单元与式 (3) 的延长单体在 Mitsunobu 反应条件下相结合, 在所述式 (2) 中, 其中 R^6 是 C1-C6 酰基或 H, R^1 、 R^3 、 R^4 、Az 和 Z 如权利要求 15 所定义; 在式 (3) 中, 其中 R^x 表示 C1-C6 酰基, 且 M 表示 H 或阳离子;



从而得到含有由 1,6- α 键连接的至少两个 2-氮杂取代的甘露糖单元的寡糖。

28. 权利要求 27 所述的方法, 其中所述 Mitsunobu 反应条件被保持一段延长的时间, 从而得到式 (4) 的寡糖,



其中, p 是从 1 到 20 的整数。

29. 权利要求 27 所述的方法, 其中每一个 Az 表示 NHAc 或者 N₃。

30. 权利要求 28 所述的方法, 其中 p 是 1-5。

31. 权利要求 28 所述的方法, 其中 p 是 2-10。

32. 权利要求 27 所述的方法, 进一步包括将所述寡糖结合到蛋白质。

33. 权利要求 32 所述的方法, 其中所述蛋白质是选自白喉类毒素、百日咳类毒素、大肠杆菌 LT、大肠杆菌 ST、铜绿甲单胞菌外毒素 (rEPA)、或者破伤风类毒素的灭活细菌毒素。

34. 权利要求 32 所述的方法, 其中所述蛋白质是 CRM197。

35. 按照权利要求 27 所述的方法制备的寡糖。

36. 按照权利要求 27 所述的方法制备的免疫原性化合物。

37. 权利要求 1 所述的寡糖, 其用于在下述方法中, 所述方法包括将有效量的 A 型脑膜炎疫苗成分施用给对象, 从而提供免疫原性应答。

38. 药物组合物, 其包括至少一种权利要求 1 所述的寡糖, 和至少一种药学可接受的赋形剂。

39. 免疫原性组合物, 其包括至少一种权利要求 1 所述的化合物。

40. A 型脑膜炎疫苗, 其包括至少一种权利要求 1 所述的化合物。

41. 权利要求 40 所述的 A 型脑膜炎疫苗, 包括连接到蛋白质的寡糖。

A 型脑膜炎疫苗的免疫原

[0001] 相关申请

[0002] 该申请要求 2005 年 5 月 6 日提交的美国申请序列号 60/678,289 的权益,其全部通过引用被引入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及可用于 A 型脑膜炎疫苗的化合物。具体而言,该化合物是包括稳定化的含磷键——优选磷酸酯键 (phosphonate linkage) 的寡糖。更优选地,该化合物含有甘露糖单元,并且在该甘露糖单元的 C-1 处还含有成 α 构型的间隔区。本发明也包括制造该寡糖的方法,和制造含甘露糖的化合物和中间体的改进方法。

背景技术

[0004] 脑膜炎是脑脊膜感染,所述脑脊膜为包围脑和脊髓的薄膜 (thin lining)。几种细菌可引起脑膜炎,脑膜炎奈瑟氏菌 (*N. meningitidis*) 是最重要的一种。其它细菌是肺炎链球菌 (*streptococcus pneumoniae*) 和乙型流感杆菌 (*Haemophilus influenza*)。有几种脑膜炎奈瑟氏菌的亚型,其通过包围细菌的荚膜多糖的结构加以区分。

[0005] 病毒和细菌都可引起脑膜炎。引起脑膜炎的细菌的两种主要类型为流感杆菌和脑膜炎奈瑟氏菌。在流感杆菌的情况下,仅一种血清型——乙型是重要的,然而对于脑膜炎奈瑟氏菌已经鉴定了 12 个血清群 (serogroup),其中 A、B、C 和 W135 组已知引起流行病。各种血清型在不同的地区流行,例如 B 型和 C 型主要在欧洲和北美,A 型在非洲和南美。血清分型是基于包围细菌的荚膜多糖 (CPS) 的结构和抗原性,并且 CPS 也可被用作对抗细菌的疫苗。通过将糖结合到载体蛋白,可制造特别有效的疫苗 (复合糖疫苗)。参见 Plotkin, S. A. 和 Orenstein, W. A., *Vaccines*, 4th ed., Saunders, 959-987 页 (2004),其通过引用被引入本文。这些复合糖诱导具有记忆性的 T- 细胞依赖性免疫应答,并也对于幼年孩子起作用,而一般而言,非结合 CPS 既不能在成年人中提供记忆效应 (memory effect),也不能在婴儿中提供任何实质性免疫原性效应。A 型疫苗的开发被认为特别困难,原因在于作为 CPS 一部分的异头磷酸二酯键的固有不稳定性。A 型的重复单位是单糖——通过磷酸二酯键桥 1 $\rightarrow$ 6 连接的 2- 乙酰氨基 -2- 脱氧 - α -D- 吡喃甘露糖 (图 1)。在天然多糖中,3-OH 被乙酰化大约 80% 的程度。该乙酰化的免疫学重要性还没有被彻底研究,但是迹象表明其不具有显著意义。

[0006] 脑膜炎奈瑟氏菌血清群 A 引起脑膜炎的流行病突发,主要在撒哈拉南部的非洲部分所谓的脑膜炎带。在该脑膜炎带,估计在 1970-1992 期间的发生率大约 800,000 例。参见 Plotkin, S. A. 和 Orenstein, W. A., *Vaccines*, 4th ed., Saunders 959-987 页 (2004)。脑膜炎流行病的突发正在毁掉该区域,所以迫切需要有效的疫苗。当然,希望优良疫苗的开发,加上类似于 WHO 在二十世纪六十年代和七十年代进行的对抗天花所作的努力,可同样地消除脑膜炎奈瑟氏菌血清型 A 引起的脑膜炎。接种疫苗比用抗生素和其它治疗方法控制疾病是成本更有效的方式,而在研发领域,成本是特别重要的。

[0007] 从细菌上多糖包被——其荚膜多糖制备的疫苗，在成年人中有效。暴露于该多糖引起成年人发展免疫应答，其保护免于脑膜炎奈瑟氏菌引起的脑膜炎。然而，这类疫苗的一个重要限制是大约两岁以下的孩子的免疫系统不对大多数多糖抗原应答。遗憾的是，这是对于细菌脑膜炎最大危险的年龄组。因此，多糖疫苗在年幼孩子中是无用的。而且，即使在较大的孩子和成年人中，这些疫苗也仅仅诱导短期的免疫性。在接种疫苗大约两年后，保护迅速降低，并且通常消失。

[0008] 多糖如脑膜炎奈瑟氏菌 CPS 是 T 细胞非依赖性抗原，这意味着在没有 T 细胞（胸腺产生细胞）参与的情况下，它们可产生免疫应答。这种应答缺乏几种表征 T 细胞依赖性免疫应答的重要性能，例如免疫记忆、从 IgM 到 IgG 的类别转换以及亲和力成熟。然而，如果将多糖部分结合到载体蛋白，那么其引发产生记忆效应的细胞免疫应答，并且也在年幼儿童中提供保护。这类接合到载体蛋白的多糖通常被称为复合糖，并且其作为疫苗特别有用。

[0009] 因为它们的产生涉及多糖抗原或其它糖抗原与载体蛋白的结合，所以称为复合糖疫苗。复合糖疫苗中的糖部分通常是官能化的细菌 CPS，但是也可以是合成的。合成的碳氢化合物结构相比基于自然来源的碳氢化合物的结构具有大量的潜在优势。自然源的碳氢化合物是异源混合物，其可包括少量的天然杂质和污染物。相反地，合成的碳氢化合物可作为同源单一化合物以受控的方式产生，具有很少或没有批次之间 (batch-to-batch) 的差异。合成结构的另一个优点是可使它们包含用于碳氢化合物部分衍生或修饰的官能团，这些衍生或修饰在天然物质上难以或不可能进行。在免疫原性调节中，载体蛋白是重要因素。多种载体已被用于结合，并且使用强免疫原性蛋白如白喉毒素和破伤风毒素的去毒版本，已经取得了最好的结果，其已被允许在人中使用。参见美国专利 4,354,170。也已显示，当患者已经用特定的载体蛋白免疫后，免疫系统更有效地反应。

[0010] 通常将细菌的天然荚膜多糖结构结合到适当的载体蛋白，制造复合糖疫苗。然而，由于包裹脑膜炎奈瑟氏菌的多糖的性能，此种方法存在问题。在将多糖结合到蛋白质所必需的条件下，其磷酸二酯键可能降解，甚至在制备以后，天然 CPS 的复合糖倾向于在储存期间降解。

[0011] 磷酸二酯键通常是十分稳定的，但是在脑膜炎奈瑟氏菌的荚膜多糖中，磷酸二酯键被连接到碳氢化合物残基的异头中心 (anomeric center)。因此磷酸二酯键的一个氧也是缩醛键的一部分，其使缩醛键易于被亲电体例如酸或金属离子水解切割。该键的切割将多糖分解成小片段。遗憾的是，在形成复合糖或者甚至在疫苗配制中所需要的操作期间，A 型脑膜炎奈瑟氏菌的 CPS 经历这种降解，致使难以制造或储存包括该特定 CPS 的有效疫苗。

[0012] 使磷酸二酯键更稳定的一种方式消除磷和异头氧之间的氧，以便键的部分不再易于被亲电水解所切割。在异头中心的外环氧可被等构碳原子 (CH_2) 所取代，将磷酸二酯键转化为它的 C-磷酸酯类似物。这应该产生抗原多糖的稳定版本。涉及这种方法的一种研究近来已经被公布。Torres-Sanchez, M. L 等, Synlett (2005) 7:1147-1151。然而，作者并没有评估它们的化合物的活性或者公开超过两个甘露糖单元的寡聚物。而且，它们的合成方法仅在寡糖拟被结合到蛋白的位置提供 β 异头物，而且脑膜炎奈瑟氏菌的天然 CPS 仅包含 α 键。因此仍旧需要在甘露糖单元之间具有稳定键的 α 连接的复合糖，以及合成它们的方法。

[0013] 另一个方法利用临近取代基的诱导作用减少异头氧处的电子密度,来稳定磷酸二酯键;这样也应当减慢预期的亲电子降解机制。可保持取代基的吸电子性能,同时构建寡糖,并且或许也同时将其结合到蛋白质,然后一旦分子不再需要暴露于破坏性的条件时,将其除去。

[0014] 本发明包括这些方法的每一个,以及它们的组合。因此,本发明的一方面提供疫苗开发所需的脑膜炎奈瑟氏菌 A 型荚膜多糖重复单元的寡聚形式的 C-磷酸酯类似物的有效合成。参见 Bundle, D. R. 等, J. Biol. Chem. (1974) 249:2275-2281。具体而言,本发明提供了引入间隔区部分的方法,通过间隔区部分,本发明的寡糖可被结合到蛋白质以制造复合糖疫苗,并且将间隔区部分定位于 α 异头构型中。图 2 阐明在该中心具有期望 α 构型的化合物,和具有 β 构型的化合物。因为目标生物体的天然 CPS 是甘露糖单元的完全 α -连接的寡聚物,因此特别期望在合成的免疫原中提供相同的 α -连接构型。即使复合糖的合成寡聚物部分中的甘露糖单元之间所有的键都是在 α 构型中,当复合糖的寡糖部分含有大约 10 个以下甘露糖单元时,寡糖通过它被连接到蛋白质的中心的构型可特别影响免疫原性效应。

[0015] 因此,本发明提供了这类的化合物和制备这些化合物的方法。通常使用 C-磷酸酯单酯和 Mitsunobu 条件施行关键的偶联步骤。虽然制备大小与天然 CPS 相当的多糖是不切实际的,但这也是不必要的;甚至在长度上只有几个甘露糖单元的寡糖也可以诱出免疫应答。而且,合成的寡糖提供了体内选择性连接机制 (selective linkage mechanism) 和稳定性增加的优点,这些优点中的每一个应增强其体内免疫原性效果。

[0016] 本发明的另一方面提供了稳定甘露糖单元的方法,以便可以使用磷酸二酯键——该键存在于天然的荚膜多糖中。其包括提供稳定化的化合物和方法,以有助于制备寡糖的蛋白复合体。通过吸电子基团提供稳定化,所述吸电子基团为多糖中至少一个甘露糖单元的 C-2 处的氮化物,这增加了多糖的稳定性,以便其可被结合到蛋白质。在结合之后,稳定性不那么重要了,此时,氮化物一般被还原为胺并且被乙酰化,提供 2-乙酰氨基基团,该 2-乙酰氨基基团为脑膜炎奈瑟氏菌 A 型荚膜多糖中重复甘露糖单元的一部分。

[0017] 如果合适,也可混合所述两种稳定方法;因此本发明的寡糖可包括含氮化物的甘露糖单元以及磷酸酯连接的甘露糖单元,所述含氮化物的甘露糖单元通过临近异头中心的磷酸二酯连接。该组合可提供另外的稳定性,这取决于磷酸酯的取向;或者该组合也提供合成的优点,例如产率增加,并且其可以避免乙酰胺取代基可能引起的复杂化。

[0018] 在其它方面,本发明提供合成这些化合物重要前体、含有它们的药学组合物的方法,以及使用它们制造药物的方法。可施用这些化合物、组合物和药物给对象,以在对象中诱导免疫原性应答,所述对象一般是人。

发明内容

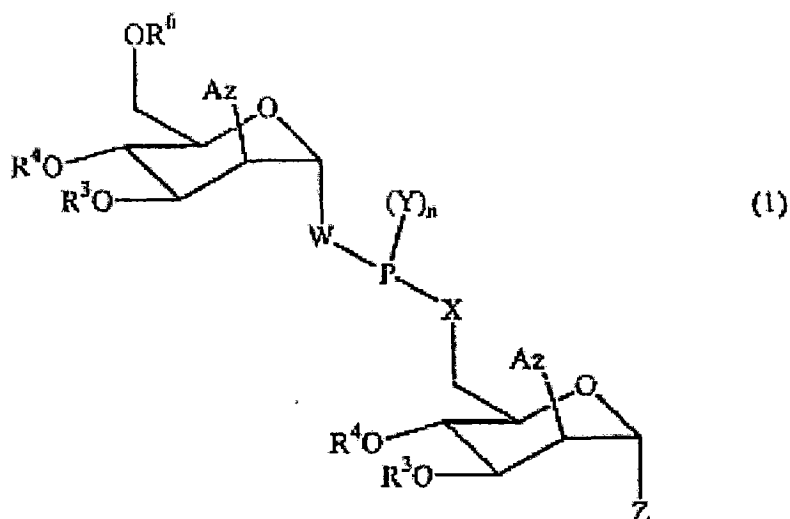
[0019] 本发明提供包括多糖或寡糖的免疫原性化合物和制造这些化合物的方法,以及使用它们作为疫苗提供保护以免于脑膜炎奈瑟氏菌 A 细菌感染的方法。所述方法允许制备包括至少两个通过 1,6-键连接的甘露糖单元的多糖。该键通常为 1,6- α 键,并且甘露糖单元有时为 N-取代的甘露糖基团,例如在一个或多个甘露糖单元上具有 2-NHAc 或 2-N₃ 的 N-取代的甘露糖基团。所述键可以采用不同的形式,但是其通常包括磷酸酯或磷酸酯。在一些

实施方式中,寡糖包括依次连接的至少三个甘露糖单元,其每一个一般是 N- 取代的。虽然化合物可包括任意数量的甘露糖单元,但在优选的实施方式中,分子的寡糖部分具有 2000 以下的分子量。因此,优选地,本发明的化合物包括大约 2 到 10 个串连的甘露糖单元,优选大约 3 到 7 个。

[0020] 对本发明的化合物进行改变以结合到蛋白质,因为复合糖形式是有效得多的用于接种疫苗目的的免疫原;其在婴儿中诱导免疫原性应答,并且其诱导提供延长接种疫苗效用的记忆效应的细胞应答。因此,化合物包括连接于甘露糖单元链上第一个甘露糖单元的间隔区部分(或间隔基部分)。间隔区单元被具体设计以提供将寡糖连接到蛋白质的方法,或者提供帽化末端糖单元的方法,使得其对例如进一步的链延长/修饰反应无活性。典型地,该间隔区部分具有胺、羧酸酯或羟基,以与蛋白载体上的互补基团相偶联,但是也包括本领域已知的提供将寡糖结合到蛋白质的方式的其它基团。可选地,间隔区部分拥有保护或加帽基团,例如烷基、芳基或酰基,以及在本领域公知的和/或本文公开的其它基团。在本发明的化合物中,该间隔区部分成 α 构型,以便其最严格地类似脑膜炎奈瑟氏菌的天然 CPS 中的键,并且其不会干扰期望的免疫原性效应,即使在本发明的短寡糖中。

[0021] 本发明的化合物通常包括分子式 (1) 所示的结构:

[0022]



[0023] 其中,每一个 Az 表示氮杂取代基;

[0024] 每一 R^3 和 R^4 独立地表示 H 或保护基;

[0025] R^6 表示 H、保护基或连接到另一个糖单元的连接体;

[0026] W 和 X 中的一个为 O, 并且 W 和 X 中的另一个为 CH_2 ;

[0027] n 是 1 或 2;

[0028] 当 n 是 1 时, Y_n 是 OR, 当 n 是 2 时, 一个 Y 是 = O 并且另一个 Y 是 OR,

[0029] 其中 R 是 H、C1-C6 烷基、或 C6-C12 芳基、或 C6-C12 芳烷基, 或者 R 是 M, 这里 M 是阳离子; 和

[0030] Z 是 OR' 、 SR' 、 NR'_2 或卤素, 这里每一 R' 独立地是 H 或任选地取代的烷基、酰基、芳基、芳烷基、杂烷基、杂酰基、杂芳基或杂芳烷基;

[0031] 或者 Z 表示结合到另一个糖单元的连接体或者结合到蛋白质的间隔区部分。

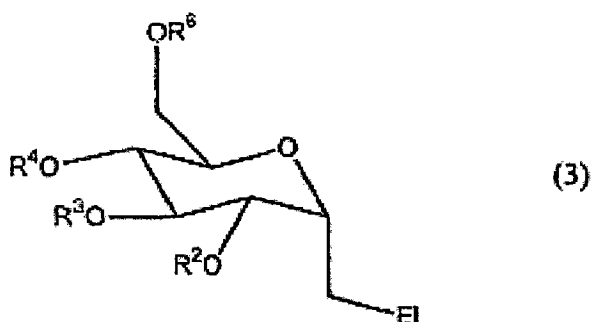
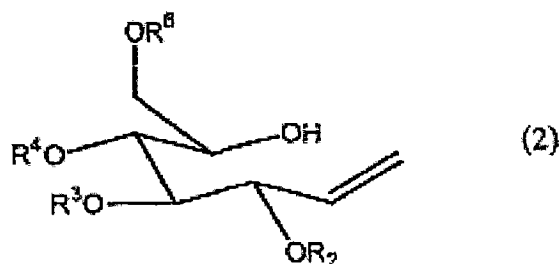
[0032] 通常在这些化合物中, X 是 O, W 是 CH_2 , 并且 Az 通常是 N_3 、 NH_2 或 $NHAc$; 并且通常 n

为 2。

[0033] 本发明的化合物部分通过本领域已知的方法合成,但是形成这些分子的大量新方法也是本发明的一部分。例如,可通过本文描述的 Mitsunobu 反应构建式 (1) 化合物中的 1,6- α 键。N-取代基例如 Az 也可通过本文描述的方法作为氮化物插入,然后可被还原以提供胺或取代胺,这通常在甘露糖单元的位置 2,如式 (1) 所示。用于还原氮化物的一般方法包括催化加氢和氢硼化物还原,一般使用催化量的镍盐。

[0034] 本发明也提供制造磷酸酯-取代甘露糖单元的方法,以装配本发明描述的寡糖。例如,分子式 (2) 的化合物,其可从葡萄糖得到,可被转化为磷酸酯的前体,所述磷酸酯可用于形成分子式 (1) 所示的包含磷酸酯的 1,6- α -键,这里 W 是 CH_2 ,X 是 O。本方法包括用亲电体环化分子式 (2) 的化合物,以形成分子式 (3) 的化合物。

[0035]



[0036] 其中 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^6 的每一个独立地为 H 或保护基；

[0037] 并且 El 表示亲电体残余部分 (residue)。

[0038] 亲电体残余部分 El 是用于引起环化的亲电试剂的一部分,其保持与碳连接。然后 El 可直接或间接被含磷基团例如磷酸酯基团通过本文描述的方法取代。这提供葡萄糖衍生物而不是 N-取代的甘露糖单元,即其在 C-2 处具有错误的立体化学;因此本发明进一步提供,通过用氮化物取代 OR^2 的 O 的活性形式,将分子式 (2) 或分子式 (3) 中 OR^2 转化为具有恰当立体化学的 Az 基团的方法。该方法包括 Mitsunobu 反应,其一般使用磷酰氮化物作为氮化物来源。

[0039] 本发明也提供制备 2-叠氮-2-脱氧-D-吡喃甘露糖的方法,该方法包括在 1,3,4,6-四-保护的吡喃葡萄糖衍生物的位置 2 形成三氟甲磺酸酯 (triflate);并且用氮化物亲核体取代三氟甲磺酸酯。在一些实施方式中,1,3,4,6-四-保护的葡萄糖衍生物是 1,3,4,6-四-O-乙酰基-吡喃葡萄糖,这是容易获得的。参见,例如 Helferich, B. 等, Ber. Dtsch Chem. Ges. (1962) 95:2604-2611。有时,优选 1,3,4,6-四-O-乙酰基-吡喃葡萄糖。

[0040] 包括本文描述的寡糖的化合物和组合物的免疫原性活性通常通过将寡糖结合到

蛋白质而得到增强。因此,在许多实施方式中,本发明包括通过连接到链上第一个甘露糖单元的 C-1 碳的间隔区部分,将寡糖结合到蛋白质。在一些实施方式中,根据其增强人免疫原性应答的能力而选择蛋白质,并且通常使用白喉和破伤风的去毒毒素类。因此,本发明的化合物通常包括间隔区部分,其可以是分子式 (1) 中的 Z,或者可以被结合到甘露糖单元上的任何可用的羟基或 N-取代基;并且其有助于结合到蛋白质。典型地,连接到蛋白质是通过 Z,因此 Z 通常是间隔区部分,其能被结合到蛋白质。在本发明的许多化合物中,Z 是被保护形式。适当的保护基取决于 Z 的准确属性,这类保护基的选择和使用是在本领域普通技术范围内的。这类保护基的实例和其使用的细节例如可从 Greene, T. W. 和 Wuts, P. G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d ed. (1991) 获得。相似地,本发明提供使用 Z 将寡糖结合到蛋白质以生产免疫原性组合物的方法。

[0041] 本发明也提供含本发明寡糖的疫苗组合物,其被用于在哺乳动物中诱导免疫原性应答。哺乳动物一般是人对象,因为脑膜炎奈瑟氏菌被认为仅在人中致病,但是在其它哺乳动物中诱导免疫应答也是有价值的,并可被用于提供免疫成分例如抗体。因此,本发明提供免疫原性组合物和使用这些免疫原性组合物在哺乳动物中诱导免疫原性应答的方法。

[0042] 附图简述

[0043] 图 1 示出了 A 型脑膜炎奈瑟氏菌的荚膜多糖的结构。

[0044] 图 2 是中心位置的 α 和 β 的异头物的说明,通过它们,寡糖被结合到蛋白质以增强免疫原性。

[0045] 图 3 示出合成寡糖的模块式装配方法 (modular assembly strategy)。

[0046] 图 4 示出不同疫苗剂量时合成复合糖和寡糖复合体对照物诱导的特异性抗体应答之间的关系。

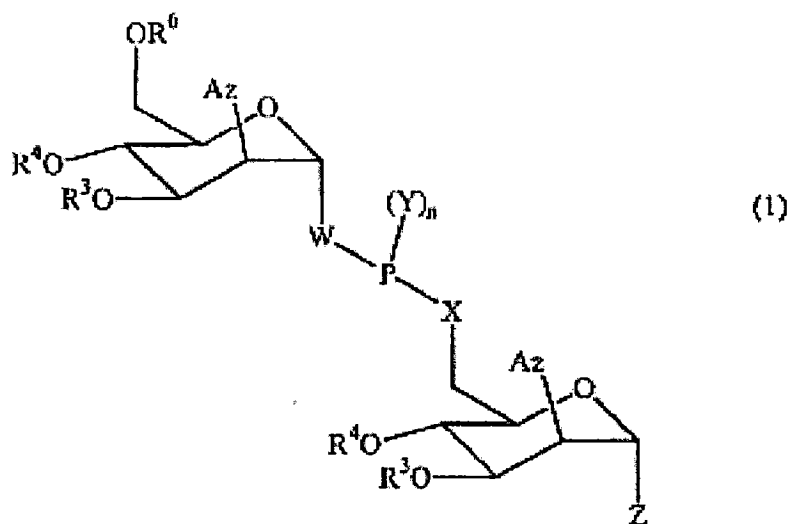
[0047] 本发明的实施方式

[0048] 在一方面,本发明提供含有第一甘露糖单元和第二甘露糖单元的寡糖,其中第一甘露糖单元在 C-1 处包括成 α 构型的间隔区。该间隔区可结合到蛋白质,并且第一甘露糖单元通过 1,6-键连接到第二甘露糖单元,所述 1,6-键将第一单元的 C-6 与第二甘露糖单元的 C-1 连接。在一些实施方式中,1,6-键包括磷酸酯。在一些实施方式中,1,6-键在 α 构型中。在这些实施方式的一些中,第一甘露糖单元是 2-脱氧-2-氮杂取代的甘露糖衍生物,以及在一些实施方式中,第二甘露糖单元是 2-脱氧-2-氮杂取代的甘露糖衍生物。某些实施方式具有二个或三个,或者三个以上的这些 2-氮杂取代的甘露糖单元。

[0049] 在本发明的一些实施方式中,1,6-键具有 [第二个甘露糖单元的 C-1]-CH₂-P-O-[第一个甘露糖单元的 C-6] 的形式,即磷酸酯的碳被结合到第二甘露糖单元的 C-1,磷酸酯氧被结合到第一甘露糖单元的 C-6。任选地,这些甘露糖单元被保护,并且在许多实施方式中,这两个甘露糖单元的一个或两个包含 2-氮杂取代基,其选自 NH₂、NHAc 和 N₃。当这些实施方式包括第三个甘露糖单元,它有时通过包含磷的键结合到第二甘露糖单元,并且其中所述键将第二甘露糖单元的 C-6 结合到第三甘露糖单元的 C-1。该键通常包括磷酸酯,其通常通过磷酸酯键与第二甘露糖单元排成一列,通过磷酸酯的 P-C 键与第三甘露糖单元排成一列。

[0050] 在其它方面,本发明提供分子式 (1) 的寡糖:

[0051]



[0052] 其中,每一个 Az 表示氮杂取代基;

[0053] 每一 R^3 和 R^4 独立地表示 H 或保护基;

[0054] R^6 表示 H、保护基或连接到另一个糖单元的连接体;

[0055] W 和 X 中的一个为 O,并且 W 和 X 中的另一个是 CH_2 ;

[0056] n 是 1 或 2;

[0057] 当 n 是 1 时, Y_n 是 OR,当 n 是 2 时,一个 Y 是 = O 并且另一个 Y 是 OR,

[0058] 其中 R 是 H、C1-C6 烷基、或 C6-C12 芳基、或 C6-C12 芳烷基,或者 R 是 M,这里 M 是阳离子;和

[0059] Z 是 OR' 、 SR' 或 NR'_2 ,这里每一 R' 独立地是 H 或任选地取代的烷基、酰基、芳基、芳烷基、杂烷基、杂酰基、杂芳基或杂芳烷基;

