



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 75579

(13) C2

(51) МПК (2006)

C07H 3/00

C07H 11/00

C07H 15/04 (2006.01)

A61K 39/102

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ СИНТЕЗУ СУМІШІ ОЛІГОСАХАРИДІВ

1

2

(21) 2002021613

(22) 15.08.2000

(24) 15.05.2006

(86) PCT/UA00/00003, 15.08.2000

(31) 121/99

(32) 30.08.1999

(33) CU

(46) 15.05.2006, Бюл. № 5, 2006 р.

(72) Верес Бенкомо Вісенте, CU, Рой Рене, СА

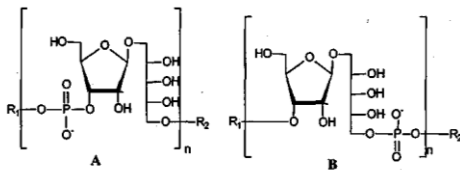
(73) УНІВЕРСИДАД ДЕ ЛА ХАВАНА, МІНІСТЕРІО
ДЕ ЕДУКАСІОН СУПЕРІОР, CU, ЮНІВЕРСИТІ ОФ
ОТТАВА, СА

(56) EP 0276516, A2, 03.08.1988

EP 0320942, A2, 21.06.1989

WO 9400149, A1, 06.01.1994

(57) 1. Спосіб синтезу суміші олігосахаридів, які включають в себе повторювані ланки формул (фосфат-рибоза-рибітол)_n або (рибоза-рибітол-фосфат)_n



де

n — ціле число від 4 до 25;

R₁ — спейсер у разі, коли R₂ — H, або R₂ — спейсер у разі, коли R₁ — H;

який **відрізняється** тим, що реакція утворення згаданого олігосахариду містить такі стадії: дисахарид 2,3,4-три-О-бензил-1-О-(β-D-2',5'-ди-О-бензил-3'-О-триетиламонійфосфонатрибофуранозил)-D-рибітол (19) або його аналог 2,3,4-три-О-бензил-5-О-триетиламонійфосфонат-1-О-(β-D-2',5'-ди-О-бензилрибофуранозил)-D-рибітол (23) піддають подальшій реакції поліконденсації у присутності промотору в основному розчиннику, в якій бере участь спейсер, причому промотором є півалоїлхлорид або адамантан-1-карбонілхлорид, і згаданий спейсер як рецептор може припиняти ріст ланцюгів олігосахаридів, і одержаний продукт

поліконденсації додатково піддають окисненню фосфонату до фосфату з подальшим гідруванням з видаленням бензильних захисних груп, деблокування або активування спейсера та видалення фракцій, коротших за 4 або довших за 25 повторюваних ланок, шляхом одноразового або кількаторазового застосування розділення за розміром молекул.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що дисахаридна проміжна хімічна сполука 2,3,4-три-О-бензил-1-О-(β-D-2',5'-ди-О-бензил-3'-О-триетиламонійфосфонатрибофуранозил)-D-рибітол (19) або 2,3,4-три-О-бензил-5-О-триетиламонійфосфонат-1-О-(β-D-2',5'-ди-О-бензилрибофуранозил)-D-рибітол (23) та промотор знаходяться у молярному співвідношенні від 1/1 до 1/3.

3. Спосіб за пп. 1 та 2, який **відрізняється** тим, що промотором є активна похідна сполука стерично утрудненої кислоти.

4. Спосіб за пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що промотором, за варіантом, якому віддають перевагу, є півалоїлхлорид, адамантоїлхлорид або активна похідна сполука фосфорної кислоти.

5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що дисахаридна проміжна хімічна сполука 2,3,4-три-О-бензил-1-О-(β-D-2',5'-ди-О-бензил-3'-О-триетиламонійфосфонатрибофуранозил)-D-рибітол (19) або 2,3,4-три-О-бензил-5-О-триетиламонійфосфонат-1-О-(β-D-2',5'-ди-О-бензил-рибофуранозил)-D-рибітол (23) та спейсер знаходяться у молярному співвідношенні від 5/1 до 10/1.

6. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що дисахаридом є 2,3,4-три-О-бензил-1-О-(β-D-2',5'-ди-О-бензил-3'-О-триетиламонійфосфонатрибофуранозил)-D-рибітол (19), спейсером є 5-азидо-3-оксапентанол, промотором є півалоїлхлорид, розчинником є піридин.

7. Спосіб синтезу дисахаридної проміжної хімічної сполуки 2,3,4-три-О-бензил-5-О-аліл-(β-D-рибофуранозил)-D-рибітолу (4) у чистій формі шляхом рибозилування 2,3,4-три-О-бензил-5-О-

(13) C2

(11) 75579

(19) UA

аліл-D-рибітолу (14) перацетатом рибофуранози з подальшим деацетилюванням з одержанням 2,3,4-три-O-бензил-5-O-аліл-(β-D-рибофуранозил)-D-рибітолу (4), який піддають абсорбуванню-десорбуванню на силікагелі для очищення.

8. Спосіб синтезу дисахаридної проміжної хімічної сполуки 5-O-пропеніл-2,3,4-три-O-бензил-1-O-(2',5'-ди-O-бензил-β-D-рибофуранозил)-D-рибітолу (17), який включає в себе процес дибензилування дисахариду 2,3,4-три-O-бензил-5-O-аліл-(β-D-рибофуранозил)-D-рибітолу (4) оксидом дибутиллолова, йодидом тетрабутиламонію, гідридом натрію та хлоридом бензилу у співвідношенні 1:0,5-2:0,001-1:0,5-10:1-5, у розчиннику, наприклад, толуолі, бензолі, тетрагідрофурані або ксилолі, з одержанням сполуки формули 5 (5-O-аліл-2,3,4-три-O-бензил-1-O-(β-D-2',5'-ди-O-бензилрибофуранозил)-D-рибітолу), з подальшою ізомеризацією алілу до пропенілу.

9. Дисахарид 5-O-пропеніл-2,3,4-три-O-бензил-1-O-(2',5'-ди-O-бензил-β-D-рибофуранозил)-D-рибітол як проміжна хімічна сполука у синтезі похідних 2,3,4-три-O-бензил-1-O-(β-D-2',5'-ди-O-бензил-3'-O-триетиламонійфосфонатрибофуранозил)-D-рибітолу (19) та 2,3,4-три-O-бензил-5-O-триетиламонійфосфонат-1-O-(β-D-2',5'-ди-O-бензилрибофуранозил)-D-рибітолу (23).

10. Дисахаридні похідні 2,3,4-три-O-бензил-1-O-(2',5'-ди-O-бензил-β-D-рибофуранозил)-D-рибітол-5-O-триетиламонію фосфонат (23) та 2,3,4-три-O-бензил-1-O-(2',5'-ди-O-бензил-β-D-рибофуранозил)-D-рибітол-3'-O-триетиламонію фосфонат (19) як ключові проміжні хімічні сполуки у процесі олігомеризації за пп. 2-4.

11. Спосіб одержання дисахаридів 2,3,4-три-O-бензил-1-O-(β-D-2',5'-ди-O-бензил-3'-O-триетиламонійфосфонатрибофуранозил)-D-рибітолу (19) або 2,3,4-три-O-бензил-5-O-триетиламонійфосфонат-1-O-(β-D-2',5'-ди-O-бензилрибофуранозил)-D-рибітолу (23) з використанням як вихідної сполуки дисахариду 5-O-пропеніл-2,3,4-три-O-бензил-1-O-(2',5'-ди-O-бензил-β-D-рибофуранозил)-D-рибітолу, який включає в себе процес фосфонілювання трихлоридом фосфору-імідазолом із подальшим гідролізом пропенілової групи або ацетилювання, гідроліз пропенілової групи та фосфонілювання трихлоридом фосфору-імідазолом із подальшим деацетилюванням.

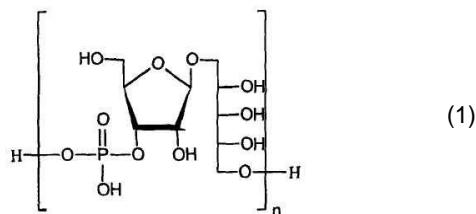
12. Застосування дисахаридів 2,3,4-три-O-бензил-1-O-(β-D-2',5'-ди-O-бензил-3'-O-триетиламонійфосфонатрибофуранозил)-D-рибітолу (19) або 2,3,4-три-O-бензил-5-O-триетиламонійфосфонат-1-O-(β-D-2',5'-ди-O-бензилрибофуранозил)-D-рибітолу (23) для синтезу олігосахаридних сумішей за п. 1.

Цей винахід має відношення до галузі медицини, зокрема, до хімічного синтезу сумішей олігосахаридів, які є похідними рибозо-рибітолфосфату та які використовуються як активна речовина у вакцинах для запобігання інфекцій, які спричинюються бактерією *Haemophilus influenzae* типу b (Hib), а також до вакцин, до складу яких входять згадані суміші олігосахаридів.

Бактерія *Haemophilus influenzae* типу b представляє собою серйозну проблему для здоров'я людей цілого світу. Ця бактерія викликає, головним чином у дітей віком до 5 років, менінгіт, пневмонію, епіглотит та інші захворювання дихальних шляхів. На наслідки, у межах від глухоти до тяжкого розумового відставання, у багатьох країнах страждають більш ніж 30% людей, які залишилися у живих після хвороби. Нещодавні визначення ВОЗ вказують на те, що кожного року від захворювань, які викликає бактерія *Haemophilus influenzae* типу b, у світі вмирає понад 550000 дітей.

Очищений капсульний полісахарид бактерії *Haemophilus influenzae* є здатним до індукування захисного імунітету у дорослих, однак імунна реакція у дітей є дуже слабкою і практично відсутня у маленьких дітей, яким не виповнилося 2 років.

