



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) **NO**

(11) **169775**

(13) **B**

(51) **Int Cl⁵ C 07 H 15/04**

Styret for det industrielle rettsvern

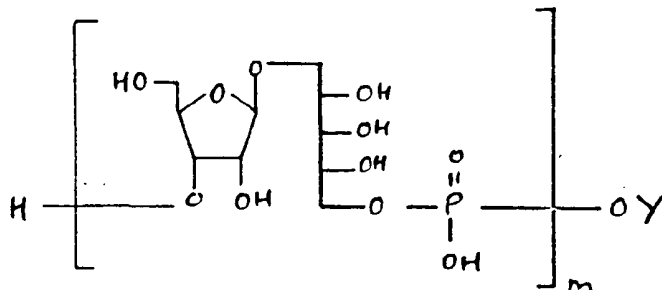
(21) Søknadsnr	875442	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	28.12.87	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	28.12.87	(30) Prioritet	31.12.86, NL, 8603325
(41) Alm. tilgj.	01.07.88		
(44) Utlegningsdato	27.04.92		
(71) Patentsøker	RIVM of Bilthoven, Antonie van Leeuwenhoeklaan 9, NL-3720 BA Bilthoven, NL		
(72) Oppfinner	Eduard Coen Beuvery, Vianen, NL Adolf Evenberg, Utrecht, NL Jan Theunis Poolman, Broek in Waterland, NL Jacobus Hubertus van Boom, Voorschoten, NL Peter Hoogerhout, Gouda, NL Constant Adriaan Anton van Boeckel, Oss, NL		
(74) Fullmektig	Dag Dawes, Bryn & Aarflot AS, Oslo		

(54) **Benevnelse** **Analogifremgangsmåte for fremstilling av nye oligosaccharider**

(56) **Anførte publikasjoner** **Ingen**

(57) **Sammendrag** Fremgangsmåte for fremstilling av nye oligosakkarider omfattende strukturen (D-ribose-D-ribitol-fosfat)_m, (D-ribitol-fosfat-D-ribose)_m eller (fosfat-D-ribose-D-ribitol)_m, idet m er 2,3,4 19 eller 20, nye immunogener som inneholder slikt oligosakkarid og vaksiner som inneholder slike immunogener. Vaksinen er meget godt egnet for behandlinger av infeksjoner forårsaket av Haemophilus influenzae type b.

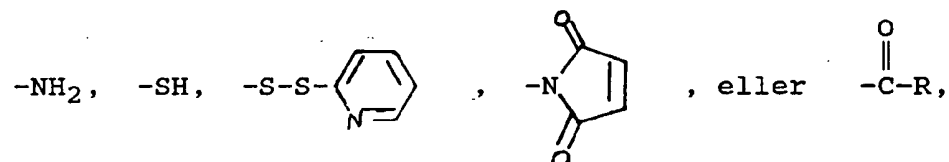
Oppfinnelsen angår en analogifremgangsmåte for fremstilling av et oligosakkarid med formelen:



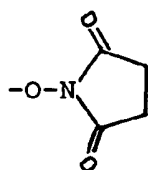
hvor

m er 2, 3,19 eller 20; og

Y er en reaktiv gruppe som kan danne en binding med et protein, en micelle, en vesikkel eller liposom, eller en gruppe inneholdende en hydrofob kjede ved den ikke-bundede ende og som inneholder én av de følgende reaktive funksjoner:



hvor R = -OH, -N₃, -O-alkyl (C₁-C₁₂), -OC₆F₅, -H, -Br, -Cl, eller



eller salter derav.

Immunogener inneholdende slike oligosakkarider kan anvendes i fremstilling av vaksiner.

Kapsel-polysakkaridet hos bakterien *Haemophilus influenzae* type b består av mange enheter av D-ribose-D-ribitol-fosfat (-> 3)-D-ribf-(1->1)-ribitol-5->PO₄-). *Haemophilus influenzae* type b er blant annet en patogen bakterie som forårsaker menin-gitt og andre infeksiøse sykdommer.

Det er funnet at immunitet kan oppnås ved administrering av kapsel-polysakkeridet hos *Haemophilus influenzae* type b (HIB). Det er også funnet, særlig hos barn under 2 år, at den oppnådde immunitet har kort varighet, og hos barn under 18 måneder kan

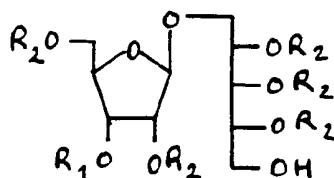
den ikke påvises i det hele tatt. Dette kan forbedres ved administrering av kapsel-polysakkaridet knyttet til en såkalt thymus-avhengig bærer (protein). Slike polysakkarid-protein-konjugater har den ulempe at strukturen ikke er nøyaktig definert og at polysakkarid-delen i produktet ikke er homogen. Dette har det resultat at hver nylig fremstilt ladning av vaksine som inneholder slike konjugater, må undersøkes i forsøksdyr og/eller mennesker når det gjelder vaksinens effektivitet. Dessuten kan anvendelse av et slikt produkt i en vaksine frembringe uønskede antistoffer eller toksisitet.

Oligosakkarider oppnådd ved nedbrytning av kapsel-polysakkaridet HIB er dessuten ikke rene, skjønt de er bedre definert. Her vil også effektiviteten måtte undersøkes igjen.

Det er derfor behov for en vaksine mot HIB-sykdom inneholdende et nøyaktig beskrevet, rent oligosakkarid-fragment, d.v.s. et oligosakkarid-fragment som ikke inneholder oligosakkarider med forskjellig struktur eller kjedelengde.

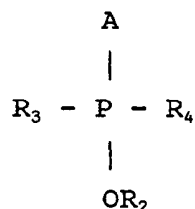
Det er nå funnet at slike rene oligosakkarider kan fremstilles syntetisk, og at egnede immunogener kan fremstilles ved at slike fragmenter knyttes til en bærer. Slike immunogener kan anvendes i vaksiner. Det faktum at et slikt oligosakkarid kan fremstilles syntetisk har også den fordel at tilgjengeligheten ikke er avhengig av tilgjengeligheten på den patogene bakterie HIB.

Ifølge oppfinnelsen fremstilles de foreliggende oligosakkarider ved at et oligosakkarid med formelen 2:



hvor R_1 og R_2 er permanente beskyttelsesgrupper,

- 1) omsettes med en forbindelse med formel 3:



hvor

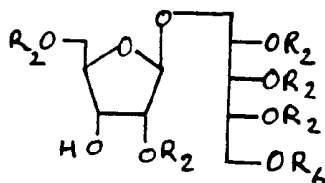
A er et oksygenatom bundet ved hjelp av en dobbeltbinding til fosforatomet, eller ingenting (i det tilfellet fosforatomet har et fritt elektronpar);

R₂ har den tidligere angitte betydning;

R₃ er en reaktiv gruppe; og

R₄ er en reaktiv gruppe;

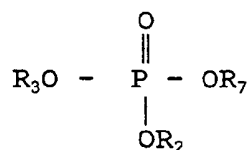
og med en forbindelse med formel 5:



5

hvor R₂ har den forut gitte betydning og R₆ er en temporær beskyttelsesgruppe; og at

- 2) i det oppnådde produkt fjernes R₆; og at
- 3) trinnene 1) og 2) gjentas m-2 ganger med det oppnådde produkt i trinn 2), og at
- 4) det oppnådde produkt fra trinn 2) eller 3) omsettes med en forbindelse med formel 6:



hvori

R₂ er en permanent beskyttelsesgruppe;

R₃ er en reaktiv gruppe;

R₇ er en permanent beskyttelsesgruppe, en reaktiv gruppe som kan danne en binding med et protein, en micelle, en vesikkel eller liposom, eller en gruppe inneholdende en hydrofob kjede ved den ikke-bundede ende, og at

- 5) i det således oppnådde produkt erstattes den permanente beskyttelsesgruppe R₇, hvis den er tilstede, med Y; og at
 - 6) den i trinn 4) eller 5) oppnådde forbindelse befris for beskyttelsesgruppen ved å erstatte de permanente beskyttelsesgrupper med et hydrogenatom;
- hvorefter den oppnådde forbindelse eventuelt kan overføres i et salt derav.

Fortrinnsvis er m lik 2,3,4,5 eller 6 siden et oligosakkarid-skjelett med en slik lengde vanligvis allerede er passende når det gjelder det aktuelle formål. Med enda større preferanse er m lik 3,4,5 eller 6.

På grunn av at fosfatgruppene i oligosakkaridene fremstilt ifølge oppfinnelsen opptrer i ionisert tilstand i oppløsning ved for eksempel nøytral pH, fremstilles oligosakkaridene fortrinnsvis i form av et salt, for eksempel et natriumsalt.

På grunn av at oligosakkaridene fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse ikke i seg selv har noen immunogenitet, eller tilstrekkelig immunogenitet, er det nødvendig å knytte oligosakkaridene til en bærer, idet immunogeniteten som et resultat av dette faktisk oppnås i en tilstrekkelig grad. Avhengig av typen bærer, vil den måte på hvilken oligosakkaridet er forbundet med bæreren, variere. Sammenknyttingen av oligosakkaridet og bæreren skjer direkte eller indirekte via -OY i formel I.

På grunn av at -OH- og =O-gruppene vist i formel 1, som er aktive i større eller mindre grad, er beskyttet i lengre eller kortere tid under fremstilling av oligosakkaridene ifølge oppfinnelsen, er det fordelaktig å innføre de modifikasjoner som fordres for sammenknytting med bæreren før de beskyttende grupper fjernes. Som allerede angitt, finner sammenknyttingen

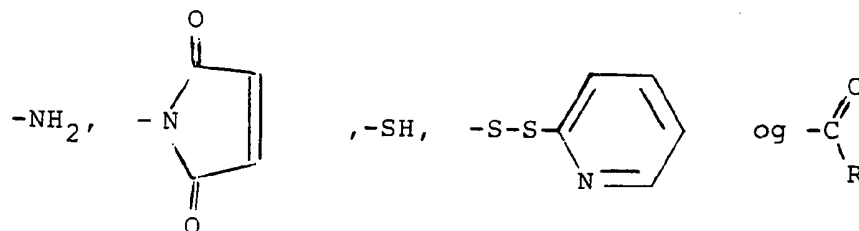
mellom oligosakkaridet og bæreren sted $-OY$. Hvis X og Y nå var hydrogen i formel 1, ville de beskyttende grupper måtte innføres igjen før den gruppe som fordres for sammenknytting med bæreren, kunne innføres. X er derfor fortrinnsvis lik hydrogen og $Y(-OY)$ lik én av de andre grupper som er spesifisert eller Y er lik hydrogen og $X(XO-)$ lik én av de andre grupper som er spesifisert.