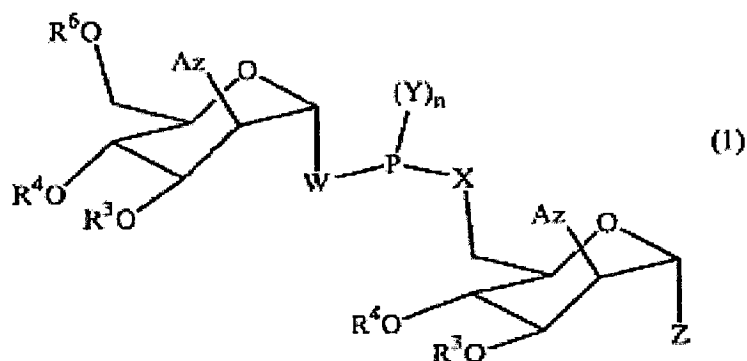
[0060] 或者 Z 表示结合到另一个糖单元的连接体或者结合到蛋白质的间隔区部分。

[0061] 在一些实施方式中,包含分子式 (1) 的化合物通过酰胺键或酯键被结合到蛋白质。通常在分子式 (1) 的化合物中,W 是 CH_2 ,X 是 O,并且在许多这类实施方式中,Az 是 NHAc, n 为 2。也在该方面的许多实施方式中,R 是 M,Z 包括 $-O-(CH_2)_n-NH-$,其中 n 是 2-6。在基于分子式 (1) 的这些化合物的实施方式中,每一个 R^3 和 R^4 独立为 H 或 Ac。通常 R^3 是 Ac,并且任选地, R^3 和 R^4 都是 H 或 Ac。

[0062] 在其它方面,本发明提供制造寡糖的方法,该方法包括通过包含磷酸酯的 1,6-键,将包含至少一个氮杂取代甘露糖单元的第一部分连接到包含至少一个氮杂取代甘露糖单元的第二部分。在这些实施方式中,第一部分通常包括间隔区部分,该间隔区部分被连接到 α 构型中的甘露糖单元的 C-1。在这些方法的一些实施方式中,使用 Mitsunobu 反应将第一部分的甘露糖单元的 C-6 连接到第二部分的甘露糖单元的 C-1。在这些方法的许多实施方式中,1,6 键是 1,6- α 键。

[0063] 在这些方面的一些中,连接的氮杂取代甘露糖单元包括分子式 (1)

[0064]



[0065] 其中, 每一个 Az 表示氮杂取代基;

[0066] 每一 R^3 和 R^4 独立地表示 H 或保护基;

[0067] R^6 表示 H、保护基或连接到另一个糖单元的连接体;

[0068] W 和 X 中的一个为 O, 并且 W 和 X 中的另一个是 CH_2 ;

[0069] n 是 1 或 2;

[0070] 当 n 是 1 时, Y_n 是 OR, 当 n 是 2 时, 一个 Y 是 = O 并且另一 Y 是 OR,

[0071] 其中 R 是 H、C1-C6 烷基、或 C6-C12 芳基、或 C6-C12 芳烷基, 或者 R 是 M, 这里 M 是单价阳离子; 和

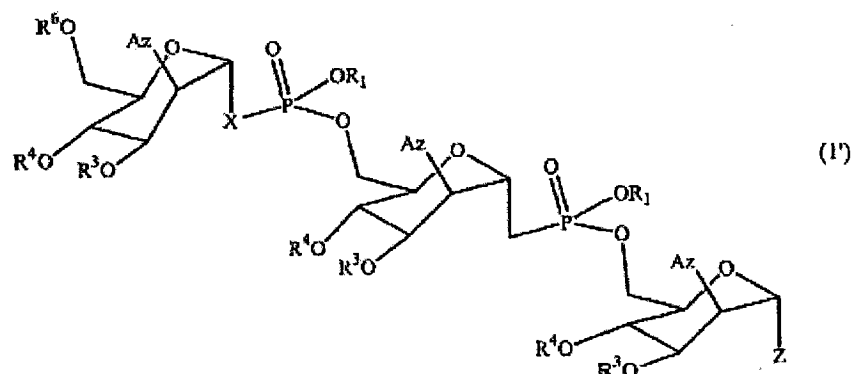
[0072] Z 表示可被结合到蛋白质的部分, 其可是保护形式。

[0073] 在本方法的一些实施方式中, 在包含分子式 (1) 的化合物中, X 是 CH_2 , W 是 O。在这些实施方式中, 通常甘露糖单元上至少一个氮杂取代基是通过还原氮化物 (N_3) 取代基得到的胺或取代胺。在优选的实施方式中, 胺或取代胺在甘露糖单元的位置 2 上。在这些方法的一些实施方式中, 寡糖包括可以是分子式 (1) 化合物中的 Z 的间隔区部分, 其位于甘露糖单元的异头中心。该间隔区单元可包括氨基取代的烷氧基, 任选地其为被保护的形式。例如, 其可以具有分子式 $-O-(CH_2)_n-NH-PG$, 这里 PG 表示 H 或保护基; 保护基通常是烷氧基羰基例如甲氧基羰基; 叔-丁氧基羰基; 或者苄氧基羰基。因此 NH-PG 通常是氨基甲酸酯基团。

[0074] 在这些方法的一些实施方式中, 该方法进一步包括通过在分子式 (1) 中的 OR^6 的氧和另外的糖之间形成的键将第二甘露糖单元连接到另外的糖。该糖可以是甘露糖单元或者包含甘露糖单元, 并且在许多实施方式中, 另外的糖通过 1,6- α 键被结合到第二甘露糖单元。在这些实施方式中, 通常 R^6 是 H 或 Ac, 并且存在的每一个甘露糖单元的异头中心成 α 构型, 以最严格类似于天然脑膜炎奈瑟氏菌的 CPS。

[0075] 在其它方面, 本发明提供分子式 (1') 的寡糖:

[0076]



[0077] 其中, 每一个 Az 独立地选自 NH_2 、 NHAc 和 N_3 ;

[0078] Z 表示能被结合到蛋白质的间隔区部分, 其可是被保护形式或未保护形式, 并且其可被结合到蛋白质;

[0079] 每一个 R^1 是独立的 H, 任选地取代的 C1-C6 烷基、或 M, 这里 M 是阳离子;

[0080] X 是 O 或 CH_2 ;

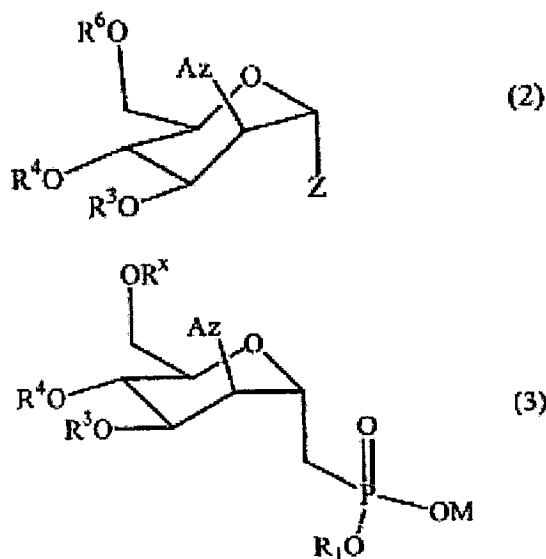
[0081] 每一 R^3 和 R^4 独立地选自 H、Ac、Bn 和其它保护基;

[0082] 以及 R^6 是 H、或保护基、或磷酸酯、或连接另外糖单元的键。

[0083] 在本发明的这方面, 一些实施方式包括通过第一甘露糖单元的 C-1 处 α 构型中的间隔区部分结合到寡糖的蛋白质。有时, 蛋白质是选自白喉类毒素、百日咳类毒素、大肠杆菌 (E. coli) LT、大肠杆菌 ST、铜绿甲单胞菌外毒素 (Pseudomonas aeruginosa (rEPA))、或者破伤风类毒素的灭活细菌毒素, 或者蛋白质可以是 CRM197。在这些实施方式中的蛋白质可通过间隔区部分连接到分子式 (1) 中的寡糖, 所述间隔区部分包括羟基或胺, 其中任何一个任选地被保护或任选地结合到蛋白。在该方面的一些实施方式中, R^3 是酰基, 并且 R^4 是 H。分子式 (1) 的可选的或优选的实施方式也适用于分子式 (1')。

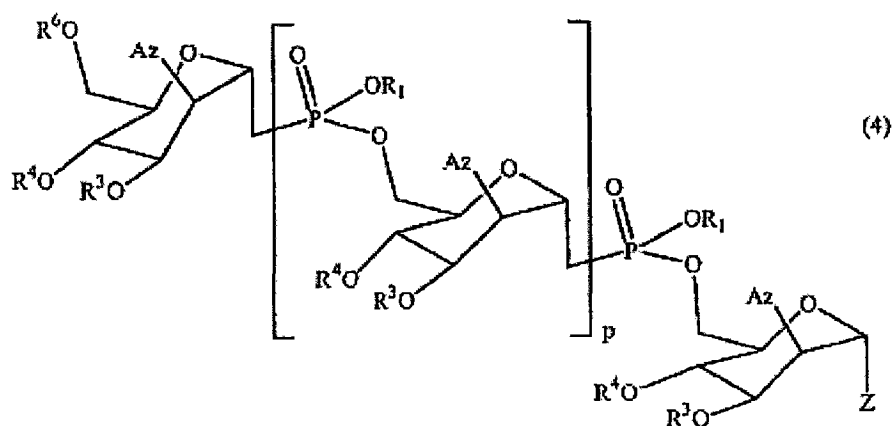
[0084] 在某些方面, 本发明提供合成 α -连接的甘露糖单元的寡糖的方法, 其包括在 Mitsunobu 反应条件下, 将含有分子式 (2) 的甘露糖单元与分子式 (3) 的延长单体相结合, 在分子式 (2) 中, R^6 是 C1-C6 酰基或 H, R^1 、 R^3 、 R^4 、Az 和 Z 按照权利要求 15 所定义; 在分子式 (3) 中, R^x 表示 C1-C6 酰基, 且 M 表示 H 或阳离子;

[0085]



[0086] 以生产含有由 1,6- α 键连接的至少两个氮杂取代的甘露糖单元的寡糖。在该方法的一些实施方式中, Mitsunobu 条件包括使用二异丙基偶氮二羧酸酯 (DIAD) 或二乙基偶氮二羧酸酯 (DEAD) 和三苯基膦或取代的三苯基膦例如三 (对-氯苯基) 膦。在一些实施方式中, 使用 DIAD 和三 (对-氯苯基) 膦, 并且过量使用三乙胺。在某些实施方式中, Mitsunobu 反应条件被维持一段延长的时间, 并且产物是分子式 (4) 的寡糖,

[0087]



[0088] 其中, p 是从 1 到 20 的整数。

[0089] 在许多这些实施方式中, 每一个 Az 表示 NHAc 或者 N_3 。在这些实施方式的一些中, p 是 1-10, 而在另一些中, p 是大约 1-5 或者 p 是 2-4。在这些实施方式的某些中, 本发明的方法进一步包括将分子式 (4) 的寡糖结合到蛋白质的方法。任选地, 这通过 Z 进行, 所述 Z 通常为被选择可与这类蛋白质结合的间隔区部分。在这些实施方式的一些中, 蛋白质是选自白喉类毒素、百日咳类毒素、大肠杆菌 LT、大肠杆菌 ST、铜绿甲单胞菌外毒素 (rEPA)、或者破伤风类毒素的灭活细菌毒素。在其它实施方式中, 蛋白质是 CRM197。

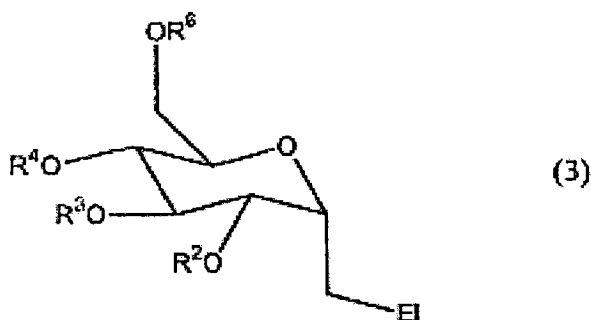
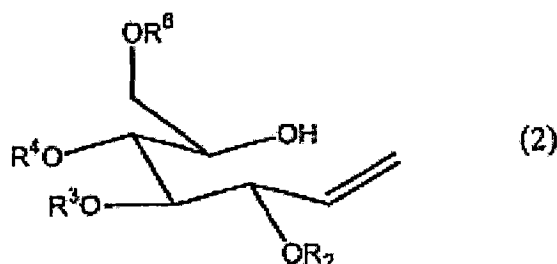
[0090] 在其它方面, 本发明提供通过前述方法制备的寡糖。通过这些方法制备的寡糖化合物是免疫原性化合物, 并且一般在被治疗的哺乳动物中诱导免疫原性应答, 该免疫原性应答提供了对脑膜炎奈瑟氏菌引起的感染的至少部分免疫性。

[0091] 在进一步其它的实施方式中, 本发明一般通过给予哺乳动物, 提供使用本发明的任何寡糖化合物诱导免疫原性应答的方法。在许多实施方式中, 这些化合物被用作 A 型脑膜炎疫苗成分; 因此, 该方法通常包括将有效量的疫苗成分施用给对象, 从而提供免疫原性应答。所述免疫原性应答在对象中提供对 A 型脑膜炎奈瑟氏菌引起的脑膜炎的至少部分抗性或免疫性。

[0092] 本发明也提供了药学组合物, 其包括与至少一种药学可接受的赋性剂混合的至少一种本发明的寡糖, 以提供免疫原性的药学组合物。在一些实施方式中, 这些组合物因此是包括含有本发明任意化合物的 A 型脑膜炎疫苗的疫苗。在许多实施方式中, 疫苗包括至少一种结合到蛋白质的寡糖。

[0093] 又在其它方面, 本发明提供制造可用于制备免疫原性寡糖的甘露糖衍生物的方法, 其包括本发明那些方法。这些方法包括用亲电体环化分子式 (2) 的化合物来形成分子式 (3) 的化合物,

[0094]



[0095] 其中 R²、R³、R⁴ 和 R⁶ 的每一个独立地为 H 或保护基；

[0096] 并且 EI 表示源自亲电体的残余部分。

[0097] 在某些实施方式中，该方法包括另外的步骤，该另外的步骤包括用磷基团取代 EI 的步骤。所述磷基团一般为磷酸酯，在一些实施方式中，本发明也提供用氮化物取代分子式 (2) 或分子式 (3) 的化合物中的 OR² 的方法。在优选的实施方式中，OR² 的取代包括 Mitsunobu 反应。在一些这样的实施方式中，磷酰基氮化物提供了用于 Mitsunobu 反应的氮化物。

[0098] 在进一步其它的方面，本发明提供改进的方法以制备 2-叠氮-2-脱氧-D-吡喃甘露糖，该方法包括：

[0099] 在 1,3,4,6-四-O-酰基-吡喃葡萄糖衍生物的位置 2 形成三氟甲磺酸酯；和

[0100] 用氮化物亲核体取代三氟甲磺酸酯。

[0101] 也可使用制造这些化合物的其它方法，该改进的方法在产物逐步生产 (work-up) 和分离过程中提供最小化暴露于湿气的预防措施。这导致比已知方法极大提高的产率，例如，Popelova 等.，Carbohydrate Res. (2005) 340:161-166。在优选的实施方式中，1,3,4,6-四-O-酰基-吡喃葡萄糖衍生物是 1,3,4,6-四-O-乙酰基-吡喃葡萄糖，并且产物为 2-叠氮-1,3,4,6-四-O-酰基-吡喃甘露糖。

[0102] 在其它方面，本发明提供可诱导针对 A 型脑膜炎的保护性抗体的免疫原性组合，其包括具有至少两个糖单元的寡糖，所述糖单元一般为甘露糖单元，其通过稳定化的含磷键彼此共价结合。在许多这样的实施方式中，可以为甘露糖单元的至少一个糖单元，在其异头中心包括 α-连接的间隔区部分。所述稳定化的含磷键可包括磷酸酯。在某些实施方式中，这些寡糖包括至少两个通过稳定化的含磷键彼此共价结合的甘露糖单元。在许多实施方式中，寡糖被结合到蛋白质。可使用许多蛋白质，例如前面描述作为适当的载体蛋白的那些蛋白质，但是在优选的实施方式中，蛋白质不是清蛋白。在一些实施方式中，本发明的免疫原性组合包括至少两种不同的寡糖部分。在许多实施方式中，在两个糖之间的稳定

化含磷键包括磷酸酯。在许多这类的实施方式中,磷酸酯键是通过 Mitsunobu 反应形成的 1,6- 键,在某些实施方式中,任意前述组合物的寡糖包括至少一个甘露糖单元,其包括在异头中心的 α - 连接的间隔区部分。

[0103] 在本发明的一些免疫原性组合物中,组合物包括至少两种不同的寡糖,它们对至少两种脑膜炎球菌免疫型是特异性的。该组合物也包括其它的抗原化合物,在一些实施方式中,组合物进一步包括肺炎链球菌 (*Streptococcus Pneumoniae*) 抗原。该抗原在一些实施方式中是多糖,并且在许多这些实施方式中,该多糖被结合到蛋白质。

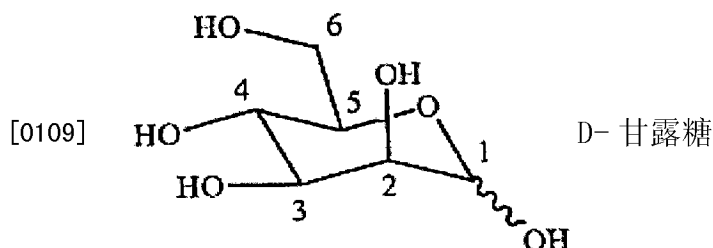
[0104] 在一些实施方式中,本发明的组合物也包括至少一种源自血清型 A、B、C、W135 或 Y 的脑膜炎的抗原。在一些优选的实施方式中,该抗原源自血清型 C、W135 或 Y 的脑膜炎。本发明的组合物通常进一步包括佐剂,并且在一些实施方式中,佐剂是明矾。

[0105] 在本发明的许多组合物中,寡糖成分通过含有二羧酸或其衍生物的双官能试剂被结合到蛋白质。在许多实施方式中,该二羧酸包括己二酸或辛二酸或它们的衍生物。在其它实施方式中,该双官能试剂包括方酸酯。

[0106] 本发明范围内的磷酸酯连接的化合物的制备可通过制造受体单体和延长单体 (elongating monomer) 完成,所述受体单体和延长单体的每一个可以是适当地修饰的吡喃甘露糖环,其被称为甘露糖单元。延长单体通过磷酸酯键被结合到受体以制造二糖。可修改延长单体以使其 C6 羟基被选择性地保护;因此,如果需要更长的寡糖,二聚糖中的延长单体可成为受体。其可被去保护,而没有对 C3 和 C4 羟基去保护,所以 C6 羟基可被连接到另一延长单体的磷酸酯。这种过程可被重做必要的许多次,以提供期望长度的寡糖。

[0107] 图 3 描述如何连接受体单体和延长单体以形成具有两个甘露糖单元 (即二糖) 的寡糖,以及该二糖如何可通过 C6 羟基的去保护然后通过连接其它延长单体而进一步扩展。任选地,可将受体单体通过可切割的连接体结合到固体支持体,以有助于控制和分离。在这种情况下,寡糖可通过多次重复延长过程,保持连接于固体支持体,并且可最终被切割以释放期望长度的相对纯的寡糖产物。有时,间隔区部分 Z 被用于在合成期间将寡糖连接到固体支持体,然后被用于将寡糖结合到蛋白质,任选地通过修饰。

[0108] 本发明提供了制造含有两个或多个修饰的甘露糖单元的免疫原性寡糖、以及更长的寡糖或多糖分子的方法,和通过将寡糖和 / 或多糖结合到蛋白质,把它们制成更多的免疫原性物质的方法。甘露糖单元是具有甘露糖环基础结构的吡喃糖环,但是其具有至少一些结构修饰。在许多实施方式中,本发明包括至少一个取代基,其中氮原子或其它杂原子被结合到环碳,代替甘露糖的一个羟基;如本文使用,考虑这类取代环为甘露糖单元,只要吡喃糖环上的取代基的排列与甘露糖上的立体中心的排列具有相同的相对立体化学。注意,甘露糖构型不限定在 C-1 的立体化学;C-1 为甘露糖单元的异头中心,可以在 α 构型或 β 构型中。因此甘露糖单元可具有代替一个甘露糖羟基的连接的 C、N 或 S 原子,或者可具有两个或多个这类的修饰。这里提供 D- 甘露糖的结构和碳原子的编号,作为参考。



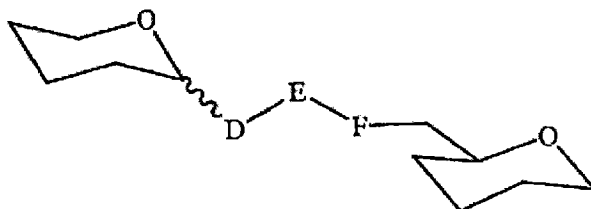
[0110] 本发明的方法可使用具有 D- 甘露糖或 L- 甘露糖的绝对立体化学的甘露糖单元；在许多实施方式中，绝对立体化学是 D- 甘露糖的绝对立体化学。然而，本发明的寡糖可包括一种或多种具有 L- 甘露糖构型的甘露糖单元。当然，其也可连接到另外的糖或肽部分，例如，只要包括如本文描述连接的至少两个甘露糖单元。

[0111] 本发明的寡糖包括至少两个连接在一起的吡喃糖环，如果仅包括两个环，分子可被描述为二聚体；对于依次连接的三个环，可被称为三聚体，等等。然而，如本文使用的总称寡糖包括这些较小的实施方式，以及依次具有三个或更多、五个或更多、七个或更多、十个或更多、十五个或更多、二十或更多以及超过二十五个单体的更长聚合体类型。具有大约 5 个以上糖环的类型在本文中有时称为多糖。在许多实施方式中，寡糖包括至少三个甘露糖单元。

[0112] 不管包括的甘露糖单元的数目如何，有时期望将寡糖连接到其它的分子特征上，所以可用多种基团取代甘露糖单元，并且可通过一个或多个甘露糖单元、一般通过一个末端甘露糖单元将寡糖连接到另一部分。在一些实施方式中，将寡糖结合到蛋白是有益的，并且这些复合糖形式特别包括在本发明内。一般地，通过将目标蛋白质结合到在寡糖的第一甘露糖的 C-1 处连接的间隔区部分上的官能团，形成复合糖，并且间隔区部分在 α 构型中。在许多实施方式中，期望将保护基或其它官能度结合到甘露糖单元上的一个或多个杂原子取代基上。在一些优选的实施方式中，杂原子取代基选自 OH、OAc、NH₂、N₃、NHAc 和被连接到保护基或蛋白质的 O、N 或 S。

[0113] 一般地，甘露糖单元通过 1,6- 键连接。1,6- 键指，通过不包括间插糖环的键 (linkage)，将第二甘露糖单元的 C-1 碳——异头中心，直接或间接连接到第一甘露糖单元的 C-6 碳。一般地，两个甘露糖单元之间的键将包括至少两个原子，通常是在甘露糖单元碳原子之间的两个或更多非碳原子。在许多实施方式中，该键具有下述通用形式：

[0114]

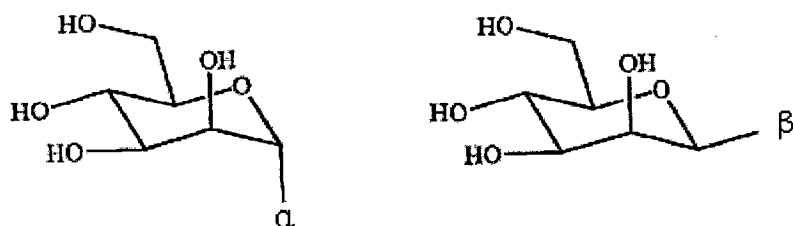


[0115] 这里，D、E 和 F 的每一个表示选自 O、N、S、Si 和 P 的杂原子，并且每一个四氢吡喃环表示甘露糖单元的环。在一些实施方式中，E 表示磷原子，其通常处于磷酸酯或膦酸酯的氧化态。典型地，该式中的 D 和 F 的至少一个是氧 (O)，在一些实施方式中，D 和 F 都是氧。具体的实施方式包括其中 D-E-F 表示 O-P(O)-O 或 C-P(O)-O 或 O-P(O)-C 的那些。有时，D-E-F 优选为含有 -CH₂-P(O)-O- 的键。

[0116] 在一些实施方式中，相邻甘露糖单元之间的键是 1,6- α (1,6-alpha) 键。对于甘露糖单元，1,6- α 键指，相应于甘露糖异头中心碳的 C-1 上的非氢取代基，与 C-2 处非氢取代基为“反 (anti)”相对立体化学关系。可选地，寡糖中一个或多个甘露糖单元可通过 β 键被连接。(在异头中心具有相对于甘露糖中 C-2 取代基为“顺式 (syn)”的键的构型被称为 β 键。) 然而，化合物一般以 α 关系被连接在一起，而不管键本身的性质如何。

[0117] 下列结构阐明 α 键和 β 键取向之间的差异。

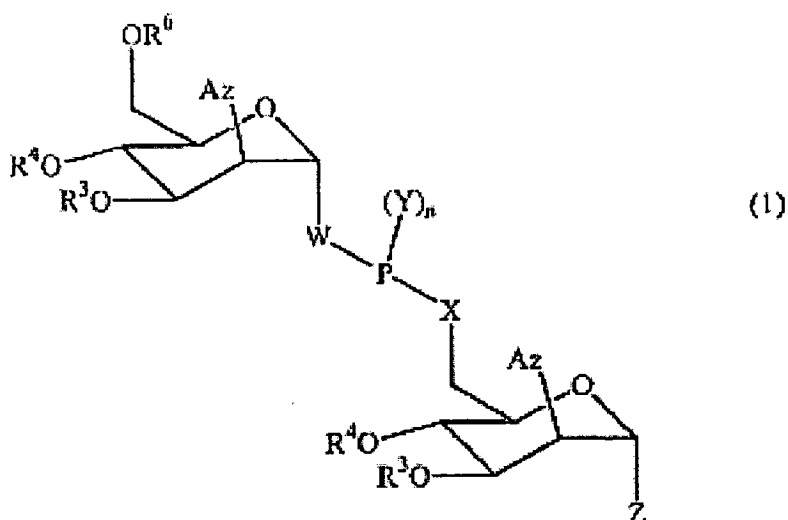
[0118]



[0119] 本发明的许多实施方式包括氮杂取代的甘露糖单元,这意味着至少一个甘露糖羟基已用本文称为“氮杂”取代基的取代基所取代。这是这样的取代基,其中至少直接连接到甘露糖单元的原子是氮。氮杂取代基包括 NH_2 和多种取代胺,包括烷基化胺和二烷基化胺,以及酰化胺和二酰化胺,其中酰基包括杂酰基例如苄氧基羰基和甲氧基羰基,以及这类酰基,如乙酰基、甲酰基和苯甲酰基。氮杂取代基的其它实施方式包括 NO_2 和 N_3 。本发明氮杂取代的甘露糖单元的一些实施方式具有在甘露糖环 C-2 上的氮杂取代基,并且优选的实施方式包括其中甘露糖单元上的氮杂取代基是 NH_2 、 N_3 或 NHAc 的化合物和方法。

[0120] 因此,在一些实施方式中,本发明的化合物和方法包括分子式 (1) 的部分:

[0121]



[0122] 其中,每一个 Az 表示氮杂取代基;

[0123] 每一 R^3 和 R^4 独立地表示 H 或保护基;

[0124] R^6 表示 H、保护基或连接到另一糖单位的连接体;

[0125] W 和 X 中的一个为 O,并且 W 和 X 中的另一个为 CH_2 ;

[0126] n 是 1 或 2;