Капсульний полісахарид має наведену далі структуру:



Було показано, що головною проблемою є сама природа антигену. Оскільки це полісахарид, то він є Т-незалежним антигеном, який є нездатним до стимулювання імунної системи немовлят, яка ще є незрілою. Було показано також, що цю проблему можна вирішити шляхом ковалентного зв'язування (кон'югування) полісахариду з білком, відомим як носій. Продукт, який одержують таким чином, відомий як кон'югатна вакцина, індукує захисний рівень антитіл із двомісячного віку.

Чу (Chu) та інші (Infection immunity, 1983, 40, 245-256) одержали кон'югат із нативного капсульного полісахариду та протиправцевої сироватки після активації за допомогою ціаногенброміду.

Гордон (Gordon) [патент США №4,496,538] активував природний полісахарид ціаногенбромідом, після чого кон'югував його із протидифтерійною сироваткою за допомогою гідразиду адипінової кислоти.

Гілман (Hilman) [патент США №4,459,286] кон'югував природний полісахарид за допомогою 6-амінокапронової кислоти до зовнішнього білка менінгококової мембрани після його попередньої активації.

В усіх попередніх процесах кон'югування кілька груп капсульного полісахариду та білок-носії об'єднуються ковалентним зв'язком.

Здатність до індукування захисного імунітету у немовлят залежить від структури кон'югату. У разі, коли кон'югування відбувається на нативному полісахариді, групи, які приймають участь у об'єднанні з білком, довільно розподіляються вздовж полісахаридного ланцюгу, що дуже ускладнює визначення характеристик кожної партії лікарського препарату.

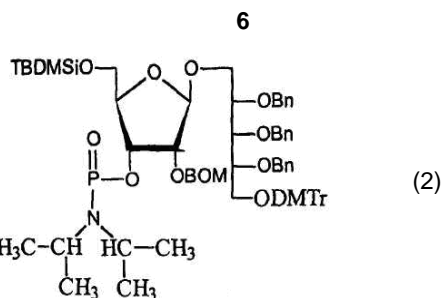
Усі ці вакцини дуже важко аналізувати за допомогою фізико-хімічних методів; унаслідок цього загальноприйнятою практикою є оцінка кожної партії лікарського препарату шляхом визначення імуногенності на експериментальних тваринах. Однак поведінка кон'югату в організмі дітей та експериментальних тварин відрізняється.

На думку ВОЗ [M.P. Холідей (M.R. Holliday), К. Джоунс (C. Jones), *Biologicals*, 1999, 27, 51-53], для забезпечення стабільної якості контроль кон'югатних вакцин повинен ґрунтуватися на фізико-хімічних методах, які демонструють відтворюваність від однієї партії лікарських препаратів до іншої.

З метою полегшення цього завдання вакцини на основі кон'югата повинні мати все більш точне визначення на молекулярному рівні. Одним з альтернативних рішень цієї проблеми є синтез фрагментів капсульних полісахаридів. Спосіб конструювання антигену *Haemophilus influenzae* типу b шляхом синтезу має два головні етапи, а саме: синтез дисахаридної проміжної хімічної сполуки та її олігомеризація. Для здійснення цього синтезу було розроблено кілька варіантів підходу.

Бьювері (Beuvery) та інші [Заявка на європатент EP 0276 516; патент США №5,034,519; *Tetrahedron Lett.*, 28, 1553, 1987] та Хугерхут (Hoogerhout) та інші [J. Carbohydr. Chem., 7, 1988, 399-416] одержали шляхом синтезу фрагмент капсульного полісахариду, до складу якого, за твердженням авторів, входило від 3 до 20 повторюваних одиниць. Для досягнення цієї мети спочатку одержували дисахаридну проміжну хімічну сполуку 2, потім, за допомогою твердофазного хімічного методу синтезу або синтезу у розчині, олігомер, який складався з 6 повторюваних одиниць (Елі (Eli) та інші, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 108, 1989, 219). Олігомери кон'югували з білками або пептидами через спейсер. Кон'югований тример мав таку ж саму імуногенність у мишей, що і комерційно доступна вакцина, яку було одержано з капсульного полісахариду.

За переважним варіантом втілення, який ілюструє обраний синтетичний шлях, вдавались до стратегії, яку наведено далі: 1 — синтез рибітолу, 2 — сполучення з рибозою, 3 — вибірне введення замісників до рибозної одиниці та 4 — введення активної функціональної групи фосфору. У разі використання цього шляху ключову дисахаридну похідну 2 одержували всього за 15 реакційних етапів.

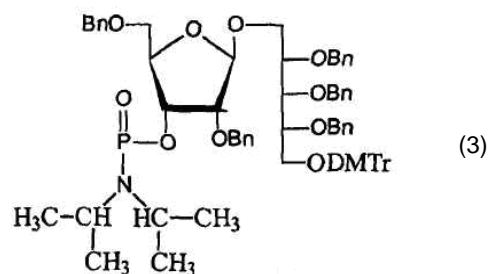


Загальний вихід становив 7% (Германе (Hermans) та інші, *Reel. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1987, 106, 498-504). Крім того, цей процес мав два головні недоліки: процес включає в себе 11 хроматографічних етапів і захисні групи ключової проміжної хімічної сполуки не є ідеальними для процесу олігомеризації.

На етапі олігомеризації, або другого етапу синтезу, спосіб, який було використано для здійснення синтезу у розчині шляхом активації ефіру кислоти тривалентного фосфору, забезпечував вихід у межах від 70% до 90% на цикл, виходячи з дисахариду. Головним недоліком такої процедури є неможливість одержання фрагментів, до складу яких входить більше ніж 4 повторюваних одиниць, оскільки різко зменшується вихід. Дисахаридна проміжна хімічна сполука 2 має три різні захисні групи, що надзвичайно ускладнює деблокування кінцевого продукту. Таким чином, цей дисахарид не є найпридатнішим для олігомеризації за допомогою твердофазного хімічного методу синтезу. Незважаючи на це, повідомлялось про його використання для одержання гексамеру.

У імунологічних випробуваннях (Пітере Ккам (Peters Ccam) та інші, *Infect. Immunity*, 1991, 59, 3504-10) повідомлялось лише про кон'югування тримеру із протиправцевою сироваткою та його імуногенність у мишей та мавп.

Г. Джаст (G. Just), Дж. Апслакіс (J. Upešlakis) (заявка на європатент EP 0 320 942, Л. Чан (L. Chan); Г. Джаст (G. Just), *Tetrahedron*, 46, 1990, 151-162) також синтезували фрагмент капсульного полісахариду шляхом використання дисахаридної проміжної хімічної сполуки та синтезу у розчині. Із метою одержання оптимальної проміжної хімічної сполуки для синтезування антигену, було обрано інший шлях: 1 — синтез рибітола, 2 — синтез рибозної одиниці з відповідними захисними групами, 3 — сполучення рибози та рибітолу та 4 — введення активної функціональної групи фосфору.



Ця процедура забезпечує одержання проміжної хімічної сполуки 3, фосфорамідату, яка, завдяки своїм захисним групам, має переважні властивості для процесу олігомеризації. Для досягнення

цієї мети необхідною є більша кількість етапів. Ключову похідну одержали через 19 етапів із застосування 8 хроматографічних процесів очищення.

Дисахарид 3 олігомеризували у розчині з одержанням фрагментів капсульного полісахариду, які складались з 3 повторюваних одиниць, із виходом у межах 70-90% на цикл, виходячи з дисахариду.

Канділ (Kandil) та інші (Syn. Lett., 1992, 555-7), Чон (Chon) та інші (заявка WO 93/15205 та патент США №5,679,352) за допомогою твердофазного хімічного методу синтезу синтезували фрагменти капсульного полісахариду з використанням тієї ж самої дисахаридної проміжної хімічної сполуки 3 та монометоксиполіетиленгліколю як основи. До складу синтезованих фрагментів входило до 6 повторюваних одиниць, вихід на цикл дорівнював 95%.

Криван (Krivan) та інші (заявка WO 94/00149) та Нілссон (Nilsson) та інші (J. Carbohydr. Chem., 10, 1991, 1-22) одержали фрагмент із 10 повторюваних одиниць із використанням подібної дисахаридної проміжної хімічної сполуки та твердофазного хімічного методу синтезу. Цей фрагмент кон'югували через спейсер із Hib-адгезином. Фосфонатну проміжну хімічну сполуку одержали через 21 етап із загальним виходом 5%. Необхідними були також як мінімум 7 хроматографічних етапів. Процес олігомеризації здійснювали з використанням Н-фосфонатів та твердофазного хімічного методу синтезу з застосуванням амінованої смоли компанії Merrifield. Одержали антиген із 97-99% включенням на цикл.

У роботі Чу Мачадо (Chiu Machado) та інших (J. Carbohydr. Chem., 13, 1994, 465-474) та патенті Куби № 22424 повідомлялось про ефективну процедуру синтезу відповідним чином захищеної рибозної похідної із глюкози. Із використанням цієї похідної ключовий дисахарид одержували за 20 реакційних етапів.

Одним з аспектів, який ускладнює застосування синтезу для одержання Hib фрагментів та їх використання у вакцинах, є синтез дисахаридної проміжної хімічної сполуки.

Усі вищенаведені способи відбивають сучасний стан хімії вуглеводів, однак вони мають два головні серйозні технічні недоліки. Використання декількох хроматографічних етапів впродовж синтезу, завдяки чому застосування синтезу у промисловому масштабі стає непрактичним, та кількість етапів синтезу, яка є, як правило, дуже великою. Головною проблемою синтезу дисахариду з меншою кількістю реакційних етапів є введення бензильних груп до рибозної одиниці.

