



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107224577 B

(45)授权公告日 2020.08.04

(21)申请号 201710323724.3

A61P 11/00(2006.01)

(22)申请日 2017.05.10

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 104004085 A,2014.08.27

申请公布号 CN 107224577 A

CN 106390113 A,2017.02.15

(43)申请公布日 2017.10.03

WO 2004067033 A1,2004.08.12

(73)专利权人 山东大学

CN 105636611 A,2016.06.01

地址 250199 山东省济南市历城区山大南路27号

TROUW,B.B. 等.Synthetic Polysaccharide Type 3-Related Di-, Tri-, and Tetrasaccharide-CRM197 Conjugates Induce Protection against Streptococcus pneumoniae Type 3 in Mice.《INFECTION AND IMMUNITY》.2001,第69卷(第7期),第4698-4701页.

(72)发明人 顾国锋 熊成鹤 郭忠武 冯少杰 乔银

Pozsgay,V..Recent Developments in Synthetic Oligosaccharide-Based Bacterial Vaccines.《Current Topics in Medicinal Chemistry》.2008,第8卷第126-140页.

(74)专利代理机构 济南金迪知识产权代理有限公司 37219

代理人 朱家富

审查员 靳春鹏

(51)Int.Cl.

A61K 39/09(2006.01)

A61K 39/385(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书13页 附图5页

(54)发明名称

一种基于3型肺炎链球菌荚膜多糖的寡糖缀合物及其制备方法与应用

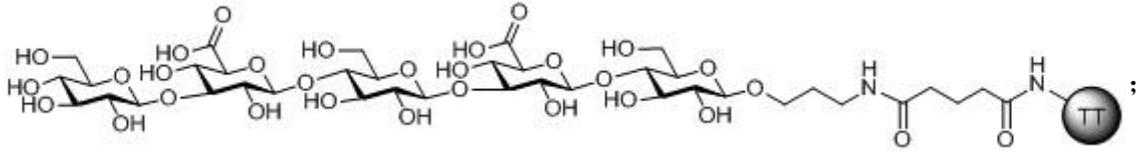
(57)摘要

本发明涉及一种基于肺炎链球菌3型荚膜多糖的寡糖缀合物及其制备方法与应用。一种肺炎链球菌3型荚膜多糖相关寡糖缀合物,结构通式

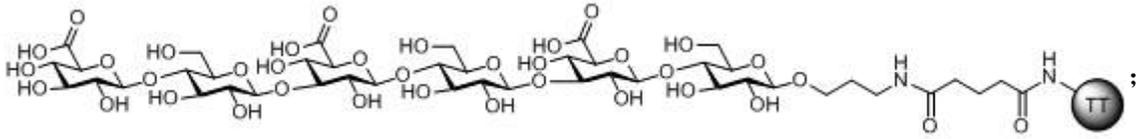
如下所示:  $\left[ \begin{array}{c} \boxed{\text{寡糖}} - x - \boxed{\text{连接体}} \\ \downarrow \\ \boxed{\text{载体}} \end{array} \right]_t$  本发明

首次公开了肺炎链球菌3型荚膜多糖相关寡糖衍生物的合成,肺炎链球菌3型荚膜多糖相关寡糖衍生物可用来制备针对3型肺炎链球菌的新型寡糖-蛋白结合疫苗。

1. 一种肺炎链球菌3型荚膜寡糖缀合物,其特征在于,结构式选自如下之一:



或者,



式中,TT为破伤风类毒素。

2. 权利要求1所述肺炎链球菌3型荚膜寡糖缀合物在制备3型肺炎链球菌引起的肺炎的疫苗中的应用。

## 一种基于3型肺炎链球菌荚膜多糖的寡糖缀合物及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于肺炎链球菌3型荚膜多糖的寡糖缀合物及其制备方法与应用,属于肺炎链球菌疫苗研制技术领域。

### 背景技术

[0002] 肺炎链球菌是一种革兰氏阳性双球菌,在1881年同时由美国陆军医生George Sternberg和法国化学家Louis Pasteur首次分离得到。它常寄居在人的鼻咽腔中,可造成呼吸道感染和肺部感染,严重时可引起脑膜炎、中耳炎、败血症等疾病。在发展中国家每年将近有100万的5岁以下儿童死于这些疾病,预防和救治这些传染性疾病需要花费大量的财力。

[0003] 肺炎链球菌的表面有一层厚厚的糖衣,可以减小外界的影响和在一定程度上抵抗非特异性的人体免疫,该糖衣就是肺炎链球菌的荚膜多糖。研究表明,荚膜多糖是其致病的重要独立因子因素。根据荚膜多糖的结构不同,人们将肺炎链球菌分成多个亚型,如3型、6A型、6B型、23F型等等。截至目前为止,人们已经发现96种亚型,但是并不是所有的亚型都常见或有致病性,常见的致病亚型有3型、5型、19F型、6B型、23F型等。

[0004] 长久以来,人们将抗生素作为抗肺炎链球菌感染的首选药物。随着对抗生素和其它抗菌药物产生耐药性的菌株的出现,临床上治疗肺炎链球菌感染面临很大的困难。因此,肺炎链球菌疫苗的研制一直是国际上关注的热点方向。肺炎链球菌疫苗主要有荚膜多糖疫苗、荚膜多糖-蛋白结合疫苗。但肺炎链球菌荚膜多糖是不依赖于T细胞的抗原,对免疫系统发育不完善的5岁以下儿童和免疫系统能力下降的65岁以上的老人保护性弱,外加上儿童和老人又是侵袭性感染和粘膜感染的高发年龄组,所以人们将肺炎链球菌荚膜多糖与载体蛋白共价结合,使荚膜多糖抗原转化成依赖T细胞的抗原,使儿童和老人在注射疫苗后产生良好的免疫应答,产生抗体清除致病细菌。因此,目前市场上主要以肺炎链球菌荚膜多糖-蛋白结合疫苗为主。

[0005] 多价的肺炎链球菌荚膜多糖-蛋白结合疫苗的生产,首先是培养各个亚型的肺炎链球菌,培养成熟后通过破碎菌体来提取其荚膜多糖,得到各亚型荚膜多糖后将它们通过化学法键合到载体蛋白上制成糖蛋白结合疫苗。这类结合疫苗存在几点不足之处:(1)通过破碎菌体得到的荚膜多糖非单一物质,其荚膜多糖糖链长短不一;(2)在提取荚膜多糖的过程中不可避免的会混入破碎的菌体碎片;(3)每个批次结合疫苗的效果可能不一样,具有微观不均一型,产品质量难以控制。

[0006] 中国专利文献CN105636611A(申请号201480051165.X)公开了不含蛋白质和肽的缀合物,包含合成的碳水化合物和载体分子,其中所述合成的碳水化合物是与肺炎链球菌3型荚膜多糖有关的碳水化合物而所述载体分子是鞘糖脂。所述缀合物及其药物组合物可用于免疫与肺炎链球菌有关的疾病,和更特别地与肺炎链球菌3型有关的疾病。然而,由于载体分子是一类小分子化合物--鞘糖脂,导致其生物兼容性较差,免疫记忆持续时间较短;而

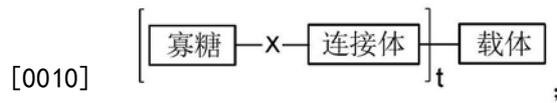
目前未有采用免疫原性的生物大分子与肺炎链球菌细胞表面3型荚膜多糖的寡聚衍生物相连接的研究,比如白喉类毒素CRM197、破伤风类毒素(TT)以及单磷酸化的脂质A等。主要技术难题是肺炎链球菌细胞表面3型荚膜多糖的寡聚衍生物与不同的免疫原性的生物大分子相连后,对其生物活性的影响不可预知。

### 发明内容

[0007] 本发明针对现有肺炎结合疫苗生产技术的不足,提供一种肺炎链球菌3型荚膜多糖相关寡糖缀合物及其制备方法与应用,其中的寡糖是肺炎链球菌细胞表面3型荚膜多糖的寡聚衍生物。

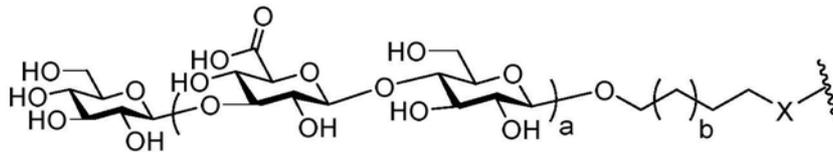
[0008] 本发明通过如下的技术方案来实现:

[0009] 一种肺炎链球菌3型荚膜多糖缀合物,结构通式如式(III)所示:

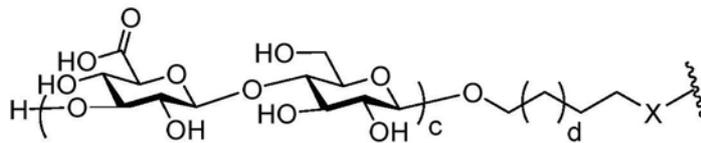


式(III)

[0011] 其中,寡糖选自如下式(I)或式(II)之一:



[0012]