[0127] 当 n 是 1 时, Y_n 是 OR,当 n 是 2 时,一个 Y 是 O 并且另一 Y 是 OR,

[0128] 其中 R 是 H、C1-C6 烷基、或 C6-C12 芳基、或 C6-C12 芳烷基,或者 R 是 M,这里 M 是阳离子;和

[0129] Z 是 OR' 、 SR' 、 NR' 或卤素,这里每一 R' 独立地是 H 或任选地取代的烷基、酰基、芳基、芳烷基、杂烷基、杂酰基、杂芳基或杂芳烷基;

[0130] 或者 Z 表示结合到另一糖单位的连接体或者结合到蛋白质的间隔区部分。

[0131] 优选的氮杂取代基是其中氮原子直接结合到甘露糖单元的那些氮杂取代基。这类取代基的实例包括 N_3 、 NH_2 、 NH -烷基、 NH -酰基、 NH -芳基和类似取代基。任选地,这些取代基中的每一个 N 可以包括选自烷基、芳基和酰基的一个或两个基团,这里,每个烷基、酰基

和芳基任选被取代。

[0132] 关于羟基、胺基和巯基,术语“被保护的”或“保护基”指这样的官能团形式——其用本领域技术人员已知的保护基被保护免于不期望的反应,例如在有机合成中的保护基(Protective Groups in Organic Synthesis)中所述的那些保护基,其可使用该文列出的方法添加或除去。被保护羟基的实例包括但不限于甲硅烷基醚,例如 TBDMS 或 TBS,例如通过羟基与试剂反应而得到的那些,所述试剂例如但不限于,叔-丁基二甲基-氯硅烷、三甲基氯硅烷、三异丙基氯硅烷和三乙基氯硅烷;取代的甲基和乙基醚,例如但不限于甲氧基甲醚、甲硫基甲醚、苄氧基甲醚、叔-丁氧基甲醚、2-甲氧基乙氧基甲醚、四氢吡喃醚、1-乙氧基乙醚、烯丙醚和苄醚;酯,例如但不限于苯甲酰基、苯甲酰甲酸酯、甲酸酯、乙酸酯、三氯乙酸酯和三氟乙酸酯。被保护胺基的实例包括但不限于苄基或二苄基,酰胺例如甲酰胺、乙酰胺、三氟乙酰胺和苯甲酰胺;二酰亚胺例如邻苯二甲酰亚胺和二硫代琥珀酰亚胺;和其它被保护胺基。在一些实施方式中,醇的保护基是苄基或乙酰基,并且本文中胺的典型保护基是乙酰基或苄基或叔丁基氨基甲酸酯。

[0133] 如本文使用的“保护基”包括本领域认为作为杂原子 N、O 和 S 的保护基的那些部分,例如在 Greene, T.W. 和 Wuts, P.G.M. 的参考书 Protective Groups in Organic Synthesis, 2d ed., Wiley and Sons (1991) 中描述的,其通过引用被引入本文。乙酰基 (Ac) 是一个这类保护基,并且因为脑膜炎奈瑟氏菌的天然 CPS 通常是乙酰基化的,特别是在 C-3 位置,所以在本发明的一些实施方式中,一种或多种保护基是 Ac;在一些优选的实施方式中,在至少一个甘露糖单元上的 R^3 代表 Ac。

[0134] 在这些化合物的一些中, X 和 W 的一个是 CH_2 , 而另外一个为 O;例如,在一些实施方式中, X 和 W 都是 O,而在其它实施方式中, W 是 CH_2 , X 是 O。在是寡聚的并含有三个或更多甘露糖单元的本发明给定化合物中,可以存在键的不同实施方式;因此,两个通过含有磷酸酯的键连接在一起的甘露糖单元可经磷酸酯二酯键连接到第三个甘露糖单元,而不背离本发明。

[0135] 通常期望,将本发明的寡糖与另一分子、一般为蛋白质相结合。这些方法制成的结合物在本发明的范围内。因此糖与蛋白质的结合通常通过将活性双官能分子加入蛋白质,然后将衍生化的蛋白质暴露于糖而实现,这样,糖通过双官能试剂提供的连接体共价连接,该双官能试剂通常被结合于糖的一个羟基。然而,在本发明的化合物的受控合成中,包括特别设计用来将寡糖结合到蛋白的间隔区部分,是特别方便的。这样的间隔区部分可被结合到寡糖中任意一个甘露糖单元;然而,一般在末端甘露糖单元,或者在第一“受体”单体,或者在最后的“延长”单体。经常是在受体的 C-1 位置或延长单体的 C-6 位置,并且在分子式 (1) 的化合物中,其可以为 Z 表示的基团或者 R^6 表示的基团。

[0136] 将寡糖结合到蛋白质的间隔区部分可包括多原子间隔区部分,以使寡糖的免疫原性表位更可用,因此更有效。可选地,例如,化合物例如分子式 (1) 表示的那些化合物中的 Z 可以是单个原子例如 O 或 N 或 S,并且寡糖和蛋白质之间的间隔可由用于将寡糖和载体蛋白连接在一起的双官能试剂提供。适于用于本发明的复合糖的双官能试剂包括本领域已知的那些。这类双官能试剂实例包括二羧酸例如丙二酸、丁二酸、己二酸和辛二酸或其活化形式,以及方酸衍生物。试剂的这些类型特别便于将其中间隔区部分包括胺的化合物连接到蛋白质。

[0137] 在一些实施方式中,间隔区部分长度上至少为两个或三个原子,尽管任选地其可以是单个原子或者其可以长得多;一个实例是分子式(1)的化合物,其中Z表示2-氨基乙氧基。该2-氨基乙氧基或其同源物可在结合延长单体之前被引入受体单体,并且任选地以被保护形式引入,所以其不参与接下来的反应。间隔区部分必须包括至少一个能被用来将寡糖结合到蛋白质的官能团,一般地,其包括用于该目标的杂原子N、O或S,虽然也考虑其它的基团,例如用于通过Diels-Alder反应结合的双烯或亲双烯体,或者用于通过酯或酰胺将蛋白质结合到寡糖的羧酸酯基团。在许多实施方式中,例如上面讨论的2-氨基乙氧基,间隔区部分包括用于该目标的氮;当该氮被引入时和在构建寡糖期间,其可以是受保护的,但是在寡糖构建完之后,在不破坏寡糖的条件下,其能够被可选择性地去除。然后,间隔区部分的胺易于乙酰基化或烷基化,例如使用双官能试剂,其另一端被相似地结合于蛋白质。这样连接的顺序,即复合糖的部分先结合到双官能试剂,是不重要的,并且由从业者的判断所确定。间隔基的一些典型但是非限制性的实例包括 $\text{-Het-(CH}_2\text{)}_n\text{-A}$ 、 -Het-Ph-A 、 $\text{-Het-(CH}_2\text{)}_n\text{-Ph-(CH}_2\text{)}_n\text{-A}$ 和它们的取代形式,其中每一Het表示杂原子,通常为O、S或N;每一Ph表示苯基,任选被取代;每一n表示1-10的整数;A表示官能团或其残基,其能将间隔区连接到蛋白质,例如N、O或S,或者酯、酰胺、或其它含羰基的基团、二烯或亲二烯体。优选地,间隔区包括 OR' 、 SR' 或 NR' ,这里每一R'独立地为H或任选地取代的烷基、酰基、芳基、芳烷基、杂烷基、杂酰基、杂芳基或杂芳烷基,并且可进一步包括A。

[0138] 分子式(1)中的M可表示碱金属阳离子——选自Li、Na、K和Cs,或者铵盐 NR_4^+ ,这里每一R独立为H或C1-C6烷基或C1-C6杂烷基。可选地,其可表示任何其它的药学可接受的阳离子种类,如 MgX 或 CaX ,这里X表示卤素、羟基、乙酰基、三氟乙酰基、硫酸氢盐、碳酸氢盐或任意其它适当种类。在一些实施方式中,M是二价阳离子,并且被分子式(1)的两个分子所共享。

[0139] 本发明的方法提供合成本发明的寡糖化合物的方式。方法包括例如,以期望的方式将两个甘露糖单元结合到一起的方式,例如在两个甘露糖单元之间通过形成1,6- α 键的方式。在1,6- α 键是磷酸酯或磷酯的情况,例如分子式(1)的化合物,其中X是O,可通过Mitsunobu反应产生该键。Mitsunobu反应被描述于例如Campbell, D. A., J. Org. Chem. (1992) 57:6331-6335,并且涉及用试剂例如偶氮二羧酸酯——如DEAD或DIAD——和磷(如三苯基磷或三(对-氯苯基)磷)活化醇,然后用亲核体种类取代活化的O。在分子式(1)的化合物、其中X是O的情况下,亲核体通常为P-O种类,一般为磷酯或磷酯阴离子。在该发明的其它方面,使用Mitsunobu反应将氮杂取代基引入到糖基,在这种情况下,条件是相似的,只是亲核体为氮化物,氮化物可作为氮化物阴离子或作为三烷基甲硅烷基氮化物或磷酰基氮化物而被提供。

[0140] 本发明的方法也提供在例如分子式(1)的那些化合物的甘露糖单元上安装和修饰N-取代基(氮杂取代基)的方式。因此在一些实施方式中,本方法提供以适当的立体化学将氮杂取代基插入甘露糖单元的方式。一个这样的方法包括用N-取代基——典型为 N_3 取代吡喃糖环上C-2羟基。用亲核取代反应可将其插入,但是在一些实施方式中,通过Mitsunobu型反应,在活化基例如偶氮二羧酸酯如DEAD或DIAD的帮助下将其插入。磷酰基氮化物例如二苯基磷酰基氮化物可提供该Mitsunobu反应的亲核体。在该反应中,本发明提供的具体改进包括使用磷酰基氮化物作为氮杂取代基的来源,并且引入基本无水的工作

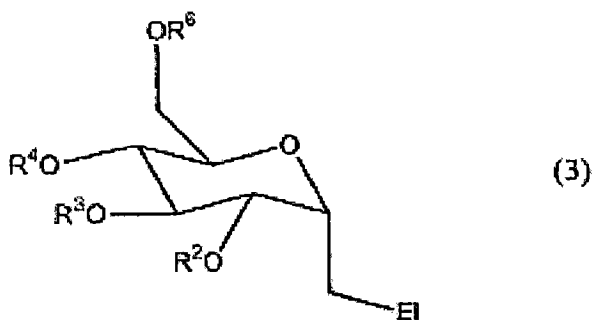
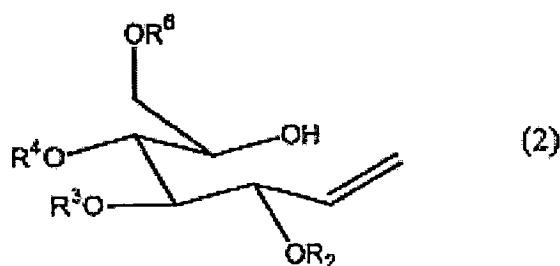
条件以避免产物的分解。在本文描述的条件,甘露糖单元的 2-叠氮基衍生物的产率相对于现有技术的方法得到实质性的提高。

[0141] 在一些优选实施方式中,本发明的寡糖的至少一个甘露糖单元是具有胺或乙酰化胺的氮杂取代的甘露糖,该取代通常在甘露糖单元的 C-2 位置。在本发明方法的一些实施方式中,为 N_3 的氮杂取代基被插入,其可被还原,提供胺,并且在例如 Greene 和 Wuts 的前面关于保护基的参考书中描述的条件下,可乙酰化所述胺。将氮化物 (N_3) 还原为 NH_2 通过一般的方法容易实现,例如使用氢硼化镍,氢硼化镍可由氯化镍六水合物和氢硼化钠原位产生,如本文所描述。

[0142] 在一些实施方式中,本发明提供寡糖和制造寡糖的方法,其中寡糖包括氮杂取代甘露糖单元的重复系列;在许多实施方式中,每一个甘露糖单元具有氮杂取代基,典型为 N_3 、 NH_2 或 $NHAc$,位于每一甘露糖单元的 C-2 位置——例如在分子式 (1) 的化合物中, Az 将为 N_3 、 NH_2 或 $NHAc$ 。任选地,在至少两个甘露糖单元之间的键是磷酸酯键,其可以是 1,6- α 键,例如分子式 (1) 的化合物中的 1,6- α 键,其中 W 是 CH_2 , X 是 O。包括磷酸酯或磷酸酯的 1,6- α 键,例如分子式 (1) 的化合物,其中 W 是 CH_2 或者 O, X 是 O,可通过上面描述的 Mitsunobu 反应形成。优选地, Mitsunobu 在前面作为参考的 Campbell 描述的改进条件下进行。

[0143] 在另一方面,本发明提供改进的方法,以制造某些糖分子,所述糖分子可用于前面描述的寡糖的合成。因此,本发明提供合成某些磷酸酯-取代的单糖的方法。例如,可从葡萄糖获得的、分子式 (2) 的化合物,可被转化为用于形成分子式 (1) 所示的含磷酸酯的 1,6- α 键的磷酸酯的前体,其中 W 是 CH_2 , X 是 O。本方法包括用亲电体环化分子式 (2) 的化合物,以形成分子式 (3) 的化合物。

[0144]



[0145] 其中 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^6 的每一个独立地为 H 或保护基;

[0146] 并且 E1 表示亲电体残余部分。

[0147] 用来进行环化的亲电体可以是汞盐,在这种情况下,在环化为分子式 (3) 的化合

物之后,亲电体残余部分一般为 HgX , 这里 X 为卤素、乙酰基或类似物。通过用碘处理,汞可被取代,得到分子式 (3) 的化合物,其中 $E1$ 是 I 。然后可用磷亲核体取代碘化物;例如,用三烷基亚磷酸盐处理,直接取代碘化物,并且产生二烷基膦酸酯。其它亲电体也可以用来进行环化;例如,卤化环化是已知的,将直接提供卤化物作为 $E1$,其可被取代。相似地,可使用方法,从而烯烃可被环氧化而具有正确的立体化学,使得环氧化物开环可产生吡喃环,和分子式 (3) 的化合物,其中 $E1$ 是 OH 。然后该 OH 可被转化为卤化物或可取代的磺酸酯,例如三氟甲磺酸酯、甲苯磺酸酯或甲磺酰酯,以及可用三乙基亚磷酸盐按前面描述的引入磷,或者可通过使用阴离子 P 种类例如二乙基亚磷酸钠阴离子的直接亲核取代,将其引入。

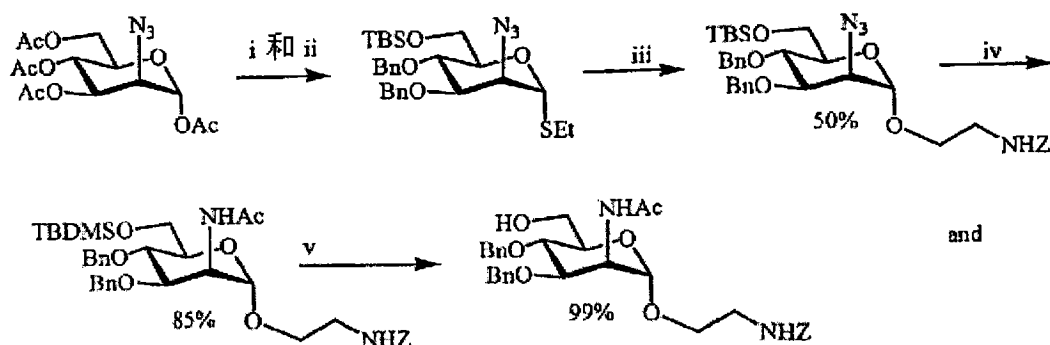
[0148] 这提供了分子式 (3) 的葡萄糖衍生物,而不是 N -取代的甘露糖单元;因此本发明进一步提供将分子式 (2) 或分子式 (3) 中的 OR^2 转化为具有期望“轴”取向的氮杂取代基的方法。氮取代基的引入通常通过分子式 (3) 的化合物与活化剂反应,形成其中 R^2 是可取代基团的化合物例如三氟甲磺酸酯、甲苯磺酸酯或甲磺酰酯而实现。因为在 (2) 中的这种取代将导致烯丙基的重排,所以这种转化通常在分子式 (3) 的化合物中进行。虽然可能通过普通的亲核取代进行这类反应,但在本发明的一个实施方式中,这种用氮杂取代基取代 OR^2 使用 Mitsunobu 反应进行。在优选的实施方式中, Mitsunobu 反应使用磷酰基氮化物作为杂氮取代基的来源。因此,该反应提供非常有效的方式将容易得到的葡萄糖源化合物例如 (2) 转化为 2-脱氧-2-杂氮-取代的甘露糖衍生物,其中 2-杂氮-取代基是氮化物。然后可将氮化物还原为胺,例如用氢硼化镍进行处理,并且可根据需要将胺官能化或保护。在本发明的许多实施方式中,用保护基立刻将胺乙酰基化,通常用乙酰基 (Ac),因为乙酰基可作为保护基并且也存在于脑膜炎奈瑟氏菌的 CPS 的甘露糖单元中。

[0149] 在另一方面,本发明提供了制造保护形式的 2-杂氮-取代的甘露糖衍生物的极大改进的方法。该方法包括通过将 2-羟基转化为三氟甲磺酸酯,然后用氮化物取代三氟甲磺酸酯,来取代以其它方式被保护的吡喃葡萄糖的 2-羟基。亲核取代使中心转向,因此将吡喃葡萄糖转化为吡喃甘露糖。虽然取代本身已被报道,但其使用标准的条件,产生非常差的分离产率。在本发明中,已发现,使用容易获得的 1,3,4,6-四-O-酰基-吡喃葡萄糖可得到期望产物的高产率,只要反应的进程在基本无水下进行。因此,在极性非质子溶剂例如 DMF 或 NMP 中,用氮化物阴离子取代三氟甲磺酸酯;然后,在直接运用到色谱柱之前,可以部分浓缩该反应浓缩物,而不是使用普通的水性/有机萃取过程去除大多数溶剂和盐。使用这样非水过程,产物可以以高产率从柱洗脱。

[0150] 下面的描述提供制造本发明的某些化合物的方法的更多细节。

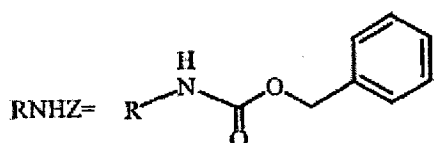
[0151] 起始单体受体的一个实例——下面示出的化合物 XIV,被描述于 Berkin, A. 等, Chem. Eur. J. (2002) 8:4424-4433 中。作为选择,可使用下列次序:

[0152]



(i) TBDMSCl, pyr (ii) BnBr, NaH (iii) NIS, AgOTf, HO(CH₂)₂NHZ

(iv) 1. NaBH₄, NiCl₂(H₂O)₆ 2. Ac₂O (v) TBAF

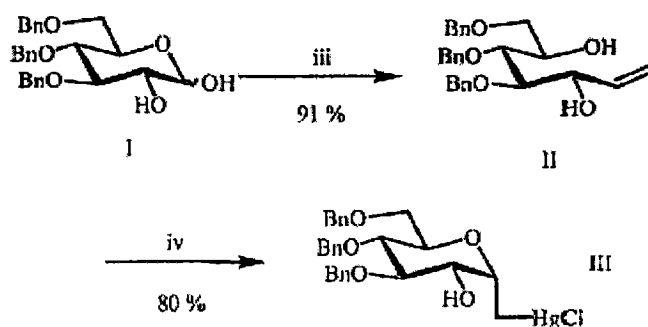


[0153] 当在异头中心使用二苄基保护的化合物引入间隔区时,得到大约 1 : 1 的异头物混合物。如果改用乙酸酯取代苄醚,那么仅得到痕量的 β 异头物,并且产生分离产率为 86% 的期望的 α 异头物。因此,该方法提供在该中心产生期望 α 构型的有效方式,该中心通常为与寡糖结合到载体蛋白的间隔区相连接的中心。 α 构型是期望的,因为其与目标生物的天然 CPS 的所有 α 骨架最匹配。也发现, β 异头物在乙硫基-糖苷取代步骤具有较小的活性。然而,乙酸酯有时引起后来的系列困难,所以在一些实施方式中,在这一步使用苄醚。使用 NaBH₄/ 催化剂 NiCl₂·6H₂O 将完全保护的 2- 氮杂甘露糖中间体的叠氮基再还原为胺,并用乙酸酐乙酰化胺,两个步骤的产率为 85%。最后,用 TBAF 除去甲硅烷基醚,得到 99% 产率的起始结构单元受体。

[0154] 所需延长单元的方便合成在下面方案 1-3 中示出,例如,这允许制备具有不同保护基的延长单元。

[0155] 方案 1

[0156]



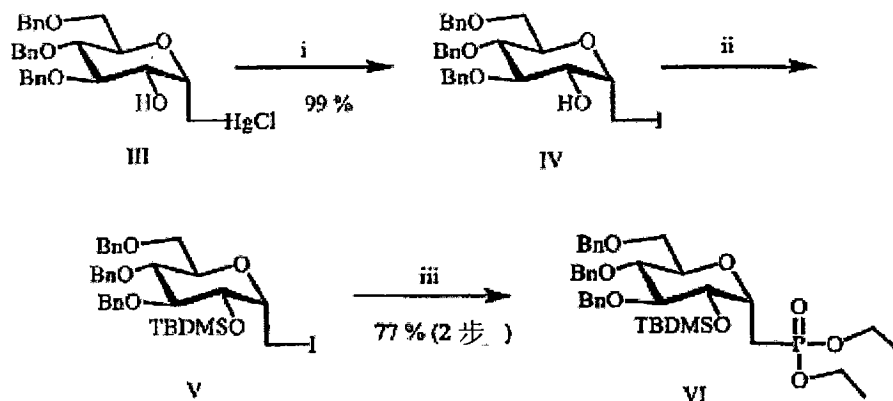
[0157] (i) MeOH/ 可力丁 (ii) BnBr/KOH, HOAc (70%), NaOMe/ MeOH (iii) BuLi/ 甲基三苯基溴化磷 (iv) Hg(OAc)₂, KCl

[0158] 获得化合物 I 并将其用作异头物的混合物,并且在七个步骤中从葡萄糖得到。其通过与甲基溴代三苯基磷的 Wittig 反应被延长,例如,得到 91% 产率的链烯烃。从 D- 阿糖制备该链烯烃的另外方法使用两个碳延长,其涉及加入二乙烯基锌。化合物 II 的汞环化只

得到 α -C-糖苷, 尽管相应的四-O-苄基保护的烯烃产生异头物的混合物。可以使用环化这些种类的可选方法, 例如卤醚化和环氧化 / 亲电体开环。将乙酸汞化合物转化为相应的氯化汞衍生物, 其被分离。接下来, 用碘取代氯化汞, 通过用 I_2 处理得到极好的产率。

[0159] 方案 2

[0160]



[0161] (i) I_2 (ii) TBDMSCl/pyr/咪唑 (iii) $P(OEt)_3$

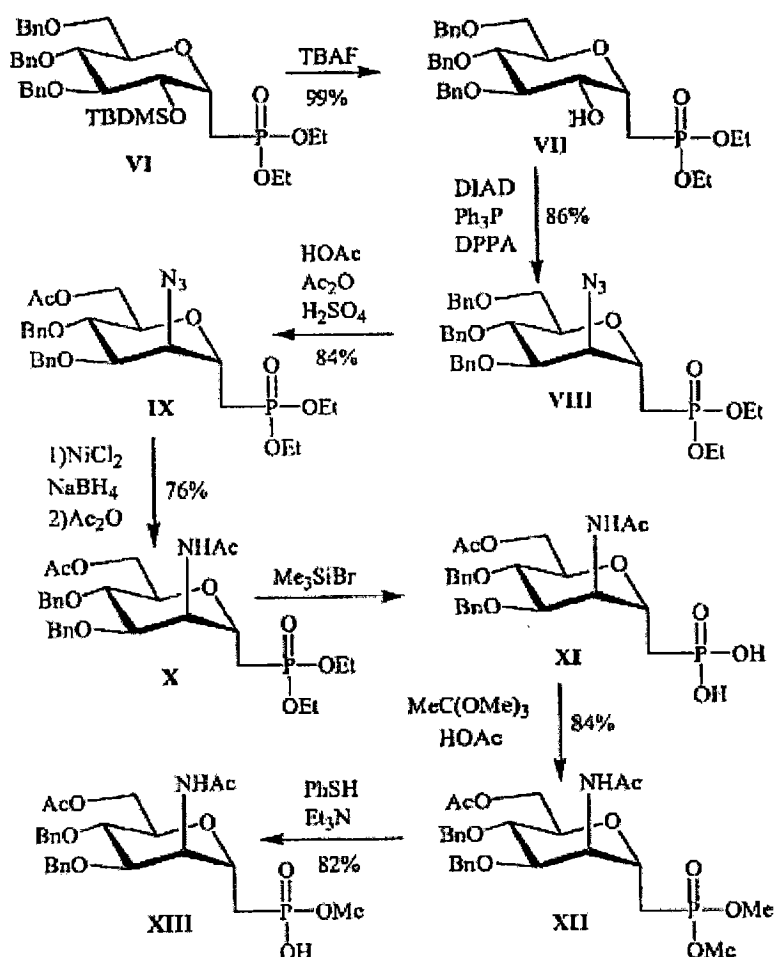
[0162] 为了避免在接下来的步骤中形成环磷酸酯, 首先保护 C2 羟基为甲硅烷基醚。通过使用三乙基亚磷酸酯处理一代碘化物 V, 得到 C-磷酸酯 VII, 获得 77% 产率的 VI。然后使用氟化四丁基铵 (TBAF) 从 C2 羟基上切割下甲硅烷基醚, 产率为 99%。

[0163] 通过与氯化物的取代反应, 然后通过如方案 3 中所示的还原和乙酰化, 引入轴向乙酰氨基基团。该取代使 C-2 中心转向, 提供在天然荚膜多糖中发现的 C-2 乙酰胺取代基的轴取向。通过制备 C-2 羟基的三氟甲磺酸酯和用氯化物阴离子将其取代, 将该氯化物以低产量引入。然而, 通过使用 Mitsunobu 条件, 和二苯基磷酰氮化物 (DPPA) 作为氯化物来源, 得到高产率 (86%) 的叠氨基衍生物 IX。为了在 0-6 处引入可选择性去除的保护基, 用乙酸酯取代 VIII 的第一苄基醚, 使用标准的乙酸水解条件, 得到 84% 的产率; 可省略该步骤, 在这种情况下, 所有苄基醚可被立即切割。省略乙酸水解缩短了合成, 但是更难以使用 C-6 羟基进行进一步的延长或其它的官能化作用, 尽管将苄基换为乙酰基也可在延长步骤之后进行。当乙酸酐和乙酸 (1/1) 的混合物被与硫酸一起使用时, 乙酸水解反应进行得更好。在存在氯化镍六水合物下用氢硼化钠还原氯化物, 并用乙酸酐乙酰基化所形成的胺, 得到 69% 产率的化合物 X。

[0164] 方案 3 阐述本发明内的延长单体的完成, 其为 2-氮杂甘露糖单元。对于延长 C-磷酸酯单体的构建, 使用已公开方法的修改形式。参见 Casero, F. 等, J. Org. Chem. (1996) 61: 3428-3432。在前体 VI 脱甲硅基以提供 2-OH 化合物 VII 之后, 使用 Mitsunobu 条件进行氯化物取代, 得到 2-叠氨基-2-脱氧-吡喃甘露糖苷 VIII (86%)。通过乙酸水解以提供 6-O-乙酸酯 IX (84%), 引入正交的保护基, 以便后来的 6-O 延长。氯化物还原、然后乙酰化给出 X (76%), 从 X 除去乙酯, 产生带有游离磷酸的延长单体 XI。对于许多实施方式, 优选偶联磷酸的单酯, 以便产物仍然受保护为磷酸酯。这些化合物可在两步中制成, 如下面示出的 XI 到 XIII 的转化。注意, 如果需要更长的寡糖, 那么可推迟氯化物的还原, 直到另外的甘露糖单元被装入, 这样所有的氯化物可被还原并且同时乙酰化所产生的胺。