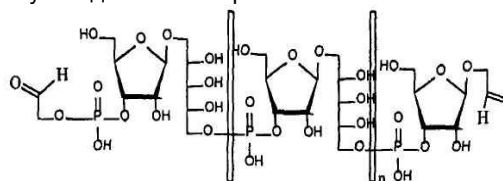
Процес олігомеризації дисахаридної проміжної хімічної сполуки може здійснюватись у розчині. У цьому випадку серйозний недолік полягає у тому, що максимальний розмір, який можна одержати, обмежується 3-4 повторюваними одиницями. Для здійснення цього процесу можна вдаватись також до твердофазного хімічного методу синтезу. Хімія твердофазного синтезу надає можливість одержання олігосахаридів у межах від 6 до 10 повторюваних одиниць із високими виходами на цикл. Однак постійно виникають дві серйозні проблеми, які полягають у тому, що реальний вихід становить

лише 10-15%, оскільки для забезпечення високого рівня включення дисахаридної проміжної хімічної сполуки на цикл необхідним є, як правило, великий надлишок дисахариду, у межах від 3 до 10 моль-еквівалентів. Надлишок дисахариду втрачається впродовж згаданого процесу. Інша проблема полягає у тому, що, як правило, виникає потреба у двох різних похідних, одна з яких є необхідною для сполучення із твердою основою, а друга для подовження ланцюга.

Загальним аспектом усіх попередніх повідомлень про синтез Hib антигенів, який, у той же самий час, становив одну з головних цілей, було одержання одного фрагменту чистого олігосахариду, який не відрізнявся не лише за своєю структурою, але також і за довжиною ланцюга. Все це було базоване на припущенні, що антиген, який складається з однієї молекули, є необхідною для одержання анти-Hib кон'югатних вакцин більш постійної якості внаслідок полегшеного контролю.

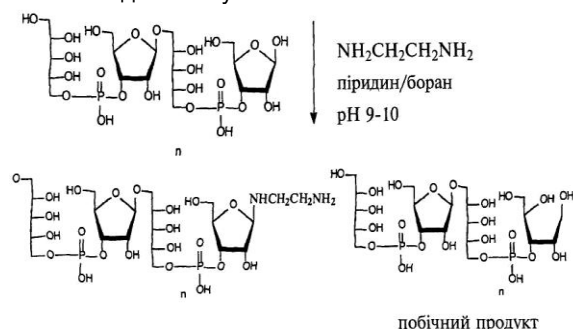
Були розроблені нові методи одержання олігосахаридних фрагментів шляхом фрагментування природних полісахаридів, а також активації суміші олігосахаридів однією з їхніх кінцевих груп.

У патентах США №4,808,700 та № 4,761,283, а також у роботі Р.К. Сейда (R.C. Seid) та інших, яку було вміщено у Glycoconjugate J., 1989, 6, 489-498, повідомлялось про те, що природний полісахарид оксидується періодатом і одержані фрагменти очищають. Суміш олігосахаридних фрагментів активується двома кінцевими групами, як показано на наведеній далі схемі. Ці олігосахариди були кон'юговані шляхом гідроамінування з білком CRM 197. Як показано на схемі, обидві ділянки кон'югування є різними. Після завершення кон'югування виникає як мінімум два сімейства кон'югованих олігосахаридів із різними структурами. З іншого боку, наслідком зв'язування одного і того ж олігосахариду із двома різними ділянками того ж самого білка або із двома різними молекулами білка є одержання не дуже добре визначеного відсотка продукту. Усі ці явища викликають гетерогенність та ускладнюють контроль.



З іншого боку, у патенті США № 5,153,312, а також у роботі П. Константіно (P. Constantino) та інших, яку було вміщено у Vaccine, 1999, 17, 1251-63, повідомляється про гідроліз природного полісахариду оцтовою кислотою та очищення одержаної суміші олігосахаридних фрагментів. Продукт активують за допомогою ряду реакцій, під час яких спейсер вводять шляхом гідроамінування етилендіаміном при високому рН та температурі, що може негативно вплинути на цілісність олігосахаридної суміші. З іншого боку, частина антигену, можливо, інактивується після відновлення карбонільної кінцевої групи, як показано на наведеній далі схемі. У подальшому олігосахаридна амінова похідна вибірно заміщується активним складним ефіром адипінової кислоти на одній зі своїх кінце-

вих складноєфірних функціональних груп. Інша складноєфірна функціональна група залишається активною для сполучення з білком.



Дві вакцини, які були одержані із продуктів фрагментування природного полісахариду, використовували для практичного вакцинування великої кількості дітей. Результати цього вакцинування продемонстрували можливість використання для виготовлення кон'югатної вакцини проти Hib олігосахариду не одного певного розміру, але цілого діапазону розмірів, з одночасним адекватним контролюванням відтворюваності та якості продукту. Навіть у разі, якщо кон'югати, одержані цим шляхом, є більш визначеними, аніж ті, які були одержані шляхом прямої активації полісахариду, практично неможливо здійснити фрагментування природного полісахариду з подальшим введенням функціональної активної групи та одержанням того ж самого рівня молекулярної визначеності та чистоти антигену, якого можна досягти шляхом хімічного синтезу.

Не існує явних переваг у контролюванні кон'югатних вакцин ані у разі використання олігосахариду певного розміру, ані у разі використання суміші олігосахаридів за розміром, однак, однорідних за рештою своєї структури. Це було продемонстровано за допомогою аналітичних методів, які відповідають сучасному технічному рівню і які дозволяють легко визначити склад суміші олігосахаридів Hib (П. Константіно (P. Constantino) та інші, Vaccine, 1999, 17, 1251-1263 та Д. Прієті (D. Prieti) та інші, European Carbohydrate Symposium, Galway, липень 1999 року, PB014).

З іншого боку, не існує різниць у імунологічних властивостях вакцини, яка складається з суміші олігосахаридів Hib за розміром, або з олігосахариду одного розміру у разі, коли фрагмент є більшим за 3 повторювані одиниці (С. Піллаї (S. Pillai) та інші, Infection and Immunity, 1991, 59, 4371-6; А.А. Кенділ (A.A. Kandil) та інші, Glycoconjugate J., 1997, 14, 13-7 та Петерс ККАМ. (Peters CCAM) та інші, Infect. Immunity, 1991, 59, 3504-10).

Додаткові обставини ускладнюють вибір одного оптимального розміру з усіх точок зору. Олігосахариди, які складаються з 4-6 повторюваних одиниць, синтезуються з більшою легкістю і їхній розмір, як правило, є достатнім для індукування адекватної імунної відповіді. Однак кількість білка-носія, яка є необхідною для цієї вакцини, є дуже великою, і стійкість олігосахариду у вакцин є гіршою, оскільки унаслідок процесу розкладу, який

відбувається шляхом гідролізу складного ефіру кислоти двовалентного фосфору, дуже швидко виникають дуже короткі фрагменти, сполучені з білком, які мають менше ніж 4 повторювані одиниці і стають, унаслідок цього, неактивними. Фрагменти з розміром у границях 8-20 повторюваних одиниць є, у принципі, більш стійкими, оскільки після розкладу до половини розміру залишковий фрагмент, сполучений з білком-носієм, буде більшим за 4 повторювані одиниці. Кількість білка-носія, необхідна для вакцинних доз, також є меншою.

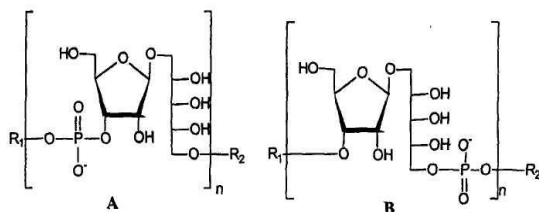
Однак, відповідно до сучасного технічного стану щодо олігосахаридів Hib, одержання фрагментів розміром 10-20 повторюваних одиниць шляхом синтезу у розчині є неможливим, і їх все ще дуже важко одержувати твердофазними хімічними методами синтезу. Фактично у жодному з попередніх повідомлень не наведено прикладу одержання олігосахаридів такого розміру. Іншим недоліком є Т-залежність імунної реакції, що є дуже важливим аспектом для одержання доброї імунної відповіді у дітей. Т-залежність полісахариду зменшується зі збільшенням його розміру (К. Фернандес (C. Fernandez), Е. Сверремарк (E. Sverre-mark), Cell Immunol., 1994, 153, 67-78).

Таким чином, будь-який шлях синтезу Hib антигенів, для того, щоб набутися конкурентоспроможності, повинен зменшити кількість етапів до одержання ключового дисахариду, зменшити кількість хроматографічних етапів, і, зокрема, значно підвищити вихід процесу олігомеризації.

До складу сумішей олігосахаридів, які одержують шляхом гідролізу природних полісахаридів, входять фракції обох розмірних діапазонів, наслідком чого є використання переваг кожного з них та зменшення їхніх недоліків. У разі, якщо подібні суміші вдасться одержати шляхом синтезу, їхньою перевагою буде вміщення обох розмірних діапазонів. Оскільки така суміш буде одержуватись шляхом синтезу, вона буде більш визначеною та чистою і буде вміщувати спейсер у точній пропорції та положенні.

Цей винахід, зокрема, має відношення до хімічного синтезу сумішей олігосахаридів, які було одержано з рибозо-рибітол-фосфату та які використовують як активну речовину у вакцинах для запобігання інфекцій, які викликаються Haemophilus influenzae типу b (Hib), а також до вакцин, до складу яких входять згадані олігосахаридні суміші.