Hvis " Y " eller betegnelsen "reaktiv gruppe" er anvendt i det følgende, menes også det tilfelle hvor den reaktive gruppe består av den reaktive gruppe $-NH_2$ eller $-SH$, idet det er nødvendig å lese $-NH_2$ eller $-SH$ for $-OY$. Oligosakkaridet fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse ender derfor fortrinnsvis i én ende i en hydroksylgruppe og i den andre ende i en reaktiv gruppe eller en gruppe med en hydrofob kjede i den ubundne ende. Valget mellom disse to gruppe-typer er bestemt ved den måte på hvilken sammenknyttingen av oligosakkaridet med bæreren er oppnådd. I prinsippet er to fremgangsmåter som i og for seg er kjent, tilgjengelige for dette formål. I henhold til den første fremgangsmåte bindes oligosakkaridet til bæreren. I dette tilfelle er bæreren vanligvis et protein. I henhold til den andre fremgangsmåte oppnås sammenknyttingen av oligosakkaridet ved en gjensidig hydrofob påvirkning mellom en gruppe som er bundet til oligosakkaridet med en hydrofob kjede i den ubundne ende og bæreren, idet bæreren er en micelle, en vesikkel eller et liposom, eller ved en gjensidig hydrofob påvirkning oligosakkaridene seg imellom. I det første tilfelle kommer den hydrofobe gruppe inn i en gjensidig hydrofob påvirkning med de hydrofobe områder hos de amfifile forbindelser (lipider) i micellen, vesikkelen eller liposomet, mens oligosakkaridet ender ved grenseflaten for micellen, vesikkelen eller liposomet.

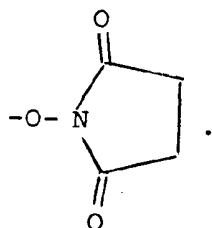
Reaktive grupper som direkte eller indirekte kan danne en binding med et protein, er kjent. Med en indirekte binding menes i denne forbindelse at bindingen kommer i stand mellom den reaktive gruppe og proteinet ved hjelp av en ytterligere forbindelse. Hvis Y i formel 1 omfatter en reaktiv gruppe, er alle de reaktive grupper i prinsippet egnet som kan danne en binding med

en karboksyl-, amin- eller annen valgfritt innført reaktiv funksjon hos proteinet.

Eksempler på slike reaktive grupper er grupper med følgende reaktive funksjon:



hvor R = -OH , -N_3 , $\text{-O-alkyl(C}_{1-12}\text{)}$, $\text{-OC}_6\text{F}_5$, -H , -Br , -Cl eller

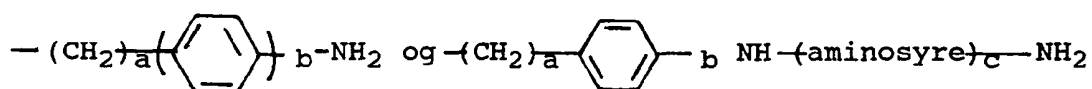


Den reaktive gruppe kan bestå av én av disse reaktive funksjoner eller kan, hvis den reaktive gruppe er større, inneholde én av disse reaktive funksjoner, i hvilket tilfelle gruppen fortrinnsvis ender i én av de nevnte reaktive funksjoner.

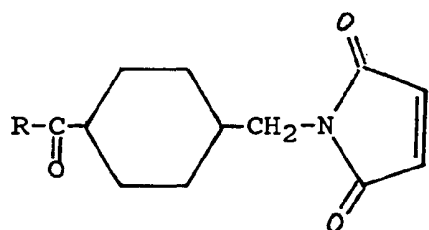
På grunn av at det er en fordel ved understøttelse av immunoogeniteten at ribose-ribitol-fosfat-enhetene i oligosakkaridet har en viss avstand fra proteinet etter binding av oligosakkaridet til proteinet, er den reaktive gruppe fortrinnsvis en ganske lang gruppe med én av de ovennevnte reaktive funksjoner.

Som angitt, innlemmes en reaktiv gruppe i enden av oligosakkarid-skjelettet fortrinnsvis når skjelettet fremdeles er beskyttet. Når først en reaktiv gruppe som inneholder én av nevnte reaktive funksjoner, er blitt innlemmet, kan den reaktive funksjon omdannes til én av de andre reaktive funksjoner hvis oligosakkarid-skjelettet fremdeles er beskyttet, men også hvis skjelettet allerede er fullstendig avbeskyttet.

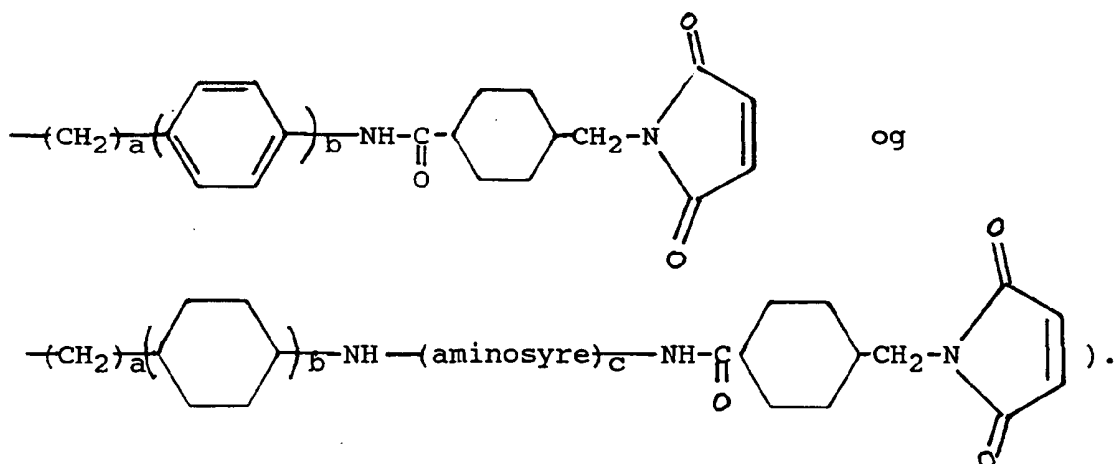
Således kan reaktive grupper som inneholder en -NH_2 -funksjon, såsom



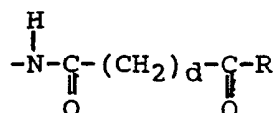
hvor $a = 0-16$, $b = 0-2$, $c = 1-10$ og den terminale aminosyre fortrinnsvis er glycin, ved hjelp av en forbindelse som inneholder en aktiv ester og en maleimid-funksjon, omdannes til en reaktiv gruppe inneholdende en maleimid-funksjon (idet nevnte grupper med



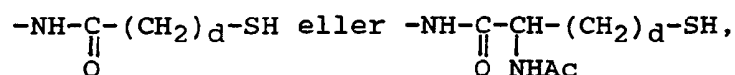
hvor R har samme betydning som på side 5, gir gruppene



Videre kan reaktive grupper som inneholder en $-\text{NH}_2$ -funksjon, ved hjelp av en forbindelse som inneholder to aktive ester- eller aldehyd-funksjoner, omdannes til en reaktiv gruppe som inneholder en aktiv ester eller aldehyd som den reaktive funksjon, for eksempel

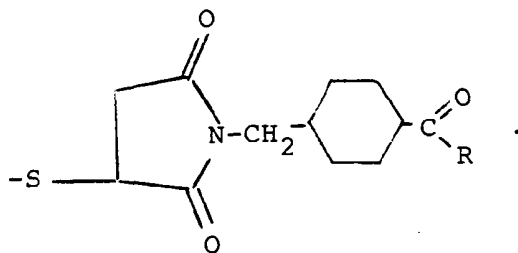


hvor R har samme betydning som på side 5 og $d = 1-6$, eller ved hjelp av en forbindelse som inneholder en aktiv ester og en -SH-funksjon, til en reaktiv gruppe inneholdende en -SH-funksjon, for eksempel



hvor $d = 1-6$ og Ac = acetyl.

Reaktive grupper som inneholder en -SH-funksjon, kan omdannes ved hjelp av en forbindelse som inneholder en aktiv ester og en maleimid-funksjon, til en reaktiv gruppe som inneholder en aktiv ester som den reaktive funksjon, for eksempel



Reaktive grupper som inneholder en $-\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{R}$ -gruppe som den reaktive funksjon, kan omdannes ved omsetting med forbindelser som inneholder en $-\text{NH}_2$ - og -SH-funksjon eller en maleimid- og $-\text{NH}_2$ -funksjon, til en reaktiv gruppe som inneholder henholdsvis en -SH- eller maleimid-gruppe som den reaktive funksjon.

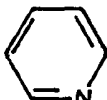
Slike omdannelser av den reaktive gruppe er i og for seg kjent i litteraturen.

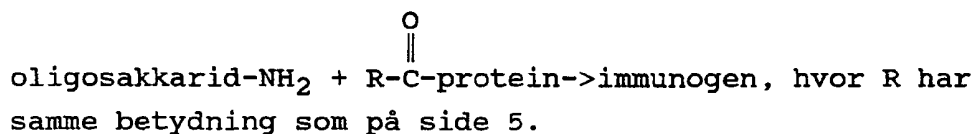
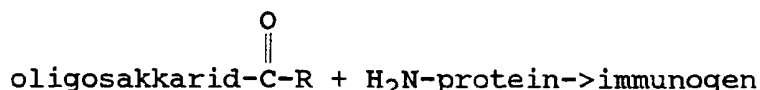
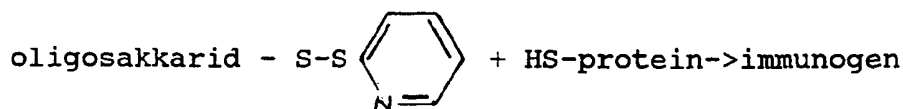
De således fremstilte oligosakkarider er bundet til et protein eller peptid. Reaktive $-\text{NH}_2$ -, $-\text{COOH}$ - eller -SH-grupper i proteinet kan omdannes til én av de andre reaktive grupper beskrevet ovenfor ved en fremgangsmåte som er analog til dem som er beskrevet der.

Oligosakkaridet fremstilt ifølge oppfinnelsen og proteinet kan bindes til hverandre blant annet som følger:

oligosakkarid - maleimid + HS-protein $\rightarrow$ immunogen

oligosakkarid - SH + maleimid-protein $\rightarrow$ immunogen

oligosakkarid - SH +  -S-S-protein $\rightarrow$ immunogen



Slike koplinger kan tilveiebringes direkte eller indirekte.

Videre kan oligosakkarider med en reaktiv -NH_2 -funksjon for eksempel koples til en NH_2 -gruppe på et protein ved hjelp av et koplingsmiddel, såsom bis[N-hydroksysuksinimid]estere eller glutarsyredialdehyd.

Hvis X eller Y i formel 1 er en gruppe som inneholder en hydrofob kjede i den ubundne ende, er slike grupper egnet for dette formål som kan gå inn i en innbyrdes hydrofob påvirkning med en micelle, en vesikkel eller et liposom, eller som kan danne en micelle ved hjelp av innbyrdes hydrofobe påvirkninger.

Den hydrofobe kjede er fortrinnsvis en alkylgruppe som inneholder 12-24 karbonatomer. Størst preferanse er gitt til grupper hvor alkylgruppen som inneholder 12-24 karbonatomer, utgjør denne gruppe.

Enda mer foretrukket er gruppen en uforgrenet alkylgruppe som inneholder 14-22 karbonatomer.

Oligosakkaridene fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse kan hensiktsmessig anvendes for fremstilling av en vaksine mot HIB-sykdom. Siden oligosakkaridene ikke i seg selv er immunogene, bør de knyttes til en bærer som gir partneren immunogenitet. Dette prinsipp er i og for seg kjent når det gjelder såkalte haptener, som skjønt de ikke i seg selv er immunogene, kan gjøres immunogene ved at de knyttes til en bærer. Egnede bærere er proteiner, peptider, miceller, vesikler og liposomer. Den største preferanse er gitt til proteiner eller miceller.