[0165] 方案 3

[0166]

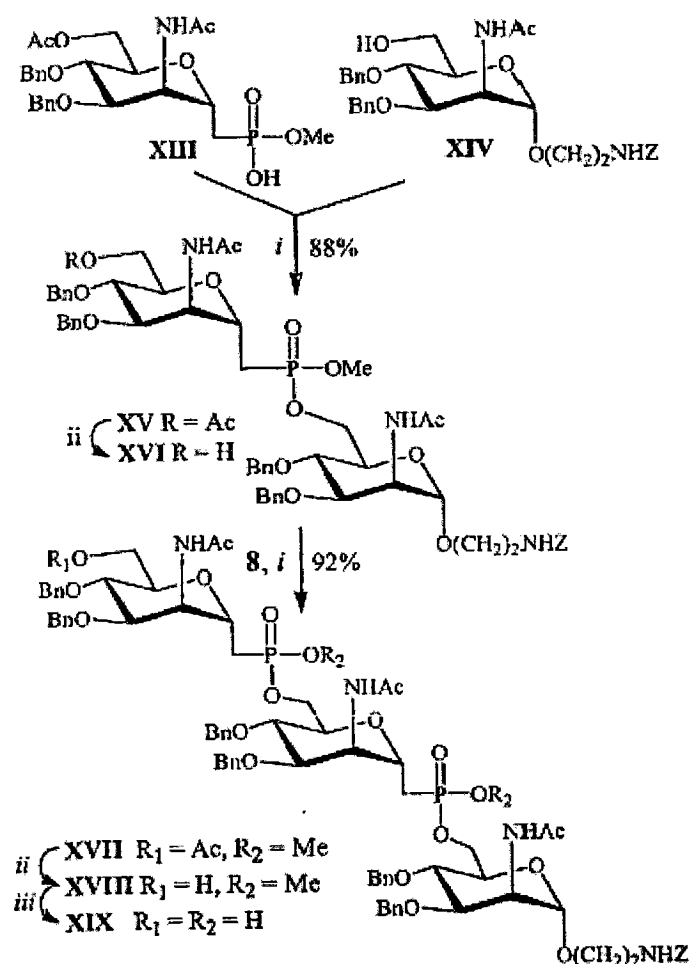


[0167] 如在上面方案 3 所示,使用甲基取代磷酸衍生物上的乙基保护基,以在寡糖被构建后便于去除。在形成连接的二糖之后,在切割磷酸乙酯所需要的条件下该连接(或键)为相对易分解的。因此通过用溴代三甲基硅烷(TMSBr)处理,乙基被定量除去,并且使用乙酸和三甲基原乙酸酯将磷酸产物转化为相应的磷酸二甲酯,产率为 84%。该反应必须被仔细监控,因为在延长的反应期间,脱乙酰作用是竞争副反应。用三乙胺(TEA)和苯硫酚处理磷酸二甲酯,有效地获得单磷酸甲酯 XIII,产率为 82%。

[0168] 方案 4 阐述在两个甘露糖单元之间形成磷酸酯键的偶联反应。DCC 和 Mitsunobu 条件都已被报道将磷酸酯偶联到醇如受体单体上,产率在 50-70% 范围内。Pozsgay 等(参见, A. Berkin, B. Coxon 和 V. Pozsgay, Chem. Eur. J., 2002, 8, 4424.)。然而,当受体已经包含磷酸酯时,产率急剧下降,这可能限制这类条件提供所需三聚体、四聚体和其它更长多糖的能力。在目前情况下的 Mitsunobu 条件,使用 Ph₃P 和 DIAD,得到 XV 的良好产率(47%)。然而,使用 Mitsunobu 条件的修改形式,如在 Campbell, J. Org. Chem. (1992) 57:6331-6335 描述的,可实现好得多的产率。Campbell 的条件,使用三(4-氯苯基)膦和大量过量的三乙胺,得到 88% 产率的 XV。在该反应中,当仔细排除可与弱亲核磷酸盐阴离子竞争的其它亲核类型时,可得到最好的产率。

[0169] 方案 4

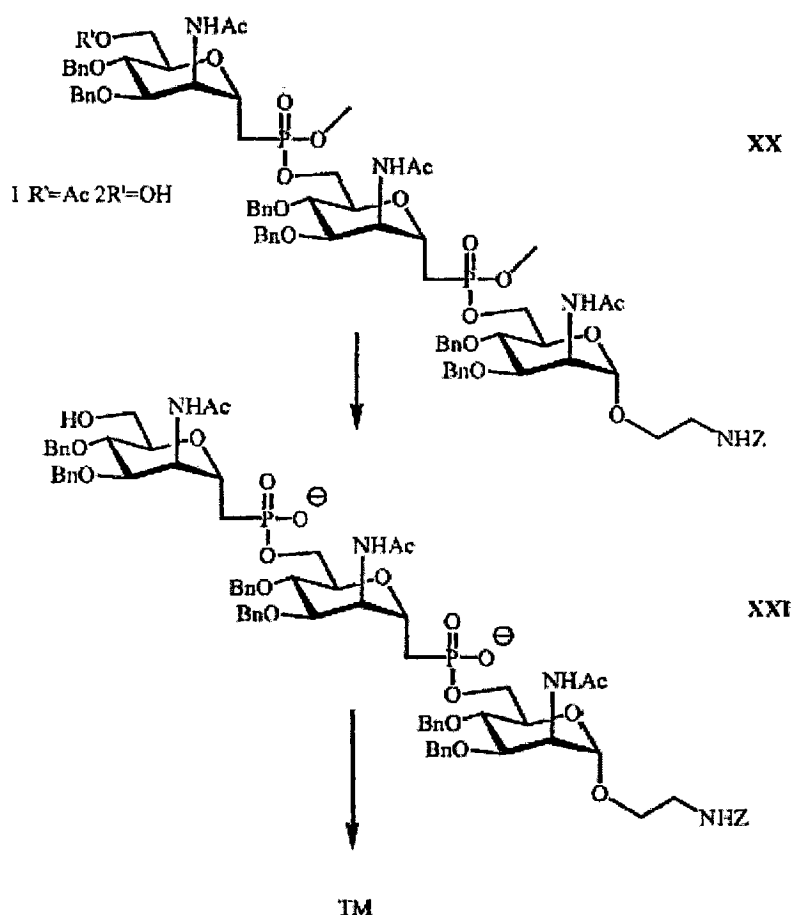
[0170]



[0171] 索引 : i) (pClPh)₃P, DIAD, Et₃N, THF ; ii) KOH, MeOH ; iii) PhSH, DBU, CH₃CN。

[0172] 使用上面描述的 Mitsunobu 条件,发现三聚体形成的产率可比得上甚至高于二聚体形成的产率。通过脱乙酰作用将二聚体 XV 转化为新的受体 (→ XVI)。然后,在 XVI 和 XIII 之间该修改的 Mitsunobu 反应提供 92% 产率的三聚体 XVII。通过 MS 和 NMR 证明产物的成分,后者 NMR 具有一定的复杂性,原因在于由磷的手性产生的非对映异构体磷酸酯。化合物 XVII 被去乙酰基化,这产生可结合到其它延长单体的新的受体 XVIII。在这步和接下来除去磷酸甲酯之后,破坏磷中心的手性,并且化合物 XIX 的 NMR 数据反映不存在磷非对映异构体。

[0173]

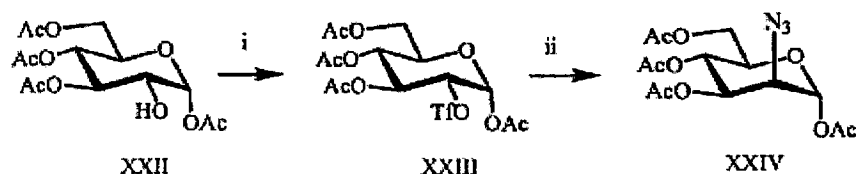


[0174] 也发现,通过延长受体 XIV 和延长单体 XIII 的混合物在 Mitsunobu 条件的暴露时间,并且在存在一些过量 XIII 下,反应提供更长的单体。因此,在该反应条件下,从引入的延长单体切割 C-6 乙酰基在某一速度下在原位进行;这提供新的受体分子。因此在某些程度上,例如,通过延长暴露于 Mitsunobu 反应,进行将 XVI 转化为 XVI,并且在那些条件下在存在过量 XIII 下,形成 XVII;等等,以产生更高的寡聚物。因此,该反应提供了制造含有保护形式的多个甘露糖单元的寡聚物的方式,而不需要逐步的去保护/分离过程,并且使本发明合成的免疫原性寡糖具有大小分布。在一些实施方式中,这已表明,主要提供四-和五-甘露糖寡糖,具有少量的更长寡聚物。因此,在本发明中提供合成更长寡聚物化合物的高度有效的方法。

[0175] 本发明也提供从容易获得的前体 1,3,4,6-四-O-乙酰基-吡喃葡萄糖,合成 2-叠氮基-2-脱氧-D-吡喃甘露糖的简单又改进的方法,如方案 5 阐述。该中间体可用于合成许多本发明的甘露糖单元。

[0176] 方案 5

[0177]



[0178] i, (TfO)₂O, pyr ii, NaN₃

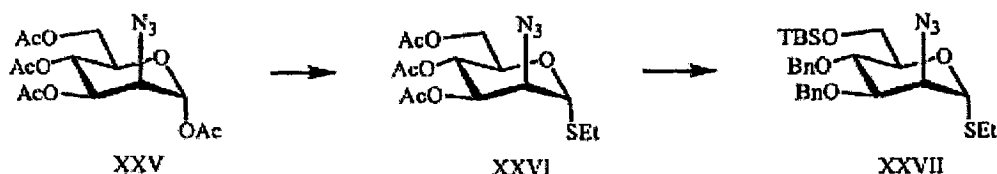
[0179] 在合成保护的 2-叠氮基甘露糖化合物的尝试中,使用三氟甲磺酸酐 (triflic

anhydride) 将 1,3,4,6-四-O-乙酰基-吡喃葡萄糖转化为其 2-O-三氟甲磺酸酯,并且用 NaN_3 处理三氟甲磺酸酯。根据 TCL 和 MALDI-TOF-ms, 2-叠氮基产物以高产率形成,但是明显地,在典型的含水生产期间,其大量分解,分离的产率仅 20%。然而,当反应在没有使用水下进行时,产率急剧上升。因此,用于取代的溶剂的大多数 DMF 在减压下被除去,并且将残留物转移到干燥柱中,该干燥柱含有预干燥的二氧化硅在干燥甲苯中的浆体。使用在甲苯中增加的乙酸乙酯梯度洗脱产物。在纯化后,产物是相对稳定的。1,3,4,6-四-O-乙酰基吡喃葡萄糖原料很容易用一锅合成法 (one pot synthesis) 从葡萄糖大规模合成,并且使用标准的条件以 97% 的产率获得中间体三氟甲磺酸酯。从所述的转化物的分离产率强烈依赖于工作条件的无水程度;通过使用预干燥的玻璃器皿和前面描述的预干燥的二氧化硅除去水,对于最优化的产率是必需的。通过在生产期间和硅胶层析法期间,最小化在湿气中的暴露,获得的可重复产率为 60% 或更好。

[0180] 四乙酸酯产物显示出在储存期间分解的一些倾向。然而,通过用 $\text{EtSH}/\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ 处理转化为其 1-乙硫基糖苷后,其变得十分稳定。接下来用醇盐处理,以除去乙酸酯基团,如方案 6 所示,并且用叔-丁基二甲基甲硅烷基 (TBS) 基团,选择性地保护伯羟基。两个仲羟基被保护为苄酯,但是这里和整个过程的其它许多步骤中可使用各种各样不同的保护基。然后,用连接体取代 -SEt 基团,连接体可被用来将最终的寡糖结合到蛋白质。可选地,其可被用来在装配寡糖时将受体单体结合到固体支撑体。在该情况下,在异头位置将被保护的氨基引入;然而,可以使用多种适于结合寡糖的连接基团,并且本领域的普通技术人员,可容易选择和使用其它的基团。

[0181] 方案 6

[0182]



[0183] 二聚体可被用作免疫原,不用进一步的延长,或者可以制备和使用更长的寡聚物。对于二聚体和三聚体,通过标准的水解除去 C6 位置的乙酰基。使用 1,8-二氮杂-7-双环 [5.4.0] 十一碳烯 (DBU) 作为碱以及苯硫酚,切割磷酸酯的甲酯,以实现亲核去甲基化作用。然后经由标准的还原氢化,切割苄醚连同苄氧基羰基,这使用活性炭上的钯作为催化剂。为了使反应进行彻底,加入含水 HCl ,以便形成的胺被质子化以形成氯化氢,这减少了催化剂中毒的倾向。

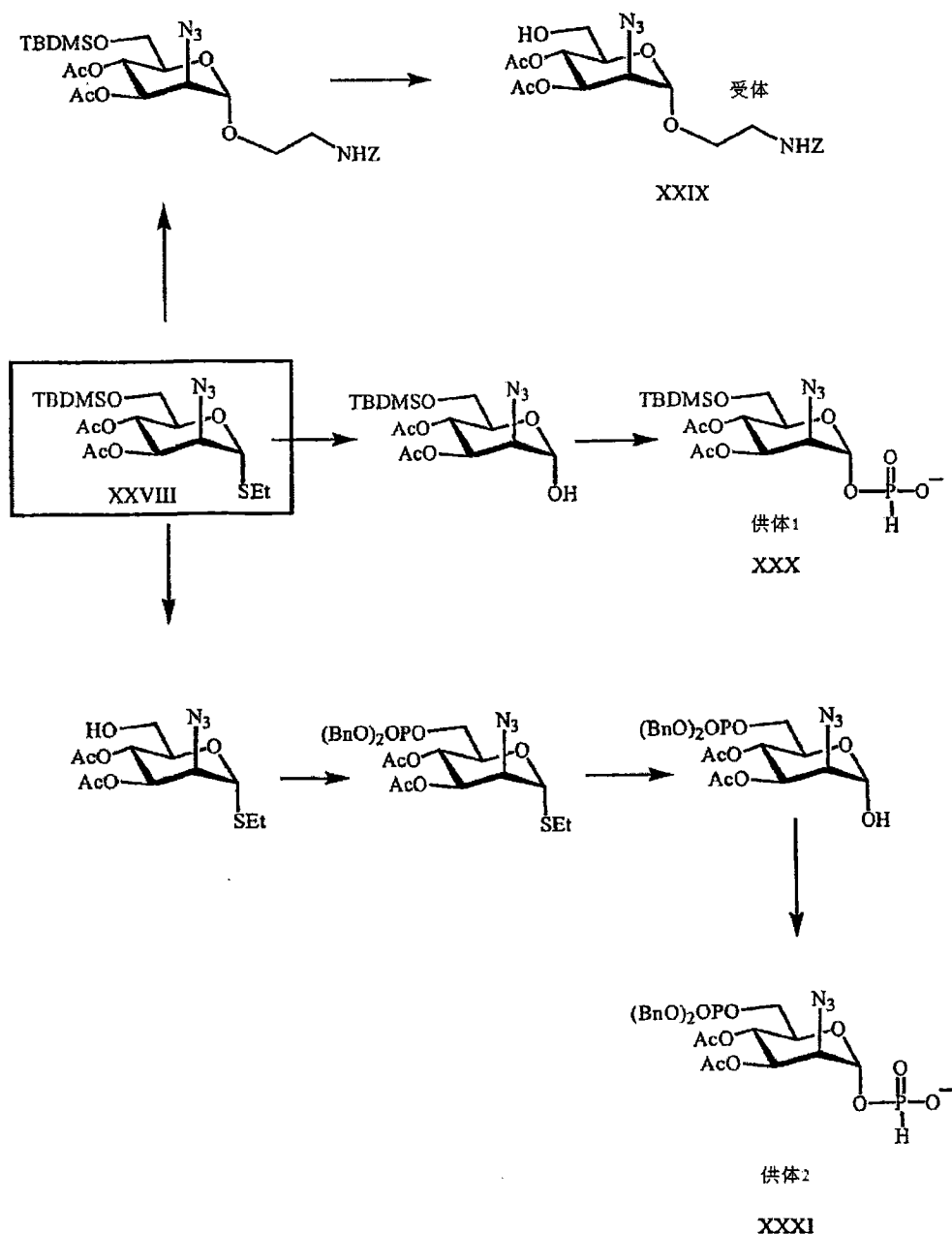
[0184] 可将本发明的寡糖施用给哺乳动物,以诱导免疫原性应答;它们可按照前面描述的使用,典型地在至少部分去保护以后使用。它们也可被部分或完全乙酰化,以加宽诱导出的免疫应答谱。目标生物体的 CPS 基本上在 C-3 羟基处乙酰化;因此本合成方法的灵活性使其可能制备含有一个或多个乙酰基团的化合物,并且特别可能制备二聚体、三聚体和 C-3 羟基处部分或完全乙酰化的更高的寡聚物,或者这些的混合物。

[0185] 代替地或另外地,使用磷酸酯键稳定磷酸二酯,如前面描述的,其可能通过在合成处理期间上至和任选地在将寡糖结合到蛋白质的步骤中,加入氮化物基团如 C-2 氮杂取代基,稳定磷酸二酯至可用的程度。这种稳定是诱导性的,但是足够提高中间体的工作稳定性

超过相应的 NHAc 化合物的工作稳定性。在氮化物完成其目标之后,可用硼氢化镍将其还原,并用乙酸酐或相似的酰化剂酰化,如本文所描述。本发明的寡聚物化合物因此可引入磷酸二酯键至一定程度,如上描述,并且通过一般的方法和本文描述的那些方法引入磷酸二酯。

[0186] 为了具有使两个目标分子具有或不具有乙酸酯的选择,保护基策略基于乙酸酯作为永久保护基。为了稳定异头磷酸二酯键,使用氮化物作为乙酰氨基的前体,尽可能进入合成,如下面方案 7 中阐述的。氮化物的吸电子性能和缺少参与作用 (participating effect) 强烈地保护该键。而且,在使用二甲氧基三苯甲基作为 6-OH 的临时保护基的开始问题之后,我们使用 TBDMS (叔-丁基二甲基甲硅烷基醚,有时称为 TBS)。TBDMS 醚以良好的产率被切割下来,由于乙酰基移动或易分解的磷酸二酯键的切割,产生很小的问题。在先前的 C-磷酸酯合成中成功用来将 TBDMS 醚去保护的 TBAF 不能被使用,原因在于如果使用 TREAT-HF,乙酰基移动相当缓慢 (特别当在位置 2 具有氮化物时) 但可靠。

[0187]



[0188] 对于一个有效的模块合成,需要三个单糖结构单元;具有初始单体 6-OH 受体的间隔区、具有临时 6-OH 保护的 α -H-磷酸酯延长单体(供体 1)和在伯位置磷酸化的封端 α -H-磷酸酯单体(供体 2)。为了获得在 C-6 位置具有磷酸酯的目标分子,如这里以三聚寡糖为示例,含有二苄基保护的磷酸酯的供体被使用,这是因为使用 amidite 化学的 C-6 羟基的连接后(post-linkage)修饰尝试是不成功的。

[0189] 为了简化合成,从相同的前体 XXVIII 合成所有三个单元,如上面方案 7 所示。使用传统的方法合成原料。为了制造受体,将原料偶联到苄氧基羰基保护的乙醇胺间隔区,产率为 86%,使用 TREAT-HF 除去 TBDMS-醚得到 97%产率的受体 XXIX。

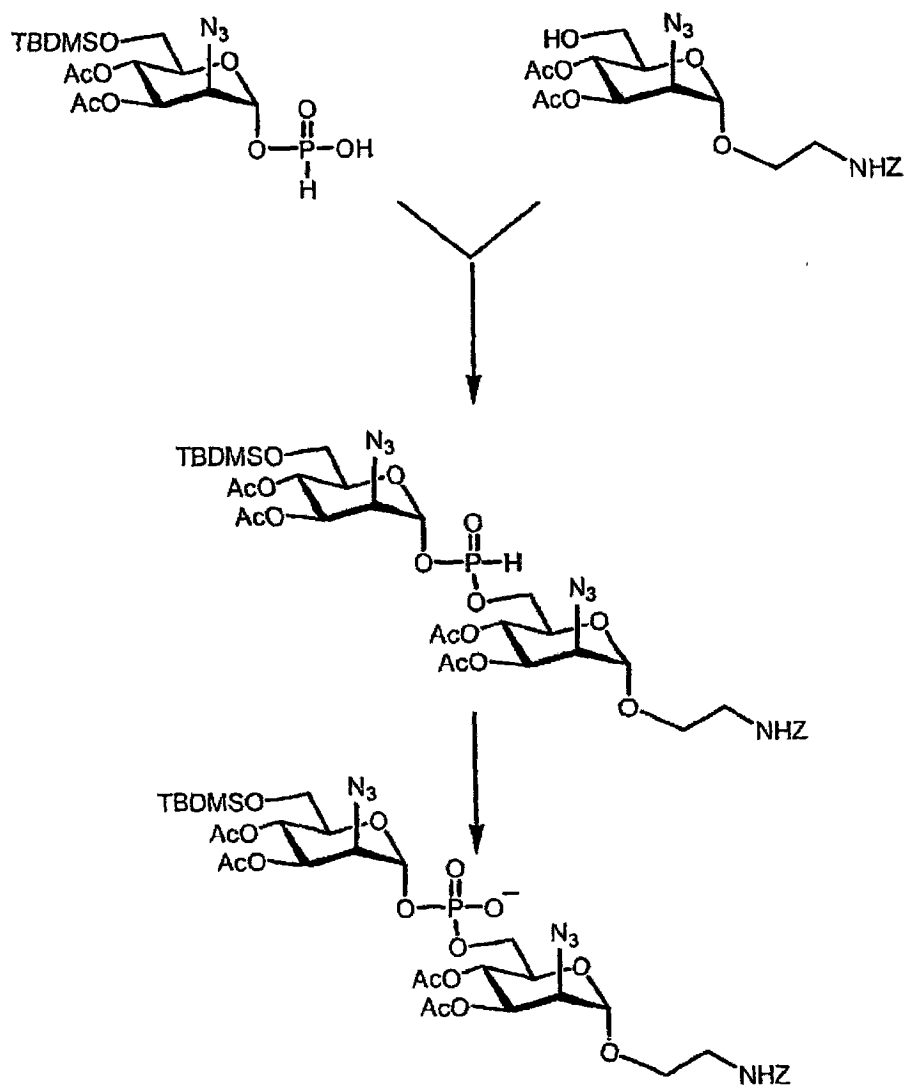
[0190] 首先通过使用 NIS 作为促进剂和水作为受体在 -20°C 下糖基化,水解硫代葡萄糖苷,合成供体 1。仅得到期望的 α 异头物,产率为 82%。如果在室温下反应,形成大百分比的 β 型。然后,使用 PCl_3 /咪唑,磷酸化该化合物,得到 97%产率的 XXX。因此,本发明包括在低温下例如低于室温下制备 α 异头物,优选在低于 0°C 进行,更优选地在低于 -10°C ,例如 -20°C 或更低。

[0191] 为了合成具有 H-磷酸酯——其可用于加入通过磷酸二酯键与本发明寡糖连接的甘露糖单元——的供体甘露糖单元,TBDMS-醚以 75%的产率被切割,并使用 amidite 化学,磷酸化羟基,以在 C-6 处得到苄基保护的磷酸酯(67%)。以与供体 1 相同的方式通过偶联水,水解乙基硫代糖苷(79%),然后将其磷酸化,得到 92%产率的 H-磷酸酯供体甘露糖单元 XXXI。

[0192] 使用传统的 H-磷酸酯化学,用新戊酰氯促进的浓缩,将延长单体偶联到受体,如下面方案 8 所阐述。使用元素碘和水,氧化 H-磷酸酯二酯,以提供磷酸二酯。以良好的产率(96%)获得二聚物。

[0193] 方案 8

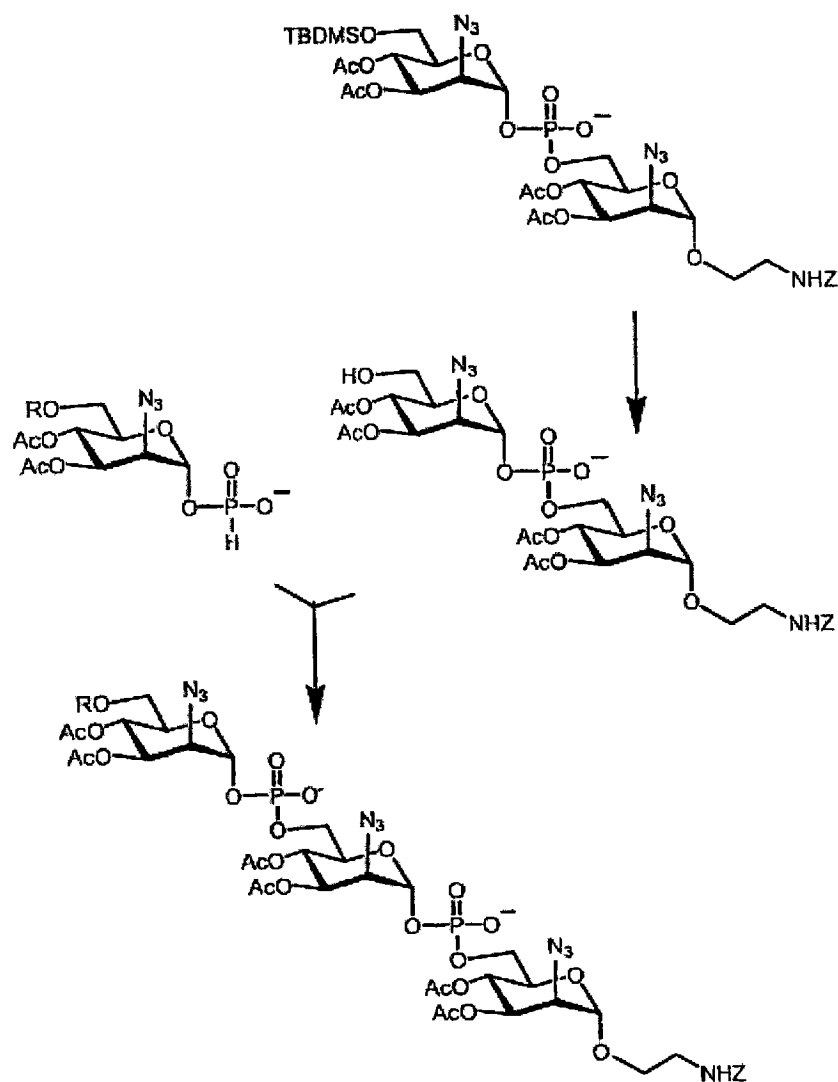
[0194]



[0195] 通过用 TREAT-HF 对 C-6 羟基去保护和反复加入延长单体,实现延长到三糖;这里保护基策略与在上面用于磷酸酯键构建的方案中示例的保护基策略的相容性,使两种类型的键在给定的寡糖中混合或匹配。这里实例阐述了用供体分子 XXX 和 XXXI 延长,提供在最后的甘露糖单元上具有 C-6 羟基,或者在那个位置上具有 C-6 O- 磷酸酯的三聚寡糖。

[0196] 方案 9

[0197]