До складу олігосахаридних сумішей, які одержують хімічним синтезом за цим винаходом, входять повторювані одиниці формул (фосфат-рибоза-рибітол)_n або (рибоза-рибітол-фосфат)_n, як мінімум 5 сполук структури А або В, які представляють повторювану одиницю капсульного полісахариду Haemophilus influenzae типу b та розрізняються лише за n, причому значення n знаходиться у межах від 4 до 25 (n ≥ 4 та ≤ 25), та де R₁ або R₂ — спейсер для кон'югування з носієм, за умови, що R₁ спейсер у разі, коли R₂ = H, або R₂ = спейсер у разі, коли R₁ = H.



Цей винахід має також відношення до імуногенів, до складу яких входять такі олігосахаридні суміші, до складу яких входять згадані імуногени, та до способів одержання таких олігосахаридів у формі сумішей. Крім того, цей винахід включає в себе використання вакцин, самостійно або у поєднанні з іншими вакцинами, для запобігання інфекцій, які викликаються *Haemophilus influenzae* типу b.

За допомогою цього винаходу можна одержати, шляхом хімічного синтезу, однорідну суміш олігосахаридів добре визначеного розміру та більш ефективним шляхом. Ця суміш має більш високу чистоту і її одержують за допомогою простішого технічного способу. Було встановлено також, що кон'югатні вакцини, одержані з суміші за цим винаходом, є переважнішими унаслідок їх виготовлення та простішими щодо контролю.

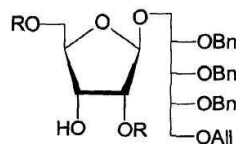
Іншою ціллю цього винаходу є спосіб синтезу для одержання вищезгаданої олігосахаридної суміші, який відрізняється тим, що є одноетапним способом, який включає в себе контрольовану реакцію поліконденсації між ключовою дисахаридною проміжною хімічною сполукою, спейсером та промотором, а також відрізняється тим, що середній розмір антигену може контролюватись пропорцією кожної складової, порядком додання складових та тривалістю реакції.

Іншою ціллю цього винаходу є використання вищезгаданих імуногенів для одержання вакцин проти хвороб, які викликаються *Haemophilus influenzae* типу b, з або без використання ад'ювантів та інших домішок.

Іншою з цілей цього винаходу є використання сумішей, опис яких було наведено перед тим, для одержання змішаних вакцин з іншими вакцинами, кон'югатними або ні, наприклад, із вакциною проти гепатиту B, асоційованою коклюшно-дифтерійно-правцевою вакциною, вакциною проти менінгококів A, B, C, вакциною проти пневмококів 1, 5, 6B, 6A, 14, 19F, 19A, 23F та протиполіомієлітної вакциною.

Іншою ціллю цього винаходу є оптимізація способу синтезування ключового дисахариду, необхідного для синтезування Hib олігосахаридів. Оптимізація полягає у відкритті нової вибіркової реакції бензилування, яка у разі використання з дисахаридом 4, забезпечує можливість його перетворення на дисахарид 5, з введенням бензильних захисних груп до рибозної одиниці на одному етапі, завдяки чому весь процес стає значно корот-

шим та простішим.



4 R = H

5 R = Bn

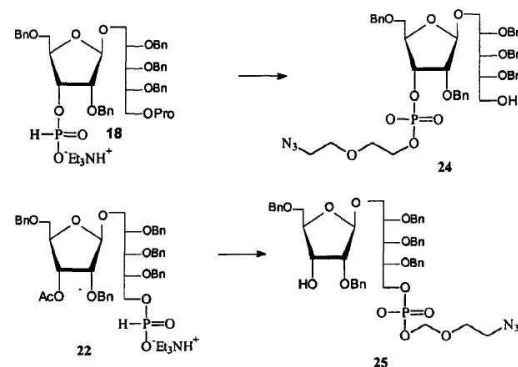
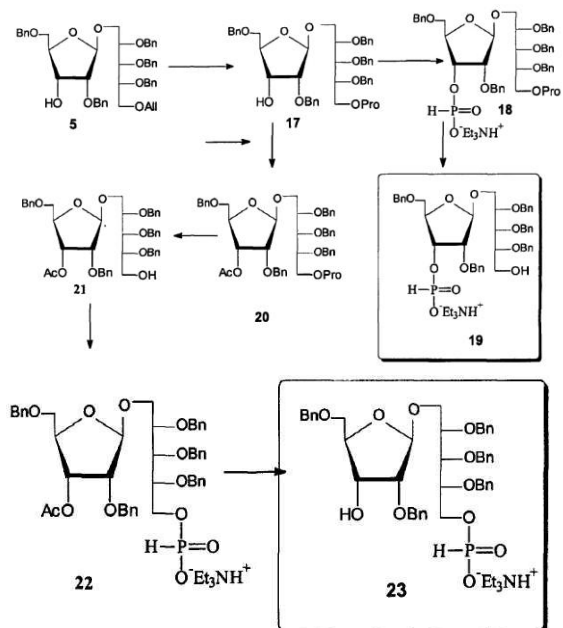
Ціллю цього винаходу є також оптимальна процедура синтезування проміжної сполуки 4, яка забезпечує її одержання з високим рівнем чистоти усього за 11 реакційних етапів та без застосування хроматографічних процесів.

Іншою ціллю цього винаходу є використання олігосахаридів, опис яких було наведено перед тим, для виявлення та кількісного визначення анти-Hib антитіл шляхом їх кон'югування з імунологічно інертними речовинами, наприклад, поліакриламідом, полістиролом, латексом.

Новизна цього винаходу полягає у складі одержаної олігосахаридної суміші, яка відповідає повторюваній одиниці капсульного полісахариду *Haemophilus influenzae* типу b зі спейсером для кон'югування лише одним зі своїх кінців у положенні, попередньо визначеним синтезом, і яка завжди відповідає однакової правильній та гомогенній структурі. До складу олігосахаридної суміші входять фрагменти двох різних розмірних діапазонів, головним чином, від 4 до 8 та від 8 до 20, завдяки чому використовуються переваги кожного діапазону та зменшуються недоліки, які б могла мати кожна група окремо.

На додаток до цього, новизна цього винаходу полягає у самому способі одержання такої суміші шляхом хімічного синтезу, який забезпечує одержання продукту з високою відтворюваністю та ефективністю. Крім того, за допомогою цього винаходу демонструється також, що усього одна реакція забезпечує одноетапне введення бензильних захисних груп до рибозної одиниці і, таким чином, підвищує ефективність одержання ключової дисахаридної похідної для синтезу таких олігосахаридів.

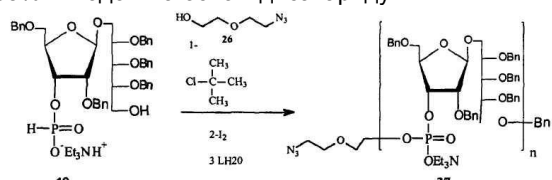
Синтез дисахаридної проміжної хімічної сполуки розпочинається з одержання похідної 5-O-аліл-2,3,4-три-O-бензил-Б-рибітолу 14 за допомогою 9 хімічних реакцій, які представлено на наведений далі схемі. D-рибоза перетворюється на ізопропіліденову похідну 6 за процедурою, опис якої було наведено раніше (Леонарт (Leonart) та інші, J. Het. Chem., 1966, 3, 485). Положення 5 алілується за допомогою алілброміду за умов фазового перенесення з подальшим гідролізом ізопропіліденової групи сірчаною кислотою у метанолі з одержанням похідної 8, яку піддають бензилуванню бензилхлоридом та гідридом натрію у диметилформаміді.



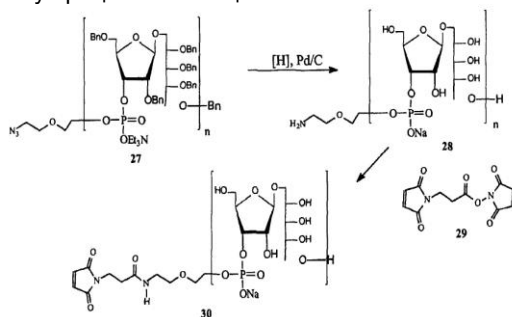
Роль спейсера у разі, коли 24, 25 або 26 — 5-азидо-3-оксапентанол, можуть відігравати будь-які інші сполуки з загальною формулою R_1-Y-OH , де Y — спейсерний ланцюг, яким може бути аліфатичний ланцюг. До складу аліфатичного ланцюга може входити ароматичний ланцюг, вставлений до нього, або ряд гетероатомів у кількості від 0 до 5. R_1 представляє собою функціональну групу у кінцевому положенні спейсера і може бути NH_2 .

COOR, CHO, SH або будь-яким з їхніх попередників.

Для декількох випадків було розроблено оптимальні умови реакції поліконденсації, наприклад, з дисахаридом 19, спейсером 5-азидо-3-окса-пентанолом 26 та півалоїлхлоридом у суміші дихлорметану-піридину одержують суміш, яка, після оксидування та хроматографування на Sephadex LH-20 з метанолом, забезпечує одержання фракції, до складу якої входять олігомери 27, з 70-85% виходом на основі дисахариду.

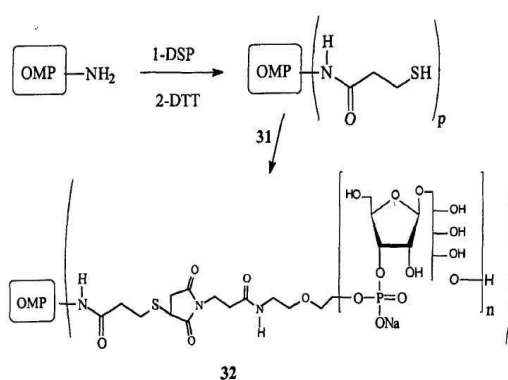


Суміш 27 олігосахаридів гідрогенізували у суміші метанолу-етилацетату-води-оцтової кислоти у присутності паладію на деревному вугіллі з одержанням суміші 28 неочищених олігосахаридів. У разі необхідності активації спейсерної групи, процес краще здійснювати на наступному етапі. Наприклад, до суміші 28 олігомерів додають N-гідроксисукцинімідоловий ефір β -малеїмідпропіонової кислоти у диметилформаміді. Після закінчення реакції одержаний розчин розбавляють дистильованою водою та піддають ультрафільтрації під тиском азоту через мембранний фільтр зі смоєю пропускання 1000. Одержаний таким чином продукт 30 представляє собою активну олігосахаридну суміш, придатну до використання у процесі кон'югації.



