

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2021 年 10 月 21 日 (21.10.2021)



(10) 国际公布号  
**WO 2021/208237 A1**

(51) 国际专利分类号:

A61K 31/785 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)

C07H 1/00 (2006.01) A61P 1/04 (2006.01)

C07H 3/06 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/097646

(22) 国际申请日: 2020 年 6 月 23 日 (23.06.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202010285718.5 2020 年 4 月 13 日 (13.04.2020) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 胡静(HU, Jing); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。尹健(YIN, Jian); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街 99 号 18 栋 E 区 501 张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,

(54) Title: APPLICATION OF HEPTOSE CHAIN-CONTAINING OLIGOSACCHARIDE COMPOUND IN PREPARATION OF HELICOBACTER PYLORI VACCINE

(54) 发明名称: 含庚糖链的寡糖化合物在制备幽门螺旋杆菌疫苗中的应用

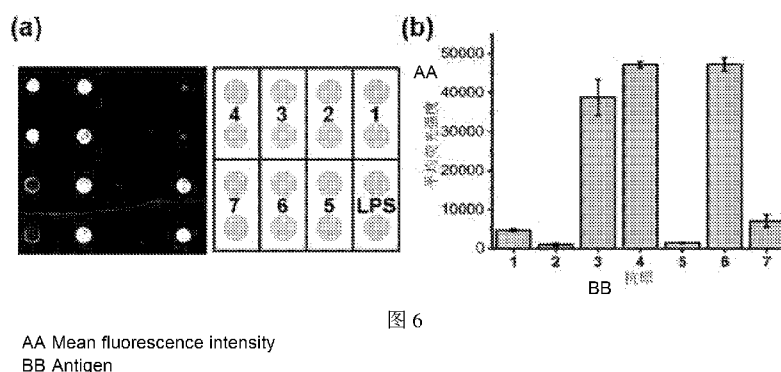


图 6

(57) Abstract: An application of a heptose chain-containing oligosaccharide compound in the preparation of a helicobacter pylori vaccine, relating to the field of medicines. A synthetic oligosaccharide chip is prepared by chemically synthesizing different antigen sugar chain fragments and immobilizing same on the surface of a chip. By combining an animal immune experiment and the analysis on the synthetic oligosaccharide chip, and testing an antibody in antiserum generated for polysaccharide, the relation between synthetic oligosaccharide and immunogenicity is explored. The exploration shows that a heptose chain in an antigen is an important immune epitope, that is, a carbohydrate antigen fragment containing the  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) heptose chain has excellent immunocompetence, and can be used for preparing and developing vaccines for preventing and treating helicobacter pylori infection.

(57) 摘要: 含庚糖链的寡糖化合物在制备幽门螺旋杆菌疫苗中的应用, 属于医药领域。通过化学合成得到的不同抗原糖链片段, 并固定于芯片表面制备得到合成寡糖芯片, 结合动物免疫实验和合成寡糖芯片分析, 利用抗血清中针对多糖产生的抗体进行检测, 探究合成寡糖与免疫原性的关系。探究得到抗原中庚糖链为重要免疫表位, 即含有  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) 庚糖链的糖抗原片段具有优异的免疫活性, 可用于制备、开发预防和治疗幽门螺旋杆菌感染的疫苗。

CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,  
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