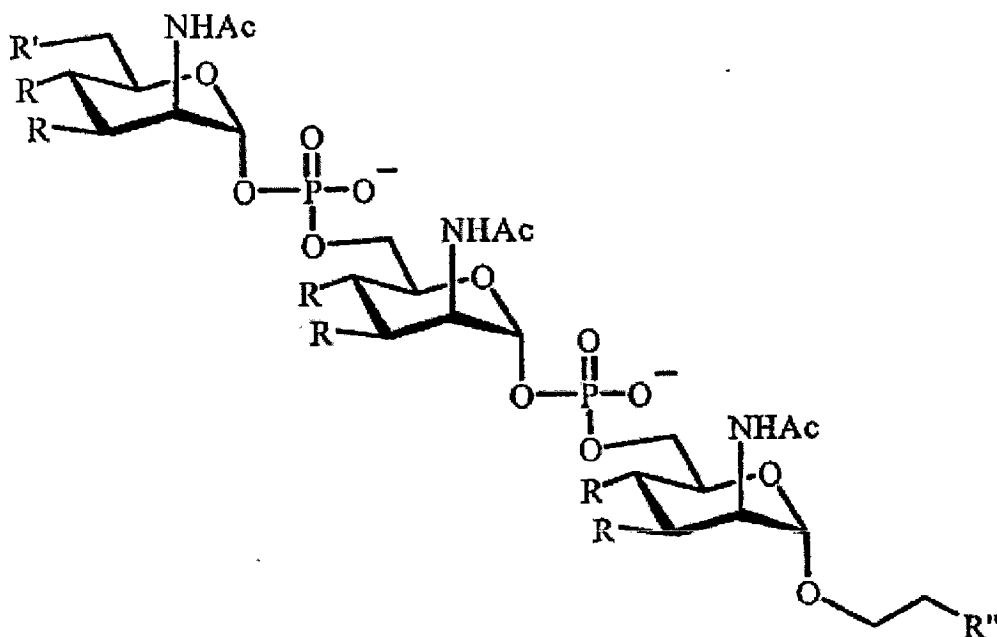
[0198] 这里 R 是 OH 或者二苄基磷酸酯。

[0199] 为了获得三糖,再次使用 TREAT-HF,以 91%的产率除去二糖上的 TBDMS-醚。接下来用与偶联二糖所使用的相同条件偶联两个供体,导致分别以 62%和 59%的产率形成两个三糖。在第二或后来偶联期间获得的产率低于从第一步偶联获得的产率,如 Pozsgay 等(参见, A. Berkin, B. Coxon 和 V. Pozsgay, Chem. Eur. J., 2002, 8, 4424.) 观察到的。因此,在优选的实施方式中,寡糖中两个相邻的甘露糖单元之间的至少一些键一般包括磷酸酯,而不是磷酸二酯。

[0200] 本发明的两种形式寡聚物上的氮化物在 R' 或其相当位置例如磷酸酯寡聚物的二聚物和三聚物中的 R⁶ 基团处,也可包括另外的保护形式的磷酸酯。这被任选地引入,因为天然 CPS 中的末端甘露糖单元可被磷酸化,并且使用传统化学可将相应的磷酰基团引入作为二苄基磷酸酯。然后,例如,苄基可以随 C-3 和 / 或 C-4 位置的苄醚被除去,或者苄基可以随可用来保护第一甘露糖单元位置 1 的间隔区部分氨基的苄氧基羰基的还原性切割而被除去。苄基磷酸酯不干扰产生寡聚物所需要的其它反应。例如,使用硼氢化钠和催化量的氯化镍六水合物,在某些含有该基团的化合物中的氮化物被成功地还原为胺,并且使用乙酸酐将所形成的胺乙酰化,得到相应的氨酰基衍生物。当三聚磷酸二酯连接的化合物中的甘露糖单元的末端基团为 OTBDMS 时,这个反应产生 89% 的产率,当末端基团为二苄基磷

酸酯时,产率为 64%。

[0201]



[0202] 1R = OAc 2R = OH R' = TBDMSO 或磷. 1R'' = NHZ2R'' = NH₂

[0203] 两个三糖以不同的顺序去保护。为了得到目标分子 1 和 2, 首先使用还原性氢化去保护 Z- 基团 (83%)。为了避免还原性氢化期间磷酸二酯键的降解带来的问题, 将阳离子交换树脂加入到混合物, 得到良好的结果。再次使用 TREAT-HF 除去 TBDMS- 醚, 给出 85% 产率的 1。在标准甲醇钠 / 甲醇条件下, 切割乙酸酯。对于目标分子 3, 以与先前 1 去保护相同的方式除去 Z (85%), 为了得到 4, 在还原性氢化之前 (64%) 除去乙酸酯 (80%)。

[0204] 在上述方案中描述的方法也可用于制备具有 C- 磷酸酯的化合物, 例如本文描述的分子式 (1) 或 (1') 的那些化合物。

[0205] 使用化合物作为抗原

[0206] 通过上述方法制备的寡糖是免疫原性的, 并且可用于诱导保护免于脑膜炎奈瑟氏菌感染的免疫应答, 如在疫苗中。具体而言, 具有上述分子式 (1) 所示结构的寡糖如果被投药给哺乳动物, 能诱导免疫原性应答, 并且因此施用包括分子式 (1) 的寡糖的组合物可用于诱导抗体的形成和 / 或提供免疫原性应答, 以及提供对 A 型脑膜炎奈瑟氏菌感染的至少部分抗性或部分免疫性。抗体和 / 或免疫原性应答提供保护免于 A 型脑膜炎奈瑟氏菌感染。包括分子式 (1) 的部分的化合物, 特别是 W 是 CH₂ 或 O, X 是 O 并且 Az 是 NHAc 的那些化合物, 可用作如分子式 (4) 的化合物的疫苗成分。

[0207] 当被结合到蛋白质时, 这些化合物是特别有用的, 并且任选地, 分子式 (1) 的 Z 基团可被用来将分子式 (1) 的寡糖结合到蛋白质。同样地, 在分子式的其它化合物中, 本发明寡糖的第一甘露糖单元的 C-1 位置的相应基团, 可以是能被用来将该化合物结合到载体蛋白, 以提高其免疫原性性能的部分。尽管选择通过 Z 连接, 然而, 本发明的化合物和具体包括分子式 (1) 或分子式 (4) 结构的化合物可被通过其它方法连接到载体蛋白, 例如通过一个或多个羟基或者通过代替乙酰基连接在其中一个甘露糖单元的一个乙酰胺上的酰基。这类可选的连接机制在本发明的范围内, 只要寡糖的 C-1 (异头) 中心保持所需的 α 构型。优选地, 这类寡糖在两个甘露糖单元之间包括至少一个磷酸酯键。

[0208] 因此,本发明的一个方面涉及疫苗,其包含作为活性成分的免疫原性有效量的如本文描述的免疫原性寡糖。可将寡糖(一种或多种)引入宿主,包括人,或者单独引入,或者结合到载体例如蛋白质而引入,或以甘露糖单元或其它糖类的均聚物或杂聚物而引入。在一些实施方式中,它们被用作复合糖,并且根据其对寡糖抗原的免疫原性应答的增强能力,选择寡糖所结合的蛋白质;有时优选在待被治疗的哺乳动物中已诱导免疫应答的蛋白质。复合糖具有免疫活性增强的优点,并且另外具有诱导抗体和/或 CTL 的能力,所述抗体和/或 CTL 与病毒或肿瘤细胞的不同抗原决定子反应。

[0209] 本发明的免疫原性组合物包括至少一个本发明的化合物,并且可任选地包括一个以上这类化合物。因此,有时期望将本发明的两种或多种化合物混合在一起,以扩大诱导出的免疫原性应答。例如,经常期望将化合物——其中 R^3 是 H——与化合物——其中 R^3 是 Ac——相结合,因为目标生物体的 CPS 是部分而不是全部地在这个位置被乙酰化。因此,在一些实施方式中,免疫原性组合物包括至少两种、任选三种或多种这类的免疫原性化合物和/或这类化合物的蛋白质偶联物。

[0210] 相似地,当作为复合糖被输送时,载体蛋白可影响免疫原性应答,并且甚至影响抗体的准确属性,所述抗体是由本发明的一种或多种化合物治疗动物时产生的。因此,本发明包括含有一种以上载体蛋白的组合物,无论它们是否含有两种或多种寡糖。

[0211] 可用的载体蛋白在本领域是公知的,包括,例如甲状腺球蛋白、清蛋白例如人血清清蛋白、破伤风类毒素、白喉类毒素、聚氨基酸例如聚(赖氨酸:谷氨酸)、流感病毒、乙型肝炎病毒核心蛋白、乙型肝炎病毒重组疫苗和类似物。也可使用细菌外膜蛋白,例如外膜复合物 c(OMPC)、孔蛋白、运铁结合蛋白、肺松解素(pneumolysis)、肺炎球菌表面蛋白 A(PspA)、或肺炎球菌粘附蛋白(PsaA)。其它蛋白例如卵清蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清清蛋白(BSA)或纯化的结核菌素(PPD)蛋白衍生物也可被用作载体蛋白。载体蛋白优选非毒性和非反应原性并且可以获得充足数量和纯度的蛋白。

[0212] 载体蛋白应当遵从标准的结合方法。在本发明优选的实施方式中,从白喉棒状杆菌(*Corynebacteria diphtheriae*)培养物纯化并且使用甲醛化学去毒的白喉毒素被用作载体蛋白。在其它实施方式中,使用 CRM197。

[0213] 将寡糖结合到载体蛋白的方法是常规的,有技术的从业者使用传统的方法可产生含有本发明化合物的复合糖。指导在很多出版物也可获得,例如在美国专利 4,356,170; 4,619,828; 5,153,312; 5,422,427; 和 5,445,817 中。

[0214] 在一个这类实施方式中,使用 2-氨基乙氧基在第一甘露糖单元的 C-1 位置作为间隔区部分和磷酸二酯键,并且使用辛二酸或方酸酯作为双官能试剂将间隔区部分连接到载体蛋白,并且使用 CRM197 作为载体蛋白,制备复合糖。根据 MALDI-TOF 质谱分析,这些偶联物在每个载体蛋白分子上平均包含大约五个寡糖分子。然而,通常期望寡糖:载体蛋白的摩尔比为大约 0.1 到大约 1,大约 1-30 : 1 或大约 1-10 : 1 的摩尔比在本发明的范围内,无论使用哪种载体蛋白。寡糖与载体蛋白的比例也可表述为两者之间的重量比例;通常优选大约 1 : 1 到 1 : 500 的比例。精确的比例依赖于蛋白质和寡糖的分子量的比例;对于更小的寡糖,有时使用 1 : 5 到 1 : 200 的重量比。

[0215] 在将荚膜多糖结合到载体蛋白之后,多糖-蛋白质偶联物可通过各种技术进行纯化(针对多糖-蛋白质偶联物的量进行富集)。纯化步骤的一个目标是从多糖-蛋白偶联

物去除未结合多糖。用于纯化的一个方法,涉及在存在硫酸铵下进行超滤,其被描述于美国专利 6,146,902。可选地,通过任意的许多标准技术,其中包括尺寸排阻色谱法、密度梯度离心法、疏水作用色谱法或硫酸铵分馏法以及其它方法,可从未反应的蛋白质和多糖中纯化出偶联物。参见,例如 Anderson, P. W. 等, J. Immunol. (1986) 137 :1181-1186。也参见 Jennings, H. J. 等, J. Immunol. (1981) 127 :1011-1018。

[0216] 本发明的疫苗包括至少一种本发明的免疫原性化合物,也可包括生理学上可耐受的(可接受的)稀释剂例如水、磷酸盐缓冲盐盐水或生理盐水,并且进一步一般包括佐剂。美国专利第 6,869,607 号提供用于蛋白质-结合免疫原的非离子佐剂,并且讨论了其它适用的佐剂,并且在此通过引用引入对那些佐剂的描述。物质例如弗罗因德不完全佐剂、磷酸铝、氢氧化铝或明矾、硫酸铝、磷酸铝和它们的组合是本领域公知的作为佐剂的物质。也可用的是 BAY、DC-chol、pcpp、单磷脂 A、CpG、AS-21、霍乱毒素和甲酰甲硫氨酰肽,以及乳液制剂,其包括 MF59、SAF、角鲨烷、吐温、pluronic-嵌段聚合物 L121 和成分例如单磷脂 A、海藻糖二霉菌酸以及细胞壁骨架。也可包括细胞因子例如 IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12、干扰素和肿瘤坏死因子(TNF)。在本发明的一些实施方式中,明矾被用作佐剂。

[0217] 在用本文描述的组合物经由注射、气溶胶、口服、经皮或其它途径免疫之后,宿主的免疫系统通过产生大量对期望抗原特异性的 CTL,对疫苗应答,并且宿主对后来脑膜炎奈瑟氏菌病原体的感染至少部分免疫。

[0218] 本发明的疫苗和药学组合物打算用于肠胃外、表面、口腔或局部给药。优选地,其被肠胃外给药例如静脉内、皮下、皮内或肌内给药。因此,本发明提供肠胃外给药的组合物,其包括溶解或悬浮于可接受载体的免疫原性部分的溶液,优选为主要含水载体。可使用多种含水载体,例如水、缓冲水、0.8%盐水、0.3%甘氨酸、透明质酸和类似物。可通过传统的灭菌技术将这些组合物灭菌,也可无菌过滤这些组合物。对形成的水溶液可进行包装以照其原样使用,或者进行冻干,在给药之前将冻干的制剂与无菌溶液结合。组合物可包含药学可接受的辅助物质,其近似生理条件所要求,例如 pH 调节剂和缓冲剂,渗透压调节剂、润湿剂和类似物,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、失水山梨糖醇单月桂酸酯、油酸合三乙醇胺等。这类药学组合物的制备在本领域的普通技术范围内,标准参考书例如最新版本的 Remington's Pharmaceutical Science 可进行指导,其被引入本文作为参考。

[0219] 在优选的实施方式中,大量水混合物中包含分子式(1)或分子式(4)的至少一个部分的疫苗组合物被配制为无菌、无致热原的缓冲盐水或含磷酸盐的溶液,其也可包括保存剂(或防腐剂)或者也可无保存剂。适当的保存剂包括例如苄醇、对羟基苯甲酸酯、乙基汞硫代水杨酸钠、氯丁醇和亚苄基苯扎氯铵。溶液优选为接近等压的,并且可用试剂例如酒石酸钠、氯化钠、丙二醇和磷酸钠调节其渗透压。

[0220] 药物制剂中,本发明的免疫原性寡糖的浓度可广泛变化,即,按重量计从在大约 0.1%以下,通常在或至少大约 0.1%至多达 20%到 50%或更多,并且主要根据流体体积、粘性等以及依照所选择的具体给药方式进行选择。化合物和组合物的人单位剂量形式一般包括于药物组合物中,其包括具有可接受载体、优选含水载体的人单位剂量,并且以本领域技术人员已知的流体体积施用,以将该组合物给药于人,而且根据对于被治疗的具体对象的普遍理解的原则进行调整。因此,在一实施方式中,本发明提供单位剂量的在适当量水溶液中的本发明疫苗成分,所述适当量的水溶液例如 0.1-3ml,优选 0.2-2ml。

[0221] 本发明的免疫原也可经由脂质体给药,这可用在在特定的组织中浓缩免疫原,所述特定的组织例如淋巴组织,或者增强免疫原的活性或输送特性。对于制备脂质体,多种方法是可行的,其被描述于例如 Szoka 等, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* (1980) 9:467, 美国专利第 4,235,871、4,501,728、4,837,028 和 5,019,369 号中。

[0222] 对于固体组合物,可使用传统的无毒性固体载体,其包括例如药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁和类似物。对于口服给药,通过引入任何的通常使用的赋形剂,例如前面列出的那些载体,和单位剂量的活性成分——即,本发明的一种或多种化合物,无论其是否结合到蛋白质,形成药学可接受的无毒性组合物。

[0223] 对于气溶胶给药,优选以细分的形式,连同表面活性剂和推进剂,提供免疫原性化合物。当然,表面活性剂必须是无毒性的,并且优选可溶于推进剂。这类试剂的代表是含有 6 到 22 个碳原子的脂肪酸与脂肪族多元醇或其环式酸酐形成的酯或偏酯,所述脂肪酸例如己酸、辛酸、月桂酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、油硬脂酸 (olesteric acid) 或油酸。可使用混合的酯,例如混合的或天然的甘油酯。按组合物的重量计,表面活性剂可占 0.1% 到 20%,优选地 0.25% 到 5%。组合物的余量通常是推进剂。当需要时,也可包括载体,例如用卵磷脂用于鼻内输送。

[0224] 对于该用途的有效量依赖于例如寡糖组合物、其是否结合到蛋白质、给药方式、患者的体重和总体健康状况以及开处方医师的判断,但是一般地,初次免疫(即对于预防给药)的范围,对于 70kg 患者为从大约 1.0 μ g 到大约 5,000 μ g 肽(例如 1.0 μ g, 1.5 μ g, 2.0 μ g, 2.5 μ g, 3.0 μ g, 3.5 μ g, 4.0 μ g, 4.5 μ g, 5.0 μ g, 7.5 μ g, 10 μ g, 12.5 μ g, 15 μ g, 17.5 μ g, 20 μ g, 25 μ g, 30 μ g, 35 μ g, 40 μ g, 45 μ g, 50 μ g, 75 μ g, 100 μ g, 250 μ g, 500 μ g, 750 μ g, 1,000 μ g, 1,500 μ g, 2,000 μ g, 2,500 μ g, 3,000 μ g, 3,500 μ g, 4,000 μ g, 4,500 μ g 或 5,000 μ g)。实际施用给对象的剂量通常根据每 kg 对象体重适当的量确定。例如,有效量可以是大约 0.1 到 5 μ g/kg 体重。

[0225] 任选地,初次剂量之后,按照数周到数月的加强方案,给予从大约 1.0 μ g 到大约 1,000 μ g 肽的加强剂量(例如 1.0 μ g, 2.0 μ g, 2.5 μ g, 3.0 μ g, 3.5 μ g, 4.0 μ g, 4.5 μ g, 5.0 μ g, 7.5 μ g, 10 μ g, 12.5 μ g, 15 μ g, 17.5 μ g, 20 μ g, 25 μ g, 30 μ g, 35 μ g, 40 μ g, 45 μ g, 50 μ g, 75 μ g, 100 μ g, 250 μ g, 500 μ g, 750 μ g, 1,000 μ g, 1,500 μ g, 2,000 μ g, 2,500 μ g, 3,000 μ g, 3,500 μ g, 4,000 μ g, 4,500 μ g 或 5,000 μ g),这取决于通过测量患者血内特异性 T 细胞的活性所确定的患者的反应和状况。

[0226] 包含本发明的化合物的免疫原性组合物适合使用于成年人或儿童,并且在一些实施方式中,它们被施用给处于感染脑膜炎奈瑟氏菌引起的脑膜炎的危险中的幼儿。任选地,这类组合物可与其它药学活性物质组合给药,并且经常地,与其它疫苗组合使用,作为儿童时期疫苗计划 (childhood vaccination program) 的一部分。有益地,施用的组合物可以包括其它类型的免疫原性化合物,例如也诱导免疫应答以提供针对其它脑膜炎病原体的保护的复合糖。因此,在一些实施方式中,本发明的疫苗组合物包括至少一种源自其它脑膜炎血清型的抗原,典型地源自血清型 A、B、C、W135 和 Y 的至少一种。优选的实施方式通常包括,至少一种和通常两种或所有的血清型 C、Y 和 W135 的抗原,以及含有本发明寡糖的至少一种和任选 2 种或多种化合物。

[0227] 实施例

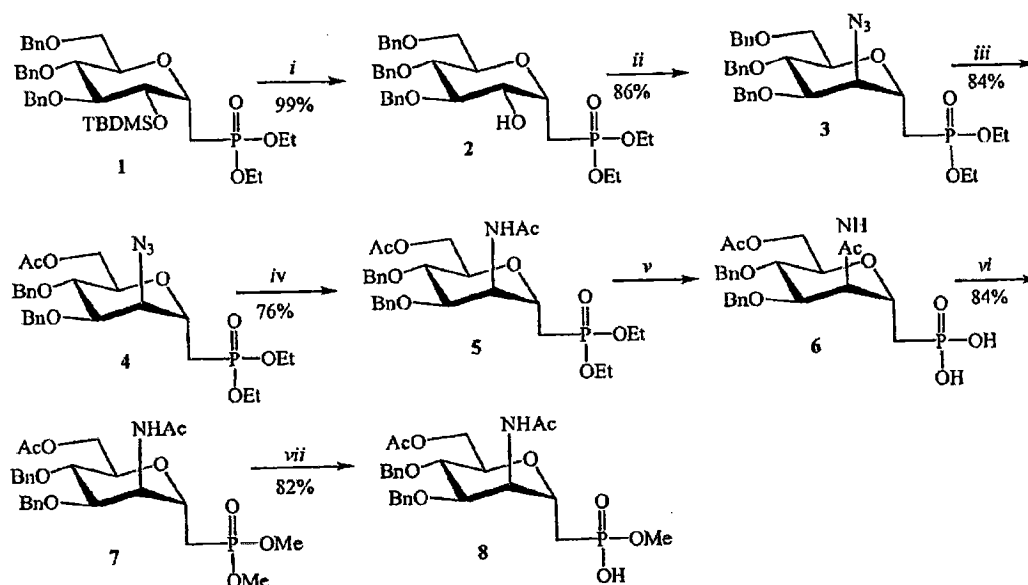
[0228] 下面的实施例阐明本发明的某些实施方式,但是绝不限其范围。示例性的反应和剂型的其它变化对本领域的技术人员是明显的,其也在本发明的范围内。例如,改变步骤的顺序,或者修饰选择的保护基策略通常为普通从业者所作的一般选择。下面部分中化合物的编号方式与上面提供的反应方案中化合物的编号方式不相关,提供其是为了读者的方便。

[0229] 一般方法

[0230] 在 Merck 预包被的 60F₂₅₄ 板上使用 AMC(钼酸铵-硫酸铈(IV)-10% 硫酸为 100g : 2g : 2L) 或 8% H₂SO₄ 实施 TLC,以可视化。在硅胶 (0.040-0.063mm, Amicon) 或反相凝胶 (C18 60A 40-63 μm) 上进行柱层析。在 25°C、Varian 300MHz 或 400MHz 仪器下,在 CDCl₃ (外标 Me₄Si, δ = 0.00) 或 D₂O (内标丙酮 ¹³C, δ = 30.89, ¹H = 2.22) 中记录 NMR 谱。在 30°C、减压下,浓缩有机溶液。

[0231] 实施例 1

[0232]



[0233] 索引: i) TBAF; ii) Ph₃P, DIAD, DPPA, THF; iii) HOAc, Ac₂O, H₂SO₄; iv) a. NaBH₄, NiCl₂·6H₂O, b. Ac₂O; v) Me₃SiBr; vi) MeC(OMe)₃, HOAc; vii) PhSH, Et₃N.

[0234] 二乙基 C-(3,4,6-三-O-苄基-α-D-吡喃葡萄糖基) 甲烷膦酸酯 (2)。将 TBAF (2.6g 1.3eq) 加入到二乙基 C-(2-O-三丁基二甲基甲硅烷基-3,4,6-三-O-苄基-α-D-吡喃葡萄糖基) 甲烷膦酸酯 (1, 5.36g, 7.7mmol) 的 THF 溶液 (150 mL) 中。20 分钟后,在减压下除去溶剂,通过硅胶柱层析法纯化产物,得到 2 (4.44g, 7.6mmol, 99%)。

[0235] 二乙基 C-(2-叠氮基-3,4,6-三-O-苄基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖基) 甲烷膦酸酯 (3)。将 DIAD (2.4ml, 12.4mmol) 逐滴加入冷却的 (-5°C) 的 Ph₃P (3.1g, 11.7mmol) 的 THF 溶液 (50ml) 中。30 分钟后,加入 2 (5.57g, 9.5mmol) 的 THF 溶液 (20ml)。在另外的 10 分钟后,加入叠氮磷酸二苯酯 (DPPA; 2.4ml, 11.31mmol), 并且使反应混合物达到室温 (rt)。在搅拌过夜后,蒸发溶剂,并且通过硅胶层析法纯化残留物,得到无色油 3 (5.0g, 8.2mmol, 86%)。 ¹³C-NMR (CDCl₃) 138.17, 137.92, 137.38, 128.6-127.7, 78.2, 74.3, 73.9, 73.7, 73.5, 72.4, 69.5, 68.8, 62.2, 62.1, 62.0, 61.9, 61.0, 60.9, 27.9 (d, J = 141Hz),

16.5, 16.4; ^{31}P -NMR(CDCl_3) 27.9。

[0236] 二乙基 C-(6-O-乙酰基-2-叠氮基-3,4-二-O-苄基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖基) 甲烷膦酸酯 (4)。将化合物 3 (3.2g, 5.2mmol) 溶于 $\text{HOAc}/\text{Ac}_2\text{O}$ (1 : 1, 32mL)。加入 10 滴 1% H_2SO_4 的 Ac_2O 溶液。在搅拌过夜后, 将混合物倒入含有冰和 CH_2Cl_2 的分离漏斗中。分离有机相, 通过硅石塞过滤并进行浓缩。通过柱层析法纯化残留物, 得到 4 (2.48g, 4.4mmol, 84%)。 ^{13}C -NMR(CDCl_3) 170.41, 137.41, 136.95, 128.34-127.75, 77.77, 77.60, 74.01, 73.39, 72.17, 71.89, 69.26, 62.47, 61.82, 61.73, 60.50, 60.37, 27.57 (d, $J = 141\text{Hz}$), 20.59, 16.27, 16.19; ^{31}P -NMR(CDCl_3) 27.50; $[\alpha]_{\text{D}} + 37$ (c1.0, CHCl_3)。

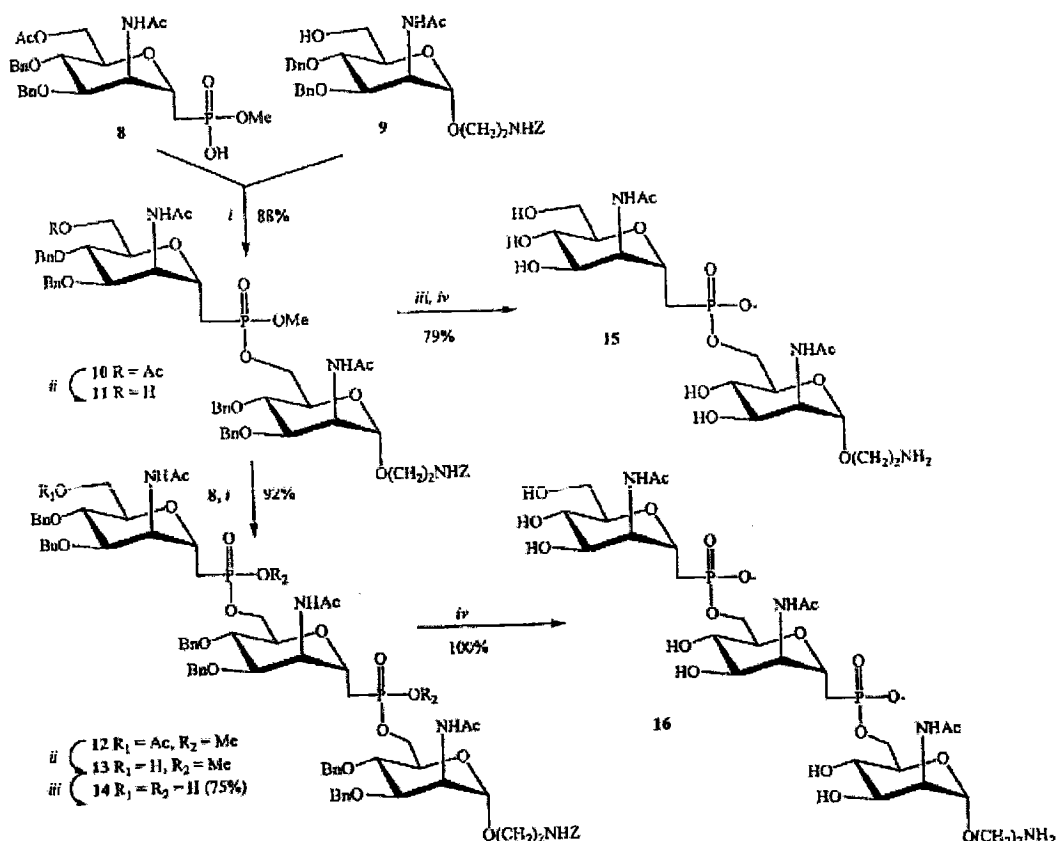
[0237] 二乙基 C-(6-O-乙酰基-2-乙酰氨基-3,4-二-O-苄基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖基) 甲烷膦酸酯 (5)。将催化量的 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 加入到搅拌的 4 (2.50g, 4.45mmol) 的 MeOH 溶液 (125mL) 中, 然后每隔 10 分钟, 加入部分 NaBH_4 (总计 0.34g, 8.9mmol), 直到在 TLC (系统) 中观察不到原料。在 50 分钟后, 加入 Ac_2O (3mL), 并用甲苯稀释反应混合物, 通过硅石塞过滤并进行浓缩。通过硅胶层析法纯化残留物, 得到 5 (1.95g, 3.4mmol, 76%)。 ^{13}C -NMR(CDCl_3) 170.4, 169.7, 137.3, 137.0 残余芳族 C 128.5-127.7, 75.3, 72.6, 72.4, 72.1, 72.0, 67.1, 61.91, 61.8, 61.8, 61.3, 61.2, 48.8, 48.6, 28.5 (d, $J = 142\text{Hz}$), 23.0, 20.6, 16.3, 16.2, 16.1; ^{31}P -NMR(CDCl_3) 29.5。