Структуру одержаних продуктів в усіх випадках було підтверджено ядерним магнітним резонансом 1H та ^{13}C , а також експериментами з кореляцією H-N та H-X.

Білки дериватизували тіопропіоновою кислотою шляхом введення тіолу, замаскованого під дисульфід. Для цієї дериватизації можна використовувати такі реактиви, як SPDP або DSP (динатрійфосфат), з подальшим реагуванням з дитіотреїтолом у атмосфері азоту. Надлишок реактивів може видалятися для зовнішнього білка мембрани *Neisseria meningitidis* або для протиправцевої сироватки шляхом осадження за допомогою водного розчину етанолу (20-95%) з подальшим центрифугуванням. Цей процес для зовнішнього білка мембрани *Neisseria meningitidis* ілюстровано на наведеній далі схемі.

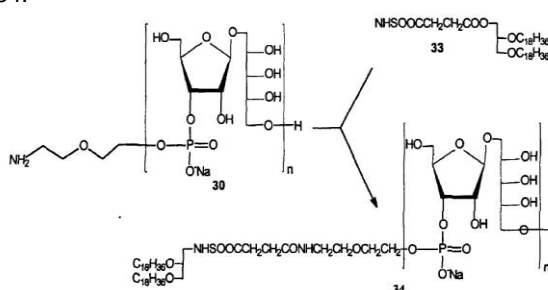


DSP — динатрійфосфат; DTT — дитіотреїтол; OMP — зовнішній білок мембрани.

Білок, який було піддано обробці тіолом, змішують у інертній атмосфері з активним олігосахаридом, який попередньо було профільтровано через фільтр з порами 0,2мкм та ліофілізовано. Реакційну суміш різко охолоджували холодним етанолом з осадженням продукту та подальшим центрифугуванням та ультрафільтруванням.

За альтернативним варіантом надлишок активаційних реактивів може видалятися з кон'югату шляхом ультрафільтрації. За допомогою обох процесів відокремлення майже весь некон'югований з білком олігосахарид видаляється, що значно підвищує та стабілізує якість кінцевого продукту.

Суміш 30 олігосахаридів може кон'югуватися з іншим носієм, наприклад, ліпідами. Так, наприклад, шляхом реакції з 2,3-діоктадецилоксипропілсукцинімідилбутандіоатом 33 у присутності карбодііміду одержують кон'югат 34.



Кон'югат суміші синтетичних олігосахаридів та білків може розбавлятися або відновлюватися у відповідному фізіологічному буферному розчині та може змішуватися з домішками, наприклад, ад'ювантами, консервантами тощо, з метою одержання кінцевої вакцинної лікарської форми.

Подібним же чином, вакцина може змішуватися перед або під час процесу виготовлення з іншими вакцинами, що належать до типу тих, які використовують на сучасному етапі у програмах вакцинації немовлят до 1-річного віку. Наприклад, шляхом змішування з зовнішнім білком мембрани (OMP) *Neisseria meningitidis* типу b, можна одержати комбіновану вакцину проти Hib та проти менінгіту типу B. Шляхом змішування з DTP можна одержати комбіновану тетравалентну вакцину проти Hib, коклюшу, дифтерії та правця.

Імуногенність кон'югатної вакцини між олігосахаридами 30 та зовнішніми білками мембрани *Neisseria meningitidis* демонстрували на декількох тваринних моделях. Присутність антитіл проти капсульного

полісахариду Hib, індукованих вакциною, виявляли за допомогою твердофазного імуоферментного методу (ELISA) (Д.К. Фіппс (D.C. Phipps) та інші, J. Immunol. Methods, 1990, 135, 121-8). Результати показано на Фіг.2-5.

Вакцина, до складу якої не входив оксид алюмінію, більш активну відповідь у кролів індукувала першими дозами. Однак після других доз різниця між препаратами зникала. У обох випадках спостерігався високий титр антитіл.

У разі пацюків лінії Sprague-Dawley вакцина, яку одержали із двох кон'югатів, які різнилися співвідношенням вуглеводів-білка, також показала високі титри анти-Hib антитіл.

У мишей лінії Balb c вакцина, яку одержали з такого ж кон'югату, індукувала високі титри антитіл проти капсульного полісахариду.

Суміш 30 олігосахаридів може сполучатись із матрицями, наприклад, поліакриламідом. Одержаний продукт може використовуватись для виявлення анти-Hib антитіл у вакцинованих людей та імунізованих лабораторних тварин. Суміш може сполучатись також з латексом та використовуватись для виявлення антитіл у хворих або вакцинованих людей. Поліакриламід, активований за методом Н. Бовіна (N. Bovin) (Glycosylconjugate J., 1998, 15, 431-446), реагує з сумішшю 30 олігосахаридів. Відносна здатність HbO-HSA (олігосахарид вірусу гепатиту В-людський сироватковий альбумін), рекомендованої речовини для виявлення анти-Hib антитіл, та поліакриламідного кон'югату 30, показана на Фіг.6. Краще відношення реакції до шуму одержали із продуктом, до складу якого входили синтетичні олігосахариди.

Робочі приклади:

Приклад 1: Синтез 5-О-аліл-2,3-ді-О-бензил-О-рибітолу 11

Алілування. 100г метил 2,3-О-ізопропіліден-Д-рибофуранозиду розчиняють у 70мл алілброміду і перемішують у присутності 75мл водного 50% розчину гідроксиду натрію та 2,6г тетрабутиламонію йодиду впродовж 12 год. Перемішування припиняють і одержані фази відокремлюють. Водну фазу екстрагують дихлорметаном (70 мл), змішані органічні фази сушать та випарюють.

Гідроліз. Одержаний сироп розчиняють у 1,5л метанолу. До одержаного розчину додають 3,6мл водного розчину сірчаної кислоти (0,4N) і суміш нагрівають у колбі зі зворотним холодильником при температурі перегонки впродовж 3год. Після закінчення реакції реакційну суміш нейтралізують бікарбонатом натрію, одержані солі відфільтровують, розчин випарюють. Залишок екстрагують етилацетатом, сушать та випарюють. Продукт сушать під вакуумом впродовж як мінімум 2год.

Бензилювання. Одержаний продукт розчиняють у 450мл диметилформаміду. Одержаний розчин охолоджують до температури 0°C і повільно додають 50г гідриду натрію. Суміш перемішують впродовж 30хв, після чого додають краплями бензилхлорид (150мл). Після 2год перемішування до реакційної суміші додають краплями 20мл метанолу. Одержану суспензію випарюють під вакуумом, знову розчиняють у дихлорметані та промивають водою. Органічну фазу сушать сульфатом натрію та випарюють.

Гідроліз. Одержаний з попередньої реакції сироп розчиняють у 1,5л діоксану. Додають HCl (2N, 1,5л) і систему нагрівають при температурі 75-80°C. Через 2год реакцію припиняють і фази відокремлюють. Водну фазу двічі екстрагують 200мл дихлорметану, змішані органічні фази випарюють. Концентрований продукт розчиняють у дихлорметані (1л) і послідовно промивають водою (400мл), насиченим розчином бікарбонату натрію (300мл) та водою (400мл) і сушать сульфатом натрію та випарюють.

Відновлення. Одержаний сироп розчиняють у етанолі (800 мл) і систему охолоджують до температури 20°C. Після цього додають 24г NaBH₄. Суміш перемішують впродовж 1,5год при кімнатній температурі; після завершення реакції надлишок борогідриду видаляють за допомогою оцтової кислоти до pH 7-8. Розчин фільтрують та випарюють. Залишок розчиняють у 500мл дихлорметану, органічний розчин промивають водою, сушать сульфатом натрію та використовують у нижченаведеному прикладі.

Приклад 2: Очищення 5-О-аліл-2,3-ді-О-бензил-О-рибітолу 11

До розчину неочищеного 5-О-аліл-2,3-ді-О-бензил-О-рибітолу 11 з попереднього прикладу у дихлорметані додають 300г силікагелю і суміш вручну перемішують до адсорбування продукту твердою фазою. Суспензію випарюють під вакуумом для видалення дихлорметану. Силікагель, який вміщує продукт, вносять до фільтру-перколятору. Домішки видаляють шляхом екстрагування циклогексаном впродовж 48 год. Екстракційний розчинник заміняють на дихлорметан для екстрагування продукту з одержанням хроматографічно чистого сиропу блідо-жовтого кольору. Вихід 75-95%. ЯМР¹³C δ 60,7 (C-1), 70,2 (C-4), 71,0, 71,7, 72,0, 73,6 (PhCH₂C-5, OCH₂CH=), 79,2, 79,3 (C-2,3), 117,1 (CH₂=), 127,5-128,2 (Ph), 134,3 (CH=), 138,9, 138,1 (Cipso).

Приклад 3: Синтез 5-О-аліл-2,3,4-три-О-бензил-Б-рибітолу 14

Тритилювання. 100г 5-О-аліл-2,3-ді-О-бензил-О-рибітолу 11 з попереднього прикладу сушать під вакуумом та розчиняють у 600мл піридину. До цього розчину додають 75г хлортрифенілметану та 0,5г диметиламінопіридину і суміш перемішують при температурі 50°C впродовж 6 год. Після завершення реакції розчинник випарюють, залишок розчиняють у 500мл дихлорметану, розчин промивають водою (1л), сушать та випарюють. Залишок сушать під вакуумом впродовж 3 год.