[0013] 式(I)和式(II)中,a是2~4中的任意一个整数,b是0~10中的任意一个整数,c是3~5中的任意一个整数,d是0~10中的任意一个整数;

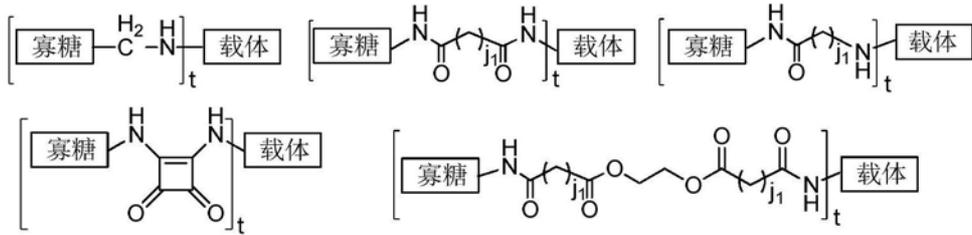
[0014] X选自:  $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}-$ 或  之一;

[0015] 连接体是寡糖与载体直接或间接连接后得到的结构部分;

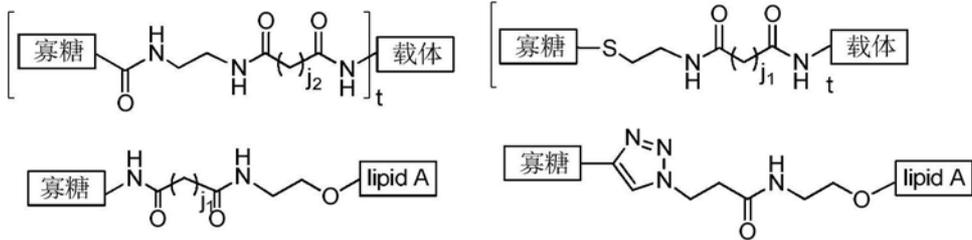
[0016] t是与载体连接的寡糖的数量,t为1~30中的任意一整数;

[0017] 载体选自:牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、血蓝蛋白(KLH)、破伤风类毒素(TT)、白喉毒素无毒突变体(CRM197)、单磷酸化的脂质A(lipid A)之一。

[0018] 根据本发明优选的,所述3型肺炎链球菌荚膜寡糖缀合物的结构通式为如下之一:



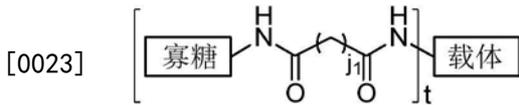
[0019]



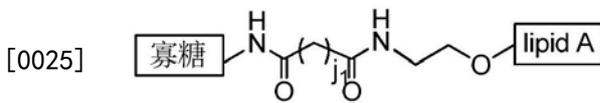
[0020] 式中,  $j_1$  是 1~10 中的任意一个整数,  $j_2$  是 1~10 中的任意一个整数,  $k$  是 33 或 35,  $t$  是 1~30 中的任意一个整数。

[0021] 根据本发明优选的,所述的载体选自:牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、血蓝蛋白(KLH)、破伤风类毒素(TT)或白喉毒素无毒突变体(CRM<sub>197</sub>)之一。

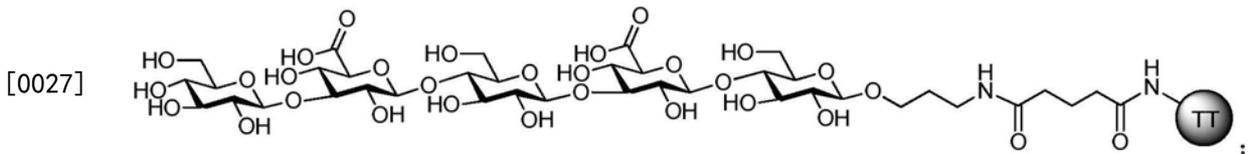
[0022] 根据本发明进一步优选的,所述肺炎链球菌3型荚膜寡糖缀合物的结构通式如下:



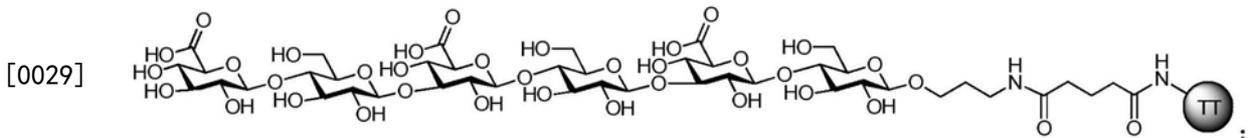
[0024] 根据本发明进一步优选的,所述肺炎链球菌3型荚膜寡糖缀合物的结构通式如下:



[0026] 最优的,所述肺炎链球菌3型荚膜寡糖缀合物的结构式选自如下之一:



[0028] 或者,



[0030] 式中,TT为破伤风类毒素。

[0031] 上述肺炎链球菌3型荚膜寡糖缀合物在制备3型肺炎链球菌寡糖缀合物疫苗中的应用。

[0032] 有益效果

[0033] 1、本发明首次公开了肺炎链球菌3型荚膜多糖相关寡糖缀合物,肺炎链球菌3型荚膜多糖相关寡糖缀合物可用来制备针对3型肺炎链球菌的新型寡糖-蛋白结合疫苗;

[0034] 2、本发明公开的化合物A17-TT、B5-TT诱导产生的免疫响应主要是IgG型,而IgG型

抗体属于T细胞参与的免疫响应,它能够使宿主细胞产生免疫记忆,促进抗体成熟,这一结果说明化合物A17-TT、B5-TT较其他类似结构的化合物而言是一种非常有前景的肺炎疫苗。

### 附图说明

- [0035] 图1是化合物A17的<sup>1</sup>H NMR谱图;  
[0036] 图2是化合物B5的<sup>1</sup>H NMR谱图;  
[0037] 图3是化合物C5的<sup>1</sup>H NMR谱图;  
[0038] 图4是化合物D5的<sup>1</sup>H NMR谱图;  
[0039] 图5是A17、B5、C5、D5的IgG免疫活性评价图;  
[0040] 图6是A17、B5、C5、D5的IgM免疫活性评价图;

### 具体实施方式

[0041] 为了更好地理解本发明的技术方案,下面结合实施例对本发明的技术方案作进一步详细描述,但本发明所保护范围不限于此。

[0042] 实施例1:通用的合成方法

[0043] A: 苯甲酰化反应

[0044] 取原料(1质量份)溶于吡啶中,在搅拌条件下加入苯甲酰氯溶液(2.2质量份),室温搅拌2小时,随着反应的进行,不断的有白色固体析出,浓缩,重结晶,过滤,得白色固体产物;

[0045] B: 4,6位苯叉转位反应

[0046] 取原料(1克)溶于干燥的15毫升二氯甲烷中,在0℃和氮气保护的条件下,加入三乙基硅烷(5质量份)和三氟乙酸(5质量份),搅拌反应2小时后,用20毫升二氯甲烷将反应液稀释,用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤萃取3遍后,取下层有机相,用无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,用硅胶柱色谱分离,所用洗脱液为石油醚(PE)与乙酸乙酯(EA)体积比4:1的混合溶液;

[0047] C: 氯乙酰基的脱除反应

[0048] 取原料溶于二氯甲烷:无水甲醇=1:4中,加入硫脲(5质量份)和2,6-二甲基吡啶(1质量份),60℃~70℃条件下回流反应,TLC检测原料反应完全,浓缩,粗品经硅胶柱分离得目标产物,所用洗脱液为石油醚(PE)与乙酸乙酯(EA)体积比3:1的混合溶液;

[0049] D: 预活化糖基化反应

[0050] 取糖基供体(1.2质量份)和分子筛溶于干燥的二氯甲烷中,在氮气气氛下室温搅拌30分钟,将反应液降温至-78℃,向反应瓶内滴加对甲苯硫氯(1.2质量份),搅拌10分钟后加入三氟甲磺酸银(AgOTf,1.2质量份),搅拌5分钟后加入糖基受体(1.0质量份),反应液缓慢升至室温,待TLC检测到原料全部反应后用三乙胺中和,过滤除去不溶的固体,滤液旋干,粗品经硅胶柱分离得目标产物,所用洗脱液为石油醚(PE)与乙酸乙酯(EA)体积比由8:1逐级变为2:1的混合溶液;

[0051] E: 催化氢化反应

[0052] 取原料(100毫克)溶于去离子水中,在氮气保护下加入催化量的钯碳(10%Pd/C,10毫克),向反应瓶中通入氢气,置换出氮气,反应液在氢气气氛下搅拌36小时。将反应液过滤除去钯碳,减压蒸馏除去溶剂得目标产物。

[0053] F:寡糖缀合物的合成

[0054] 寡糖的活化:将寡糖(1毫克)溶于1毫升混合液,混合液由N,N-二甲基甲酰胺(DMF)和磷酸盐缓冲溶液(PBS buffer,0.1M)按质量比4:1的比例混合,搅拌条件下加入双琥珀酰亚胺戊二酸酯(20毫克),反应液室温搅拌4小时,减压蒸馏除去溶剂得白色粉末状固体,固体用EA(乙酸乙酯)洗涤,干燥,得活化的寡糖。