[0238] 二甲基 C-(6-O-乙酰基-2-乙酰氨基-3,4-二-O-苄基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖基) 甲烷膦酸酯 (7)。向 5 (0.25g, 0.43mmol) 的干燥 CH_2Cl_2 (5mL) 溶液中, 在室温下加入溴三甲基硅烷 (0.28mL, 2.2mmol, 5eq)。在添加完成后, 在室温下搅拌混合物 1 小时。将溶液冷却至 0°C , 加入 Et_3N (1mL), 然后加入水 (1mL)。10 分钟后, 在减压下除去溶剂, 并通过 RP-层析法对残留物进行脱盐 (水-水/ MeOH 1 : 1)。甲基化产物 C-(6-O-乙酰基-2-乙酰氨基-3,4-二-O-苄基-2-脱氧- α -D-吡喃葡萄糖基) 甲烷膦酸酯 (6), 而没有进一步纯化。向上面描述的反应的产物中, 加入 AcOH (5.5mL) 和三甲基原乙酸酯 (11.5mL)。在回流下加热该混合物 30 分钟, 然后浓缩。通过硅胶层析法纯化残留物, 得到 7 (0.20g, 0.36mmol, 84%, 两步)。(反应必须仔细监控, 并且当反应完成时, 正好停止反应, 否则结果为想要的产品和 6-OAc 被去保护的产品的混合物。) ^{13}C -NMR(CDCl_3) 170.6, 170.0, 137.4, 137.1 残余芳族 C 129.9-127.4, 75.3, 73.0, 72.5, 72.4, 72.0, 66.7, 61.8, 52.9, 52.8, 52.2, 52.1, 49.0, 48.7, 28.0 (d, $J = 142\text{Hz}$), 23.2, 20.8; ^{31}P -NMR(CDCl_3) 31.6。

[0239] 甲基 C-(6-O-乙酰基-2-乙酰氨基-3,4-二-O-苄基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖基) 甲烷膦酸酯 (8)。向 7 (1.35g, 2.46mmol) 的 THF 溶液 (2mL) 中加入苯硫酚 (1.0mL, 9.83mmol) 和 Et_3N (2.0mL, 14.7mmol)。48 小时后, 将反应混合物直接置于硅胶柱上, 并且首先用甲苯洗脱, 然后用含有 1.5% TEA 的 9 : 1 的 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 洗脱, 得到 8 (1.28g, 2.01mmol, 82%)。 ^{13}C -NMR(CDCl_3) 169.5, 169.1, 137.1, 137.1, 残余芳族 C, 127.4-126.7, 75.0, 72.6, 72.1, 71.6, 71.2, 62.0, 51.7, 50.6, 50.5, 49.5, 28.6 (d, $J = 129\text{Hz}$), 22.4, 22.3, 19.9; ^{31}P -NMR(CDCl_3) 20.4; $[\alpha]_{\text{D}} + 15$ (c1.0, CHCl_3)。

[0240] 将下述方案施用到实施例 1 的剩余部分和实施例 2-6。

[0241]



[0242] 索引: i) (pClPh)₃P, DIAD, Et₃N, THF; ii) KOH, MeOH; iii) PhSH, DBU, CH₃CN; iv) H₂, Pd/C, HCl

[0243] 2-羧苄基酰氨乙基 6-O-[甲基 C-(6-O-乙酰基-2-乙酰氨基-3,4-二-O-苄基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖基) 甲烷膦酸酯]-2-乙酰氨基-3,4-二-O-苄基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖苷 (10)。向 8 (50mg, 0.093mmol)、三(4-氯苯基)膦 (38mg, 0.10mmol)、2-羧苄基酰氨乙基 2-乙酰氨基-3,4-二-O-苄基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖苷 (9.42mg, 0.072mmol)、Et₃N (0.050mL, 0.36mmol) 的 THF 溶液 (0.5mL) 中, 加入 DIAD (0.021mL, 0.10mmol)。45 分钟后, 在减压下除去溶剂, 并且通过硅胶层析法 (EtOAc, 然后 9 : 1 的 CHCl₃/MeOH) 纯化残留物, 之后在 LH-20 凝胶柱 (4 : 1 的 CH₂Cl₂/MeOH) 上进一步纯化, 得到为非对映异构体混合物的产物 10 (70.1mg, 0.064mmol, 88%)。

[0244] 实施例 2

[0245] 2-羧苄基酰氨乙基 6-O-[甲基 C-(2-乙酰氨基-3,4-二-O-苄基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖基) 甲烷膦酸酯]-2-乙酰氨基-3,4-二-O-苄基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖苷 (11)。向 10 (73mg, 0.066mmol) 的 MeOH (2mL) 溶液中, 加入溶解于 MeOH 的 KOH 储液中的 KOH (7.4mg, 0.13mmol)。25 分钟后, 用 CH₂Cl₂ 稀释该反应混合物, 通过硅石塞过滤, 并且在减压下除去溶剂。在 LH-20 凝胶柱 (4 : 1 的 CH₂Cl₂/MeOH) 上纯化残留物, 得到产物 11 (70mg, 0.066mmol, 100%)。

[0246] 实施例 3

[0247] 2-羧苄基酰氨乙基 6-O-[甲基 C-(6-O-[甲基 C-(6-O-乙酰基-2-乙酰氨基-3,4-二-O-苄基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖基) 甲烷膦酸酯]-2-乙酰氨基-3,4-二-O-苄基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖基) 甲烷膦酸酯]-2-乙酰氨基-3,4-二-O-苄基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖苷 (12)。向 11 (70mg, 0.066mmol) 的 MeOH (2mL) 溶液中, 加入溶解于 MeOH 的 KOH 储液中的 KOH (7.4mg, 0.13mmol)。25 分钟后, 用 CH₂Cl₂ 稀释该反应混合物, 通过硅石塞过滤, 并且在减压下除去溶剂。在 LH-20 凝胶柱 (4 : 1 的 CH₂Cl₂/MeOH) 上纯化残留物, 得到产物 12 (70mg, 0.066mmol, 100%)。

氧- α -D-吡喃甘露糖苷(12)。向8(27mg, 0.051mmol)、三(4-氯苯基)膦(19mg, 0.052mmol)、11(38mg, 0.036mmol)和Et₃N(0.025mL, 0.18mmol)的THF(0.5mL)溶液中,加入DIAD(0.010mL, 0.052mmol)。40分钟后,浓缩该反应混合物,并且通过硅胶层析法(EtOAc, 然后9:1的CHCl₃/MeOH)纯化反应混合物。在LH-20凝胶柱(4:1的CH₂Cl₂/MeOH)上进一步纯化产物,得到12(52mg, 0.033mmol, 92%)。

[0248] 实施例4

[0249] 2-羧苄基酰氨基乙基6-O-[甲基C-(6-O-[甲基C-(2-乙酰氨基-3,4-二-O-苄基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖基)磷酸酯]-2-乙酰氨基-3,4-二-O-苄基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖基)磷酸酯]-2-乙酰氨基-3,4-二-O-苄基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(14)。向12(67mg, 0.043mmol)的MeOH(2mL)溶液中,加入溶解于MeOH的KOH储液中的KOH(4.7mg, 0.085 mmol, 2eq)。25分钟后,用DCM稀释该反应混合物,通过硅石塞过滤,并且在减压下除去溶剂。在LH-20凝胶柱(4:1的CH₂Cl₂/MeOH)上纯化残留物,得到13(65mg, 0.042mmol, 100%)。向13(36mg, 0.024mmol)的乙腈(0.5mL)溶液中,加入苯硫酚(0.096mL, 0.94mmol, 40eq)和DBU(0.070mL, 0.47mmol, 20eq)。2.5小时后,在减压下除去溶剂,并且通过硅胶层析法(甲苯, 然后9:1的CHCl₃/MeOH+1.5%的TEA)纯化产物。在LH-20凝胶柱(MeOH+1.5%的TEA)上进一步纯化产物,得到14(30mg, 0.018mmol, 75%)。³¹P NMR(CDCl₃): 21.2, 22.4。

[0250] 实施例5

[0251] 2-氨基乙基6-O-[C-(2-乙酰氨基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖基)甲烷膦酸酯]-2-乙酰氨基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(15)。向11(35.1mg, 0.033mmol)的乙腈(0.5mL)溶液中,加入苯硫酚(0.066mL, 0.64mmol, 20equiv.)和DBU(0.048mL, 0.32mmol, 10equiv.)。2小时后,在减压下除去溶剂,并且通过硅胶层析法(甲苯, 然后20:1的CHCl₃/MeOH+1.5%的TEA)纯化产物。在LH-20凝胶柱(MeOH+1.5%的TEA)上进一步纯化产物,得到2-(苄氧基羰基)氨基乙基6-O-[C-(2-乙酰氨基-3,4-二-O-苄基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖基)甲烷膦酸酯]-2-乙酰氨基-3,4-二-O-苄基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(30mg, 2.63mmol, 79%)。¹³C-NMR(CD₃OD) 173.55, 172.57, 158.72, 139.94, 139.66, 139.64, 139.39, 138.24, 残余芳族C 130.36-125.05, 100.26, 78.86, 77.82, 76.03, 75.90, 75.18, 74.60, 74.19, 72.85, 72.27, 72.20, 71.97, 67.36, 67.25, 64.57, 61.09, 54.66, 51.28, 51.16, 50.56, 41.43, 29.94(d, J = 135Hz), 22.59, 22.43。向该产物(10mg)的EtOH(4mL)溶液中,加入溶于水的HCl(0.1M, 0.25mL), 然后加入催化量的碳上Pd。搅拌过夜后,在100psi氢气气氛中,用乙酸钠中和该溶液。通过反相硅胶的塞子过滤该反应混合物,并且³¹P NMR显示原料全部转化为单一产物,冻干之后,其在P2-Biogel柱上进一步纯化,得到15(100%)。NMR(D₂O): ³¹P 23.1; ³¹C 22.5, 22.6, 26.7, 28.5, 30.9, 39.5, 47.2, 52.8, 53.1, 53.3, 60.0, 63.6, 63.9, 66.8, 67.8, 69.1, 69.6, 72.0, 72.1, 73.1, 74.5, 99.3, 174.8, 175.4。

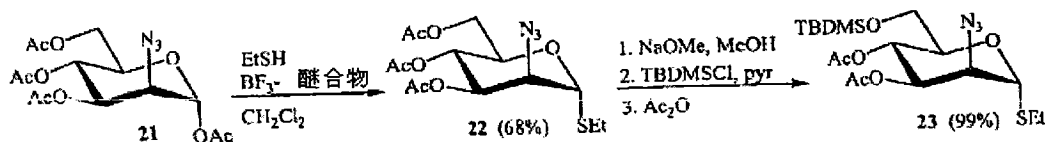
[0252] 实施例6

[0253] 2-氨基乙基6-O-[C-(6-O-(C-2-乙酰氨基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖基)甲烷膦酸酯)-2-乙酰氨基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖基)甲烷膦酸酯]-2-乙酰氨基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(16)。向14(12mg)的EtOH(4mL)溶液中,加入溶于水的HCl(0.1M, 0.25mL), 然后加入催化量的碳上Pd。搅拌过夜后,在100psi氢气气氛中,用乙酸钠中和该溶

液。通过反相硅胶塞过滤该反应混合物,并且 ^{31}P NMR 显示原料全部转化为单一产物,其在 P2-Biogel 柱上进一步纯化,得到 16(100%)。NMR(D_2O): ^{31}P 22.72, 22.75; ^{13}C 22.5, 22.7, 23.9, 26.9, 28.7, 30.9, 39.5, 47.1, 52.8, 53.2, 53.3, 60.9, 63.6, 64.0, 66.9, 67.3, 67.8, 69.2, 69.5, 69.7, 72.1, 72.2, 73.2, 74.2, 74.5, 99.4, 174.8, 175.4。

[0254] 实施例 7a

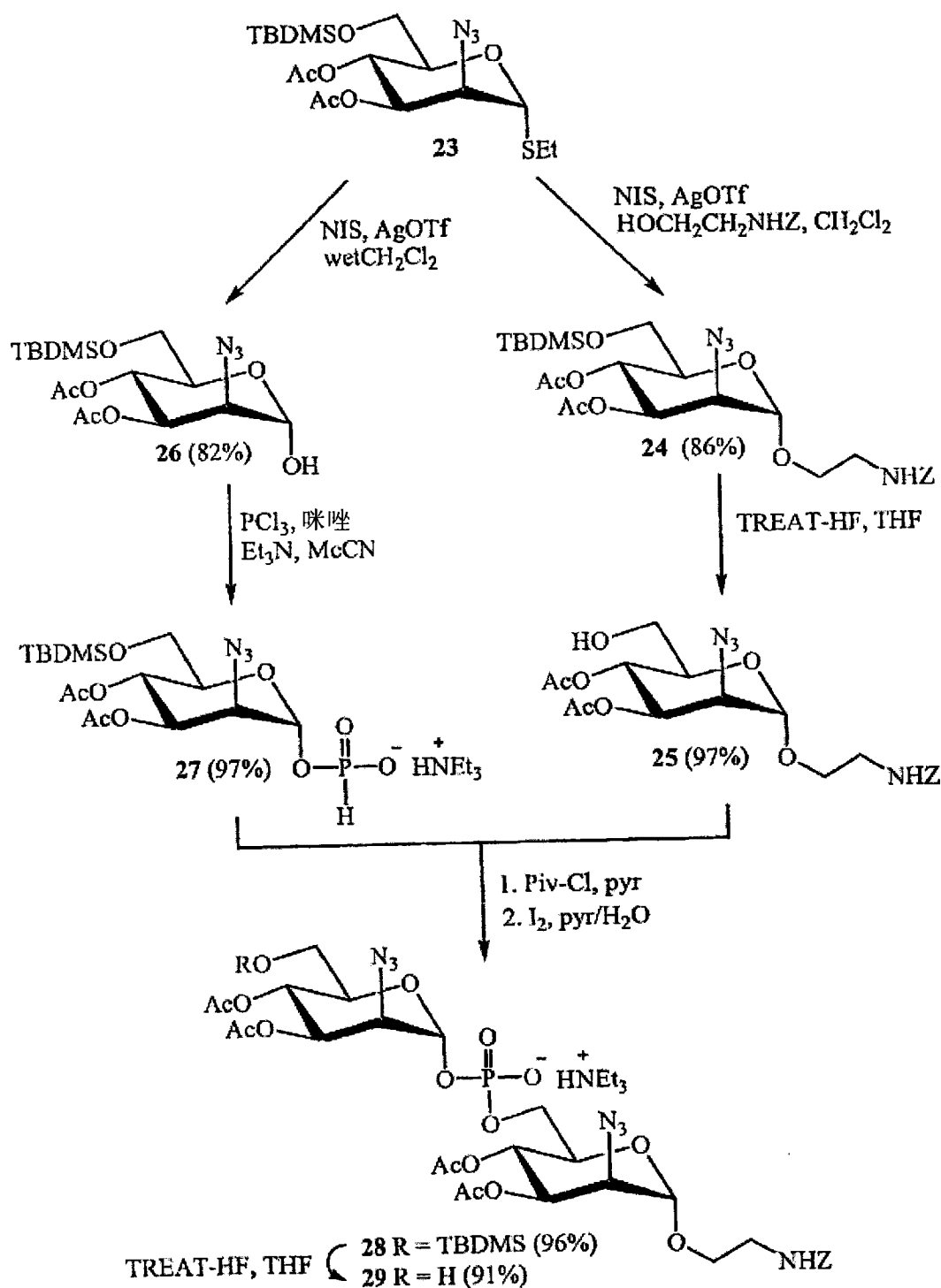
[0255]



[0256] 乙基 3,4,6-三-O-乙酰基-2-叠氮基-2-脱氧-1-硫代- α -D-吡喃甘露糖苷(22)。向 1,3,4,6-四-O-乙酰基-2-叠氮基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(21)(5.04g, 13.5mmol) 的 CH_2Cl_2 溶液中,加入 EtSH(1.6mL, 21.6mmol) 和 MS(4 Å)。混合物在室温、氩气下搅拌 30 分钟。然后在 1 个小时期间加入溶于 CH_2Cl_2 (10mL) 中的 BF_3 -醚合物(4.8mL, 38.1mmol)。7 小时后,用 CH_2Cl_2 稀释混合物、用饱和的 NaHCO_3 洗涤混合物、过滤(硅石)并且浓缩该混合物。层析法(1:0 $\rightarrow$ 1:1 甲苯-EtOAc)得到 22(3.46g, 9.22mmol, 68%); ^{13}C NMR δ 14.8(SCH_2CH_3), 20.6, 20.7, 20.8(CH_3CO), 25.6(SCH_2CH_3), 62.3, 62.9, 66.2, 69.0, 71.4(C-2-6), 82.5(C-1), 169.6, 170.0, 170.7(CH_3CO)。

[0257] 乙基 3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-6-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2-脱氧-1-硫代- α -D-吡喃甘露糖苷(23)。向 22(3.71g, 9.88mmol) 的 MeOH(30mL) 溶液中,加入 NaOMe(1M)。1 小时后,用 AcOH 中和该混合物,并且进行浓缩。将干燥残留物溶于吡啶(15mL),并且加入叔丁基二甲基甲硅烷基氯化物(1.94g, 12.87mmol)。在室温下,过夜搅拌反应混合物。用乙酸酐乙酰化、用甲苯稀释、过滤(硅石)、浓缩以及用层析法(1:0 $\rightarrow$ 1:1 甲苯-EtOAc)纯化,得到 23(4.357g, 9.73mmol, 99%); $[\alpha]_D^{+109} (c1.0, \text{CHCl}_3)$; ^{13}C NMR δ -5.33, -5.28(CH_3Si), 14.7(SCH_2CH_3), 18.4($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 20.7, 20.9(CH_3CO), 25.0(SCH_2CH_3), 25.9($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 62.6, 62.9, 67.0, 71.7, 71.9(C-2-6), 81.5(C-1), 169.7, 170.1(CH_3CO); ^1H NMR δ 0.05(s, 3H), 0.05(s, 3H), 0.90(s, 9H), 1.30(t, 3H), 2.05(s, 3H), 2.10(s, 3H), 2.55-2.75(m, 2H), 3.60-3.75(m, 2H), 4.10(m, 1H), 4.15-4.20(m, 1H), 5.20-5.25(m, 1H), 5.30-5.35(m, 1H); 用 HRMS 计算 $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{NaO}_6\text{SSi}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 为 470.1757, 发现为 470.1750。

[0258]



[0259] 3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-6-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷 (**26**)。将 NIS (394mg, 1.75mmol) 和 AgOTf (催化剂) 加入到 **23** (653mg, 1.46mmol) 的湿 CH₂Cl₂ (10mL) 溶液中。在 -20℃ 搅拌反应混合物 30 分钟。加入 CH₂Cl₂, 并且用 Na₂S₂O₃ (10%) 洗涤该混合物、过滤 (硅石) 并且浓缩混合物。用层析法 (1 : 0 $\rightarrow$ 1 : 1 甲苯 - EtOAc) 纯化残留物, 得到 **26** (487mg, 1.21mmol, 82%) ; ¹³C NMR δ -5.29, -5.22 (CH₃Si), 18.6 ((CH₃)₃Si), 20.7, 20.9 (CH₃CO), 26.0 ((CH₃)₃Si), 62.1, 63.2, 66.9, 71.0, 71.6 (C-2-6), 92.7 (C-1), 169.8, 170.3 (CH₃CO) ; ¹H NMR δ 0.05 (s, 3H), 0.06 (s, 3H), 0.89 (s, 9H), 2.03 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 3.65-3.70 (m, 2H), 4.00-4.02 (m, 2H), 5.19-5.23 (m, 2H), 5.42-5.47 (m, 1H)。

[0260] 3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-6-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖基氢-膦酸酯,三乙铵盐(27)。咪唑(915mg,13.45mmol)、 PCl_3 (335 μL ,3.84mmol)和 Et_3N (2.0mL,14.35mmol)在 MeCN(25mL)中的混合物在 0℃下,搅拌 30 分钟。在 0℃下,30 分钟期间,加入化合物 26(388mg,0.96mmol)的 MeCN(25mL)溶液。然后在室温下,搅拌该反应混合物 10 分钟,用 TEAB(0.5M)淬灭并进行浓缩。稀释该残留物(CHCl_3)、用 TEAB(0.5M)洗涤该残留物、过滤(棉)并且浓缩该残留物。残留物的层析法(1:0 $\rightarrow$ 10:1 CHCl_3 -MeOH+1.0% Et_3N)得到 27(499mg,0.93mmol,97%); $[\alpha]_D^{+67}$ (c 1.0, CHCl_3); ^{13}C NMR δ -5.43, (CH₃Si), 8.98, 18.3((CH₃)₃CSi), 20.6, 20.8(CH₃CO), 25.8((CH₃)₃CSi), 45.7, 62.4, 62.5, 66.5, 71.1, 72.1(C-2-6), 93.1(C-1), 169.4, 170.0(CH₃CO); ^1H NMR δ -0.06(s, 3H), -0.05(s, 3H), 0.79(s, 9H), 1.94(s, 3H), 1.99(s, 3H), 3.59-3.63(m, 2H), 3.93-4.00(m, 2H), 5.21-5.28(m, 1H), 5.37-5.41(m, 1H), 5.51-5.50(m, 1H); ^{31}P NMR δ 0.28;使用 HRMS 计算 $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_9\text{PSi}[\text{M}]^-$ 为 466.1411,发现为 466.1400。

[0261] 实施例 7b

[0262] 2-(苄氧基羰基)氨乙基 3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-6-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(24)。将化合物 23(527g,1.18mmol)溶于含有 MS(4 $\text{\AA}$)的 CH_2Cl_2 (10mL)。加入苄基 N-(2-羟乙基)氨基甲酸酯(300mg,1.54mmol),并且在 -20℃、氩气下搅拌该混合物 30 分钟,然后加入 NIS(345mg,1.53mmol)和 AgOTf (催化剂)。30 分钟后,用 Et_3N 中和该反应混合物,用 CH_2Cl_2 稀释该反应混合物、用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (10%)洗涤该反应混合物、过滤(硅石)并且浓缩该混合物。层析法(1:0 $\rightarrow$ 1:1 甲苯-EtOAc)得到 24(595mg,1.02mmol,86%); $[\alpha]_D^{+46}$ (c1.0, CHCl_3); ^{13}C NMR δ -5.38, -5.34(CH₃Si), 18.4((CH₃)₃CSi), 20.6, 20.8(CH₃CO), 25.9((CH₃)₃CSi), 40.7($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 61.6, 62.6, 66.6, 66.9, 67.6, 71.3, 71.8(C-2-6, PhCH_2O , $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 98.0(C-1), 128.2, 128.3, 128.6, 136.5(芳族 C), 156.4(NHCOCCH_2), 169.6, 170.1(CH₃CO); ^1H NMR δ 0.03(s, 3H), 0.04(s, 3H), 0.89(s, 9H), 2.03(s, 3H), 2.09(s, 3H), 2.35(s, 1H), 3.32-3.40(m, 1H), 3.44-3.52(m, 1H), 3.58-3.66(m, 3H), 3.72-3.80(m, 2H), 3.98-4.00(m, 1H), 5.11(s, 2H), 5.18-5.23(m, 1H), 5.32-5.36(m, 1H), 7.16-7.36(m, 5H)。

[0263] 2-(苄氧基羰基)氨乙基 3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(25)。向化合物 24(575mg,0.99mmol)的 THF(5mL)溶液中,加入 TREAT-HF(0.81mL,4.97mmol)。混合物在室温氩气下搅拌过夜。浓缩并且层析法(2:1 $\rightarrow$ 0:1 甲苯-EtOAc),得到 25(448mg,0.96mmol,97%); $[\alpha]_D^{+60}$ (c1.0, CHCl_3); ^{13}C NMR δ 20.7, 20.8(CH₃CO), 40.7($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 61.4, 61.6, 66.4, 67.0, 67.5, 70.9, 71.0(C-2-6, PhCH_2O , $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 98.2(C-1), 128.3, 128.3, 128.7, 136.5(芳族 C), 156.5(NHCOCBn), 170.1, 170.5(CH₃CO); ^1H NMR δ 2.04(s, 3H), 2.1(s, 3H), 3.32-3.46(m, 2H), 3.54-3.60(m, 2H), 3.62-3.78(m, 3H), 4.02-4.04(m, 1H), 5.06-5.18(m, 3H), 5.22-5.28(m, 1H), 5.36-5.40(m, 1H), 7.28-7.38(m, 5H);使用 HRMS 计算 $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{NaO}_9[\text{M}+\text{Na}]^+$ 为 489.1597,发现为 489.1574。

[0264] 实施例 7c

[0265] (3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-6-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖基磷酸酯)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-(苄氧基羰基)氨乙基 3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷)三乙铵盐(28)。化合物 25(325mg,