Бензилювання. Сироп із попередньої реакції розчиняють у 300мл диметилформаміду і одержаний розчин охолоджують до температури 5°C. Повільно додають гідрид натрію (25г), після чого суміш перемішують впродовж 30хв. Після цього повільно додають бензилхлорид (40мл) і перемішування продовжують на протязі 1год. Після завершення реакції реакційну суміш знову охолоджують і повільно додають 10мл метанолу для видалення надлишку реактивів. Розчинники випарюють, залишок розчиняють у 500мл дихлорметану, промивають 1л води. Органічну фазу сушать сульфатом натрію та випарюють.

Гідроліз. Залишок розчиняють у оцтовій кисло-

ті (1л) та 110мл води і реакційну суміш перемішують при температурі 80°C впродовж 1,5год. Розчинник видаляють випарюванням і залишок розчиняють у 500мл циклогексану. Органічну фазу охолоджують при температурі 0-5°C впродовж 4год, після чого фільтрують, промивають водою, сушать сульфатом натрію та випарюють. Чистий продукт одержують шляхом дистилування при температурі 200-220°C і під тиском 0,1мм. Вихід 80-90г, виходячи зі 100г рибози. ЯМР¹³C δ 61,2 (C-1), 69,6, 71,8, 72,1, 72,3, 73,9 (PhCH₂C-5, OCH₂CH=), 78,0, 78,8, 78,9 (C-2,3,4), 116,8 (CH₂), 127,5-128,2 (Ph), 134,7 (CH=), 138,0, 138,1, 138,2 (Cipso).

Приклад 4: Синтез 5-О-аліл-2,3,4-три-О-бензил-1-О-(р-Б-рибофуранозил)-0-рибітолу 4

Глікозилювання. Продукт із попереднього прикладу (370г) розчиняють у 2,7л сухого дихлоретану та переносять до реакційної судини. Розчин охолоджують до температури 0-25°C, додають порошкоподібні молекулярні сита 4 А (207г) і через 15хв повільно додають ефірат трифториду бору (407мл) зі швидкістю 15мл/хв. Нарешті, повільно (впродовж 20хв) додають розчин перацетату D-рибофуранози 15 (370г) у сухому дихлоретані (1л). Реакційну суміш перемішують впродовж 3год і проходження реакції контролюють засобами тонкошарового хроматографування (гексани/етилацетат, 2/1). Пластинки проявляють 5% розчином H₂SO₄(C) у етанолі. Після закінчення реакції реакційну суміш нейтралізують триетиламіном (222мл) до pH7, потім додають насичений розчин бікарбонату натрію (800мл) і перемішування продовжують на протязі 30хв. Необхідно утримувати на нейтральному рівні pH реакційної суміші. Вміст реакційної судини фільтрують під вакуумом. Тверду речовину двічі промивають дихлоретаном (200мл) із метою екстрагування будь-якого залишкового продукту у твердій речовині. Тверду фазу видаляють, органічну фазу двічі екстрагують водою (600мл), сушать сульфатом натрію та випарюють під вакуумом.

Деацетилювання. До одержаного у попередній реакції сиропу, який було розчинено у метанолі (2л), додають розчин метоксиду натрію (1%) у метанолі до pH9. Реакція триває впродовж майже 2год. Після завершення реакційну суміш нейтралізують смолою кислотного ствердження, доки pH не досягне рівня 6-7. Смолу відфільтровують під вакуумом. До складу сиропу (427г) входить необхідний продукт разом із 5-О-аліл-2,3,4-три-О-бензил-О-рибітолом, D-рибозою та іншими незначеними домішками.

Приклад 5: Очищення 5-О-аліл-2,3,4-три-О-бензил-1-О-(р-О-рибофуранозил)-0-рибітолу 4

Сироп із попереднього прикладу розчиняють у дихлорметані (1л). До розчину додають силікагель (1кг) і суміш вручну перемішують до адсорбування продукту твердою фазою. Суспензію випарюють під вакуумом для видалення дихлорметану. Одержану тверду речовину сушать під вакуумом впродовж 2год для видалення будь-яких слідів кількостей дихлорметану. Силікагель, який включає в себе продукт, вносять до фільтру-перколятору. Домішки видаляють шляхом екстрагування циклогексаном впродовж 48 год. Екстракційний розчин-

ник заміняють на хлороформ для екстрагування продукту з одержанням сиропу блідо-жовтого кольору. Вихід 238г. ЯМР ¹H δ 5,85 (m, 1H, CH=), 5,20 (m, 2H, CH₂), 4,85 (s, 1H, H-1'), ¹³C δ 62,8 (C-5'), 77,7, 77,9, 78,2 (C 2,3,4), 84,0 (C-4'), 107,2 (C-1').

Приклад 6: Синтез 5-О-аліл-2,3,4-три-О-бензил-1-О-(р-О-2',5'-ді-О-бензил-рибофуранозил)-0-рибітолу 5

Бензилювання. Сполуки (200г), які було одержано у попередньому прикладі, розчиняють у толуолі (2л). До цього розчину додають Bu₂SnO (80г) і суміш нагрівають у колбі зі зворотним холодильником при температурі перегонки впродовж 4 год. Невеликими порціями при кімнатній температурі додають 50% NaH (56г), і суміш перемішують при температурі 80°C впродовж 30хв. Додають тетрабутиламонію йодид (62г) і суміш знову перемішують впродовж 1 год. Після цього додають бензилхлорид (148мл) і реакцію продовжують із перемішуванням при температурі 80°C впродовж декількох годин. Додання бензилхлориду повторюють з 30-хвилинними інтервалами доти, доки тонкошарова хроматографія (гексани/етилацетат, 2/1) не продемонструє, що головним продуктом у реакційній суміші є дибензилований дисахарид. Реакційну суміш охолоджують та нейтралізують 1% розчином HCl у метанолі. Після цього реакційну суміш фільтрують через целіт та випарюють під зниженим тиском. Одержаний продукт, до складу якого входять деякі солі, розчиняють у етилацетаті, фільтрують під зниженим тиском та концентрують. Неочищений сироп очищають шляхом хроматографування на колонках у системі розчинників толуол-ацетон, 60/1. Чистий продукт 5 одержують у формі сиропу (100г). ЯМР ¹H δ 5,96 (m, 1H, -CH=), 5,18 (m, 2H, CH₂=), 5,02 (s, 1H, H-1).

Приклад 7: Синтез 2,3,4-три-О-бензил-1-О-(β-D-2',5'-ді-О-бензил-3'-О-триетиламонійфосфонат-рибофуранозил)-0-рибітолу (19)

Ізомеризація алільної групи. 20г сиропу, який було одержано у попередньому прикладі, сушать під високим вакуумом впродовж 2год. Сироп розчиняють у сухому диметилсульфоксиді (100мл) і додають і-бутоксид калію (6,4г). Реакційну суміш перемішують при температурі 100°C впродовж 1 год, після чого додають до 250мл суміші льоду з водою. Додають крапля за краплею концентровану хлористоводневу кислоту до досягнення pH7. Суміш тричі екстрагують 80мл діетилового ефіру. Органічні фази змішують, сушать сульфатом натрію та випарюють.

Фосфонілювання. Розчин імідазолу (1,5г) у сухому ацетонітрилі (34мл) охолоджують до температури 0°C. Додають трихлорид фосфору (0,56мл) та триетиламін (3,1мл). Одержаний розчин перемішують впродовж 15 хв. До цієї суміші додають дисахарид із попередньої реакції, який було розчинено у сухому ацетонітрилі (3мл). Одержану суміш перемішують впродовж 15 хв при кімнатній температурі, реакцію припиняють шляхом додання 1М розчину триетиламонійброміду. Перемішування продовжують протягом 10 хв, додають дихлорметан і фази відокремлюють. Органічну фазу промивають холодним розчином триетиламонію бікарбонату, сушать та випарюють.

Гідроліз пропенілової групи. Продукт розчиня-

ють у оцтовій кислоті (60%) і перемішують при температурі 70°C впродовж 30 хв. Розчинник видаляють випарюванням і продукт розчиняють у дихлорметані, промивають триетиламонію бікарбонатом, сушать та випарюють. Шляхом хроматографування одержаного продукту на колонках одержують чисту сполуку з виходом у межах 70-85%. ЯМР ^1H δ 6,85 (d, H-P), 4,95 (s, H-1), 4,60 (m, H-3), 2,93 (q, NCH_2CH_3) 1,20 (t, NCH_2CH_3). ^{13}C δ 105,9 (C-1).

Приклад 8: Реакція поліконденсації між 19 та 26 (співвідношення 10-1)

До розчину сполуки 19 (1г) у піридині-триетиламіні (10-1, 1мл) додають триметилацетилхлорид (0,14мл) і реакційну суміш перемішують впродовж 20 хв. Додають спейсер 26 (29,2мг) та нову кількість триметилацетилхлориду (0,9мл) і реакційну суміш перемішують впродовж 1 год. Додають розчин I_2 (1,1г) у піридині-воді (7,3мл; 20-1) і реакційну суміш перемішують впродовж 30 хв. Суміш розбавляють дихлорметаном, промивають розчином тіосульфату натрію (ІМ) та холодним розчином триетиламонію броміду (0,5М), після чого сушать сульфатом натрію та випарюють. Одержаний продукт розчиняють у метанолі та хроматографують на колонці Sephadex LH-20 з тим же самим розчинником. Фракції, які вміщують олігомери, змішують та випарюють. Вихід 80%.