Som særlig egnede proteiner og peptider kan nevnes tetanus-toksin, tetanustoksoid, difteritoksin, difteritoksoid, kikhostetoksin, kikhostetoksoid, kikhoste-filament-hemagglutinin, kikhoste-fimbrier, kikhoste-ytremembran-proteiner, meningokokk-

(*Neisseria meningitidis*)-ytremembran-proteiner, *Haemophilus influenzae*-ytremembran-proteiner, *Haemophilus influenzae*-fimbrier, poliovirus-subenhet-proteiner og meslingvirus-subenhet-proteiner. Proteiner fra *Haemophilus influenzae* er mest foretrukket. En fordel ved slike bærere er at de anvendes eller kan anvendes i eksisterende DPTP-vaksiner. Nevnte proteiner er i og for seg kjent, likesom fremgangsmåter for isolering av slike proteiner. Fremgangsmåter er også kjent til å knytte sakkarider sammen med slike proteiner. Vanligvis er en kovalent binding mellom sakkaridet og proteinet innbefattet.

Hvis Y i formel 1 er en gruppe som inneholder en hydrofob kjede i den ubundne ende, kan oligosakkaridet gjøres immunogent på en hensiktsmessig måte ved at nevnte oligosakkarid knyttes til miceller, vesikler eller liposomer. Forbindelsen oppnås ved en innbyrdes hydrofob påvirkning mellom den hydrofobe kjede og hydrofobe deler av micellen, vesiklen eller liposomet. Slike sammenknyttings-fremgangsmåter er i og for seg kjent.

Hvis Y i formel 1 er en reaktiv gruppe, kan en reaksjon eventuelt utføres først med en forbindelse som inneholder en reaktiv gruppe og en hydrofob kjede. Det således oppnådde produkt kan så knyttes til miceller, vesikler eller liposomer.

En annen fremgangsmåte til å gi oligosakkaridene immunogenitet er å behandle oligosakkarider, hvor Y er en gruppe som inneholder en hydrofob kjede i den ubundne ende, på en måte slik at de hydrofobe kjeder danner en micellestruktur ved hjelp av innbyrdes hydrofobe påvirkninger. I dette tilfelle oppnås ikke immunogeniteten ved en sammenknytting mellom oligosakkaridet og en bærer, men ved sammenknytting av flere molekyler av nevnte oligosakkarid med hverandre.

Enda en annen mulighet til fremstilling av et immunogen er å kople oligosakkaridene ifølge formel 1 hvor Y er en reaktiv gruppe, til et amfifilt hjelpemolekyl ved hjelp av en kovalent binding via den reaktive gruppe. Denne kopling kan være direkte eller indirekte. Etter kopling av oligosakkaridet og hjelpestoffet, kan den ubundne ende på hjelpestoffet danne en micelle, eventuelt sammen med et ubundet hjelpestoff eller med andre lipidsubstanser. Egnede amfifile hjelpestoffer er for eksempel

avridin (N,N-dioktadekyl-N',N'-bis(2-hydroksyetyl)-pro-pandiamin), det lipoidale amin 4-aminometyl-1-(2,3-(di-n-dekyl-oksy)-n-propyl)-4-fenylpiperidin, dimetyl-dioktadekyl-ammonium-bromid, laurylmuramyl-dipeptid, lauryl-tetrapeptid, (N²-[N-(N-lauryl-L-alanyl)-D-glutamyl]-N⁶-(glycyl)-D,D-L,L-2,6-diamino-pimelinsyre, L-tyrosin og alkylderivater derav, maltose-tetra-palmitat, pluronsyre-polyoler, L-tyrosin-azobenzen-p-arsonat, sorbitan-monooleat (Span 80), trehalose-derivater (såsom trehalose-dimycolat), retinoylsyre og derivater derav, D,L- α -tokoferol (vitamin E), lipid A og analoger og glykosider, såsom for eksempel saponiner (for eksempel Quil A fra basten av *Quillaja saponaria* Molina).

Slike immunogener og fremgangsmåter for fremstilling av disse immunogener er i og for seg kjent fra europeisk patentsøknad 86.200.203,7. Lipid A og analoger er kjent som hjelpestoffer fra nederlandsk patentsøknad 8 500 499. Anvendelse av saponiner som hjelpestoffer og micelledannelse av saponiner koplet til antigen-determinanter er kjent fra nederlandsk patentsøknad 8 303 646.

Immunogenene kan hensiktsmessig anvendes ved fremstilling av en vaksine mot HIB-sykdom. For ytterligere forbedring av immunogeniteten kan det med fordel anvendes hjelpestoffer. Anvendelse av slike hjelpestoffer og nevnte hjelpestoffer er i og for seg kjent. Hjelpestoffene kan tilsettes til immunogenet. Det er også mulig å knytte hjelpestoffer sammen med immunogenet. Slike fremgangsmåter til forbedring av immunogeniteten er også i og for seg kjent. Immunogenene omfatter således, i tillegg til forbindelsene av oligosakkarider med bærere og forbindelsene mellom oligosakkarider seg imellom, dessuten forbindelser av nevnte to typer som et hjelpestoff også er forbundet med.

Vaksinen inneholder i det minste de ovenfor nevnte immunogener. Vanligvis vil immunogenet være i vaksinen i vandig oppløsning, emulsjon eller suspensjon, hvor tilsetninger som er vanlig for vaksiner kan finnes, såsom hjelpestoffer, stabilisatorer, buffere og andre immunogener. Egnede hjelpestoffer som kan tilsettes, er aluminiumhydroksyd, -fosfat eller -oksyd eller en blanding som består av en mineralolje, for eksempel Marcol

52, eller en vegetabilsk olje, og ett eller flere emulgeringsmidler såsom Tween 80 eller Span 80, eller ett av de amfifile hjelpestoffer som allerede er nevnt ovenfor.

Egnede stabilisatorer er karbohydrater såsom sorbitol, laktose, mannitol, stivelse, sakkarose, dekstran og glukose eller proteiner såsom albumin eller kasein.

Som buffere er det mulig for eksempel å anvende en alkali-metallfosfat-, en alkalimetallkarbonat- eller en jordalkalimetallkarbonat-buffer.

Som allerede angitt kan vaksinen også inneholder andre immunogener. I dette tilfelle er en såkalt "cocktail" innbefattet som har den fordel at immunitet mot flere patogener kan oppnås ved en enkelt administrering. Andre immunogener som kan anvendes, er for eksempel de immunogener som anvendes i de kjente DPTP-vaksiner. Vaksinen fremstilles i henhold til fremgangsmåter som i og for seg er kjent ved anvendelse av et immunogen som forut beskrevet, f.eks. ved oppløsning, emulgering eller suspensjon av immunogenet i et vandig miljø. Ett eller flere av de vanlige additiver kan tilsettes til eller kan være tilstede i det vandige miljø.

En slik vaksine kan anvendes for immunisering mot HIB-sykdom, men også for såkalt "priming" (hvorved kroppen ikke direkte stimuleres til dannelsen av spesifikke frie antistoffer men faktisk forberedes slik at det etter etterfølgende infeksjon eller gjen-vaksinering utløses en sterk immunreaksjon). Vaksinen administreres vanligvis ved hjelp av intramuskulær eller subkutan injeksjon. Vanligvis vil mengden av immunogen som administreres pr. injeksjon, være mellom 0,1 og 100 µg pr. dose.

Vaksinen gir i prinsippet beskyttelse for hvert individ mot HIB-sykdom og er særdeles egnet for vaksineringsprogrammer av små barn (under 2 år). Som et resultat av renheten til oligosakkaridet fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse, er det ikke nødvendig å undersøke hver fremstilt ladning av vaksinen som inneholder et slikt oligosakkarid igjen med hensyn til dens effektivitet. Dessuten er mengden av uønsket stimulerte antistoffer, forekomsten av andre bivirkninger, såsom toksisitet, begrenset med en slik vaksine.

Oligosakkaridene kan fremstilles ved at flere forbindelser valgt fra gruppen bestående av forbindelser som inneholder ribose-, ribose-ribitol-, ribose-ribitol-fosfat-, ribitol-, ribitol-fosfat-, ribitol-fosfat-ribose-, fosfat-, fosfat-ribose- og fosfat-ribose-ribitol-enheter, hvor disse enheter er forsynt med de nødvendige beskyttende grupper, omsettes med hverandre i flere trinn, og til slutt fjernes de beskyttende grupper. Oligosakkaridene fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse fremstilles til slutt ved at de beskyttende grupper i oligosakkarider, omfattende strukturen (D-ribose-D-ribitol-fosfat)_m, (D-ribitol-fosfat-D-ribose)_m eller (fosfat-D-ribose-D-ribitol)_m, hvor $m = 2, 3, 4 \dots 19$ eller 20 og hvor hydrogenatomet i de frie hydroksygruppene er blitt erstattet med en beskyttende gruppe, erstattes med et hydrogenatom. I sin alminnelighet er det kjent at oligosakkarider kan fremstilles ved at større eller mindre enheter som det endelige oligosakkarid er oppbygd av, bindes til hverandre ved hjelp av flere reaksjoner, idet enhetene er forsynt med de nødvendige beskyttende grupper. Etter at det nødvendige oligosakkarid er blitt dannet, fjernes de beskyttende grupper.

Oligosakkaridene kan fremstilles idet man starter ut fra en forbindelse med formel 2 ifølge formelarket. Idet man starter ut fra denne forbindelse, er det en rekke fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen til fremstilling av oligosakkaridene.

Den første fremgangsmåte er å bygge opp oligosakkaridet ved at man kontinuerlig inkorporerer en liten enhet. Dette kan gjøres ved at forbindelser med formel 2 fosforyleres med forbindelser med formel 3, og deretter sammenkoples en forbindelse med formel 5 med fosforgruppen, disse to trinn gjentas så ofte som ønsket og til slutt avsluttes oppbyggingen ved omsetning med en forbindelse med formel 6 ifølge formelarket, hvorefter de beskyttende grupper fremdeles må fjernes. En annen måte er å fosforylere en forbindelse med formel 5 med en forbindelse med formel 3, binde det oppnådde produkt ved hjelp av fosforgruppen til en forbindelse med formel 2, gjenta dette trinn så ofte som ønsket, og til slutt avslutte oppbyggingen ved omsetning med en forbindelse med formel 6 ifølge formelarket, hvorefter de

beskyttende grupper fremdeles må fjernes.

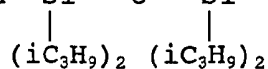
R_1 kan være en permanent beskyttende gruppe. R_2 er en permanent beskyttende gruppe. R_3 i formel 3 er en reaktiv gruppe og R_4 er en reaktiv gruppe eller en gruppe med formel 4. Siden Y fortrinnsvis ikke er lik hydrogen, er R_5 i formel 4 fortrinnsvis en gruppe som ikke er en permanent beskyttende gruppe. R_4 er fortrinnsvis en reaktiv gruppe og derfor ikke en gruppe med formel 4.

Med betegnelsen "permanent beskyttende gruppe" menes grupper som under hele fremstillingen av oligosakkaridene, utøver sin beskyttende virkning på de - ellers - reaktive grupper. Først etter at syntesen er blitt fullstendig utført, fjernes de permanent beskyttende grupper ved at de erstattes med et hydrogenatom. Slike beskyttende grupper er kjent i sukker- og nukleotid-kjemien.