[0055] 寡糖蛋白缀合物的合成:按照30:1的摩尔比取活化的寡糖和蛋白(寡糖:蛋白=30:1)溶于PBS缓冲溶液,反应液搅拌过夜,用透析的方法除去小分子物质,透析完毕后将蛋白水溶液冻干得寡糖-蛋白缀合物。

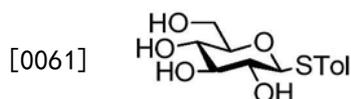
[0056] 实施例2:3-氨基丙基 $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-葡萄糖-TT缀合物(A17-TT)的合成

[0057] (1)对甲苯硫基2,3,4,6-四-氧-乙酰基-1-硫- $\beta$ -D-葡萄糖(A1)的合成



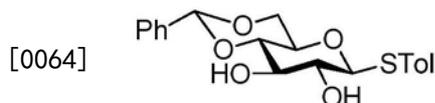
[0059] 取 $\beta$ -D-全乙酰糖(10.0g,25.6mmol)和对甲苯硫酚(3.8g,30.6mmol),干燥后,溶于50mL干燥的二氯甲烷中,在0 $^{\circ}$ C的条件下,加入10mL三氟化硼 $\cdot$ 乙醚溶液,室温反应3~4小时,TLC(PE:EA=1:2)检测反应情况,直至原料不再减少,用适量二氯甲烷将反应液稀释,用饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液洗涤萃取3遍后,取下层有机相,用无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤,浓缩,用硅胶柱色谱分离,得到化合物A1(10.0g,产率86%)。

[0060] (2)对甲苯硫基1-硫- $\beta$ -D-葡萄糖(A2)的合成



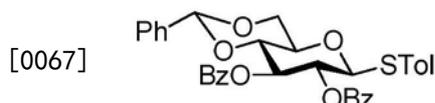
[0062] 取A1(10.00g,22.0mmol)溶于甲醇,搅拌条件下加入1mol/L的甲醇钠溶液调节pH值至10,将反应液置于室温下搅拌反应1小时,TLC检测至原料全部反应完毕,反应液用酸性树脂(Amberlite IR 120)中和,过滤除去酸性树脂,减压蒸馏除去溶剂,粗品经硅胶柱分离得目标产物A2(5.48g,产率87%)。

[0063] (3)对甲苯硫基4,6-氧-苄叉-1-硫- $\beta$ -D-葡萄糖(A3)的合成



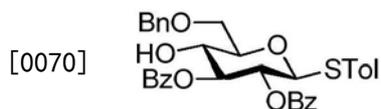
[0065] 取A2(230mg,0.8mmol)溶于5mL干燥的乙腈中,加入苯甲醛二甲缩醚(180 $\mu$ L,1.2质量份),然后加入催化量的一水合对甲苯磺酸,室温搅拌1小时,有结晶析出,TLC检测原料反应完全,加入三乙胺中和反应液,减压蒸馏除去溶剂,粗品经硅胶柱分离得目标产物A3(240mg,产率80%)。

[0066] (4)对甲苯硫基2,3-二-氧-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉-1-硫- $\beta$ -D-葡萄糖(A4)的合成



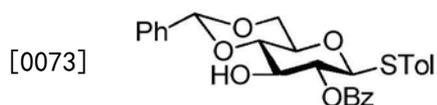
[0068] 取A3(1.40g,3.74mmol)按实施例1中通用合成方法A进行苯甲酰化,得白色固体产物A4(1.5g,产率68.8%)。

[0069] (5) 对甲苯磺基2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-1-硫-β-D-葡萄糖 (A5) 的合成



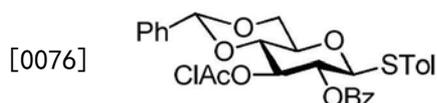
[0071] 取A4 (4.10g, 7.04mmol) 按实施例1中通用合成方法B进行4,6转位得目标产物A5 (2.5g, 产率60.7%)。

[0072] (6) 对甲苯磺基2-氧-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉-1-硫-β-D-葡萄糖 (A6) 的合成



[0074] 取干燥的A3 (789mg, 2.11mmol) 溶于3mL吡啶中, 在0℃的条件下, 加入苯甲酰氯 (0.356mL, 1.2质量份), TLC检测原料反应完全, 减压蒸馏除去溶剂, 粗品经硅胶柱分离得目标产物A6 (778mg, 产率77%)。

[0075] (7) 对甲苯磺基2-氧-苯甲酰基-3-氯乙酰基-4,6-氧-苄叉-1-硫-β-D-葡萄糖 (A7) 的合成



[0077] 取干燥的A6 (1.81g, 3.80mmol) 溶于10mL二氯甲烷和2mL吡啶的混合溶液中, 在0℃的条件下, 滴加氯乙酰氯 (0.4mL, 1.2质量份), 搅拌反应2小时, TLC检测原料反应完全, 减压蒸馏除去溶剂, 粗品经硅胶柱分离得目标产物A7 (1.62g, 产率77%)。

[0078] (8) 对甲苯磺基2-氧-苯甲酰基-3-氯乙酰基-4,6-氧-苄叉-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-1-硫-β-D-葡萄糖 (A8) 的合成



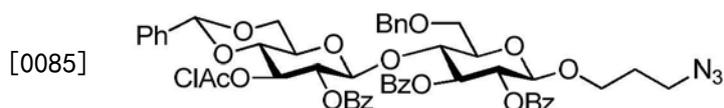
[0080] 以A7 (520.6mg, 0.94mmol) 为糖基供体, A5 (450mg, 0.77mmol) 为糖基受体, 按照实施例1中通用合成方法D进行糖基化反应得目标产物 (547mg, 产率70%)。

[0081] (9) 对甲苯磺基2-氧-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-1-硫-β-D-葡萄糖 (A9) 的合成



[0083] 取A8 (213.4mg, 0.21mmol) 按实施例1中通用合成方法C进行脱除氯乙酰基反应, 得目标产物A9 (162mg, 产率82.1%)。

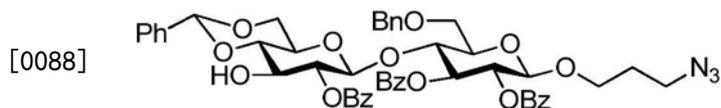
[0084] (10) 3-叠氨基丙基2-氧-苯甲酰基-3-氯乙酰基-4,6-氧-苄叉-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-1-硫-β-D-葡萄糖 (A10) 的合成



[0086] 取A8 (159.1mg, 0.17mmol) 为糖基供体, 3-叠氨基丙醇 (31.72mg, 0.31mmol) 为糖基受体和分子筛溶于干燥无水的二氯甲烷中, 在0℃和氮气保护条件下, 加入N-碘代丁二酰亚

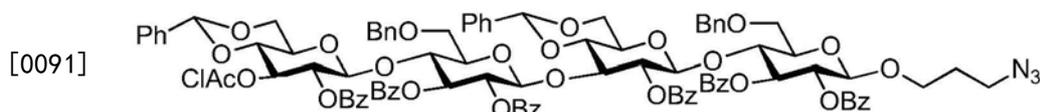
胺(38.8mg,1.2质量份)和催化量的三氟甲磺酸银。反应液缓慢升至室温,待TLC检测到原料全部反应后用三乙胺中和,过滤除去不溶的固体,滤液旋干,粗品经硅胶柱分离得目标产物A10(112mg,产率72%)。

[0087] (11) 3-叠氮基丙基2-氧-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-1-硫-β-D-葡萄糖(A11)的合成



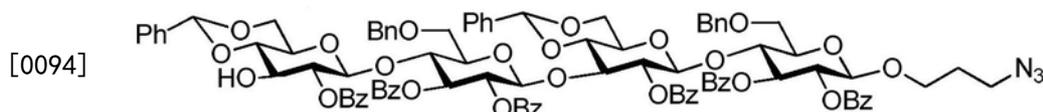
[0089] 取A10(270.3mg,0.27mmol)按实施例1中通用合成方法C进行脱除氯乙酰基反应,得目标产物A11(201mg,产率80.4%)。

[0090] (12) 3-叠氮基丙基2-氧-苯甲酰基-3-氯乙酰基-4,6-氧-苄叉-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-β-D-葡萄糖基-(1→3)-2-氧-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-1-硫-β-D-葡萄糖(A12)的合成



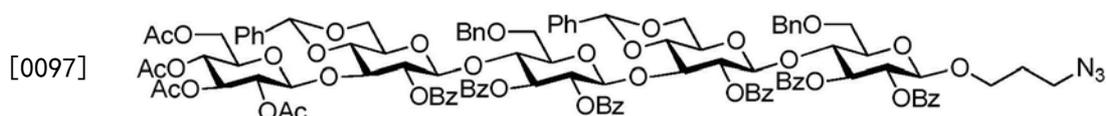
[0092] 取A8(483.3mg,0.48mmol)为糖基供体,A11(363mg,0.4mmol)为糖基受体,按实施例2中A10的合成方法进行偶联反应,得目标产物A12(562.8mg,产率78.6%)。

[0093] (13) 3-叠氮基丙基2-氧-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-β-D-葡萄糖基-(1→3)-2-氧-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-1-硫-β-D-葡萄糖(A13)的合成