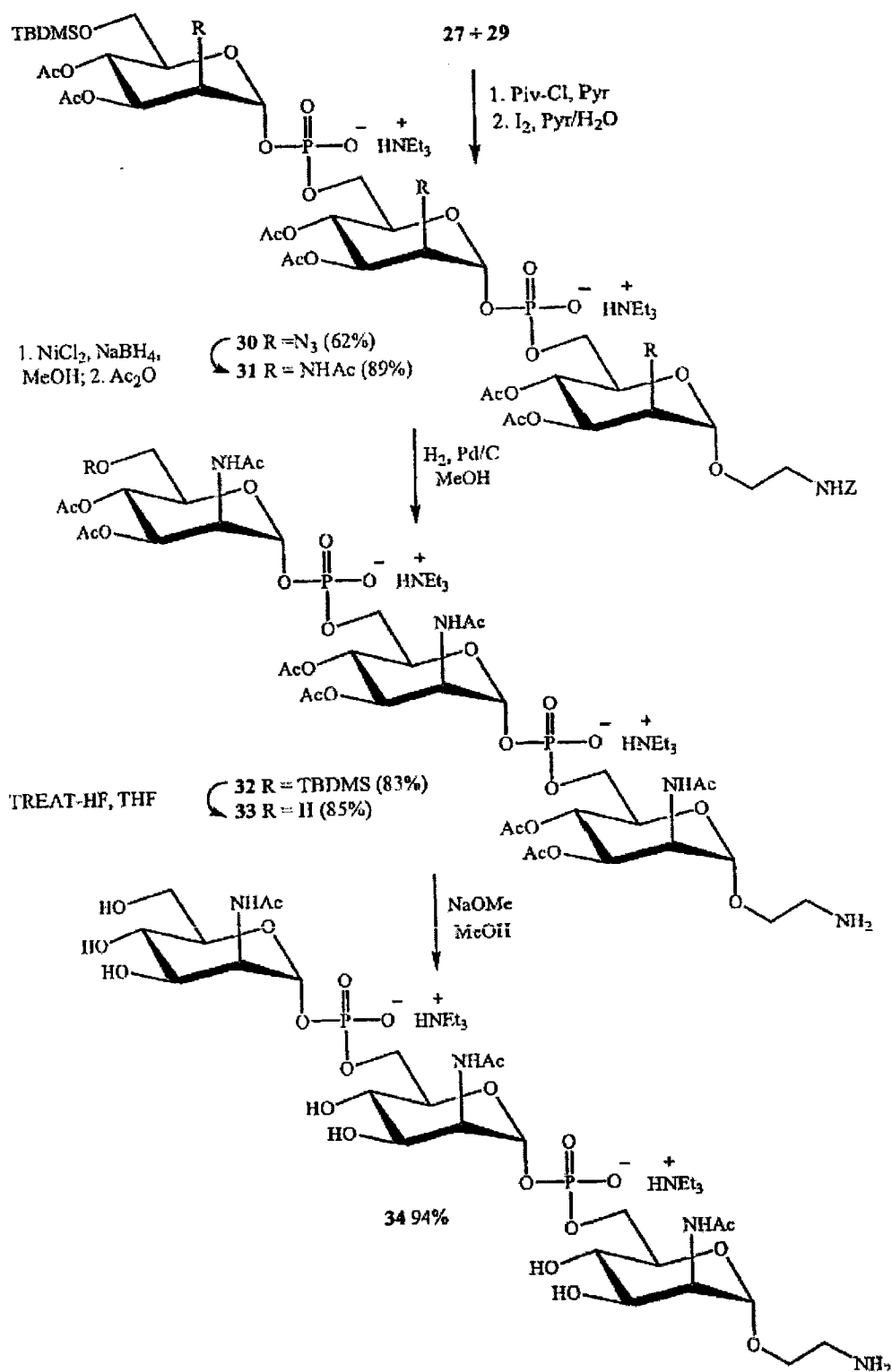
0.60mmol) 和 27(217mg, 0.47mmol) 的混合物被溶于吡啶 (3mL)。加入新戊酰氯 (144 μ L, 1.18mmol), 并且在室温氩气下搅拌混合物 1 小时。将反应混合物冷却至 -40°C , 并且加入 I_2 (143mg, 0.56mmol) 的吡啶-水溶液 (3mL, 49 : 1)。在 0°C 完成氧化, 并且用 CHCl_3 稀释混合物, 用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (10%) 和冷的 TEAB (0.5M) 洗涤该混合物。过滤 (棉)、浓缩并且层析法 (1 : 0 $\rightarrow$ 10 : 1 CHCl_3 -MeOH+0.5% 的 Et_3N), 得到 28 (469mg, 0.45mmol, 96%) ; $[\alpha]_{\text{D}}^{+52}$ (c 1.0, CHCl_3) ; ^{13}C NMR δ -5.48, -5.38 (CH_3Si), 9.27, 18.4 ($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 20.6, 20.7, 20.8, 20.8 (CH_3CO), 25.9 ($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 40.7 ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 45.8, 61.7, 62.2, 64.5, 66.3, 66.6, 66.7, 67.3, 69.8, 69.9, 71.2, 71.3, 71.8 (C-2-6, 2' -6' , PhCH_2O , $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$) 94.1, 97.9 (C-1, -1'), 128.1, 128.2, 128.6, 136.8 (芳族 C), 156.7 (NHCOOBn), 169.3, 169.7, 170.0, 170.1 (CH_3CO) ; ^1H NMR δ 0.00 (s, 3H), 0.02 (s, 3H), 0.88 (s, 9H), 1.98 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 3.30-3.38 (m, 1H), 3.42-3.52 (m, 1H), 3.56-3.64 (m, 1H), 3.66-3.68 (m, 2H), 3.74-3.80 (m, 1H), 3.90-4.04 (m, 5H), 4.12-4.14 (m, 1H), 5.1 (s, 2H), 2.16-2.22 (m, 1H), 5.29 (m, 1H), 5.32-5.47 (m, 3H), 5.51-5.54 (m, 1H), 5.63-5.68 (m, 1H), 7.28-7.38 (m, 5H) ; ^{31}P NMR δ -3.61。

[0266] 实施例 7d

[0267] (3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖基磷酸酯)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-(苄氧基羰基)氨基乙基 3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷)三乙铵盐 (29)。将化合物 28 (472mg, 0.46mmol) 溶于 THF (10mL) 中, 并且加入 TREAT-HF (372 μ L, 2.28mmol)。混合物在室温下搅拌 24 小时, 然后浓缩并在硅胶上纯化 (1 : 0 $\rightarrow$ 5 : 1 CHCl_3 -MeOH+0.5% 的 Et_3N), 得到 29 (390mg, 0.42mmol, 91%) ; $[\alpha]_{\text{D}}^{+34}$ (c 1.0, CHCl_3) ; ^{13}C NMR δ 10.6, 20.6, 20.8, 20.8, (CH_3CO), 40.7 ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 46.1, 61.5, 61.7, 62.2, 62.3, 64.6, 66.6, 66.6, 66.8, 67.4, 69.9, 70.0, 70.9, 71.2, 71.9, (C-2-6, 2' -6' , PhCH_2O , $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 94.0, 98.0 (C-1, -1'), 128.1, 128.2, 128.6, 136.6 (芳族 C), 156.6 (NHCOOBn), 169.9, 170.3 (CH_3CO) ; ^{31}P NMR δ -3.51 ; 使用 HRMS 计算 $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_{18}\text{P}$ [M] $^-$ 为 816.2089, 发现为 816.2078。

[0268] 下列方案应用于实施例 8-12。

[0269]



[0270] 实施例 7

[0271] (3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-6-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖磷酸酯)-(1 $\rightarrow$ 6)-(3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖磷酸酯)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-(苄氧基羰基)氨基乙基 3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷)双-三乙铵盐 (30)。向化合物 27 (273mg, 0.51mmol) 和 29 (357mg, 0.39mmol) 的吡啶 (3mL) 混合物中, 加入新戊酰氯 (119 μ L, 0.97mmol)。两小时后, 将该混合物冷却至 -40 $^{\circ}$ C, 并且加入 I₂ (119mg, 0.47mmol) 的吡啶-水溶液 (3mL, 49 : 1)。当

温度达到 -10°C 时,用 CHCl_3 稀释混合物。用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (10%)、冷的 TEAB (0.5M) 提取,过滤 (棉) 并且层析法 (1 : 0 $\rightarrow$ 5 : 1 CHCl_3 -MeOH+0.5% 的 Et_3N), 得到 30 (351mg, 0.24mmol, 62%) ; $[\alpha]_{\text{D}}^{+68}$ (c1.0, CHCl_3) ; ^{13}C NMR δ -5.53, -5.42 (CH_3Si), 10.1, 18.3 ($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 20.5, 20.6, 20.6, 20.8 (CH_3CO), 25.9 ($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 40.6 ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 45.9, 61.7, 62.1, 62.3, 64.2, 66.2, 66.4, 66.5, 67.1, 69.7, 70.4, 71.0, 71.2, 71.4, 71.6, 77.4 (C-2-6, 2' -6', 2'' -6'', PhCH_2O , $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 93.8, 94.0, 97.8 (C-1, -1', -1''), 128.0, 128.2, 128.5, 136.9 (芳族 C), 156.8 (NHCOOBn), 169.3, 169.6, 169.7, 169.8, 169.9, 170.0 (CH_3CO) ; ^1H NMR δ -0.05 (s, 3H), -0.03 (s, 3H), 0.80 (s, 9H), 1.90-2.00 (m, 18H), 3.23-3.31 (m, 1H), 3.36-3.45 (m, 1H), 3.50-3.64 (m, 4H), 3.69-3.76 (m, 1H), 3.79-3.97 (m, 7H), 4.02-4.15 (m, 3H), 5.00-5.06 (m, 2H), 5.12-5.21 (m, 2H), 5.24-5.31 (m, 1H), 5.33-5.37 (m, 2H), 5.38-5.45 (m, 3H), 6.04-6.10 (m, 1H), 7.18-7.30 (m, 5H) ; ^{31}P NMR δ -3.89, -3.56 ; 使用 HRMS 计算 $\text{C}_{46}\text{H}_{66}\text{N}_{10}\text{NaO}_{27}\text{P}_2\text{Si} [\text{M}+\text{Na}]^+$ 为 1303.3241, 发现为 1303.3197。

[0272] 实施例 8

[0273] (2-乙酰氨基-3,4-二-O-乙酰基-6-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖磷酸酯)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-乙酰氨基-3,4-二-O-乙酰基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖磷酸酯)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-(苄氧基羰基)氨基-2-乙酰氨基-3,4-二-O-乙酰基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷)双-三乙铵盐 (31)。将化合物 30 (83mg, 0.056mmol) 溶于 MeOH (3mL), 并且加入 $\text{NiCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ (催化剂)。通过在 0°C , 1 小时的期间内, 以小量加入 NaBH_4 , 进行还原。然后用乙酸酐处理该混合物, 接下来进行稀释 (MeOH) 和浓缩。在硅胶 (1 : 0 $\rightarrow$ 5 : 1 CHCl_3 -MeOH+0.5% 的 Et_3N) 和 LH-20 凝胶 (MeOH+1.5% 的 Et_3N) 上纯化该残留物, 得到化合物 31 (76mg, 0.050mmol, 89%) ; $[\alpha]_{\text{D}}^{+63}$ (c 1.0, CHCl_3) ; ^{13}C NMR δ -5.44, -5.38 (CH_3Si), 8.46, 18.4 ($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 20.9, 2m, 1.0, 21.0, 21.1, 23.0, 23.0, 23.0, 23.3, 23.9 (CH_3CO , CH_3CONH), 26.0 ($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 40.8 ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 46.1, 50.1, 50.4, 50.7 (C-2, -2', -2''), 59.1, 61.6, 64.5, 65.0, 65.7, 65.9, 66.7, 67.1, 70.0, 70.2, 70.3, 71.3, 77.4 (C-3-6, 3' -6', 3'' -6'', PhCH_2O , $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 94.9, 95.1, 99.1 (C-1, -1', -1''), 128.0, 128.1, 128.6, 136.8 (芳族 C), 156.6 (NHCOOBn), 169.5, 169.6, 170.0, 170.5, 170.6, 170.8, 171.3 (CH_3CO , CH_3CONH) ; ^{31}P NMR δ -3.75, -3.39 ; 使用 HRMS 计算 $\text{C}_{52}\text{H}_{79}\text{N}_4\text{O}_{30}\text{P}_2\text{Si} [\text{M}+\text{H}]^+$ 为 1329.4024, 发现为 1329.3984。

[0274] 实施例 9

[0275] 2-氨基-(2-乙酰氨基-3,4-二-O-乙酰基-6-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖磷酸酯)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-乙酰氨基-3,4-二-O-乙酰基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖磷酸酯)-(1 $\rightarrow$ 6)-(2-乙酰氨基-3,4-二-O-乙酰基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷)双-三乙铵盐 (32)。向化合物 31 (37mg, 0.024mmol) 的 MeOH (1.5mL) 溶液中, 加入 Amberlite IR-45(OH) 树脂 (40mg) 和活性炭上的钯。在 100psi 下氢解 (hydrogenolyse) 该混合物过夜, 并进行稀释 (MeOH)、离心和浓缩。在反相凝胶 (1 : 0 $\rightarrow$ 0 : 1 H_2O -MeOH) 上纯化, 得到 32 (28mg, 0.020mmol, 83%) ; $[\alpha]_{\text{D}}^{+60}$ (c1.0, MeOH) ; ^{13}C NMR (D_2O) δ -5.9, -5.4 (CH_3Si), 8.89, 18.7 ($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 20.9, 21.0, 22.4, 22.5 (CH_3CO , CH_3CONH), 26.0 ($(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 39.7 ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 47.3, 50.6, 51.4 (C-2, -2', -2''), 62.4, 64.4, 64.7, 64.9, 65.9, 66.2, 66.6, 70.1, 70.8, 71.0,

71.2, 71.5 (C-3-6, 3'-6', -''-6'', OCH₂CH₂N), 95.4, 95.5, 99.1 (C-1, -1', -1''), 173.1, 173.3, 173.5, 173.6, 173.8, 174.9, 175.1, 175.2 (CH₃CO, CH₃CONH); ³¹P NMR (D₂O) δ -3.04, -2.87; 使用 HRMS 计算 C₄₄H₇₂N₄O₂₈P₂Si [M+H]⁺ 为 1195.3656, 发现为 1195.3567。

[0276] 实施例 10

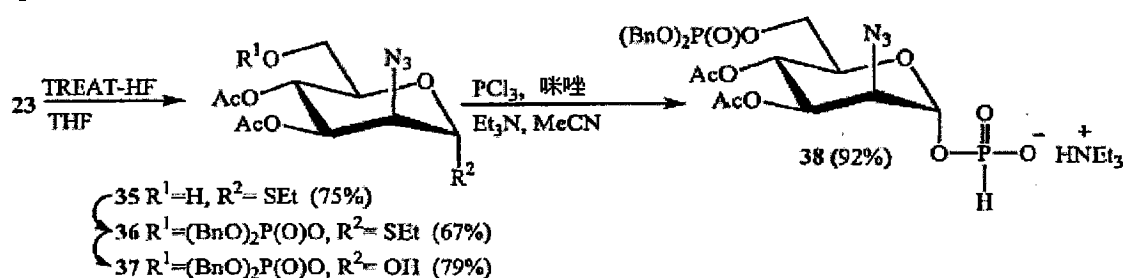
[0277] 2-氨基乙基-(2-乙酰氨基-3,4-二-O-乙酰基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖磷酸酯)-(1→6)-(2-乙酰氨基-3,4-二-O-乙酰基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖磷酸酯)-(1→6)-(2-乙酰氨基-3,4-二-O-乙酰基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖苷)双-三乙铵盐 (33)。TREAT-HF (17 μL, 0.10 mmol) 的 THF (1.5 mL) 溶液用 Et₃N (17 μL, 0.12 mmol) 处理。将该溶液加入到化合物 32 (28 mg, 0.020 mmol)。在室温下搅拌 30 分钟之后, 浓缩该混合物并在反相凝胶 (1 : 0 → 0 : 1 H₂O-MeOH) 上纯化, 得到 33 (22 mg, 0.017 mmol, 85 %) ; [α]_D+45° (c 1.0, MeOH); ¹³C NMR (D₂O) δ 8.87, 20.9, 20.9, 22.3, 22.4 (CH₃CO, CH₃CONH), 39.6 (HOCH₂CH₂NH), 47.3, 50.6, 51.3, 51.4 (C-2, -2', -2''), 60.2, 64.3, 64.5, 64.9, 66.2, 66.4, 69.9, 70.0, 70.5, 70.5, 70.7, 70.8, 71.0, 71.6 (C-3-6, 3'-6', 3''-6'', OCH₂CH₂N), 95.3, 95.3, 99.5 (C-1, -1', -1''), 173.3, 173.3, 173.6, 173.7, 173.8, 175.0, 175.1, 175.3 (CH₃CO, CH₃CONH); ¹H NMR (D₂O) δ 2.03 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 3.28-3.36 (m, 2H), 3.68-3.84 (m, 3H), 4.00-4.18 (m, 5H), 4.27-4.33 (m, 1H), 4.57-4.64 (m, 2H), 5.22-5.30 (m, 1H), 5.31-5.37 (m, 2H), 5.44-5.49 (m, 1H); ³¹P NMR (D₂O) δ -3.02, -2.95; 使用 HRMS 计算 C₃₈H₅₈N₄NaO₂₈P₂ [M+Na]⁺ 为 1103.261, 发现为 1103.2642。

[0278] 实施例 11

[0279] 2-氨基乙基-(2-乙酰氨基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖磷酸酯)-(1→6)-(2-乙酰氨基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖磷酸酯)-(1→6)-(2-乙酰氨基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖苷)双-三乙铵盐 (34)。将化合物 33 (22 mg, 0.017 mmol) 溶解于 MeOH (1 mL), 加入 NaOMe (1 M)。30 分钟后, 浓缩该混合物, 并且在反相凝胶 (H₂O → MeOH) 上纯化残留物。冻干含有产物的级分, 得到 34 (14 mg, 0.016 mmol, 94 %) ; [α]_D+12.4° (c 0.5, MeOH); ¹³C NMR (D₂O) δ 22.6 (CH₃CONH), 40.1 (HOCH₂CH₂NH), 53.1, 53.8, 53.9 (C-2, -2', -2''), 60.8, 65.3, 66.6, 67.0, 69.1, 69.3, 69.5, 72.2, 73.0, 74.1 (C-3-6, 3'-6', 3''-6'', OCH₂CH₂N), 95.8, 95.8, 99.6 (C-1, -1', -1''), 175.5, 175.5, 175.6 (CH₃CONH); ³¹P NMR (D₂O) δ -2.36, -2.22; 使用 HRMS 计算 C₂₆H₄₇N₄O₂₂P₂ [M+H]⁺ 为 829.2157, 发现为 829.2064。

[0280] 实施例 13a

[0281]



[0282] 乙基 3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-2-脱氧-1-硫代-α-D-吡喃甘露糖苷 (35)。向溶解在 THF (6 mL) 的化合物 23 (305 mg, 0.68 mmol) 中, 加入 TREAT-HF (0.55 mL, 3.38 mmol)。

在室温下搅拌混合物过夜。浓缩和层析法 (10 : 1 → 0 : 1 甲苯 -EtOAc), 得到 35 (171mg, 0.51mmol, 75 %); ^{13}C NMR δ 14.7 (SCH_2CH_3), 20.6, 20.8 (CH_3CO), 25.4 (SCH_2CH_3), 61.3, 63.0, 66.6, 71.1, 71.3 (C-2-6), 82.2 (C-1), 170.0, 170.6 (CH_3CO); ^1H NMR δ 1.26-1.30 (t, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.32 (s, 1H), 2.56-2.68 (m, 2H), 3.58-3.67 (m, 2H), 4.09-4.14 (m, 2H), 5.24-5.35 (m, 3H)。

[0283] 实施例 13b

[0284] 乙基 3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-2-脱氧-6-O-磷酸二苄酯-1-硫代- α -D-吡喃甘露糖苷 (36)。向溶解于 CH_2Cl_2 (10mL) 的化合物 35 (171mg, 0.51mmol) 中, 加入四唑 (125mg, 1.78mmol) 和 N-N-二异丙基氨基磷酸酯 (264 μL , 0.76mmol)。在室温下搅拌反应混合物 30 分钟。在 0 $^\circ\text{C}$ 加入 mCPBA (176mg, 1.02mmol), 并且继续搅拌 30 分钟。稀释 (CH_2Cl_2) 混合物, 用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (10%) 和 NaHCO_3 洗涤。过滤 (Na_2SO_4)、浓缩和层析法 (10 : 1 → 2 : 1 甲苯 -EtOAc), 得到 36 (200mg, 0.34mmol, 67 %); $[\alpha]_{\text{D}}^{+92}$ (c1.0, CHCl_3); ^{13}C NMR δ 14.6 (SCH_2CH_3), 20.5, 20.6 (CH_3CO), 25.3 (SCH_2CH_3), 62.9, 65.7, 66.1, 69.4, 69.4, 69.5, 71.4, (C-2-6, PhCH_2O), 82.0 (C-1), 127.9, 128.0, 128.5, 128.5, 128.6, 128.6, 128.7, 135.8, 135.9 (芳族 C), 169.5, 169.9 (CH_3CO); ^{31}P NMR δ -1.36; 使用 HRMS 计算 $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{NaO}_9\text{PS}[\text{M}+\text{Na}]^+$ 为 616.1495, 发现为 616.1487。

[0285] 实施例 13c

[0286] 3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-2-脱氧-6-O-磷酸二苄酯- α -D-吡喃甘露糖苷 (37)。将化合物 36 (281mg, 0.47mmol) 溶于湿 CH_2Cl_2 (10mL), 并且冷却到 -20 $^\circ\text{C}$ 。加入 NIS (137mg, 0.61mmol) 和 AgOTf (催化剂), 并且在 -20 $^\circ\text{C}$ 搅拌混合物 30 分钟。混合物被稀释 (CH_2Cl_2)、用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (10%) 洗涤、过滤 (Na_2SO_4) 和浓缩。层析法 (2 : 1 → 0 : 1 甲苯 -EtOAc), 得到 37 (201mg, 0.37mmol, 79 %); ^{13}C NMR δ 20.7, 20.7, 62.5, 66.2, 66.3, 66.4, 68.6, 68.7, 69.6, 69.7, 69.8, 69.8, 71.0 (C-2-6, PhCH_2O), 92.5 (C-1), 128.0, 128.1, 128.3, 128.6, 128.7, 128.7, 135.6, 135.7 (芳族 C), 169.8, 170.1 (CH_3CO); ^{31}P NMR δ -1.87。

[0287] 实施例 13d

[0288] 3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-2-脱氧-6-O-磷酸二苄酯- α -D-吡喃甘露糖基-氢-膦酸酯, 三乙铵盐 (38)。在 0 $^\circ\text{C}$ 搅拌咪唑 (349mg, 5.13mmol)、 PCl_3 (128 μL , 1.47mmol) 和 Et_3N (765 μL , 5.49mmol) 在 MeCN (10mL) 中的混合物 30 分钟。在 0 $^\circ\text{C}$, 在 30 分钟期间加入化合物 37 (201mg, 0.37mmol) 的 MeCN (10mL) 溶液。然后在室温下搅拌反应混合物 10 分钟, 用 TEAB (0.5M) 淬灭, 并且进行浓缩。残留物被稀释 (CHCl_3)、用 TEAB (0.5M) 洗涤、过滤 (棉) 和浓缩。残留物的层析法 (1 : 0 → 10 : 1 CHCl_3 -MeOH+1.0% 的 Et_3N), 得到 38 (243mg, 0.34mmol, 92 %); $[\alpha]_{\text{D}}^{+55}$ (c 1.0, CHCl_3); ^{13}C NMR δ 9.34, 20.6, 20.7 (CH_3CO), 45.9, 62.4, 62.5, 65.6, 65.7, 69.4, 69.5, 69.9, 70.0, 70.9 (C-2-6, PhCH_2O), 93.0 (C-1), 128.0, 128.0, 128.1, 128.5, 128.5, 128.6, 135.8 (芳族 C), 169.5, 169.9 (CH_3CO); ^{31}P NMR δ -1.32, 0.29; 使用 HRMS 计算 $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{P}_2[\text{M}]^-$ 为 612.1148, 发现为 612.1129。

[0289] 下列方案应用于实施例 13e 和 14-17。

[0290]



TEAB(0.5M)洗涤该混合物。过滤(棉)、浓缩并且层析法(1:0→5:1 CHCl₃-MeOH+0.5%的 Et₃N),得到 39(106mg,0.065mmol,59%); $[\alpha]_D^{+80}$ (c1.0, CHCl₃);¹³C NMR δ 10.2, 20.6, 20.7, 20.8(CH₃CO), 40.6(HOCH₂CH₂NH), 45.9, 57.9, 61.7, 62.3, 64.4, 65.5, 65.7, 66.1, 66.5, 66.6, 67.2, 69.4, 69.5, 70.3, 71.0, 71.4(C-2-6, 2'-6', 2''-6'', PhCH₂O, OCH₂CH₂N), 93.9, 94.0, 97.8(C-1, -1', -1''), 128.0, 128.1, 128.2, 128.5, 128.6, 136.0, 136.9(芳族C), 156.8(NHCOOBn), 169.6, 169.7, 169.8, 169.9(CH₃CO);³¹P NMR δ -4.13, -3.58, -1.52。

[0293] 实施例 12

[0294] 2-(苄氧基羰基)氨乙基(2-乙酰氨基-3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-2-脱氧-6-O-磷酸二苄酯-α-D-吡喃甘露糖基磷酸酯)-(1→6)-(2-乙酰氨基-3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖基磷酸酯)-(1→6)-(2-乙酰氨基-3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖苷)双-三乙铵盐(40)。将化合物 39(76mg,0.047mmol)溶于 MeOH(3mL),并且加入 NiCl₂(H₂O)₆(催化剂)。通过在 0℃,在 30 分钟的期间,以小量加入 NaBH₄,进行还原。然后用乙酸酐处理该混合物,接下来进行稀释(MeOH)和浓缩。在硅胶(1:0→5:1 CHCl₃-MeOH+0.5%的 Et₃N)和 LH-20 凝胶(MeOH+1.5%的 Et₃N)上纯化该残留物,得到化合物 40(50mg,0.030mmol,64%);¹³C NMR(D₂O) δ 8.89, 20.7, 20.8, 22.4(CH₃CO, CH₃CONH), 40.7(HOCH₂CH₂NH), 47.3, 50.7, 51.4(C-2, -2', -2''), 64.5, 65.9, 66.1, 66.5, 66.6, 67.2, 67.3, 69.7, 69.8, 70.5, 70.8, 70.9, 71.1(C-3-6, 3'-6', 3''-6'', PhCH₂O, OCH₂CH₂N), 95.2, 95.3, 98.8(C-1, -1', -1''), 128.2, 128.9, 129.0, 129.3, 129.5, 129.7, 135.7, 135.8, 137.1(芳族C), 158.7(NHCOOBn), 172.8, 172.9, 173.2, 173.3, 173.4, 173.4, 174.8, 174.9, 175.0(CH₃CO, CH₃CONH);³¹P NMR(D₂O) δ -3.05, -2.75, -1.20。

[0295] 实施例 13

[0296] 2-氨乙基(2-乙酰氨基-3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-2-脱氧-6-O-磷酸酯-α-D-吡喃甘露糖基磷酸酯)-(1→6)-(2-乙酰氨基-3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖基磷酸酯)-(1→6)-(2-乙酰氨基-3,4-二-O-乙酰基-2-叠氮基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖苷)三-三乙铵盐(41)。向化合物 40(46mg,0.027mmol)的 MeOH(2mL)溶液中,加入 Amberlite IR-45(OH)树脂(46mg)和活性炭上的钯。在 100psi 下氢解(hydrogenolyse)该混合物过夜,并进行稀释(MeOH)、离心和浓缩。在反相凝胶(1:0→0:1 H₂O-MeOH)上纯化,得到 41(34mg,0.023mmol,85%); $[\alpha]_D^{+43}$ (c 1.0, MeOH);¹³C NMR(D₂O) δ 8.89, 20.9, 20.9, 22.4, 22.4(CH₃CO, CH₃CONH), 39.6, (HOCH₂CH₂NH), 47.3, 50.6, 51.3, 51.4(C-2, -2', -2''), 63.6, 64.4, 64.8, 66.1, 66.2, 66.4, 69.9, 70.0, 70.6, 70.7, 71.0(C-3-6, 3'-6', 3''-6'', OCH₂CH₂N), 95.3, 95.4, 99.1(C-1, -1', -1''), 173.2, 173.3, 173.4, 173.6, 173.7, 173.7, 175.0, 175.1, 175.2(CH₃CO, CH₃CONH);³¹P NMR(D₂O) δ -3.08, -2.95, 0.05;使用 HRMS 计算 C₃₈H₅₉N₄O₃₁P₃[M/2+H]⁺ 为 580.1188,发现为 580.1142。