Gruppene R_2 i formel 2, 3, 4, 5 og 6 kan være de samme eller forskjellige grupper, fortrinnsvis valgt fra følgende sett av grupper: benzoyl, benzyl, benzyloksymetyl, 2-klorfenyl, benzyloksykarbonyl, tert.-butyldifenylsilyl, alkyl inneholdende 10-20 karbonatomer, tetrahydropyranyl, tert.-butyldimetylsilyl og trityl. Fortrinnsvis er R_2 i ribitol-enhetene benzyl.

Hvis R_1 eller R_5 er eller inneholder permanent beskyttende grupper, kan nevnte grupper passende velges fra ovennevnte sett. Det samme gjelder R_2 i formel 3, som fortrinnsvis er 2-klorfenyl.

Fortrinnsvis danner R_1 i formelen 2, sammen med R_2 i stilling 5' i ribose-enheten, en $-\text{Si} - \text{O} - \text{Si}-$ gruppe

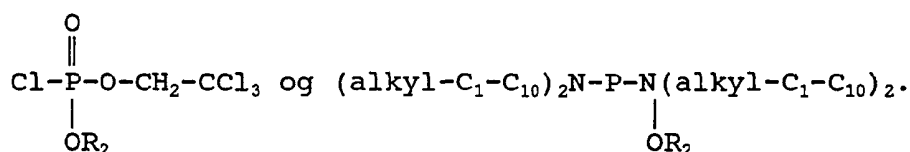
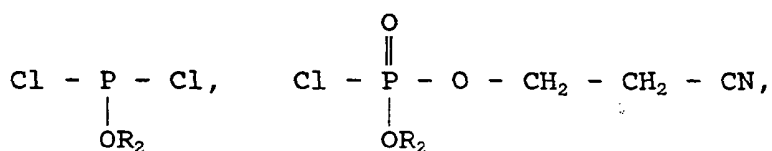
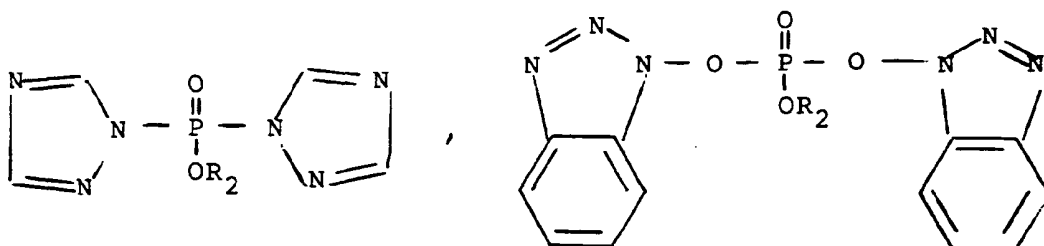


($k = L = \text{null}$) eller R_2 i stilling 5' i riboseenheten og R_1 er benzyl.

Fortrinnsvis er R_2 i stilling 2' i ribose-enheten benzyl, benzyloksymetyl, tetrahydropyranyl eller tert.-butyldimetylsilyl, idet benzyl og benzyloksymetyl er mest foretrukket, og R_2 i stilling 5' i ribose-enheten i formel 4, 5 og 6 er benzyl, benzyloksymetyl, tetrahydropyranyl, trityl eller tert.-butyldifenylsilyl, idet benzyl og tert.-butyldifenylsilyl er mest foretrukket.

De reaktive grupper R_3 og R_4 i formel 3 kan være grupper som

tilsammen kan tilveiebringe en binding mellom den frie OH-gruppe i forbindelser med formel 5 og formel 2. Egnede forbindelser med formel 3 er:



Reaksjonen mellom forbindelser med formel 2 og 3 finner vanligvis sted ved atmosfæretrykk og en temperatur på mellom 0 og 60°C i 20 minutter - 3 timer.

Deretter omsettes det således oppnådde produkt med en forbindelse med formel 5 hvor R_2 er en permanent beskyttende gruppe og R_6 er en midlertidig beskyttende gruppe.

Når det gjelder R_2 , gjelder det samme som det som allerede er angitt ovenfor ved omtale av formel 2. En midlertidig beskyttende gruppe betyr i denne forbindelse at det anvendes en gruppe som utøver sin beskyttende funksjon under en del av oppbyggingen av oligosakkarid-skjelettet for deretter, før oppbyggingen er fullstendig ferdig, å fjernes selektivt, d.v.s. uten at de permanent beskyttende grupper fjernes. Slike grupper er kjent i sukker- og nukleotid-kjemien. Egnede grupper er: allyl, 1-propenyl, dimetoksytrityl, kloracetyl, bromacetyl, levulinoyl og allyloksykarbonyl. Den største preferanse når det gjelder R_6 har allyl og 1-propenyl.

Omsetningen med forbindelsen med formel 5 finner vanligvis sted ved atmosfæretrykk og en temperatur på mellom 0 og 60°C i 20 minutter - 3 timer.

Etter omsetting med forbindelsen med formel 5, fjernes gruppe R_6 selektivt, vanligvis ved atmosfæretrykk og en temperatur på 0-60°C i 10-60 minutter, og erstattes med et hydrogenatom.

Deretter kan, hvis ønskelig, omsettingen med en forbindelse ifølge formel 3, forutsatt at R_4 er en reaktiv gruppe, omsettingen med en forbindelse ifølge formel 5 og erstatningen av R_6 med et hydrogenatom gjentas m-2 ganger. De betingelser under hvilke disse trinn utføres, er de samme som for de ekvivalente trinn som allerede er beskrevet ovenfor.

Deretter omsettes det oppnådde produkt med en forbindelse ifølge formel 6 i henhold til formelarket. Med hensyn til R_2 og R_3 gjelder det samme som det som allerede er angitt ovenfor med hensyn til R_2 og R_3 i diskusjonen av formlene 2 og 3. Fortrinnsvis er n og q lik null. R_7 har samme betydning som R_1 ; dette betyr ikke at R_1 og R_7 nødvendigvis er identiske. Siden Y i det ønskede oligosakkarid fortrinnsvis ikke er hydrogen, er R_7 fortrinnsvis lik Y ($Y \Delta H$), med det forbehold at den reaktive funksjon er forsynt med en permanent beskyttende gruppe. Grupper som passende kan anvendes for dette formål, er de permanent beskyttende grupper som allerede er nevnt; den største preferanse gis til benzyloksykarbonylgruppen.

De betingelser under hvilke reaksjonen med en forbindelse ifølge formel 6 vanligvis finner sted, er som følger: temperatur 10-60°C ved atmosfæretrykk, tid 15 minutter - 6 timer.

Oppbyggingen av oligosakkarid-skjelettet er derved fullstendig. Hvis ønskelig kan R_1 eller R_7 , for så vidt som R_1 og R_7 er en permanent beskyttende gruppe, nå erstattes med X eller Y for så vidt som X eller $Y \Delta H$. I oligosakkaridene fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse er X hydrogen; og R_1 er en permanent beskyttende gruppe. Siden Y fortrinnsvis ikke er hydrogen, er R_7 fortrinnsvis den samme som Y ($Y \Delta H$) forsynt med en permanent beskyttende gruppe. I dette tilfelle behøver verken R_1 eller R_7 erstattes med X eller Y for så vidt som X

eller $Y \Delta H$. Fortrinnsvis utføres derfor ikke dette trinn.

Endelig erstattes de permanent beskyttende grupper med et hydrogenatom. Akkurat som anvendelsen og innføring av permanent beskyttende grupper er kjent i sukker- og nukleotid-kjemien, er fjerning av beskyttelsesgrupper også kjent.

Imidlertid utføres fremstillingen av oligosakkarider ifølge den foreliggende oppfinnelse, hvor k , L , n og $q = 0$, fortrinnsvis ved at en forbindelse med formel 2, får reagere med reaksjonsproduktet fra reaksjonen mellom en forbindelse ifølge formel 3 og en forbindelse ifølge formel 5. Etter avdekking av det produkt som oppnås ved fjerning av R_6 , kan oligosakkarid-skjelettet ytterligere utvides ved omsetting med produktet fra reaksjonen mellom en forbindelse ifølge formel 3 og en forbindelse ifølge formel 5 og fjerning av beskyttelsesgrupper fra det produkt som oppnås igjen ved fjerning av R_6 . Dette kan gjentas så ofte som ønskelig, idet man tar i betraktning den fordrede lengde av oligosakkarid-skjelettet. Oppbyggingen av oligosakkarid-skjelettet avsluttes ved omsetning med en forbindelse ifølge formel 6. Fordelen ved denne fremgangsmåte er at antallet trinn kan reduseres fordi produktet, oppnådd ved omsetting av en forbindelse med formel 3 med en forbindelse med formel 5, bare behøver å fremstilles én gang. En annen fordel er at en forbindelse med formel 3 reagerer mer selektivt med en forbindelse ifølge formel 5 enn med en forbindelse ifølge formel 2. I begge tilfeller tjener forbindelsen med formel 3 til å binde bare én forbindelse med formel 2 eller 5, mens den andre reaktive gruppe i forbindelsen med formel 3 forblir intakt. Når det gjelder reaksjon med en forbindelse ifølge formel 2, skjer det mer uønsket dimér-dannelse.

Reaksjonen mellom en forbindelse med formel 3 og en forbindelse med formel 5 utføres ved en temperatur på mellom 10 og 60°C og ved atmosfæretrykk og vil vanligvis være fullstendig innen 10-60 minutter. Det således dannede produkt omsettes også ved 10-60°C og atmosfæretrykk med en forbindelse ifølge formel 2. Denne reaksjon vil vanligvis være fullstendig etter 0,5-3 timer og utføres fortrinnsvis i nærvær av en katalysator, såsom N-metylimidazol eller -tetrazol, eller etter aktivering med eller

i nærvær av et aktiverende reagens, såsom 1-(2,4,6-triisopropyl-benzen-2'-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol eller 1-(mesitylen-2'-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol.

Forbindelser ifølge formel 3 som hensiktsmessig kan anvendes, er i prinsippet de samme som de forbindelser som allerede er nevnt ovenfor.

Oligosakkaridene kan også fremstilles ifølge den foreliggende oppfinnelse idet man starter ut fra en forbindelse med formel 6 ifølge formelarket.

Denne forbindelse omsettes med en forbindelse med formel 5 hvor H er erstattet med R_6 og R_6 er erstattet med H. Fjerning av beskyttelsesgruppene utføres deretter ved at R_6 erstattes med H og det oppnådde produkt omsettes med en forbindelse med formel 3 og en forbindelse med formel 2 etter hverandre. En annen mulighet er å omsette en forbindelse med formel 6 med det produkt som oppnås ved omsetting av en forbindelse med formel 3 med en forbindelse med formel 5 hvor H er erstattet med R_6 og R_6 med H, og omsette den oppnådde forbindelse med en forbindelse med formel 2. De mellomliggende trinn kan igjen gjentas m-2 ganger.

I stedet for forbindelser med formel 3 ifølge formelarket, kan andre fosfor-forbindelser også anvendes for fremstilling av oligosakkaridene. Dette gjelder både de fremgangsmåter som allerede er beskrevet og de fremstillings-fremgangsmåter som vil følge. Således kan fosfor-forbindelser med tre reaktive grupper, såsom PCl_3 eller salicylklorfosfin, omsettes med forbindelse 2 eller 5 ifølge formelarket, og deretter hydrolyseres det oppnådde produkt til det tilsvarende fosfonat, som etter aktivering med et aktiverende reagens, såsom pivaloylklorid, omsettes med forbindelse 5 eller 2 ifølge formelarket.