[0095] 取A12(189.3mg,0.105mmol)按实施例1中通用合成方法C进行脱除氯乙酰基反应,得目标产物A13(148.3mg,产率81.8%)。

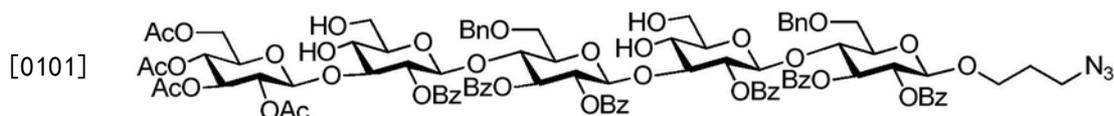
[0096] (14) 3-叠氮基丙基2,3,4,6-四-乙酰基-β-D-葡萄糖基-(1→3)-2-氧-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-β-D-葡萄糖基-(1→3)-2-氧-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-1-硫-β-D-葡萄糖(A14)的合成



[0098] 取A1(152.4mg,0.336mmol)为糖基供体,A9(262mg,0.28mmol)为糖基受体,按实施例1中通用合成方法D进行反应,得目标产物A14(396mg,产率68.9%)。

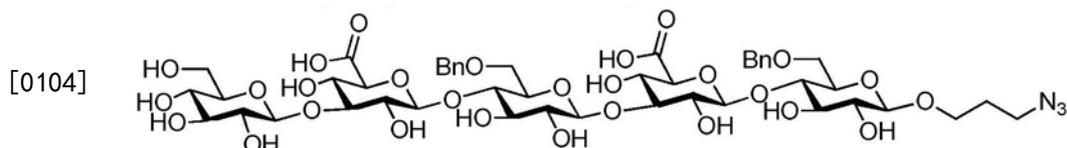
[0099] (15) 3-叠氮基丙基2,3,4,6-四-乙酰基-β-D-葡萄糖基-(1→3)-2-氧-苯甲酰基-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-β-D-葡萄糖基-(1→3)-2-氧-苯甲酰基-β-D-葡萄糖基

[0100] -(1→4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-1-硫-β-D-葡萄糖(A15)的合成



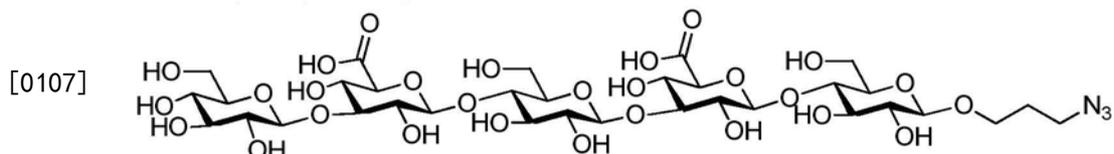
[0102] 取A14 (115mg, 0.056mmol), 溶于5mL的二氯甲烷中, 加入50 $\mu$ L的三氟乙酸的水溶液 (15:2), 室温搅拌反应半小时, TLC检测原料反应完全, 用适量的二氯甲烷稀释反应液, 依次用饱和碳酸氢钠水溶液、氯化钠水溶液洗涤一遍, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 粗品经硅胶柱分离得目标产物A15 (96mg, 产率91.2%)。

[0103] (16) 3-叠氨基丙基 $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖酸基-(1 $\rightarrow$ 4)-6-氧-苄基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖酸基-(1 $\rightarrow$ 4)-6-氧-苄基-1-硫- $\beta$ -D-葡萄糖 (A16) 的合成



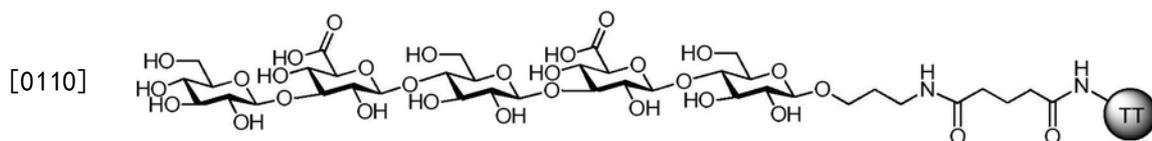
[0105] 取A15 (113.2mg, 0.06mmol), 溶于5mL二氯甲烷和2mL水中, 在剧烈搅拌的条件下, 加入2,2,6,6-四甲基哌啶-氮氧化物 (4mg, 0.4质量份) 和碘苯二乙酸 (96mg, 5质量份), 避光搅拌12小时后, TLC检测原料几乎反应完全, 加入少量10%硫代硫酸钠水溶液终止反应, 用适量二氯甲烷萃取3遍后, 取下层有机相, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 得粗产品84mg。将所得粗产品, 溶于2mL四氢呋喃中, 慢慢滴加1M的氢氧化锂溶液, 调节pH至10~11, 室温搅拌12小时后, 滴加1M的盐酸溶液中和至中性, 过凝胶柱除盐, 得目标产物A16 (44mg, 产率65.4%)。

[0106] (17) 3-氨基丙基 $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖酸基-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖酸基-(1 $\rightarrow$ 4)-1-硫- $\beta$ -D-葡萄糖 (A17) 的合成



[0108] 取A16 (6mg, 5.4 $\mu$ mmol) 按实施例1中通用合成方法E催化氢化得目标产物A17 (4.6mg, 产率93%)。<sup>1</sup>H NMR (600MHz, D<sub>2</sub>O), 见说明书附图1,  $\delta$ 4.61 (d, J=7.9Hz, 2H), 4.33 (dd, J=16.8, 8.0Hz, 3H), 3.88-3.83 (m, 1H), 3.79 (d, J=11.9Hz, 2H), 3.73 (dd, J=12.4, 2.0Hz, 1H), 3.65-3.58 (m, 7H), 3.54 (dd, J=12.5, 6.1Hz, 1H), 3.50-3.36 (m, 10H), 3.33 (t, J=9.2Hz, 1H), 3.30-3.25 (m, 1H), 3.24-3.11 (m, 4H), 2.90 (t, J=6.9Hz, 2H), 1.82-1.75 (m, 2H)。质谱: MALDI-TOF MS (m/z): 计算值: C<sub>33</sub>H<sub>55</sub>N<sub>3</sub>O<sub>28</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>, 936.28, 实测值: 936.24。

[0109] (18) A17-TT糖缀合物的合成



[0111] 取A17 (2mg), TT (4mg) 按实施例1中通用合成方法F合成A17-TT缀合物 (3.4mg)。以硫酸-苯酚法 (参考医药导报, 2008, 27, 12:1511的方法) 测定寡糖缀合物的糖含量为5wt%。

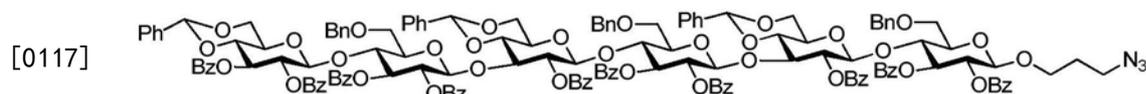
[0112] 实施例3:3-氨基丙基 $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-葡萄糖-TT缀合物(B5-TT)的合成

[0113] (1) 3-叠氮基丙基2,3-二-氧-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-1-硫- $\beta$ -D-葡萄糖(B1)的合成



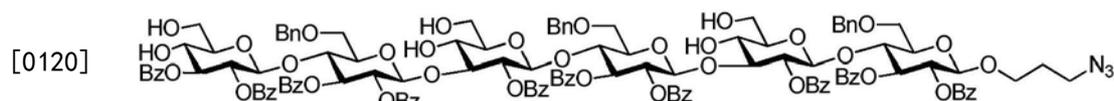
[0115] 以A4(634.2mg,1.09mmol)为糖基供体,A5(511.9mg,0.88mmol)为糖基受体,按照实施例1中通用合成方法D进行糖基化反应得目标产物B1(676mg,产率74%)。

[0116] (2) 3-叠氮基丙基2,3-二-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-二-苯甲酰基-6-氧-苄基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)-2-氧-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)-2-氧-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-1-硫- $\beta$ -D-葡萄糖(B2)的合成



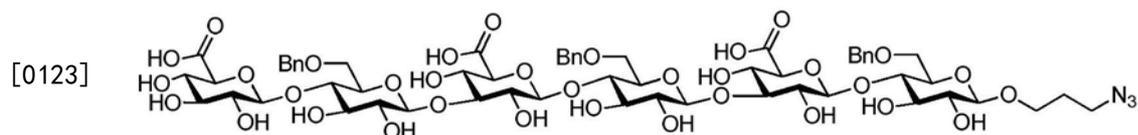
[0118] 取B1(355.6mg,0.34mmol)为糖基供体,A13(491.9mg,0.28mmol)为糖基受体,按实施例2中A10的合成方法进行偶联反应,得目标产物B2(581.4mg,产率77.2%)。

[0119] (3) 3-叠氮基丙基2,3-二-苯甲酰基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-二-苯甲酰基-6-氧-苄基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)-2-氧-苯甲酰基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)-2-氧-苯甲酰基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-1-硫- $\beta$ -D-葡萄糖(B3)的合成