## 含庚糖链的寡糖化合物在制备幽门螺旋杆菌疫苗中的应用

### 技术领域

本发明涉及含庚糖链的寡糖化合物在制备幽门螺旋杆菌疫苗中的应用，属于医药领域。

### 背景技术

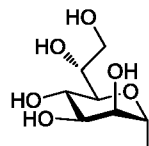
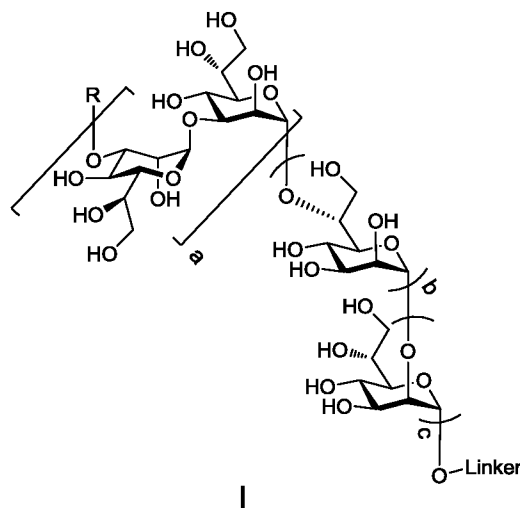
幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) 是一种微需氧型的革兰氏阴性致病菌，作为最广泛的细菌病原体之一，在世界人口的感染率约为 50% (J. G. Kusters et al., *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19: 449)。研究表明，幽门螺旋杆菌是引发胃炎、胃萎缩、消化性和十二指肠溃疡等疾病的主要病因 (B. Molnar et al., *Dig Dis*, 2010, 28: 604)。另外，由于幽门螺旋杆菌的感染与增加患胃癌的风险直接相关 (L. E. Wroblewski et al., *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23: 713; C. Prinz et al., *World J Gastroenterol*, 2006, 12: 5458)，所以在 1994 年，世界卫生组织 (WHO) 明确将其归类为 I 型人类致癌因子 (Lyon: IARC, 1994, 61: 177)。研究表明，幽门螺旋杆菌的感染使患胃癌的风险增加了 2-8 倍 (Helicobacter and Cancer Collaborative Group, *Gut*, 2001, 49: 347; F. Kamangar et al., *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98: 1445)。

目前，针对幽门螺旋杆菌感染的治疗主要是以铋剂或质子泵抑制剂联合使用抗生素的三联或四联疗法。但是，基于抗生素（以克拉霉素为主）的治疗存在许多弊端，长期使用抗生素不仅导致了细菌耐药性的产生 (G. Ayala et al., *World J gastroenterol*, 2014, 20: 1450; N. Vakil, *Cancer J Gastroenterol*, 2003, 17: 30B)，而且基于抗生素的治疗并不能阻止幽门螺杆菌重复感染的风险，因此迫切需要开发新的疗法用于幽门螺杆菌的治疗。而幽门螺杆菌疫苗被认为是控制这一全球性感染疾病最有效的方法 (M. Selgrad et al., *Curr Opin Pharmacol*, 2008, 8: 593)。虽然研究人员已经对抗幽门螺旋杆菌疫苗的研发做出了许多努力，例如 2009 年由尿素酶 B 亚基和不耐热肠毒素 B 亚基组成的融合蛋白疫苗在中国获得许可 (M. Zeng et al., *Lancet*, 2015, 386: 1457)，但迄今为止，尚未有针对幽门螺杆菌感染的疫苗成功上市。脂多糖 (LPS) O-抗原作为幽门螺杆菌细胞表面的主要成分，被认为是极具吸引力的疫苗候选物 (S. Yu et al., *Infection and Immunity*, 2007, 75: 2974; D. Ren et al., *Vaccine*, 2011, 29: 4210)。研究表明发展糖类疫苗抵抗幽门螺旋杆菌的感染是非常合理的，以糖类为基础的缀合疫苗已经成功地用于防止系统性感染和抑制宿主定植 (J. H. Passwell et al., *Infection and Immunity*, 2001, 69: 1351)。然而由于提取得到的脂多糖存在结构不够专一，并且容易附带结构类似杂质的特点，实验重复性差，限制了后续的疫苗治疗方面的应用。因此，开发一种结构专一且可明确化学合成，同时还能够具有优异的抑制幽门螺旋杆菌的效果的疫苗是具有迫切需求的。

## 发明内容

本发明克服糖类结构的结构性能多样性和难以预期性，基于化学合成的手段获得表面糖抗原寡糖，通过氨基连接臂将合成寡糖固定于芯片表面制备合成寡糖芯片，通过动物免疫获得多糖免疫的抗血清，通过合成寡糖芯片对其抗体组成和滴度进行分析，从分子水平分析其免疫表位，探究了各种表面寡糖链与免疫活性的构效关系。为制备、开发预防和治疗幽门螺旋杆菌感染的疫苗提供合成糖抗原。