Приклад 9: Реакція поліконденсації між 19 та 26 (співвідношення 10-1)

До розчину сполуки 19 (1г) та спейсера 26 (14,6мг) у піридині-триетиламіні (10-1, 1мл) додають триметилацетилхлорид (0,23мл) і реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. Додають розчин I_2 (1,1г) у піридині-воді (7,3мл; 20-1) і продукт обробляють таким же самим чином, що і у прикладі 8.

Приклад 10: Реакція поліконденсації між 19 та 26 (співвідношення 5-1)

До розчину сполуки 19 (1г) та спейсера 24 (29,2мг) у піридині-триетиламіні (10-1, 1мл) додають триметилацетилхлорид (0,23мл) і реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. Додають розчин I_2 (1,1г) у піридині-воді (7,3мл; 20-1) і продукт обробляють таким же самим чином, що і у прикладі 8.

Приклад 11: Реакція поліконденсації між 23 та 26 (співвідношення 5-1, розчинник піридин)

До розчину сполуки 23 (1г) та спейсера 26 (29,2мг) у піридині (1мл) додають триметилацетилхлорид (0,23мл) і реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. Додають розчин I_2 (1,1г) у піридині-воді (7,3мл; 20-1) і продукт обробляють таким же самим чином, що і у прикладі 8.

Приклад 12: Реакція поліконденсації між 19 та 24 (співвідношення 5-1, розчинник піридин)

До розчину сполуки 19 (1г) та спейсера 24 (29,2мг) у піридині (1мл) додають триметилацетилхлорид (0,23мл) і реакційну суміш перемішують впродовж 2 год. Додають розчин I_2 (1,1г) у піридині-воді (7,3мл; 20-1) і продукт обробляють таким же самим чином, що і у прикладі 8.

Приклад 13: Реакція гідрогенізації продуктів Прикладів 8-12

Неочищений продукт попередніх прикладів 8-12 гідрогенізували у суміші етилацетату-етанолу-

води-оцтової кислоти (1-2-2-0,1) з паладієм на деревному вугіллі (10%). Після закінчення продукт очищали шляхом іонообмінного хроматографування на Sephadex C-25 Na. Визначення характеристик ліофілізованого продукту за допомогою ЯМР показало присутність основної повторюваної одиниці Rib-Rib-фосфат та спейсера. Активні фракції одержали після ультрафільтрації продукту спочатку на мембранному фільтрі зі смугою пропускання 1000, потім фільтрату на мембранному фільтрі зі смугою пропускання 10000. Розчин, профільований через мембранний фільтр зі смугою пропускання 10000, збирали і ліофілізували з одержанням кінцевого продукту 28 з загальним виходом, який залежав від реакційних умов і дорівнював 20-80%, виходячи з дисахариду. ЯМР ^1H δ 5,12 (H-1), 4,60 (H-3), 3,29 (CH_2NH_2). ^{31}P δ 2,14 (спейсер-P-Rib) 0,74 (рибітол-P-Rib).

Приклад 14. Синтез похідної 5-(3-малеїмідопропіонамідо)-3-оксапентилполігорибозилрибітолфосфату 30

До розчину попереднього прикладу (3,34мг, 1,73мкмоль) у бідистиляті (0,1мл) додають 0,7мг (2,62мкмоль) розчину N-гідроксисукцинімідил β -малеїмідопропіонату 27 у N,N-диметилформаміді (0,4мл). Після 4-годинної реакції розчин випарюють під вакуумом, ресуспендують у дистильованій воді (0,5мл) та центрифугують (10 хв, 3500об/хв (366,3 рад·с $^{-1}$)). Супернатант розбавляють водою та ультрафільтрують на обладнанні компанії Amicon з мембранним фільтром зі смугою пропускання 1000. Фільтрат ліофілізують. Вихід становить від 85 до 95%. ЯМР ^1H δ 6,95 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 5,01 (s, H-1), 3,41 (t, 2H, CH_2NH), 2,56 (t, 2H, $\text{CH}_2\alpha$).

Приклад 15: Аналіз продуктів, які було одержано у прикладі 13, за допомогою іонообмінного хроматографування

Продукти прикладів 8-12 гідрогенізували та у вигляді натрієвих солей аналізували за допомогою іонообмінного хроматографування на колонці HR5/5 моно Q з лінійним градієнтом хлориду натрію (П. Константіно (P. Constantino) та інші, Vascine, 1999, 17, 1251-1263). Профіль хроматографічного елювання прикладу 8 представлено на Фіг.1В; показано фрагменти різних розмірів. У разі їх порівняння з результатами, які наведено у літературі, та на Фіг.1А, яка представляє хроматограму пентамеру, можна дійти висновку, що у суміші знаходяться фрагменти розміром від 4-5 до більш ніж 20 повторюваних одиниць.

Приклад 16: Кон'югація з зовнішнім білком мембрани *Neisseria meningitidis*

Комплекс зовнішніх білків мембрани *Neisseria meningitidis* (OMPC) (400мг) розчиняли у 80мл забуференого фосфатом фізіологічного розчину (pH 8), який попередньо продували $\text{N}_2(\text{g})$. Розчин продували $\text{N}_2(\text{g})$ впродовж 5 хв з перемішуванням на льодо-водяній бані. Додавали 1,6мл розчину дина-трифосфату у диметилформаміді і суміш обережно перемішували при температурі 4°C впродовж 2 год. Додавали 1,6мл розчину дитіотреїтолу у забуференому фосфатом фізіологічному розчині і перемішували при температурі 4°C продовжували протягом 1 год. Одержану суспензію переносили до центрифугальної склянки, яка вміщувала 20-400мл холодного етанолу. Склянку центрифугува-

ли при 1800об/хв ($188,4 \text{ рад} \cdot \text{с}^{-1}$) при температурі 4°C впродовж 30хв і супернатант видаляли. До твердої речовини додавали нову порцію етанолу і процес центрифугування знову повторювали після додання 200-400мл етанолу. Осад ресуспендували у 80мл забуференого фосфатом фізіологічного розчину (рН7-9). До одержаного розчину додавали синтетичний олігосахарид 30 і перемішування продовжували протягом 1-48 год. Після завершення процесу операції осадження етанолом та центрифугування повторювали з ультрафільтрацією на мембранному фільтрі зі смоєю пропускання 30000. Фільтрат відновлювали у забуференому фосфатом фізіологічному розчині до концентрації Hib 40-80мкг/мл. ПРИКЛАД 17: Кон'югація з проти-правцевою сироваткою

Розчин протиправцевої сироватки з концентрацією 5мг/мл у забуференому фосфатом фізіологічному розчині (рН8) барботували $\text{N}_2(\text{g})$ впродовж 5 хв. Не припиняючи перемішування на льодоводяній бані, додавали 1,6мл розчину динатрійфосфату у диметилформаміді і суміш обережно перемішували при температурі 4°C впродовж 2 год. Додавали 1,6мл розчину дитіотреїтолу у забуференому фосфатом фізіологічному розчині і перемішування при температурі 4°C продовжували протягом 1 год. Одержаний розчин переносили до ультрафільтраційного обладнання з мембранним фільтром зі смоєю пропускання 10000. Розчин декілька разів піддавали ультрафільтрації шляхом додання свіжого буферу, який перед тим барботували $\text{N}_2(\text{g})$, доки розчин, який проходив через мембранний фільтр, не давав негативних результатів на пробу Елмана. До одержаного розчину додавали синтетичний олігосахарид 30 і перемішування продовжували протягом 1-48 год. Після завершення процесу розчин знову піддавали ультрафільтрації, доки розчин, який проходив через мембранний фільтр, не давав негативних результатів на феноло-сірчану пробу на цукри. Розчин відновлювали у забуференому фосфатом фізіологічному розчині до концентрації Hib 40-80мкг/мл.

Приклад 18: Кон'югація з напісукцинатом діоктадецилгліцерину

Продукт прикладу 8 (10мг) розчиняли у 1мл диметилформаміду та додавали до розчину напісукцинату діоктадецилгліцерину у вигляді N-гідроксисукцинімідного складного ефіру 31. До розчину додавали етилдіамінопропілкарбодіїмід (5мг) і реакційну суміш перемішували впродовж 6 год. Додавали нову порцію карбодіїміді і перемішування продовжували на протязі 6 год. Розчинник випарювали і суміш переносили на силікагелеву колонку C18 (1г). Олігосахарид видаляли шляхом елюювання водою. Продукт елюювали градієнтною концентрацією суміші метанолу-води. Вихід 85%. ЯМР ^1H δ 5,12 (H-1), 4,60 (H-3), 3,40 (CH_2NH), 1,30 (CH_2), 0,90 (CH_3).

Приклад 19: Одержання вакцини без ад'юванту

Імуноген прикладу 16, розчинений у фосфатному буфері з концентрацією 40мкг/мл, розбавляли за асептичних умов при температурі $4-8^{\circ}\text{C}$ розчином бідиштиляту. Суспензію перемішували впродовж 10 хв. Кінцеву концентрацію Hib антигену визначали шляхом визначення вмісту рибози та

загальних білків; вона може регулюватись шляхом додання більшої кількості буферного розчину до одержання кінцевої концентрації Hib антигену 20мг/мл. Додавали тіомерсал до кінцевої концентрації 0,1-0,001%. Одержана суспензія представляє собою кінцевий об'єм анти-Hib кон'югатної вакцини без ад'юванту.