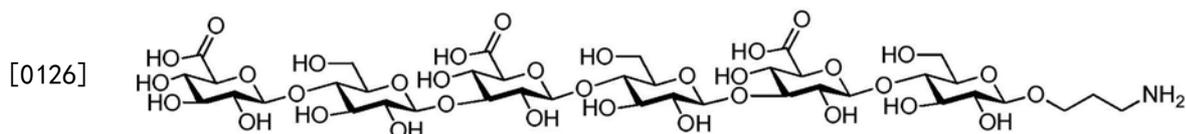
[0121] 取B2(167.6mg,0.063mmol)为原料,按实施例2中A15的合成方法进行反应,得目标产物B3(143.6mg,产率95.2%)。

[0122] (4) 3-叠氮基丙基 $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)-6-氧-苄基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)-6-氧-苄基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)-6-氧-苄基-1-硫- $\beta$ -D-葡萄糖(B4)的合成



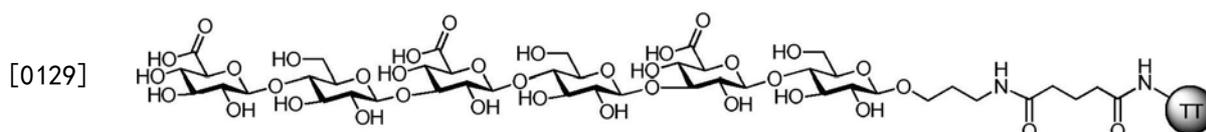
[0124] 取B3(143mg,0.06mmol)为原料,按实施例2中A16的合成方法进行反应,得目标产物B4(51.9mg,产率62.4%)。

[0125] (5) 3-氨基丙基 $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)-1-硫- $\beta$ -D-葡萄糖(B5)的合成



[0127] 取B4 (20mg, 14.4 $\mu$ mol) 按实施例1中通用合成方法E催化氢化得目标产物B5 (14.1mg, 产率90%)。<sup>1</sup>H NMR (600MHz, D<sub>2</sub>O), 见说明书附图2,  $\delta$ 4.67 (dd, J=8.0, 1.5Hz, 2H), 4.37 (ddd, J=16.1, 8.0, 2.0Hz, 4H), 3.93-3.88 (m, 1H), 3.83 (d, J=12.1Hz, 3H), 3.69-3.60 (m, 9H), 3.57-3.40 (m, 13H), 3.40-3.34 (m, 2H), 3.21 (ddd, J=27.6, 15.4, 8.5Hz, 4H), 3.01 (t, J=6.9Hz, 2H), 1.86 (td, J=11.7, 6.9Hz, 2H)。质谱: MALDI-TOF MS (m/z): 计算值: C<sub>39</sub>H<sub>63</sub>NO<sub>34</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>, 1112.31, 实测值: 1112.41。

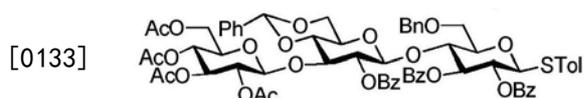
[0128] (6) B5-TT糖缀合物的合成



[0130] 取B5 (2mg), TT (4mg) 按实施例1中通用合成方法F合成B5-TT缀合物 (3.2mg)。以硫酸-苯酚法 (参考医药导报, 2008, 27, 12:1511的方法) 测定寡糖缀合物的糖含量为4.5wt%。

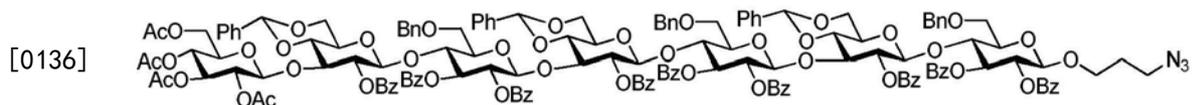
[0131] 实施例4: 3-氨基丙基 $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-葡萄糖-TT缀合物 (C5-TT) 的合成

[0132] (1) 对甲苯磺基2,3,4,6-四-氧-乙酰基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)-2-氧-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-1-硫- $\beta$ -D-葡萄糖 (C1) 的合成



[0134] 以A1 (232.3mg, 0.51mmol) 为糖基供体, A9 (400mg, 0.43mmol) 为糖基受体, 按照实施例1中通用合成方法D进行糖基化反应得目标产物C1 (378mg, 产率70%)。

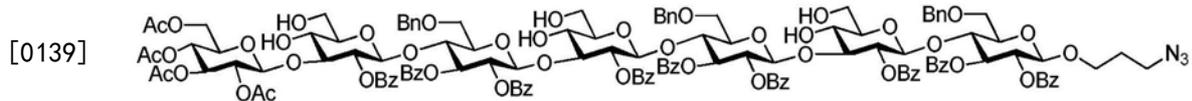
[0135] (2) 3-叠氨基丙基2,3,4,6-四-氧-乙酰基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)-2-氧-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)-2-氧-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)-2-氧-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-1-硫- $\beta$ -D-葡萄糖 (C2) 的合成



[0137] 取C1 (312.6mg, 0.25mmol) 为糖基供体, A13 (360mg, 0.21mmol) 为糖基受体, 按实施例2中A10的合成方法进行偶联反应, 得目标产物C2 (428.4mg, 产率72%)。

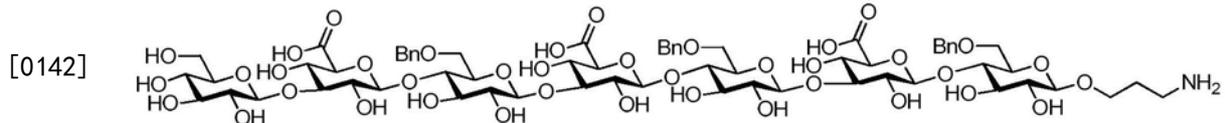
[0138] (3) 3-叠氨基丙基2,3,4,6-四-氧-乙酰基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)-2-氧-苯甲酰基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)-2-氧-苯甲酰基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)-2-氧-苯甲酰基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-1-硫- $\beta$ -D-葡萄

## 糖(C3)的合成



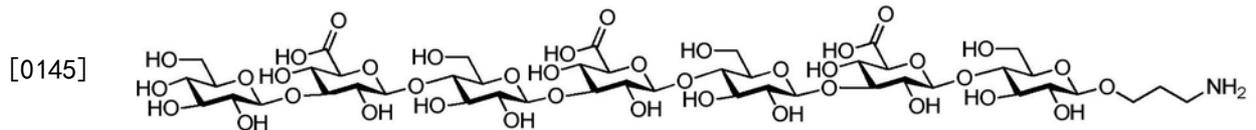
[0140] 取C2 (150mg, 0.052mmol) 为原料,按实施例2中A15的合成方法进行反应,得目标产物C3 (129.4mg, 产率95%)。

[0141] (4) 3-叠氨基丙基 $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)-6-氧-苄基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)-6-氧-苄基- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)-6-氧-苄基-1-硫- $\beta$ -D-葡萄糖(C4)的合成



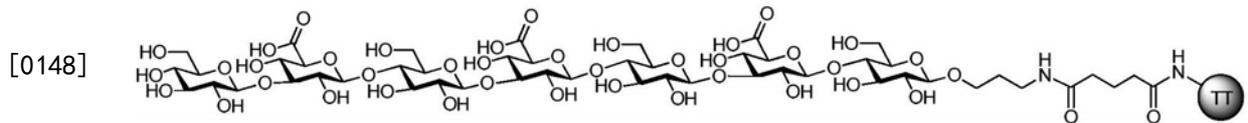
[0143] 取C3 (129.4mg, 0.05mmol) 为原料,按实施例2中A16的合成方法进行反应,得目标产物C4 (42.2mg, 产率55%)。

[0144] (5) 3-氨基丙基 $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)-1-硫- $\beta$ -D-葡萄糖(C5)的合成



[0146] 取C4 (20mg, 12.9 $\mu$ mmol) 按实施例1中通用合成方法E催化氢化得目标产物C5 (15mg, 产率91%)。<sup>1</sup>H NMR (600MHz, D<sub>2</sub>O), 见说明书附图3,  $\delta$ 4.66 (s, 3H), 4.39-4.30 (m, 4H), 3.91-3.86 (m, 1H), 3.81 (d, J=10.9Hz, 3H), 3.75 (dd, J=12.4, 2.1Hz, 1H), 3.63 (tt, J=8.0, 4.9Hz, 10H), 3.57-3.38 (m, 16H), 3.35 (t, J=9.2Hz, 1H), 3.31-3.28 (m, 1H), 3.25-3.13 (m, 5H), 2.99 (t, J=6.9Hz, 2H), 1.87-1.80 (m, 2H)。质谱: MALDI-TOF MS (m/z): 计算值: C<sub>45</sub>H<sub>73</sub>NO<sub>39</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>, 1274.37, 实测值: 1274.87。

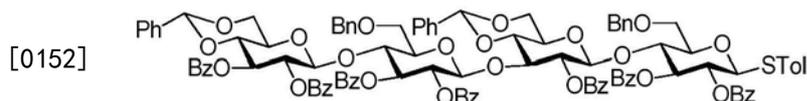
[0147] (6) C5-TT糖缀合物的合成



[0149] 取C5 (2mg), TT (4mg) 按实施例1中通用合成方法F合成C5-TT缀合物 (3.0mg)。以硫酸-苯酚法(参考医药导报, 2008, 27, 12:1511的方法)测定寡糖缀合物的糖含量为4wt%。