本发明的第一个目的是提供式(I)所示的含庚糖链的寡糖化合物在制备幽门螺旋杆菌疫苗中的应用,



其中, R 为 H 或者  $\text{CH}_2$ ; \* 为连接位点; a=1~100; b=0~100; c=0~100; 连接臂 Linker

包括氨基连接臂 $-(CH_2)_n-NH_2$ ; n 代表连接臂可以为不同的碳链长度, n=2~40。

在本发明的一种实施方式中，所述含庚糖链的寡糖化合物包含  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-庚糖链；且不含 Lewis 抗原片段。

在本发明的一种实施方式中，a 不可以为 0；b 和 c 可以同时为 0。

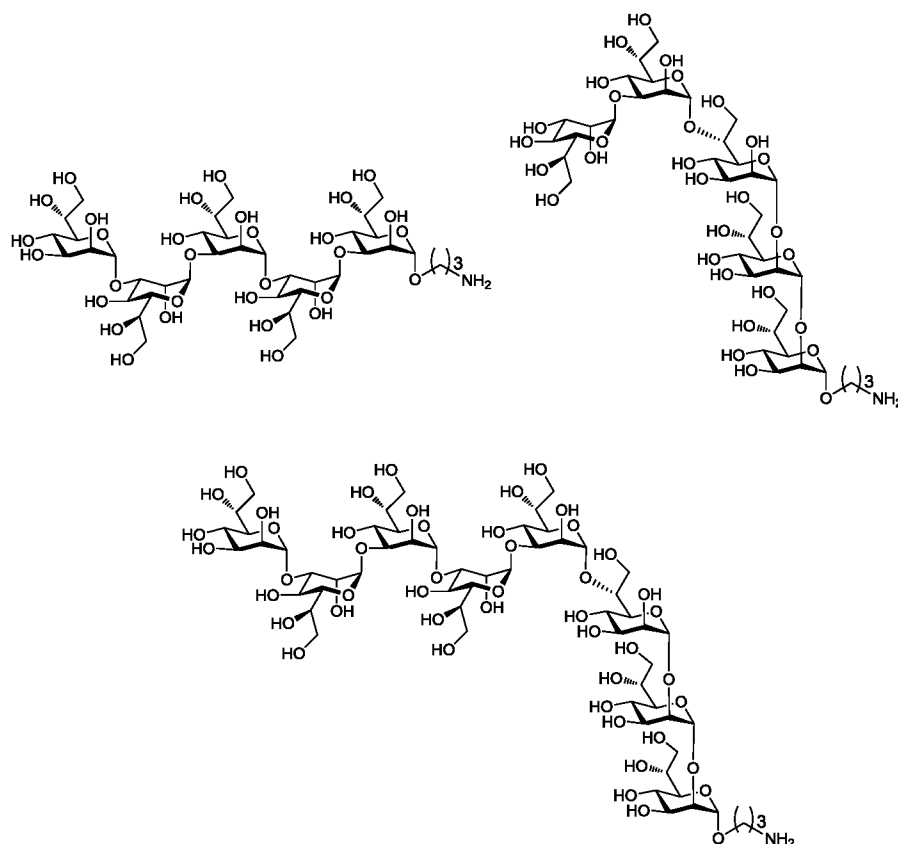
在本发明的一种实施方式中，a 进一步优选 1-5。

在本发明的一种实施方式中，**b** 进一步优选 0-2。

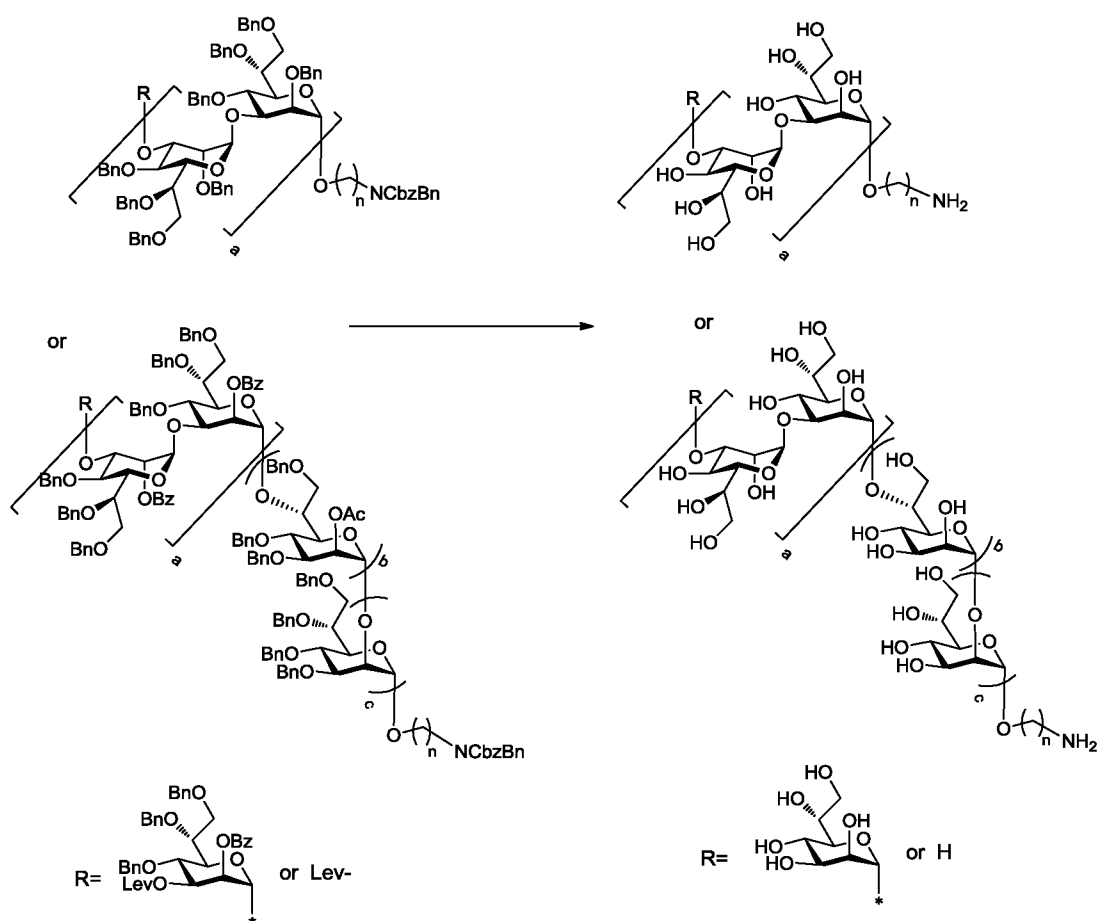
在本发明的一种实施方式中，c 进一步优选 0-2。

在本发明的一种实施方式中，n 进一步优选 2-10。

在本发明的一种实施方式中，所述抗原具体包括如下结构的化合物：



在本发明的一种实施方式中，所述含庚糖链的寡糖化合物的制备方法包括如下步骤：



(1) 将化合物 **I\*** 或者化合物 **II\*** 溶于有机溶剂中, 加入碱试剂进行脱保护, 反应完全后, 即得中间体化合物;