Etter omsetting av en forbindelse med formel 3 ifølge formelarket, med forbindelse 2 eller 5 ifølge formelarket, kan det således dannede produkt også hydrolyseres - med fjerning av den frie reaktive gruppe som er tilbake og den permanent beskyttende gruppe (som i dette tilfelle er en midlertidig beskyttende gruppe) - til det tilsvarende fosfonat, som etter aktivering med et aktiverende reagens omsettes med forbindelse 5 eller 2 ifølge

formelarket.

Hvis A i formel 3 ikke er noe og fosfor-forbindelsen således har et fritt elektronpar, eller hvis fosfor-forbindelser dannes under fremstillingen av oligosakkaridene som ikke er fullstendig oksydert, bør det utføres en oksydasjon, for eksempel med I_2 /pyridin eller tert.-butylperoksyd for oppnåelse av det tilsvarende fosfat.

Oppfinnelsen forklares under henvisning til de følgende eksempler.

Eksempler

1. Fremstilling av en forbindelse med formel 2 ifølge formelarket

Idet man startet ut fra D-ribonolakton, ble 1-O-[2-benzyl-oxsymetyl-3,5-O-(tetraisopropyldisiloksan-1,3-diyl)- β -D-ribofuranosyl]-2,3,4-tri-O-benzyl-D-ribitol (forbindelse 15 på skjema 1) fremstilt via 13 mellomprodukter.

Forbindelse 2 på skjema 1 ble fremstilt ut fra forbindelse 1 som beskrevet i Canadian J. Chem. 36 (1958) 1720.

4,5 ml av allylklorformiat i 10 ml tørt acetonitril ble tilsatt dråpevis under omrøring til 4 g av forbindelse 2 og 3,5 ml tørt pyridin i 10 ml tørt acetonitril ved 0°C. Omrøringen ble fortsatt i 1 time ved 0°C. Overskudd av klorformiat ble ødelagt ved tilsetning av is. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med 100 ml eter og vasket 3 ganger med 50 ml vann. Den organiske fase ble tørket med $MgSO_4$ og konsentrert under vakuum. Residuet ble oppløst i 10 ml diklormetan og filtrert gjennom en liten kolonne som var pakket med 6 g silikagel 60. Kolonnen ble vasket med 40 ml diklormetan. Filtratet og vaskevæsken ble blandet og konsentrert under vakuum. Forbindelse 3 ble krystallisert ut fra dette med eter/diisopropyleter.

5 g av forbindelse 3 i 20 ml dioksan ble anbrakt under heliumatmosfære. Etterat 15 mg tetrakis(trifenylfosfin)palladium var blitt tilsatt, ble oppløsningen holdt i 15 minutter under tilbakeløpsbetingelser og reaksjonsblandingen med forbindelse 4 ble konsentrert.

8,6 g av forbindelse 4, 3,5 g natriumborhydrid og 150 ml tørt tetrahydrofuran ble oppvarmet til 55°C. 30 ml metanol ble tilsatt i 45 minutter under omrøring. Omrøringen ble deretter utført i 1 time ved 55°C.

Etter avkjøling ble reaksjonsblandingen konsentrert under vakuum. Residuet ble ko-fordampet med tørr metanol (3 x 50 ml), tatt opp i 100 ml diklormetan og vasket med 100 ml av en 90% mettet oppløsning av ammoniumklorid i vann. Den vandige fase ble ekstrahert med diklormetan (2 x 100 ml). De kombinerte organiske faser ble tørret (MgSO_4) og konsentrert under vakuum. Residuet ble renset ved hjelp av kromatografi (eluering med diklormetan/metanol 100/0 $\rightarrow$ 95/5). De egnede fraksjoner inneholder forbindelse 5. 6,2 g av forbindelse 5 ble oppløst i 100 ml eddiksyre, hvorefter 40 ml vann ble tilsatt. Oppløsningen ble omrørt i 4 timer ved 50°C. Reaksjonsblandingen ble konsentrert under vakuum. Residuet ble ko-fordampet med tørt toluen (3 x 25 ml) og tørt pyridin (3 x 25 ml) og oppløst på nytt i 40 ml pyridin. Etter at 7,5 g tritylklorid var blitt tilsatt, ble oppløsningen omrørt i 12 timer ved romtemperatur. Etter at 5 ml metanol var blitt tilsatt, ble reaksjonsblandingen konsentrert under vakuum.

Residuet ble ko-fordampet med toluen (3 x 25 ml) og tatt opp i 150 ml diklormetan og vasket med 150 ml 1 M natriumbikarbonatoppløsning og med 150 ml vann. Den organiske fase ble tørret (MgSO_4) og konsentrert under vakuum. Etter kromatografisk rensning utført som i det tidligere trinn, ble forbindelse 6 oppnådd. 7,3 g av forbindelse 6 ble oppløst i 40 ml tørt N,N-dimetylformamid, hvorefter 2 g natriumhydrid ble tilsatt i små porsjoner. Den omrørte reaksjonsblanding ble avkjølt til 0°C og 6,2 ml benzylbromid i 10 ml tørt N,N-dimetylformamid ble tilsatt dråpevis i 30 minutter. Omrøringen ble fortsatt i ytterligere 30 minutter ved 0°C og deretter i 12 timer ved romtemperatur. Deretter ble 10 ml metanol tilsatt langsomt og reaksjonsblandingen konsentrert under vakuum. Residuet ble tatt opp i 150 ml eter og vasket tre ganger med 50 ml H_2O . Den organiske fase ble tørret (MgSO_4) og konsentrert under vakuum. Kromatografisk rensning av konsentratet (eluering med heksan/diklormetan 2/1

(400 ml) og 1/1 (400 ml), fulgt av diklormetan) og inndampning av de riktige fraksjoner ga forbindelse 7. 8,5 g av forbindelse 7 ble oppløst i 135 ml eddiksyre og 15 ml vann og oppvarmet i 90 minutter ved 80°C. Oppløsningen ble konsentrert under vakuum. Residuet ble tatt opp i eter og vasket med vann (50 ml) og 1 M natriumbikarbonat-oppløsning (2 x 50 ml).

Den organiske fase ble tørret (MgSO_4) og konsentrert under vakuum. 10 ml diklormetan/heksan 1/1 ble tilsatt til residuet og filtrering ble utført. Filtratet ble renset kromatografisk (eluering med 400 ml kloroform/heksan 1/1, 400 ml diklormetan og diklormetan/metanol 98/2), hvorefter man fikk forbindelse 8. 3,4 g av forbindelse 9, som ble kjøpt, og 3,1 g av forbindelse 8 ble tørket ved ko-fordampning med dioksan (3 x 50 ml) og deretter oppløst i 50 ml tørt 1,2-diklorethan. Molekylsikter (4 Å, 10 g aktiverte pellets) ble tilsatt, og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 90 minutter under en strøm av nitrogen. Deretter ble 3 x 30 μl trimetylsilyl-trifluormetansulfonat tilsatt ved intervaller på 1 time. 1 time etter siste tilsetning ble det tilsatt 100 μl trietylamin; molekylsiktene ble fjernet ved filtrering og vasket med kloroform og toluen. Filtratet og vaskevæsken ble blandet og konsentrert under vakuum. Residuet ble renset kromatografisk (eluering med toluen/acetone 100/0 $\rightarrow$ 98/2). Man fikk forbindelse 10 fra de riktige fraksjoner. 5 g av denne ble oppløst i 25 ml tørt dioksan; deretter ble 25 ml tørr metanol og 1,25 ml 1 M natriummetoksyd i metanol tilsatt. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 4 timer ved romtemperatur. Etter at 0,25 ml 1 M natriummetoksyd i metanol var blitt tilsatt, ble røringen utført i ytterligere en time. Deretter ble 1,25 g Dowex 50 WX4 (H^+ -form) tilsatt og fjernet igjen etter 30 minutter ved filtrering og vasket med metanol og kloroform. Filtratet og vaskevæsken ble blandet og konsentrert under vakuum. Kromatografisk rensning (eluering med diklormetan/metanol 100/0 $\rightarrow$ 95/5) ga forbindelse 11, av hvilken 2,4 g ble konsentrert to ganger i 20 ml tørt pyridin. Deretter ble 20 ml tørt pyridin tilsatt. Den oppnådde oppløsning ble omrørt under nitrogenatmosfære ved 0°C og 1,4 ml 1,3-diklor-1,1,3,3-tetraiso-propyldisiloksan ble tilsatt dråpevis i 15 minutter. Deretter

ble omrøring utført i 1 time ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble konsentrert under vakuum og ko-fordampet med toluen (3 x 20 ml). Residuet ble tatt opp i 75 ml dietyleter og vasket med 1 M KH_2PO_4 (3 x 50 ml) og 1 M NaHCO_3 (3 x 50 ml). Den organiske fase ble tørret (MgSO_4) og konsentrert under vakuum. Etter kromatografisk rensning (eluering med diklormetan/acetone 100/0 -> 98/2) fikk man forbindelse 12, hvorav 1,49 g ble konsentrert to ganger fra 5 ml acetonitrol. Deretter ble 4,5 ml acetonitril tilsatt. Oppløsningen ble omrørt under nitrogenatmosfære ved 50°C og 1,35 ml tørt N,N-diisopropyletylamin og 0,5 ml benzyloksymetylklorid ble tilsatt etter hverandre. Etter 2 timer ble 0,25 ml benzyloksymetylklorid tilsatt og deretter ble omrøring utført i ytterligere 1 time. Deretter ble 2 ml tørr metanol tilsatt ved 50°C . Etter avkjøling ble reaksjonsblandingen konsentrert under vakuum. Residuet ble tatt opp i 40 ml dietyleter og vasket med 1 M KH_2PO_4 (3 x 20 ml) og 1 M NaHCO_3 (20 ml). Den organiske fase ble tørret (MgSO_4) og konsentrert under vakuum. Etter kromatografisk rensning (eluering med heksan/etylacetat 10/0 -> 9/1) fikk man forbindelse 13. Forbindelse 13 (1,32 g) ble oppløst i 4 ml tetrahydrofuran. Oppløsningen ble avgasset 3 ganger og anbrakt under helium. 1,5-cyklooktadienbis(metyldifenylfosfin)-iridiumheksafluorofosfat (2-3 mg) ble tilsatt, hvorefter oppløsningen igjen ble avgasset 3 ganger og anbrakt under helium. En strøm av H_2 ble ledet over oppløsningen i 2 minutter, hvorefter den igjen ble avgasset og anbrakt under helium. Etter 4 timer ble reaksjonsblandingen konsentrert under vakuum. Den således oppnådde forbindelse 14 ble oppløst i aceton og vann (1,2 g i henholdsvis 15 ml og 1 ml). Deretter ble 300 mg HgO og 375 mg HgCl_2 tilsatt og suspensjonen ble omrørt i 30 minutter ved romtemperatur. HgO ble fjernet ved filtrering og vasket. Filtratet og vaskevæsken ble blandet og konsentrert under vakuum. Residuet ble tatt opp i 75 ml dietyleter og vasket med 40 ml av en 50% mett KI-oppløsning (3x), 40 ml av en 1% NaHSO_3 -oppløsning og 40 ml 1 M NaHCO_3 . Den organiske fase ble tørret (MgSO_4) og konsentrert under vakuum.

Etter kromatografisk rensning (eluering med heksan/etylac-

tat 9/1 -> 7/3) fikk man 0,97 g ren forbindelse 15; $R_f = 0,34$ (heksan/etylacetat 7/3), $[\alpha]_{20}^0 = +39^\circ$ (c 1,0 - CHCl_3).