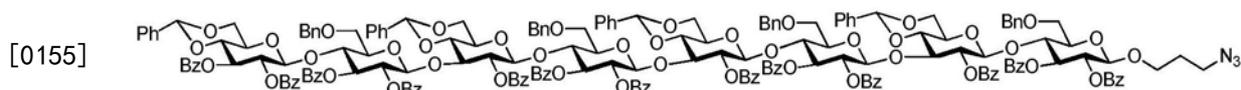
[0150] 实施例5: 3-氨基丙基 $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡萄糖基酸-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-葡萄糖-TT缀合物(D5-TT)的合成

[0151] (1) 3-叠氨基丙基2,3-二-氧-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-(1 $\rightarrow$ 3)-2-氧-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉- $\beta$ -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-二-氧-苯甲酰基-6-氧-苄基-1-硫- $\beta$ -D-葡萄糖(D1)的合成



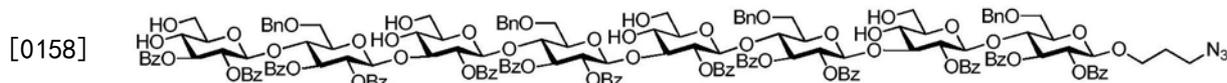
[0153] 以B1 (505mg, 0.48mmol) 为糖基供体, A9 (378.8mg, 0.40mmol) 为糖基受体, 按照实施例1中通用合成方法D进行糖基化反应得目标产物D1 (524.7mg, 产率70%)。

[0154] (2) 3-叠氮基丙基2,3-二-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-苯甲酰基-6-氧-苄基-β-D-葡萄糖基-(1→3)-2-苯甲酰基-4,6-氧-苄叉-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-苯甲酰基-6-氧-苄基-β-D-葡萄糖基-(1→3)-2-氧-苄甲酰基-4,6-氧-苄叉-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-氧-苄甲酰基-6-氧-苄基-β-D-葡萄糖基-(1→3)-2-氧-苄甲酰基-4,6-氧-苄叉-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-氧-苄甲酰基-6-氧-苄基-1-硫-β-D-葡萄糖 (D2) 的合成



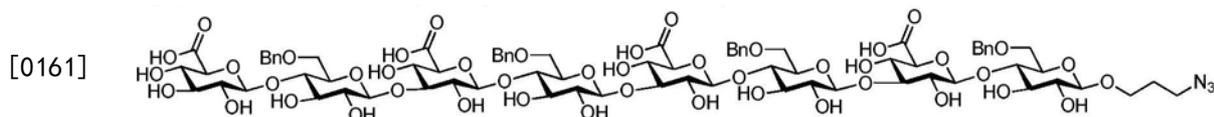
[0156] 取D1 (180mg, 0.097mmol) 为糖基供体, A13 (114.6mg, 0.081mmol) 为糖基受体, 按实施例2中A10的合成方法进行偶联反应, 得目标产物D2 (147mg, 产率65%)。

[0157] (3) 3-叠氮基丙基2,3-二-苯甲酰基-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-苯甲酰基-6-氧-苄基-β-D-葡萄糖基-(1→3)-2-苯甲酰基-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-苯甲酰基-6-氧-苄基-β-D-葡萄糖基-(1→3)-2-氧-苄甲酰基-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-氧-苄甲酰基-6-氧-苄基-β-D-葡萄糖基-(1→3)-2-氧-苄甲酰基-β-D-葡萄糖基-(1→4)-2,3-二-氧-苄甲酰基-6-氧-苄基-1-硫-β-D-葡萄糖 (D3) 的合成



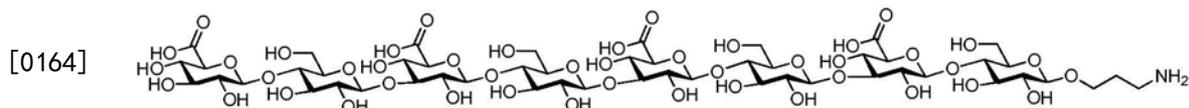
[0159] 取D2 (147mg, 0.042mmol) 为原料, 按实施例2中A15的合成方法进行反应, 得目标产物D3 (125.4mg, 产率95%)。

[0160] (4) 3-叠氮基丙基β-D-葡萄糖基酸-(1→4)-6-氧-苄基-β-D-葡萄糖基-(1→3)-β-D-葡萄糖基酸-(1→4)-6-氧-苄基-β-D-葡萄糖基-(1→3)-β-D-葡萄糖基酸-(1→4)-6-氧-苄基-1-硫-β-D-葡萄糖 (D4) 的合成



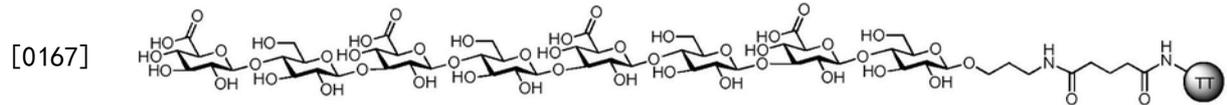
[0162] 取D3 (125.4mg, 0.04mmol) 为原料, 按实施例2中A16的合成方法进行反应, 得目标产物D4 (43.9mg, 产率60%)。

[0163] (5) 3-氨基丙基β-D-葡萄糖基酸-(1→4)-β-D-葡萄糖基-(1→3)-β-D-葡萄糖基酸-(1→4)-β-D-葡萄糖基-(1→3)-β-D-葡萄糖基酸-(1→4)-β-D-葡萄糖基-(1→3)-β-D-葡萄糖基酸-(1→4)-1-硫-β-D-葡萄糖 (D5) 的合成



[0165] 取D4 (20mg, 11 $\mu$ mol) 按实施例1中通用合成方法E催化氢化得目标产物D5 (14mg, 产率87%)。<sup>1</sup>H NMR (600MHz, D<sub>2</sub>O), 见说明书附图4,  $\delta$ 4.68 (s, 3H), 4.36 (ddd, J=10.7, 7.9, 2.2Hz, 5H), 3.92-3.87 (m, 1H), 3.82 (d, J=11.7Hz, 4H), 3.69-3.57 (m, 12H), 3.57-3.39 (m, 17H), 3.38-3.33 (m, 3H), 3.26-3.13 (m, 5H), 3.00 (t, J=6.9Hz, 2H), 1.85 (td, J=11.7, 6.9Hz, 2H)。质谱: MALDI-TOF MS (m/z): 计算值: C<sub>51</sub>H<sub>81</sub>N<sub>045</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>, 1450.40, 实测值: 1450.68。

[0166] (6) D5-TT糖缀合物的合成



[0168] 取D5 (2mg), TT (4mg) 按实施例1中通用合成方法F合成D5-TT缀合物 (3.5mg)。以硫酸-苯酚法 (参考医药导报, 2008, 27, 12:1511的方法) 测定寡糖缀合物的糖含量为4.2wt%。

[0169] 实施例6: 寡糖缀合物A17-TT、B5-TT、C5-TT、D5-TT的免疫原性抗体滴度测定

[0170] 实施例2、3、4、5中制备的寡糖缀合物A17-TT、B5-TT、C5-TT、D5-TT在小鼠 (C57/BL, 7周大, 每组6只) 体内进行免疫试验。采用皮下注射的方式, 以寡糖用量计算, 3 $\mu$ g/只小鼠/次, 分别在第1、14、21、28天进行免疫。

[0171] 分别在免疫前1天和末次免疫2天后取血, 制备抗血清研究其免疫原性, 用相应寡糖的TT缀合物作为固定抗原, 以酶联免疫法 (ELISA) 检测多糖特异性抗体的滴度, 结果如图5、图6所示。

[0172] 经过免疫后, 小鼠血液中的抗体滴度明显增高, 图6说明A17-TT、B5-TT、C5-TT、D5-TT产生的IgM抗体基本相同滴度较低。图5说明A17-TT、B5-TT、C5-TT、D5-TT产生的IgG抗体滴度各有不同, 其中A17-TT、B5-TT产生的IgG抗体滴度较高, 在总抗中占有较大比例, 说明化合物A17-TT、B5-TT诱导产生的免疫响应主要是IgG型, 而IgG型抗体属于T细胞参与的免疫响应, 它能够使宿主细胞产生免疫记忆, 促进抗体成熟, 这一结果说明化合物A17-TT、B5-TT是一种非常有前景的肺炎疫苗。