(2) 将步骤 (1) 所得中间体化合物溶于溶剂中, 加入 Pd/C 还原剂, 在氢气条件下进行还原反应, 即得目标化合物 **I** 或 **II**。

在本发明的一种实施方式中, 所述步骤 (1) 中有机溶剂为四氢呋喃、甲醇中任意一种或两种混合。

在本发明的一种实施方式中, 所述步骤 (1) 中有机溶剂优选四氢呋喃、甲醇的混合体系。其中, THF 与 MeOH 的体积比为 1:1。

在本发明的一种实施方式中, 所述步骤 (1) 中碱试剂为有机碱和/或无机碱。有机碱包括甲醇钠, 无机碱包括氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钠、碳酸钾中任意一种或多种。

在本发明的一种实施方式中, 所述步骤 (1) 具体包括如下过程:

将化合物 **I\*** 或者化合物 **II\*** 溶于 THF/MeOH (1:1, v/v, 2.0 mL), 加入 CH<sub>3</sub>ONa, 室温下搅拌 0.5 h, 然后加入 NaOH (aq, 1 M, 200  $\mu$ L), 反应在室温下搅拌 12 h。

在本发明的一种实施方式中, 所述步骤 (1) 包括: 反应完全后, 加入 Amerlite IR 120 (H<sup>+</sup>) 树脂中和反应液 pH 小于 7, 溶液过滤并浓缩, 经硅胶柱层析进行分离纯化。