2. Fremstilling av en forbindelse med formel 5 ifølge formelarket

Idet man startet ut fra forbindelse 14 på skjema 1, ble forbindelse 17 fremstilt ifølge skjema 2.

Forbindelse 14 (425 mg) ble konsentrert fra 2 ml tørt dioksan (2x) og oppløst i 2,2 ml 0,5 M tetra-n-butylammoniumfluorid i dioksan. Etter at det hadde stått i 30 minutter ved romtemperatur, ble løsningsmidlet avdampet under vakuum. 25 ml 1 M NaHCO_3 ble tilsatt til residuet, og blandingen ble ekstrahert med 25 ml diklormetan (3x). De blandede ekstrakter ble tørret (MgSO_4) og konsentrert under vakuum. Etter kromatografisk rensning (eluering med diklormetan/metanol 100/0 -> 98/2) og konsentrering av de riktige fraksjoner under vakuum, fikk man 239 mg av et produkt som inneholdt 200 mg av forbindelse 16. Dette produkt ble konsentrert to ganger fra 2,5 ml tørt pyridin og deretter oppløst i 2,5 ml diklormetan. Etter at 65 μl N,N-diisopropyletylamin og 90 μl tert.-butyldifenylsilylchlorid var blitt tilsatt, ble reaksjonsblandingen omrørt i 12 timer ved romtemperatur. Etter at 65 μl N,N-diisopropyletylamin og 90 μl tert.-butyldifenylsilylchlorid var blitt tilsatt, ble omrøringen utført i ytterligere 24 timer. 0,5 ml metanol ble deretter tilsatt og konsentrering ble så utført under vakuum. Residuet ble tatt opp i dietyleter (25 ml) og vasket med 1 M KH_2PO_4 (3 x 10 ml) og 1 M NaHCO_3 (10 ml). Den organiske fase ble tørret (MgSO_4) og konsentrert under vakuum. Kromatografisk rensning (eluering med heksan/etylacetat 10/0 -> 7/3) ga 254 mg av forbindelse 17; $R_f = 0,41$ (heksan/etylacetat 7/3) og $[\alpha]_{20}^0 = -24,8^\circ$ (c = 1,0 - CHCl_3).

3. Fremstilling av en forbindelse med formel 3 ifølge formelarket

2-klorfenyl-O,O-bis(1-benzotriazolyl)fosfat ble fremstilt i henhold til I.R.L. Press, Oxford, U.K. (1984) 153-183. Denne forbindelse er i det følgende betegnet forbindelse 18.

4. Fremstilling av en forbindelse med formel 1 ifølge formel-arket

Et oligosakkarid ble fremstilt ifølge oppfinnelsen etter skjema 3.

229 mg av forbindelse 15 og 254 mg av forbindelse 17 ble separat konsentrert fra 2,5 ml pyridin (3x, siste gang til et volum på 1 ml). Deretter ble 1,46 ml av en 0,2 M oppløsning av forbindelse 18 i dioksan tilsatt til forbindelse 17, hvorefter oppløsningen ble omrørt i 30 minutter ved romtemperatur. Denne oppløsning ble tilsatt til en blanding av forbindelse 15 og 50 μ l N-metylimidazol under vannfrie betingelser. Etter at oppløsningen var blitt omrørt i 2 timer ved romtemperatur, ble den fortynnet med 50 ml dietyleter og vasket med 1 M trietylammoniumbikarbonat (2 x 25 ml), 1 M KH_2PO_4 (25 ml) og 1 M trietylammoniumbikarbonat (25 ml). Den organiske fase ble tørret (MgSO_4) og konsentrert under vakuum. Kromatografisk rensning (eluering med heksan/etylacetat 10/0 $\rightarrow$ 8/2) ga 368 mg av forbindelse 19 ($n = 1$), som så ble behandlet med HgO/HgCl_2 som beskrevet i forbindelse med fremstilling av forbindelse 15. Etter kromatografisk separasjon (eluering med heksan/etylacetat 9/1 $\rightarrow$ 7/3) fikk man forbindelse 20 ($n = 1$).

Forbindelse 21 (0,22 mmol), fremstilt ved omsetting av pentaklorfenylesteren av benzyloksykarbonylglycin og 3-amino-1-propanol i dioksan (romtemperatur, 1 time), ble fosforylert med forbindelse 18 (1,1 ml av en 0,2 M oppløsning i dioksan). Oppløsningen ble tilsatt til en blanding av 296 mg av forbindelse 20 ($n = 1$) og 20 μ l N-metylimidazol. Etter omrøring i 2 timer ved romtemperatur ble en oppløsning, oppnådd ved fosforylering av 0,30 mmol av forbindelse 21 med 1,5 ml av en 0,2 M oppløsning av forbindelse 18 i dioksan (30 minutter), igjen tilsatt til reaksjonsblandingen. Etter 2 timer fikk man forbindelse 22 ($n = 1$) ved hjelp av en vaske-fremgangsmåte som beskrevet ved fremstillingen av forbindelse 19 ($n = 1$) og en kromatografisk rensning (eluering med kloroform/acetone 100/0 $\rightarrow$ 95/5).

Forbindelse 22 ($n = 1$) (285 mg) ble avbeskyttet ved følgende trinn etter hverandre:

- Fjerning av 2-klorfenyl-grupper ved omsetting med syn-pyridin-

- 2-karboksaldoksim og N^1, N^1, N^3, N^3 -tetrametylguanidin i tetrahydrofuran i 48 timer ved romtemperatur;
- Fjerning av 1,1,3,3-tetraisopropyldisiloksan-1,3-diyl- og tert.-butyldifenylsilylgruppen ved omsetting i dioksan med tetra-n-butylammoniumfluorid i 16 timer ved romtemperatur;
 - Fjerning av benzyloksykarbonyl-, benzyloksymetyl- og benzylgruppene ved hydrogenolyse i tert.-butanol/vann (24 timer) og vann (24 timer), etter hverandre, i nærvær av 10% Pd/C (600 mg) og glycinamid.

Etter fjerning av katalysatoren ved filtrering, vasking av filtratet (3x) med kloroform, avdamping av kloroformen, frysetørring, gelfiltrering over Sephadex G-25 (eluering med 0,01 M trietylammoniumbikarbonat pH 7) og frysetørring av de sukkerpositive fraksjoner, ble det oppnådde materiale ledet gjennom en kolonne av typen Dowex 50 WX4 (Na^+ -form) i vann. Etter frysetørring fikk man 51 mg av den faste forbindelse 23 ($n = 2$). ^{31}P -NMR:

δ 1,54 og 0,74. 1H -NMR (ref. HDO, 4,65 ppm): δ 4,90 (s, 1H); 4,86 (s, 1H); 4,5-4,4 (m, 8 linjer, 1H); 3,21 (t, $-NH-CH_2-CH_2-$, "spacer"); 1,71 (t, $-CH_2-CH_2-CH_2$, "spacer").

^{13}C -NMR (ekstern referanse tetrametylammoniumklorid δ 56,2): δ 167,8 (s), 107,7 (s, C-1 Ribf), 107,5 (s, C-1 Ribf), 83,5 (s, CH), 82,8 (d, CH, J_{CP} 5,8 Hz), 75,2 (s, CH), 75,1 (d, CH, J_{CP} 3,4 Hz), 74,6 (br s, CH, J_{CP} uoppløst), 72,3 (s, 2 x CH), 71,8 (d, 2 x CH, J_{CP} 8,8 Hz), 71,4 (s, CH), 71,0 (s, 2 x CH), 6,95 (s, CH_2), 69,3 (s, CH_2), 67,5 (d, CH_2 , J_{CP} 4,4 Hz), 67,3 (d, CH_2 J_{CP} 4,4 Hz), 64,4 (d, CH_2 , J_{CP} 5,9 Hz), 63,4 (s, CH_2), 63,2 (s, CH_2), 41,3 (s, CH_2 Gly), 37,2 (s, CH_2), 30,0 (d, CH_2 , J_{CP} 7,3 Hz).

FAB-MS (hurtig-atombombardement-massespektrometri) viste m/z 823 [forbindelse 23, $n = 2$, $-Na$] $^+$ som det mest rikelig forekommende signal i høy-masse-området.

5. Fremstilling av forbindelse 23 ($n = 3$)

Forbindelse 20 ($n = 1$) (0,46 mmol) ble tilsatt til en oppløsning oppnådd ved fosforylering av 0,56 mmol av forbindelse 17

med 3 ml av en 0,2 M oppløsning av forbindelse 18 i dioksan/pyridin i 30 minutter. Etter 3 timer fikk man 0,36 mmol av forbindelse 19 ($n = 2$). Analogt til den fremgangsmåte som allerede er beskrevet ovenfor ble det deretter fremstilt 0,30 mmol av forbindelse 20 ($n = 2$), og idet man startet ut fra 0,15 mmol av forbindelse 20 ($n = 2$), fikk man 478 mg av forbindelse 22 ($n = 2$). Ut fra denne forbindelse ble 45 μ mol avdekket til forbindelse 23 ($n = 3$). Utbytte 22 mg; ^{31}P -NMR: δ 1,66 og 0,85 (to overlappende signaler); ^1H -NMR i D_2O (ref. HDO, δ 4,65): 4,92 (s, 2H); 4,88 (s, 1H); 4,55-4,42 (m, 2H); 3,25 (t, 2H, "spacer" $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 1,74 (t, 2H, "spacer" $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -30,1^\circ$ ($c = 1,0$, H_2O).

6. Fremstilling av immunogener

Immunogener ble fremstilt ved kopling av forbindelse 23 ($n = 2$) og forbindelse 23 ($n = 3$), (se skjema 3) til tetanustoksoid (TT) og ytre-membran-protein fra *Haemophilus influenzae* type b (MP) ifølge skjema 4.

Først ble oligosakkaridene 23 ($n = 2,3$) modifisert ved at den terminale aminogruppe ble omsatt med N-suksinimidyl-S-acetylmerkaptacetat, hvilket ga forbindelse 24 ($n = 2$ eller 3). 2-Pyridylditio-(PDP)-grupper ble innført på proteinene ved at $-\text{NH}_2$ -gruppene på lysinene ble omsatt med N-suksinimidyl-2-pyridylditiopropionat (SPDP). Forbindelser 24 og 25 ble tilsatt i en buffer (pH 6,1). S-acetylgruppen i oligosakkarid-komponenten ble avspaltet ved tilsetning av hydroksylamin, og som et resultat av dette dannes det en fri $-\text{SH}$ -gruppe. Tiolen 26 reagerer så med en PDP-gruppe på proteinet under dannelsen av forbindelse 27. Omfanget av inkorporering av oligosakkaridet ble bestemt ved en differensial-UV-måling av mengden av 2-tiopyridon frigjort ($\epsilon_{343} = 8.000 \text{ M}^{-1}$).

Materialer

Oppløsninger av tetanus-toksoid (10 mg/ml) og ytre-membran-protein fra *H. Influenzae* (2,5 mg/ml i 0,14 M NaCl + 0,1% Zwittergent 3-14). N-suksinimidyl-S-acetylmerkaptacetat ble fremstilt ifølge Anal. Biochem. 132 (1983) 68-73. SPDP ble skaffet

fra Pierce Chemical Company og Zwittergent 3-14 (N-tetradekyl-N,N-dimetyl-3-ammonio-1-propansulfonat) fra Calbiochem. N-etylmorfolin og dimetylacetamid ble destillert fra fluordinitrobenzen.