Приклад 20: Одержання анти-Hib вакцини з оксидом алюмінію як ад'ювантом

Імуноген прикладу 16, розчинений у фосфатному буфері з концентрацією 40мкг/мл, змішували за асептичних умов при температурі $4-6^{\circ}\text{C}$ із рівним об'ємом оксиду алюмінію (1-0,01мг/мл) у дистильованій воді. Перемішування продовжували протягом 20 хв при температурі $4-8^{\circ}\text{C}$. Кінцеву концентрацію Hib антигену визначали шляхом визначення вмісту рибози та загальних білків; вона може регулюватись шляхом додання більшої кількості буферного розчину до одержання кінцевої концентрації Hib антигену 20мг/мл. Додавали тіомерсал до кінцевої концентрації 0,1-0,001%. Одержана суспензія представляє собою кінцевий об'єм анти-Hib кон'югатної вакцини у оксиді алюмінію.

Приклад 21: Одержання комбінованої вакцини проти Hib та менінгококу B

Імуноген прикладу 16, розчинений у фосфатному буфері з концентрацією 80 мкг/мл, змішували за асептичних умов при температурі $4-6^{\circ}\text{C}$ з основним об'ємом комплексу зовнішніх білків мембрани (ОМРС) *Neisseria meningitidis* типу B, який зараз використовується у вакцині VAMEMGOC BC, із концентрацією у забуференому фосфатом фізіологічному розчині 100-200 мкг/мл. Через 20 хв гомогенізації шляхом обережного перемішування за допомогою магнітної мішалки реакційну суміш у повному об'ємі змішували з рівним об'ємом оксиду алюмінію (1-0,01 мг/мл) у дистильованій воді. Перемішування продовжували на протязі 20 хв при температурі $4-6^{\circ}\text{C}$. Кінцеву концентрацію Hib антигену визначали шляхом визначення вмісту рибози та загальних білків за Лоурі; вона може регулюватись шляхом додання більшої кількості буферного розчину до одержання кінцевої концентрації Hib антигену 20 мкг/мл. Додавали тіомерсал до кінцевої концентрації 0,1-0,001%. Одержана суспензія представляє собою кінцевий об'єм комбінованої вакцини проти Hib та менінгококу B у оксиді алюмінію.

Приклад 22: Одержання комбінованої вакцини проти Hib, коклюшу, дифтерії та правця

Імуноген прикладу 16, розчинений у фосфатному буфері з концентрацією 80 мкг/мл, змішували за асептичних умов при температурі $4-6^{\circ}\text{C}$ з основним об'ємом DTP у концентрації, яка у 4 рази перевищує звичайну концентрацію для кінцевої лікарської форми. Через 20 хв гомогенізації шляхом обережного перемішування за допомогою магнітної мішалки реакційну суміш у повному об'ємі змішували з рівним об'ємом оксиду алюмінію (1-0,01мг/мл) у бідиштиляті. Перемішування продовжували на протязі 20 хв при температурі $4-6^{\circ}\text{C}$. Кінцеву концентрацію Hib антигену визначали шляхом визначення вмісту рибози та загальних білків за Лоурі; вона може регулюватись шляхом додання більшої кількості буферного розчину до

одержання кінцевої концентрації Hib антигену 20мг/мл. Додавали тіомерсал до кінцевої концентрації 0,1-0,001%. Одержана суспензія представляє собою кінцевий об'єм комбінованої вакцини проти Hib, коклюшу, дифтерії та правця у оксиді алюмінію.

Приклад 23: імунологічний аналіз вакцин, які було одержано з суміші синтетичних олігосахаридів та зовнішнього білка мембрани

Вакцину прикладів 19 та 20 вводили у дозі 1 мкг або 2 мкг антигенів. У цих експериментах були використані кролі, пацюки та миші. 2 імунізації були здійснені з 4 тижневим інтервалом зі знекровлюванням на 0 день, 28 день та 42 день. Кров збирали та центрифугували при 3500 об/хв (366,3 рад·с⁻¹) впродовж 20 хв. Сироватку розбавляли у 10 разів та зберігали при температурі -40°C.

Гуморальну імунну відповідь визначали за допомогою непрямого твердофазного імуноферментного методу з використанням Hib-HSA як сенситивізаційного антигену. Результати показано на Фіг.2-5.

ПРИКЛАД 24: Кон'югат суміші синтетичних олігосахаридів та /7-нітрофенілакрилату

Суміш олігосахаридів з прикладу 13 (10 мг) розчиняли у диметилформаміді і додавали до розчину нітрофенілакрилату (10-30 мг) у диметилформаміді (1 мл). Додавали 0,1-0,5 мл триетиламіну і реакційну суміш перемішували впродовж 16 год. Додавали аміак (0,1-0,5 мл) і перемішування продовжували на протязі 24 год. Розчин переносили на колонку Sephadex LH-20 у ацетонітрилі. Елюювання здійснювали за допомогою суміші ацетоніт-

рилу-води. Фракції, позитивні за орсиноюю пробою на рибозу, змішували та ліофілізували. Вихід, як правило, перевищував 80%.

Приклад 25: Здатність кон'югату синтетичних олігосахаридів до виявлення анти-Hib антитіл

Розчин продукту з попереднього прикладу у карбонатно-бікарбонатному буфері наносили з концентрацією 1-100 мкг/мл на одну половину 96-ямкового планшету. На іншу половину планшету наносили антиген HbO-HSA у рекомендованій концентрації. Аналіз за допомогою ELISA здійснили з використанням сироваток мишей, імунізованих вакциною, до складу якої входить природний капсульний полісахарид, сполучений з протиправцевою сироваткою. Одержані результати представлені на Фіг.6.

Короткий опис фігур:

Фіг.1. Типова хроматограма олігомерних фракцій, що були одержані у Прикладі 15, яку одержали шляхом іонообмінного хроматографування на Mono Q HR 5/5 із лінійним градієнтом NaCl 0-500 мМ, де А - пентамер; В - олігомер Прикладу 10.

Фіг.2. Гуморальна імунна відповідь кролів, імунізованих вакциною Прикладу 16.

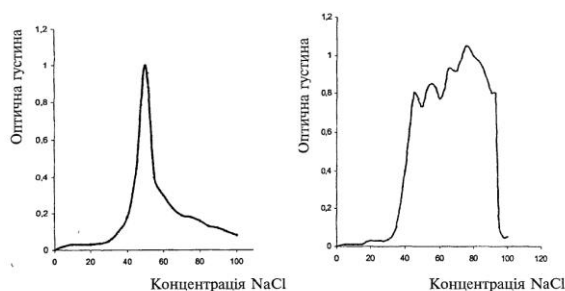
Фіг.3. Гуморальна імунна відповідь кролів, імунізованих вакциною Прикладу 15.

Фіг.4. Гуморальна імунна відповідь пацюків, імунізованих вакциною Прикладу 15.

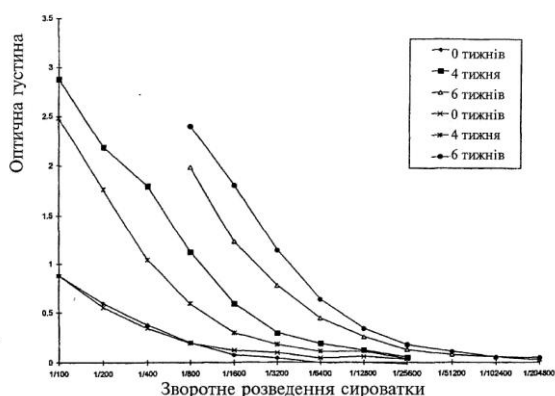
Фіг.5. Гуморальна імунна відповідь мишей лінії Balb C, імунізованих вакциною Прикладу 15.

Фіг.6. Здатність кон'югату 26-РАА до виявлення анти-Hib антитіл.

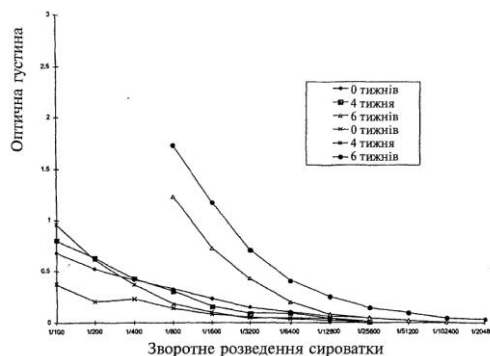
ФІГ. 1



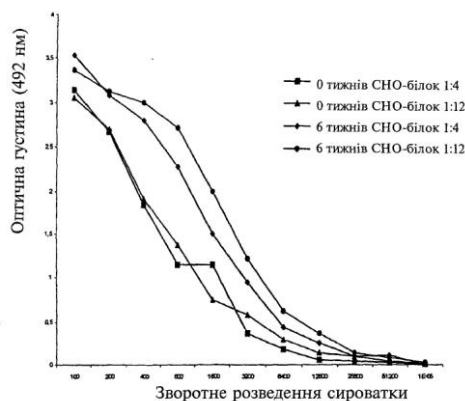
ФІГ. 3



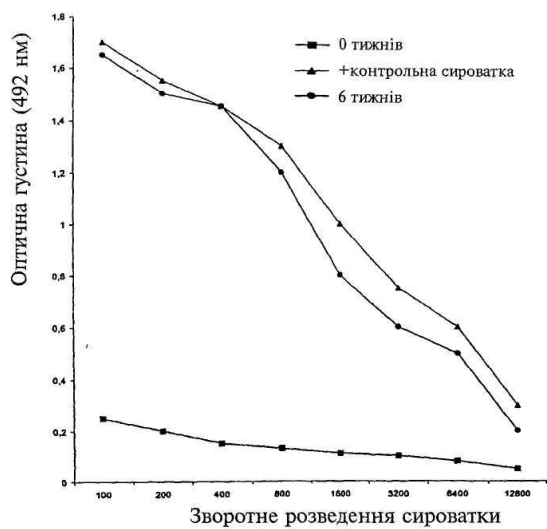
ФІГ. 2



ФІГ. 4



ФІГ. 5



ФІГ. 6