[0297] 实施例 14

[0298] 2-(苄氧基羰基)氨乙基(2-乙酰氨基-2-叠氮基-2-脱氧-6-O-磷酸二苄酯-α-D-吡喃甘露糖基磷酸酯)-(1→6)-(2-乙酰氨基-2-叠氮基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖基磷酸酯)-(1→6)-(2-乙酰氨基-2-叠氮基-2-脱氧-α-D-吡喃甘露糖苷)三-三乙铵盐(41)。向化合物 40(46mg,0.027mmol)的 MeOH(2mL)溶液中,加入 Amberlite IR-45(OH)树脂(46mg)和活性炭上的钯。在 100psi 下氢解(hydrogenolyse)该混合物过夜,并进行稀释(MeOH)、离心和浓缩。在反相凝胶(1:0→0:1 H₂O-MeOH)上纯化,得到 41(34mg,0.023mmol,85%); $[\alpha]_D^{+43}$ (c 1.0, MeOH);¹³C NMR(D₂O) δ 8.89, 20.9, 20.9, 22.4, 22.4(CH₃CO, CH₃CONH), 39.6, (HOCH₂CH₂NH), 47.3, 50.6, 51.3, 51.4(C-2, -2', -2''), 63.6, 64.4, 64.8, 66.1, 66.2, 66.4, 69.9, 70.0, 70.6, 70.7, 71.0(C-3-6, 3'-6', 3''-6'', OCH₂CH₂N), 95.3, 95.4, 99.1(C-1, -1', -1''), 173.2, 173.3, 173.4, 173.6, 173.7, 173.7, 175.0, 175.1, 175.2(CH₃CO, CH₃CONH);³¹P NMR(D₂O) δ -3.08, -2.95, 0.05;使用 HRMS 计算 C₃₈H₅₉N₄O₃₁P₃[M/2+H]⁺ 为 580.1188,发现为 580.1142。

喃甘露糖磷酸酯)-(1→6)-(2-乙酰氨基-2-叠氮基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷)二-钠盐(42)。将化合物 40(50mg, 0.030mmol)溶于 MeOH(3mL), 并且加入 NaOMe(1M)。室温下搅拌该混合物 1 小时。浓缩, 并在反相硅胶(1:0→0:1 H₂O-MeOH)上纯化, 得到 42(30mg, 0.024mmol, 80%) ; ¹³C NMR(D₂O) δ 22.6(CH₃CONH), 40.7(HOCH₂CH₂NH), 53.1, 53.8, 54.0(C-2, -2', -2''), 65.1, 66.4, 66.5, 66.8, 67.5, 68.9, 69.1, 69.6, 71.0, 71.1, 71.9, 72.0, 72.3, 73.1(C-3-6, 3'-6', 3''-6'', PhCH₂O, OCH₂CH₂N), 95.6, 95.8, 99.4(C-1, -1', -1''), 128.1, 128.4, 129.0, 129.0, 129.4, 129.5, 129.8, 135.7, 135.8, 137.1(芳族 C), 158.8(NHCOOBn), 175.3(CH₃CONH) ; ³¹P NMR(D₂O) δ -2.35, -2.23, -0.96。

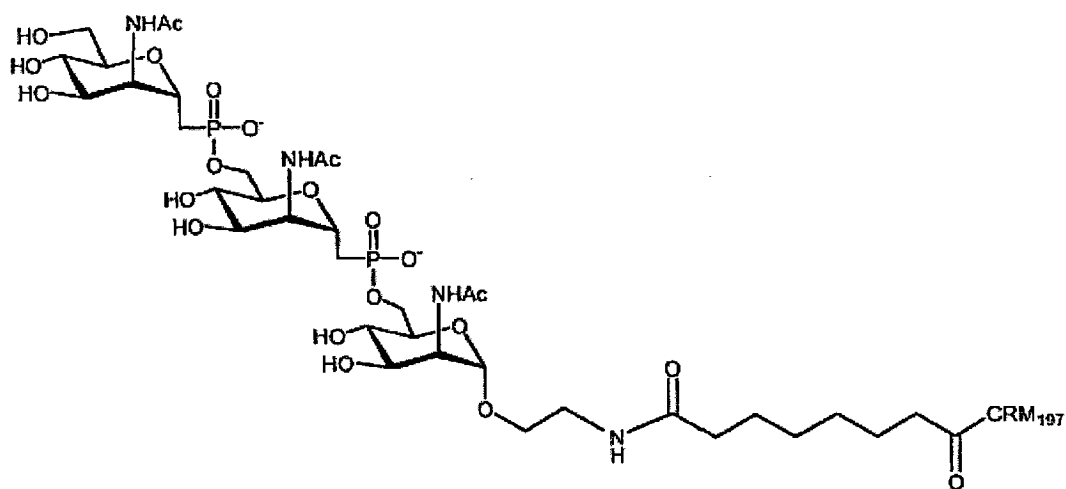
[0299] 实施例 15

[0300] 2-氨基乙基(2-乙酰氨基-2-叠氮基-2-脱氧-6-O-磷酸酯- α -D-吡喃甘露糖磷酸酯)-(1→6)-(2-乙酰氨基-2-叠氮基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖磷酸酯)-(1→6)-(2-乙酰氨基-2-叠氮基-2-脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷)三-钠盐(43)。将化合物 42(30mg, 0.024mmol)溶解于 MeOH(2mL)溶液中。加入 Amberlite IR-45(OH-)树脂(30mg)和活性炭上的钯。在 100psi 下氢解(hydrogenolyse)该混合物过夜, 并进行稀释(MeOH)、离心和浓缩。在反相凝胶(1:0→0:1 H₂O-MeOH)上纯化, 得到 43(15mg, 0.015mmol, 64%) ; $[\alpha]_D^{+13.6^\circ}$ (c 0.5, MeOH) ; ¹³C NMR(D₂O) δ 22.6, 22.6, 22.6(CH₃CONH), 39.7(HOCH₂CH₂NH), 49.5, 53.0, 53.7, 53.8(C-2, -2', -2''), 63.8, 64.2, 65.1, 65.2, 65.4, 66.5, 66.7, 67.0, 68.9, 69.2, 69.5, 72.2, 72.3, 72.9, 73.1, 73.2, 73.4, 73.4(C-3-6, 3'-6', 3''-6'', OCH₂CH₂N), 95.9, 99.6(C-1, -1', -1''), 175.4, 175.5, 175.5(CH₃CONH) ; ³¹P NMR(D₂O) δ -2.35, -2.30, 2.2 ; 使用 HRMS 计算 C₂₆H₄₆N₄Na₂O₂₅P₃[M+2Na]⁻ 为 953.1459, 发现为 953.1440。

[0301] 实施例 16

[0302] 为了研究 C-磷酸酯取代磷酸二酯对 MenA 糖的免疫原性和稳定性的影响, 合成脑膜炎奈瑟氏菌组 A 多糖重复单元的三聚体的合成寡糖类类似物, 并将其结合到载体蛋白 CRM197。分析该复合糖, 以证实物理化学性质和小鼠中的免疫原性。该偶联物的结构如下。

[0303]



[0304] 通过用非乙酰化和非磷酸化碱分子中的 C-磷酸酯基团取代连接单糖的磷酸二酯基团, 得到该化合物。

[0305] a) CRM-MenA 合成复合糖的物理化学性质

[0306] 表征该偶联物,以得到糖、蛋白、未结合(自由)糖的含量。而且,针对特异性抗 MenA 抗体,进行 SDS_Page(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)和蛋白质印迹(Western Blot)。

[0307] 糖和蛋白质浓度

[0308] 用盐水复原冻干产物(终浓度=0.8mg/ml),通过比色检测分析该产物,得到总磷和总蛋白含量(MicroBCA 分析)。然后使用适当的转化因子(converting factor),将磷含量转化为总糖含量。

[0309] 因为在储存该偶联物期间产生一些沉淀,故加入浓缩的磷酸盐缓冲液(磷酸钠,100mM pH7.5),达到 10mM 的终浓度。然后,考虑稀释因子,重新计算浓度。在用磷酸盐缓冲液稀释后,该偶联物具有 97.10 $\mu\text{g/ml}$ 的总糖浓度,和 215.63 $\mu\text{g/ml}$ 的总蛋白浓度。

[0310] b) 在小鼠中的免疫原性

[0311] 以 ELISA 和杀菌测定,分析具有合成寡糖的偶联物的免疫原性。用含有和不含有作为佐剂的磷酸明矾而配制的纯化复合糖,使 BALB/c 小鼠(每组 8 只)免疫。在表 1 示出的免疫方案,包括在第 0 天、14 天和 28 天三次给药(每次 200ng),在第 42 天放血。在 1 次给药后、2 次给药后和 3 次给药后,分析血清,以确定特异性的总 IgG 和相应的抗体机能活动。MenA-CRM2011 是野生型 MenA 偶联物。

[0312] 表 1:免疫组方案和治疗方案

[0313]

疫苗	给药次数 (n° Doses)	稀释	剂量 (μg)	配方	小鼠数量 (n° Mouse)	给药
MenA-CRM 磷酸酯偶联物	3	1/5	0.2	AlPO_4	33-40	0.5mls. c.
MenA-CRM 磷酸酯偶联物	3	1/5	0.2	无 AlPO_4	73-80	0.5mls. c.
MenA-CRM 2011	3	1/5	0.2	AlPO_4	81-88	0.5mls. c.
MenA-CRM 2011	3	1/5	0.2	无 AlPO_4	89-96	0.5mls. c.

[0314] ELISA 测定

[0315] 在 ELISA 测定中,分析血清,以特异性确定在小鼠血清中 IgG 抗体的应答。通过线性回归曲线,计算针对 A、C、W135 和 Y 多糖抗原(MenA、MenC、MenW、MenY)的总 IgG 效价,并将其表示为 ELISA 单位/毫升(EU/ml)。通过与标准血清的滴定曲线对比,得到血清效价。

[0316] 用荚膜多糖和甲基化的人血清清蛋白的混合物包被微滴定平板,其每一个在 PBS pH7.4 中终浓度为 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 。密封该平板,在 2°C -8°C 下,培养过夜,然后以 PBS pH7.4 中的含有 5% 胎牛血清的缓冲液作为封闭剂,进行洗涤和浸泡(saturate)。在室温下温育 1 小时后,洗涤平板,并且将稀释的测试血清加入到第一排的孔中。用两倍稀释步骤,通过

滴定曲线分析血清。在 2℃ -8℃ 下培养过夜后,洗涤平板,并且将结合到碱性磷酸酯酶的山羊抗小鼠抗体以 1 : 2000 稀释到饱和缓冲液中,并且加入到平板中。在 37℃ 下,温育该二抗 2 小时,洗涤后,将显色底物溶液(溶于 1M 二乙醇胺缓冲液——pH9.8,0.5mM MgCl_2 , 0.02% NaN_3 ——中的 1mg/ml 磷酸对硝基苯酯)加入到平板。在室温下温育反应 30 分钟,在 405-620nm 波长下,读出吸收值。

[0317] 第一个点的吸收值高于标准吸收值的血清,被使用更高的初始稀释度再次检测。

[0318] 阴性抗体应答(在 1 : 100 稀释时,第一个点的 OD 值低于 0.300)的小鼠被定为 2EU/ml 效价,并且被归类为“非-应答者”。

[0319] 血清杀菌抗体(SBA)测定

[0320] 通过测量脑膜炎奈瑟氏菌体外的补体介导裂解(complement-mediated lysis),分析疫苗免疫诱导的功能抗体(Goldschneider 等,1969)。使用大量商业幼兔补体作为补体来源(Pelfreeze lot No.09958)。

[0321] 测定方案是基于添加有 0.25% 葡萄糖的 Mueller Hinton 培养液(Difco)中的测试菌株的接种体,其开始于在琼脂巧克力上生长的分离菌落。在 37℃ 下,用 5% CO_2 ,温育细菌培养物,并且当细菌到达早期指数生长期(O.D._{600} 为 0.220-0.240)时,停止生长。在具有 1% BSA 的 Gey's 平衡盐溶液中,将该培养物稀释到 10^{-4} 菌落形成单位/ml (ColonyForming Unit(CFU)/ml),并且在 37℃、5% CO_2 下,在存在热灭活的试验血清池(heat inactivated test sera pool)和幼兔补体的情况下,温育 1 小时。在温育之前(T0)和温育 1 小时后(T1),将反应混合物铺于 MuellerHinton 琼脂(Difco)上。在 37℃、5% CO_2 下,温育平板过夜,并且计数对应于 T0 和 T1 的 CFU/ml。

[0322] 将血清杀菌抗体效价表示为产生 50% 杀菌的血清稀释度的倒数。

[0323] 结果

[0324] 物理化学性质

[0325] 物理化学分析的结果表明,偶联物的糖基化程度是非常低的。蛋白质印迹获得的适度信号和偶联物与 CRM 参比之间的 SDS-Page 中注意到的小的差异也表明低偶联程度。可优化偶联条件以及偶联物的纯化。

[0326] ELISA 结果

[0327] 获得的结果报告于表 2 和图 4 中。测量从每单一动物得到的 ELISA 效价,并以 ELISA 单位/ml (EU/ml) 表示。计算对每一复合糖的特异性抗体应答,作为相应免疫接种组的几何平均效价(GeometricMean Titre, GMT)。

[0328] 第二次给药后,血清在用佐剂配制的合成偶联物中显示出低效价,在没有佐剂处理的免疫组中显示出任何效价。

[0329] 具有和没有明矾的情况下,偶联物没有显示出任何效价。

[0330] 如预期的,具有和没有佐剂处理的对照组显示出高应答。

[0331] 表 2. 在第一次给药后,第二次给药后,第三次给药后小鼠血清中确定的对多糖 MenA 的 ELISA 抗体效价。报告对每一免疫组计算的几何平均效价。

		第一次给药后	第二次给药后	第三次给药后
[0332]	-	2	2	2
	+	23	36	17
	MenA lyo-	7	110	672
	MenA lyo+	3	453	1796

[0333] SBAb 测定结果

[0334] 在从每一免疫组制备的血清池中确定血清杀菌效价。将杀菌效价表示为,对比于在 T0 测量的对照 CFU/ml,导致反应混合物的 CFU/ml 下降 50%的血清稀释度的倒数。针对血清群 (serogroup) A 菌株 F8238,测量杀菌效价。SBAb 抗体效价报告于表 3 中。(MenA-CRM 是野生型对照)

[0335] 表 3. 在第二次给药后和第三次给药后血清集合体中的杀菌活性。

		第二次给药后	第三次给药后
[0336]	-	<4	<4
	+	64	256
	MenA lyo-	2048	4096
	MenA lyo+	4096	8192

[0337] 结论

[0338] 制备了偶联物,并分析其物理化学、免疫化学和免疫学特性。

[0339] 物理化学和免疫化学分析都表明了偶联物的糖基化程度。

[0340] 在对照组中,在具有或没有佐剂的情况下,对免疫接种的应答,效价是高的。

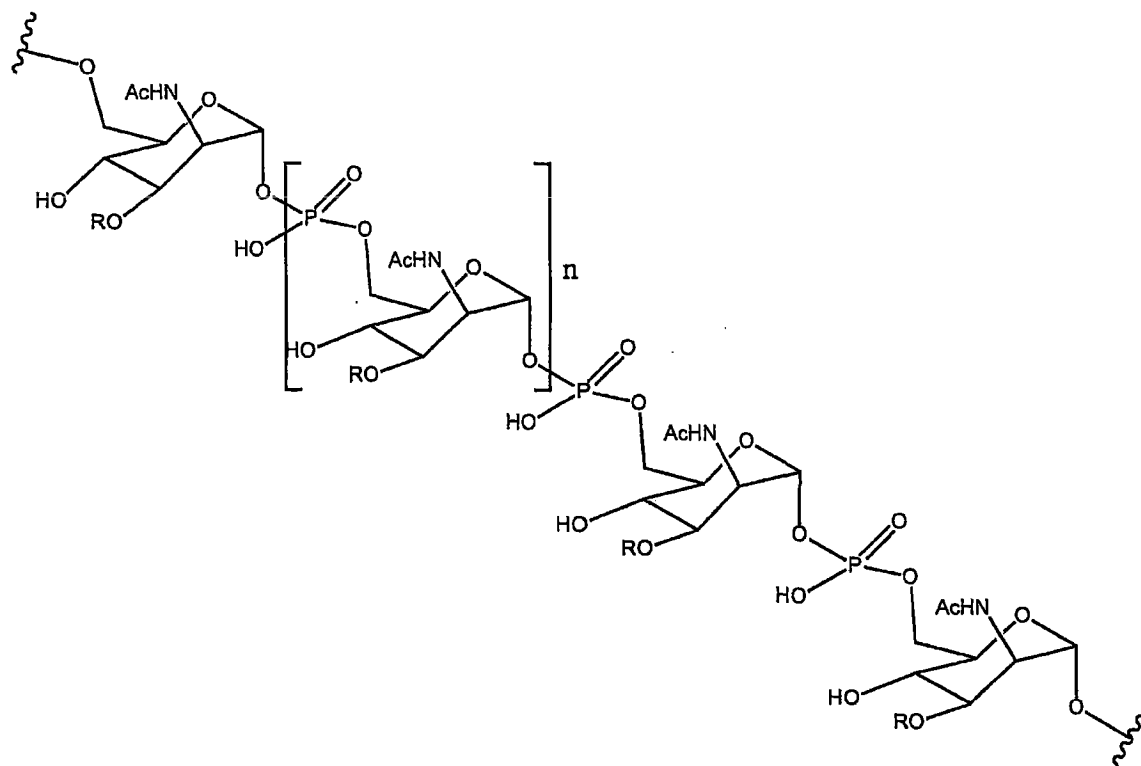
[0341] 在第三次给药后的血清池中,对比于第二次给药后的血清,效价增加。在用不具有明矾的合成偶联物治疗的组中,效价是测量不到的,在用佐剂化偶联物的免疫接种中,效价是可测量的但是较低。

[0342] 用寡偶联物进行对照免疫接种的效价明显较高。

[0343] 结果证明:结合到蛋白载体 CRM197 的合成 MenA 寡糖在小鼠中是免疫原性的。偶联物具有应该比天然磷酸二酯键稳定得多的 C- 磷酸酯键。一些免疫原性已被检测的事实表明是有前景的。

[0344] 应理解,提供前述实施例来阐明本发明,而不是限定本发明的范围。公开的要素的各种改变和组合是可行的,如一个普通技术人员将意识到的,这些也在本发明的范围内。例如,用于胺和羟基的许多保护基是公知的,并且这些中的许多能被用来代替在本文中具体叙述的那些,而不背离本发明的精神。

脑膜炎奈瑟氏菌的天然荚膜多糖(CPS)



R表示H或Ac；脑膜炎奈瑟氏菌的天然荚膜多糖的大约70-80%在该位置被乙酰化。

图1

2-脱氧-2-氮杂取代甘露糖单元的 α 和 β 异头物

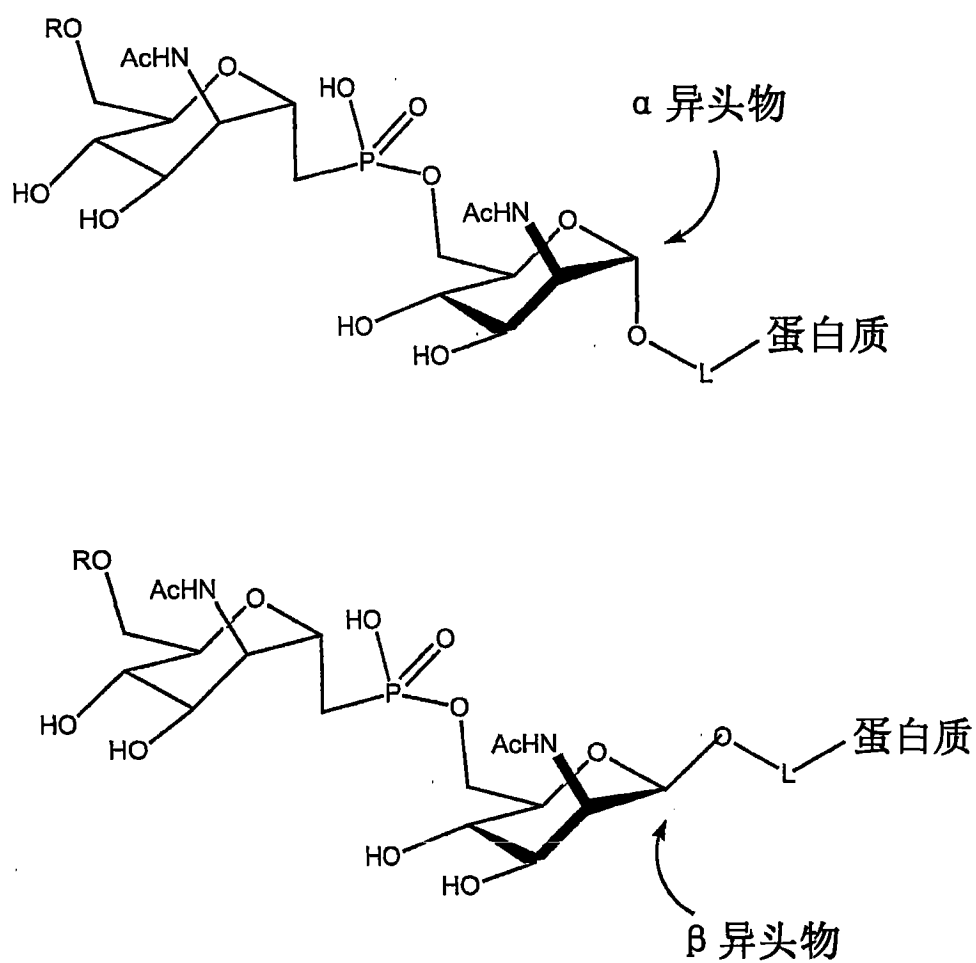


图2

制造本发明寡糖的延长顺序

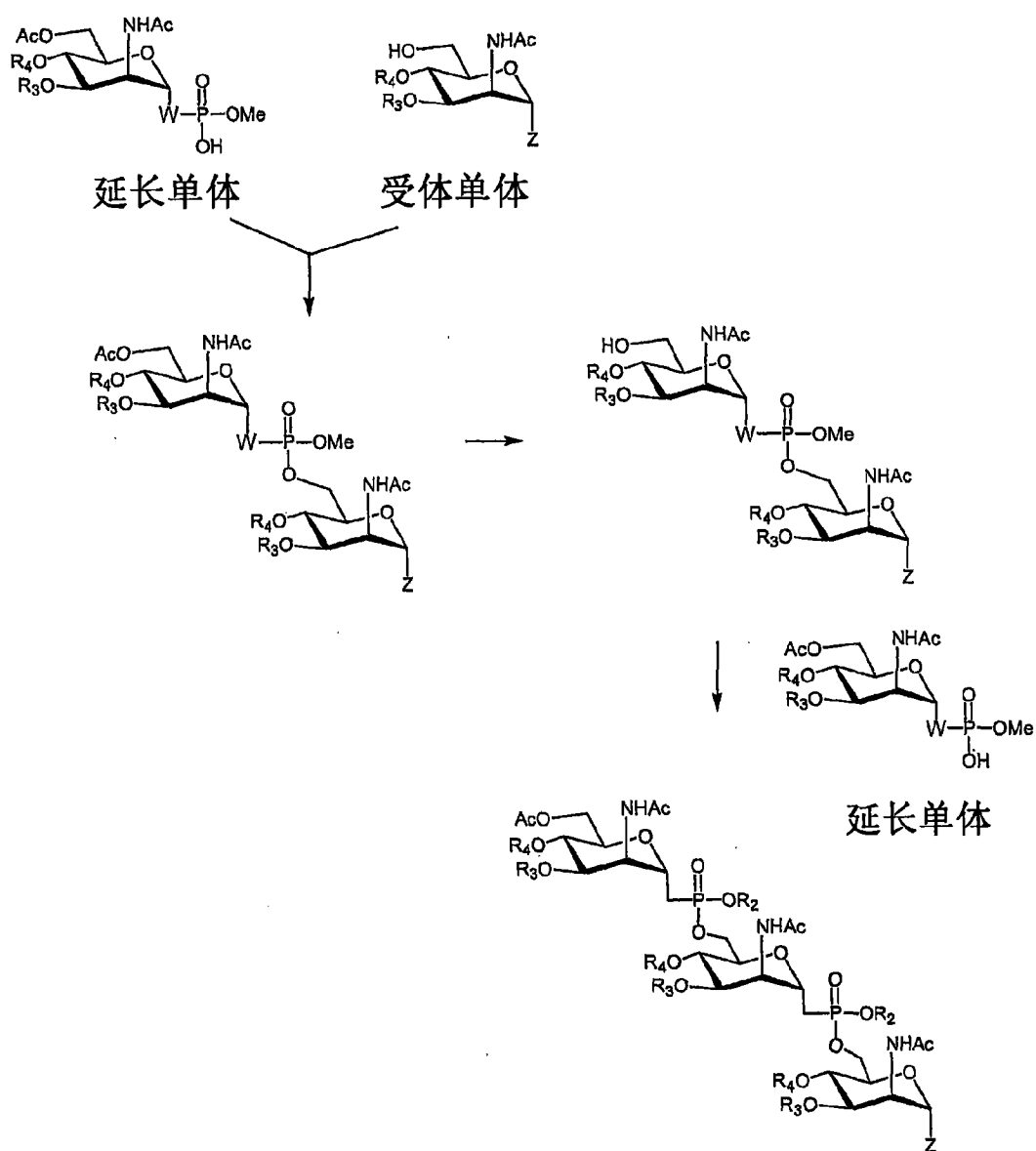


图3

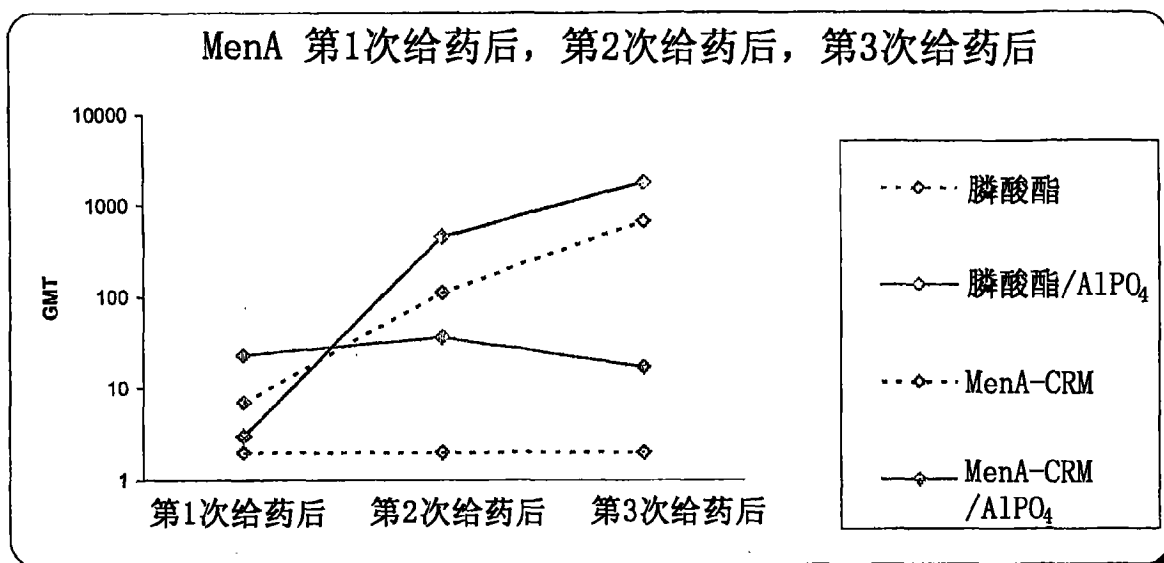


图4