Buffer A : 2 M N-etylmorfolin/HCl pH 8,5

Buffer B : 0,01 M trietylammoniumbikarbonat pH 7,0

Buffer C : 0,1 M natriumfosfat + 0,005 M EDTA (dinatriumetylen-diamintetraacetat-dihydrat) pH 6,1

Buffer D : 0,1 M natriumfosfat pH 7,8.

PD-10-kolonne : Pharmacia for-pakket Sephadex G-25 M éngangs-kolonne (volum 9,1 ml, høyde 5 cm).

G-25-kolonne : 100 x 1,0 cm Pharmacia Sephadex G-25 (superfin).

Fremstilling av forbindelse 24

19,8 mg (21,4 μmol) av trietylammoniumformen av forbindelse 23 ($n = 2$) ble oppløst i 0,21 ml av buffer A, hvorefter 25 mg N-suksinimidyl-S-acetylmerkaptacetat i 0,85 ml dimetylacetamid ble tilsatt. Den homogene reaksjonsblanding ble holdt i 1 time ved romtemperatur. Surgjøringen ble så utført ved tilsetning av eddiksyre (100 μl). Sukkermaterialet ble utfelt ved tilsetning av 5 ml aceton. Den sirupaktige utfelning ble sentrifugert fra, oppløst i et lite volum av buffer B og renset via en G-25-kolonne under anvendelse av denne buffer som elueringsmiddel. De sukkerholdige fraksjoner ble blandet og frysetørret. Det oppnådde produkt ble frysetørret to ganger til fra vann og deretter oppløst i 0,50 ml av buffer C. Produktet inneholdt 11,5 μmol av forbindelse 24 ($n = 2$).

11 mg av forbindelse 23 ($n = 3$) ble omdannet til forbindelse 24 ($n = 3$) på identisk måte. Produktet inneholdt 4,2 μmol av forbindelse 24 ($n = 3$).

Fremstilling av forbindelse 25

En PD-10-kolonne ble ekvilibrert med 25 ml av buffer D. Deretter ble 1,50 ml (15 mg, ca. 100 nmol, molekylvekt omtrent 150.000) av en TT-oppløsning innført og eluert med buffer D. 4,5 mg SPDP i 0,45 ml etanol ble tilsatt til oppløsningen av TT

i buffer D (elueringsvolum 2,5-6,0 ml) som var oppnådd på denne måte. Etter omsetning i 1 time ved romtemperatur ble reaksjonsblandingen innført i G-25-kolonnen og eluert med buffer C. De proteinholdige fraksjoner ble blandet og fortynnet til 20 ml (proteinkonsentrasjon omtrent 5 nmol/ml) med buffer C hvor en klype natriumazid var blitt oppløst. 3,0 ml av denne oppløsning ble behandlet under helium med 1,0 μ mol ditiotreitol. Etter henstand i 24 timer ved romtemperatur, var $E_{343} = 1.648$ (referanse: ubehandlet PDP-TT). Siden $\epsilon_M = 8.000$, er innholdet av 2-tiopyridon 206 nmol/ml. Inkorporeringen var 41 PDP/TT.

15 mg TT ble behandlet med 1,0 μ mol SPDP på identisk måte. G-25-fraksjonen ble fortynnet til 15 ml. Inkorporering: 4,5 PDP/TT.

Analogt med dette ble 3,75 mg (omtrent 95 nmol, molekylvekt omtrent 40.000) MP to ganger overført til 3,5 ml av buffer D. Proteinet ble behandlet med henholdsvis 14,4 og 0,4 μ mol SPDP.

Etter gelfiltrering via G-25 ble proteinfraksjonen fortynnet til 15 ml (proteinkonsentrasjon omtrent 5,25 nmol/ml). På grunn av at MP er meget hydrofobt, ble 0,1% Zwittergent 3-14 i dette tilfelle tilsatt til bufferne C og D. Inkorporering: omtrent 4,9 og omtrent 1,3 PDP/MP.

Fremstilling av forbindelse 27

43 μ l (1,0 μ mol) av den oppløsning som var oppnådd tidligere av forbindelse 24 ($n = 2$) i buffer C, ble tilsatt til 3,0 ml (1 mg/ml) 4,5 PDP/TT, 4,5 ml (0,75 mg/ml) 41 PDP/TT, 4,5 ml (0,25 mg/ml) 1,3-PDP/MP og 4,5 ml 4,9-PDP/MP (G-25-fraksjoner i buffer C, se ovenfor). Luft ble fjernet fra oppløsningene med helium. Deretter ble det tilsatt 10 μ l 0,2 M hydroksylamin pH 6,15. Etter reaksjon over natten ved romtemperatur, ble mengden av 2-tiopyridon som var dannet, bestemt. Den ventede mengde tiopyridon ble spaltet fra proteinene 4,5-PDP/TT, 1,3-PDP/MP og 4,9-PDP/MP, og en tilsvarende mengde av forbindelse 27 ble derfor dannet. Et gjennomsnitt på 20 molekyler av forbindelse 26 ble koplet til 41-PDP/TT. Etter at en ytterligere mengde av forbindelse 24 ($n = 2$) var blitt tilsatt, forble graden av

sakkarid-inkorporering uforandret. Til et analogt konjugat, som etter en kortere reaksjonstid inneholdt 17 molekyler dimer, ble det tilsatt 1 μ mol cystein. Den totale mengde tiopyridon som var ventet, ble deretter hurtig dannet.

Forbindelse 24 (n = 3) ble anvendt på analog måte for fremstilling av trimer-protein-konjugater ifølge forbindelse 27.

Oppsummert ble følgende konjugater fremstilt:

1,3- og 4,9-dimer og -trimer/MP

4,5-dimer og -trimer/TT

20-dimer/TT (med 21 residual-PDP-grupper)

17-dimer/TT (uten residual-PDP-grupper som et resultat av etterbehandling med cystein)

13-trimer/TT (28 residual-PDP-grupper).

Antigeniteten hos disse konjugater ble målt og sammenlignet med antigeniteten hos naturlig forekommende polysakkarid av HIB (Ca-salt), human polysakkaridvaksine og det homologe antigen (= polysakkarid/MP) som frembringer muse-antistoffene. De substanser som skulle undersøkes, ble blandet i en to-gangers fortykningsserie med en fast mengde antiserum. Etter inkubering i 1 time ved romtemperatur, ble titeret for de frie rest-antistoffer bestemt i en direkte ELISA-inhiberingstest. Resultatene er som følger:

Konjugat	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibering
1,3-dimer/MP	10	45
1,3-trimer/MP	10	86
4,9-dimer/MP	10	49
4,9-trimer/MP	10	81
4,5-dimer/TT	10	21
4,5-trimer/TT	10	56
20-dimer/TT	10	19
17-dimer/TT	10	20
13-trimer/TT	10	53
naturlig forekommende polysakkarid (Ca-salt)	10	91
human polysakkarid-vaksine	10	90
homologt antigen (tyraminert polysakkarid)	10	12

Som det fremgår av dette, oppviser dimer-konjugatene en betydelig binding til antistoffene, skjønt denne binding er markert lavere enn bindingen hos det naturlig forekommende polysakkarid. Trimer-konjugatene kan nesten komme på høyde med evnen som det naturlig forekommende polysakkarid har til å bindes til antistoffer.

7. Fremstilling av vaksine

Et trimer-oligosakkarid (forbindelse 23, $n = 3$) ble bundet til tetanus-toksoid med glutardialdehyd ved blanding av et overskudd på 10-100 ganger (på molar basis) av trimeren med tetanus-toksoid og ved tilsetting av glutarsyredialdehyd 3 x i overskudd i forhold til liganden ved intervaller på 1 time. Etter at reaksjonsblandingen hadde fått stå i 5 timer ved romtemperatur, ble det tilsatt et 20-dobbelt overskudd (i forhold til liganden) av glycin. Etter 1 time ved romtemperatur ble NaCNBH_3 tilsatt. Etter 5 timer ved romtemperatur ble reaksjonsblandingen dialy-

sert. Idet man startet ut fra 2,4 mmol trimer, fikk man 120 μ mol konjugat, idet 3 trimerer var inkorporert pr. tetanus-tok-soid (3 trimer/TT), og idet vektforholdet mellom trimer og TT var 0,1:3.

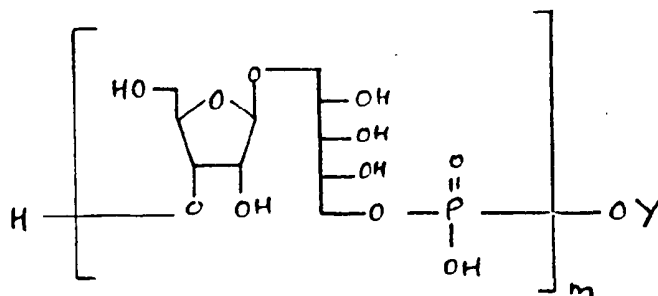
Mus ble injisert med et konjugat av polysakkarid fra *Haemophilus influenzae* type b og ytre-membran-protein fra *Haemophilus influenzae* type b koplet ved hjelp av adipin-dihydrazin (PS-MP). Vektforholdet mellom protein og polysakkarid i konjugatet var 1:1. Dosen pr. injeksjon var 5 μ g konjugat. Injeksjonen ble gjentatt 3 og 5 uker etter den første injeksjon. Etter 6 uker ble IgG-titeret bestemt og justert til 100.

Andre mus ble injisert med 3,12 μ g av 3-trimer/TT-konjugatet. Etter 4 uker ble denne injeksjon gjentatt, og etter 6 uker ble IgG-titeret bestemt, som var 36 med hensyn til PS-MP-titeret justert til 100.

Den sterke immunogenitet hos 3-trimer/TT-konjugatet vil kunne forstås ut fra det faktum at omtrent 1/3 av IgG-titeret som ble oppnådd ved injeksjon av 7,5 μ g polysakkarid, ble oppnådd med bare 0,25 μ g oligosakkarid. Med 1/30 av vekten fikk man 1/3 av effekten. Dessuten ble injeksjonen med trimeren gjentatt bare én gang, mens injeksjonen med polysakkaridet ble gjentatt to ganger.