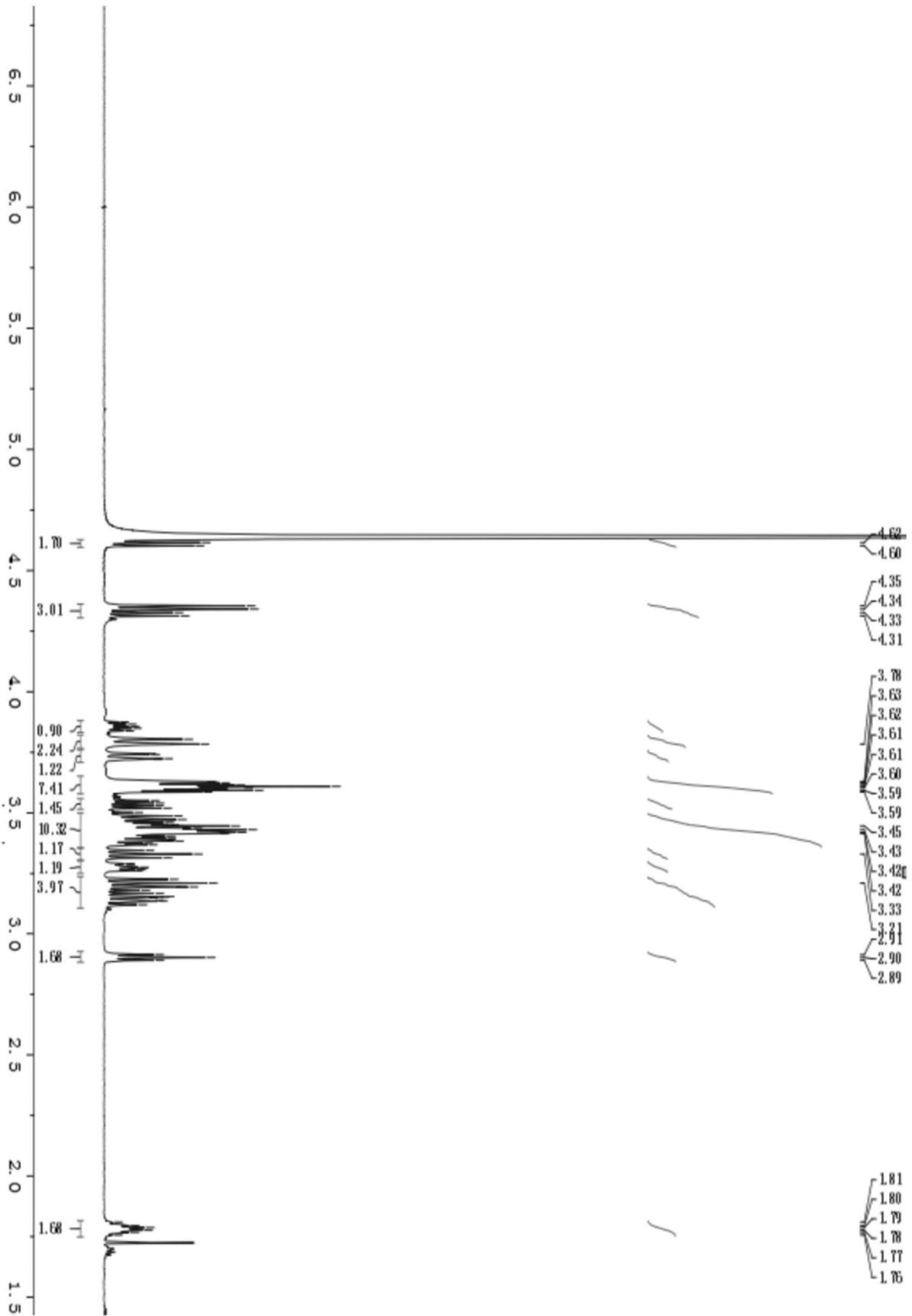


图1

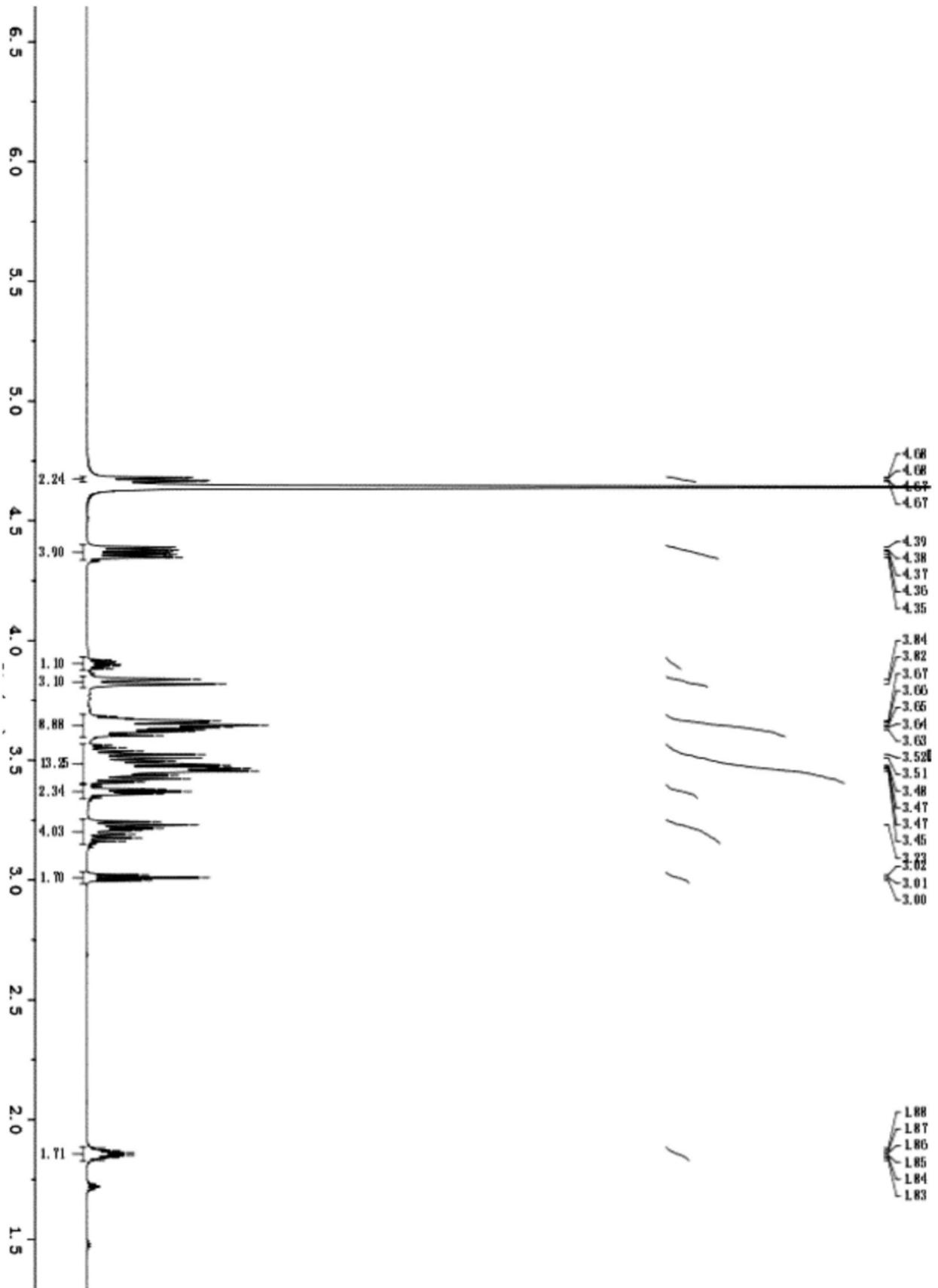


图2

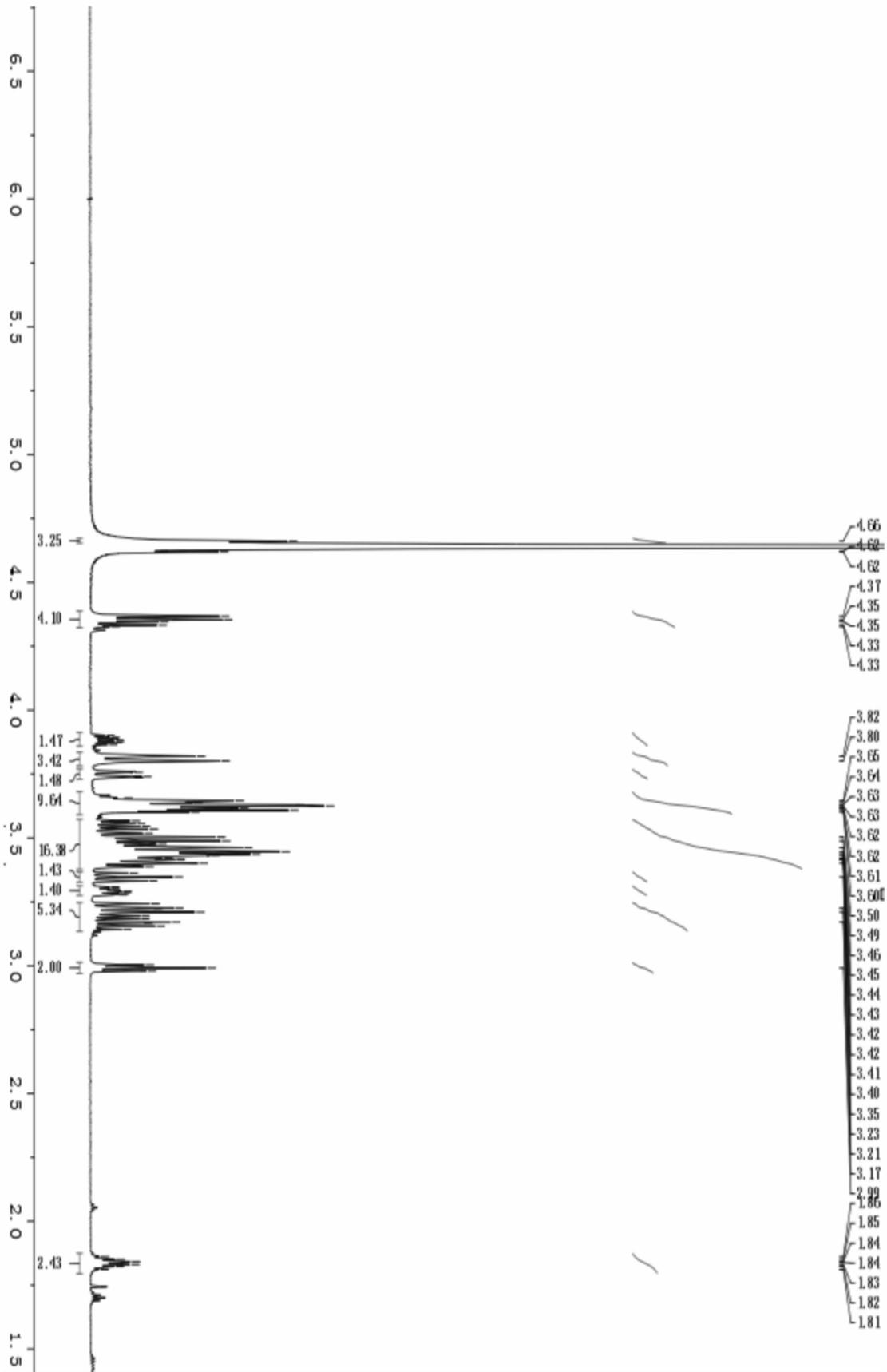


图3

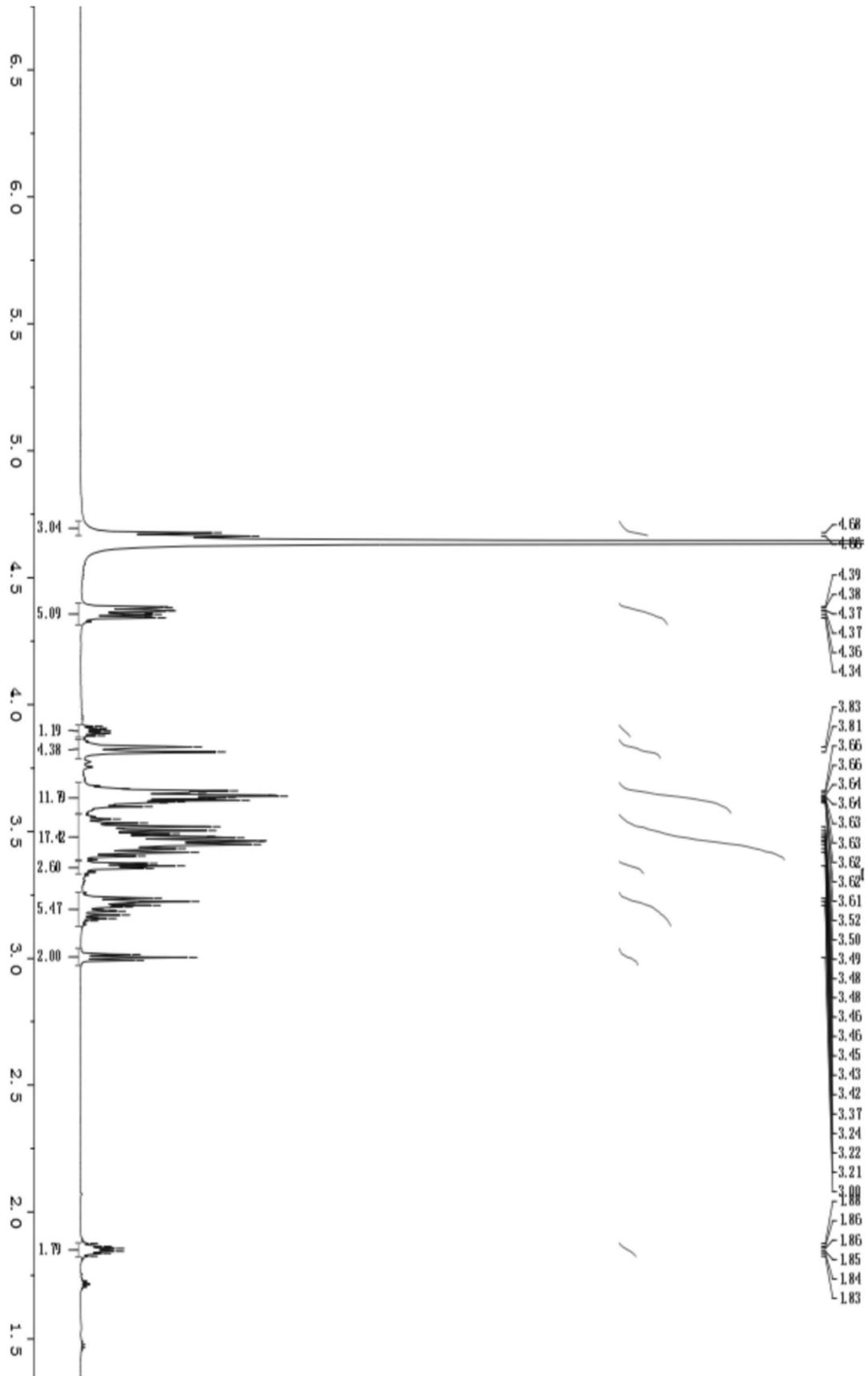


图4

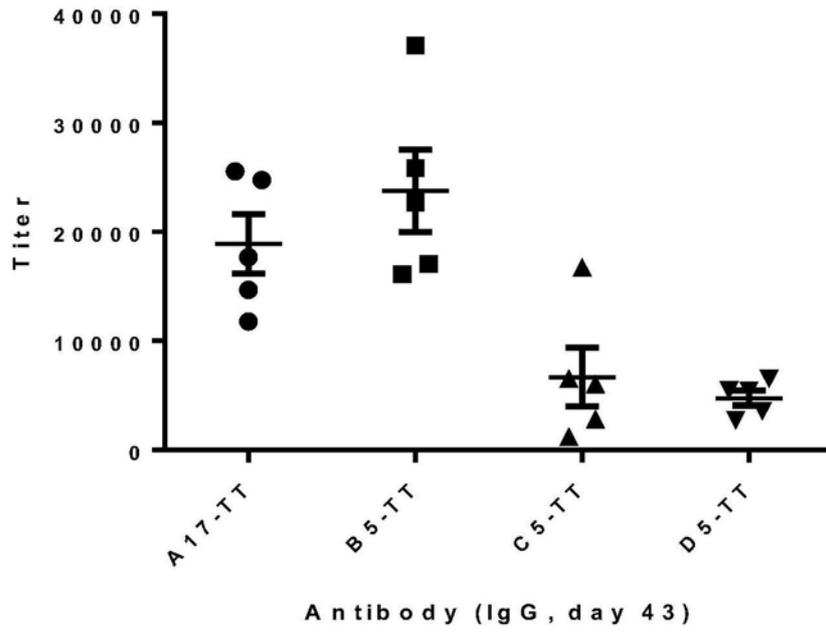


图5

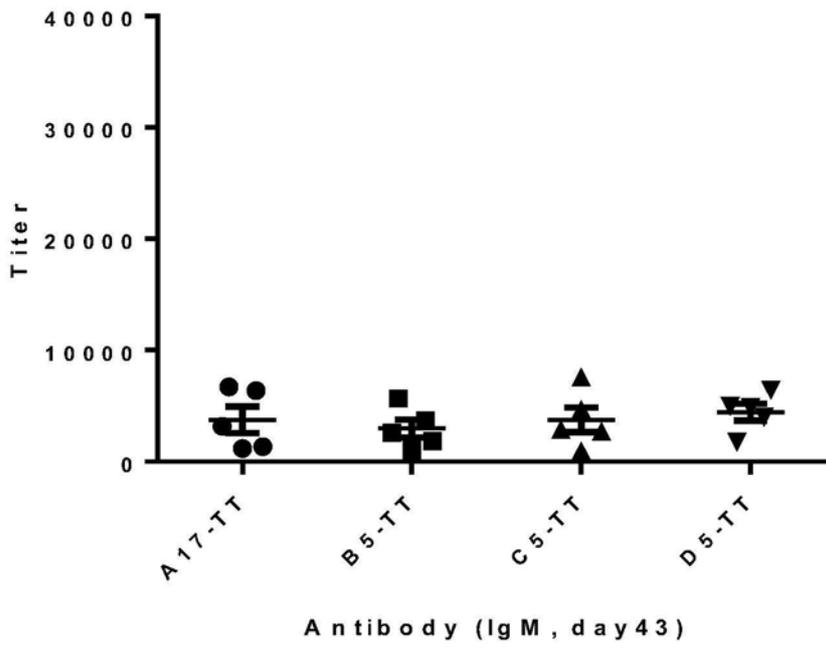


图6