P a t e n t k r a v

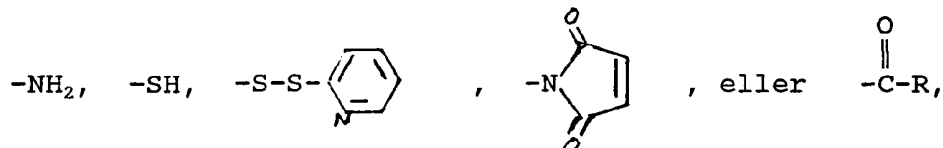
Analogifremgangsmåte for fremstilling av et oligosakkarid med formelen:



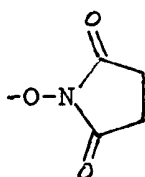
hvor

m er 2, 3,19 eller 20; og

Y er en reaktiv gruppe som kan danne en binding med et protein, en micelle, en vesikkel eller liposom, eller en gruppe inneholdende en hydrofob kjede ved den ikke-bundede ende og som inneholder én av de følgende reaktive funksjoner:

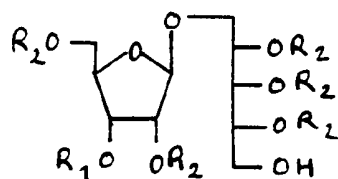


hvor R = -OH, -N₃, -O-alkyl (C₁-C₁₂), -OC₆F₅, -H, -Br, -Cl, eller



eller salter derav,

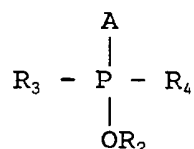
karakterisert ved at et oligosakkarid med formelen 2:



2

hvor i R₁ og R₂ er permanente beskyttelsesgrupper,

- 1) omsettes med en forbindelse med formel 3:



hvor

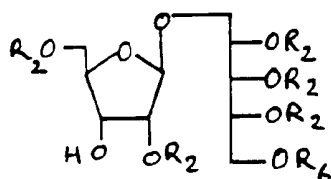
A er et oksygenatom bundet ved hjelp av en dobbeltbinding til fosforatomet, eller ingenting (i det tilfellet fosforatomet har et fritt elektronpar);

R₂ har den tidligere angitte betydning;

R₃ er en reaktiv gruppe; og

R₄ er en reaktiv gruppe;

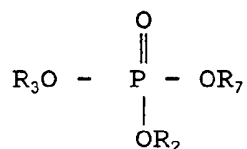
og med en forbindelse med formel 5:



5

hvor R₂ har den forut gitte betydning og R₆ er en temporær beskyttelsesgruppe; og at

- 2) i det oppnådde produkt fjernes R₆; og at
- 3) trinnene 1) og 2) gjentas m-2 ganger med det oppnådde produkt i trinn 2), og at
- 4) det oppnådde produkt fra trinn 2) eller 3) omsettes med en forbindelse med formel 6:



hvor

R₂ er en permanent beskyttelsesgruppe;

R₃ er en reaktiv gruppe;

R₇ er en permanent beskyttelsesgruppe, en reaktiv gruppe som kan danne en binding med et protein, en micelle, en

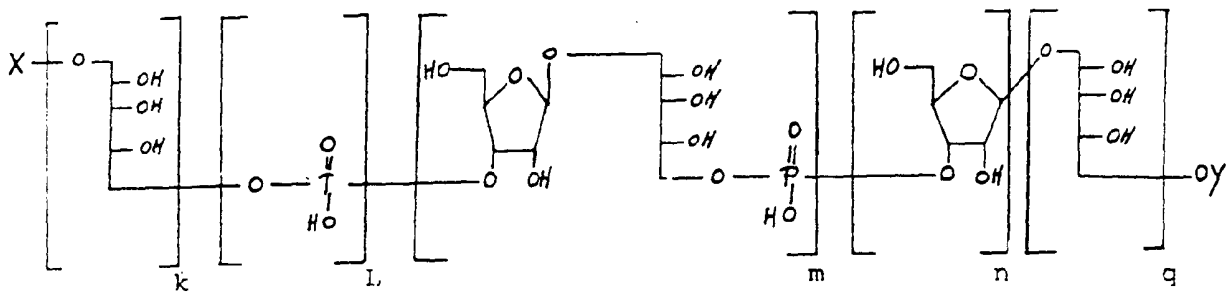
vesikkel eller liposom, eller en gruppe inneholdende en hydrofob kjede ved den ikke-bundede ende, og at

- 5) i det således oppnådde produkt erstattes den permanente beskyttelsesgruppe R₇, hvis den er tilstede, med Y; og at
- 6) den i trinn 4) eller 5) oppnådde forbindelse befris for beskyttelsesgruppen ved å erstatte de permanente beskyttelsesgrupper med et hydrogenatom;

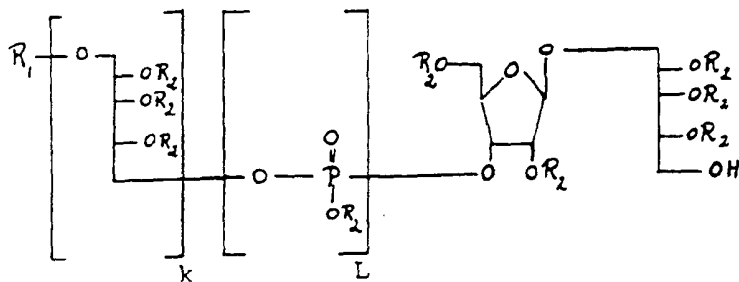
hvorefter den oppnådde forbindelse eventuelt kan overføres i et salt derav.

Formelark

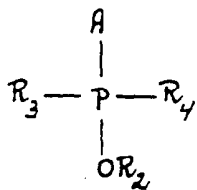
Formel 1:



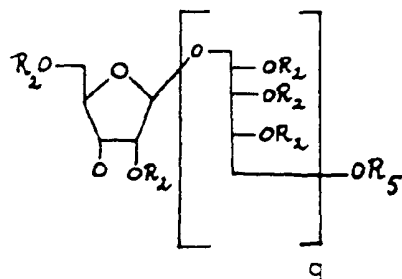
Formel 2:



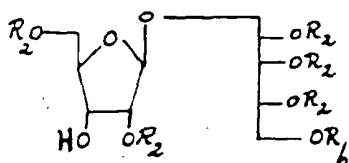
Formel 3:



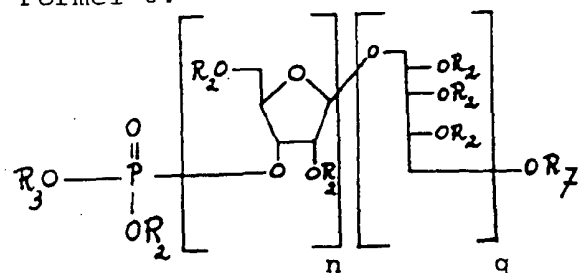
Formel 4:



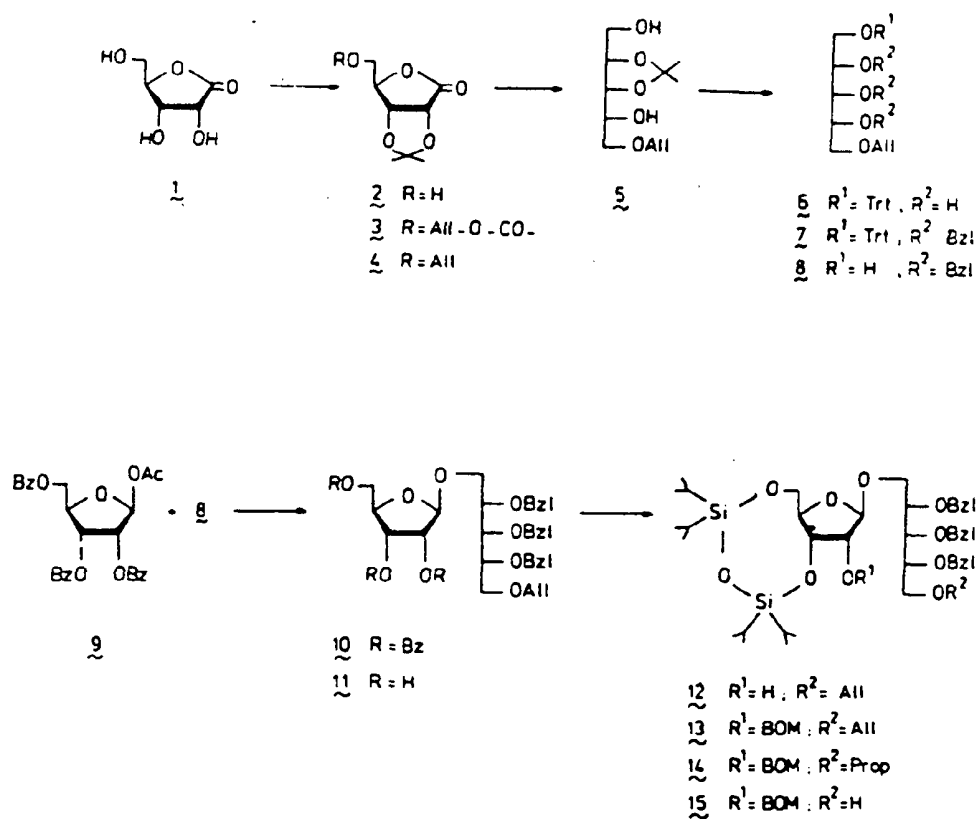
Formel 5:



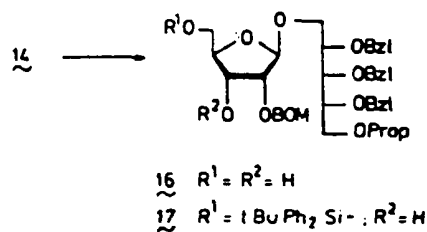
Formel 6:



Skjema 1:

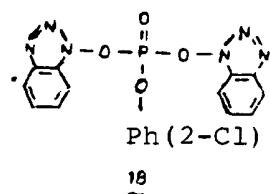


Skjema 2:



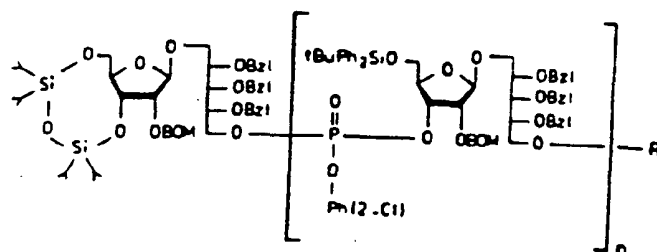
All = allyl; Trt = trifenylmetyl; Bzl = benzyl; Bz = benzoyl;
 Ac = acetyl; BOM = benzyloksymetyl; Prop = propen-1-yl;
 tBuPh₂Si- = t-butyldifenylsilyl.

SKJEMA 3

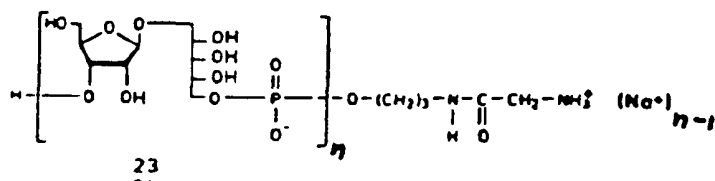
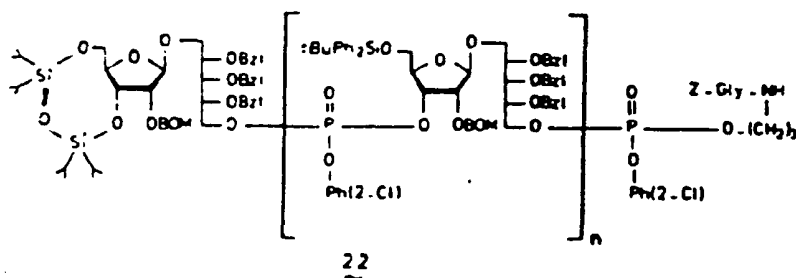
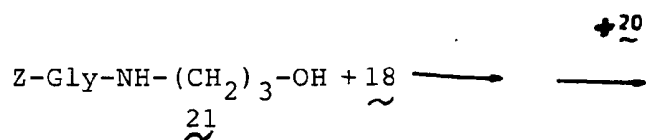


17

+ 15



20 R = H



Ph(2-Cl) = 2-klorfenyl; Z = benzyloksykarbonyl; Gly = glycin
og de andre forkortelser har samme betydning som i Skjema 1 og 2.

SKJEMA 4 (Ac= acetyl)