在本发明的一种实施方式中, 所述步骤 (2) 中溶剂为由 MeOH、THF、H<sub>2</sub>O、AcOH 组成的混合体系。其中 MeOH、THF、H<sub>2</sub>O 与 AcOH 的体积比为 10:5:4:1。

本发明涉及提取纯化幽门螺旋杆菌 O6 型脂多糖免疫新西兰兔, 得到抗血清, 得到了化学合成幽门螺旋杆菌 O6 型寡糖片段的免疫原性结果。

本发明首次完成了提取提纯的不同糖片段的含庚糖链的寡糖化合物, 经过动物免疫实验对幽门螺旋杆菌 O6 型化学合成寡糖片段的免疫活性探究。

本发明还提供了一种用于制备幽门螺旋杆菌疫苗的寡糖芯片, 其特征在于, 所述寡糖芯片是将式 (I) 所示的含庚糖链的寡糖化合物基于其氨基连接臂固定于芯片表面。

本发明通过氨基连接臂将合成寡糖固定于芯片表面, 并利用抗血清中抗体筛选检测寡糖芯片中寡糖片段与免疫原性的关系。结果揭示 O-抗原中庚糖链为重要免疫表位, 如含有庚糖链的五糖化合物 **3**、五糖化合物 **4** 和八糖化合物 **6**, 可被兔血清抗体识别, 但 Lewis 抗原可能对该免疫识别作用有阻断作用, 如含有 Lewis 抗原的十三糖化合物 **7** 不能被抗体识别, 其中庚糖链可作为糖抗原片段用于制备、开发预防和治疗幽门螺旋杆菌的疫苗。

本发明还提供了一种预防和治疗幽门螺旋杆菌的疫苗, 所述疫苗是利用式 (I) 所示的含庚糖链的寡糖化合物作为糖抗原。

### 有益效果:

本发明通过化学方法合成分别得到二糖化合物, 三糖化合物、五糖化合物、八糖化合物、十三糖化合物。合成得到的抗原糖链片段的还原端均组装有氨基连接臂, 合成寡糖固定于芯片表面制备得到合成寡糖芯片。结合动物免疫实验和合成寡糖芯片分析, 利用抗血清中针对多糖产生的抗体进行检测, 探究合成寡糖与免疫原性的关系。结果揭示抗原中庚糖链为重要免疫表位, 如含有庚糖链的五糖 **3**、五糖 **4** 和八糖 **6**, 可被兔血清抗体识别, 但 Lewis 抗原可能对该免疫识别作用有阻断作用, 如含有 Lewis 抗原的十三糖 **7** 不能被抗体识别, 其中庚糖链可作为糖抗原片段用于制备、开发预防和治疗幽门螺旋杆菌的疫苗。

### 附图说明

图 1: 不同抗原寡糖的结构式。

图 2: 全保护的抗原寡糖前体 **1\***、**2\***、**3\***、**4\***、**5\***、**6\***和 **7\***的结构式。

图 3: 提取的幽门螺旋杆菌 O6 型脂多糖  $H^1$  核磁图。

图 4: 提取幽门螺旋杆菌 O6 型脂多糖银染图。

图 5: ELISA 检测兔血清中抗体有效效价。

图 6: 糖芯片检测兔血清: (a)使用抗兔 IgG 的标记 FITC 的二抗检测。糖芯片点样模式如右图所示。1: 三糖 **1**, 点样浓度为 1mM; 2: 四糖 **2**, 点样浓度为 1 mM; 3: 含庚糖链的五糖 **3**, 点样浓度为 1mM; 4: 含庚糖链的五糖 **4**, 点样浓度为 1mM; 5: 只含有 Lewis O-抗原的五糖 **4**, 点样浓度为 1mM; 6: 含庚糖链的八糖 **6**, 点样浓度为 1mM; 7: 含 Lewis O-抗原的十三糖 **7**, 点样浓度为 1mM; 8: 幽门螺旋杆菌 O6 型脂多糖, 点样浓度为 1mg/mL; (b) 定量检测脂多糖免疫组新西兰兔的平均荧光强度。误差线为来自两个不同检测区的 4 个不同点的标准差。

### 具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述, 但是本领域技术人员将会理解, 下列实施例仅用于说明本发明, 而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者, 按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者, 均为可以通过市售购得的常规产品。

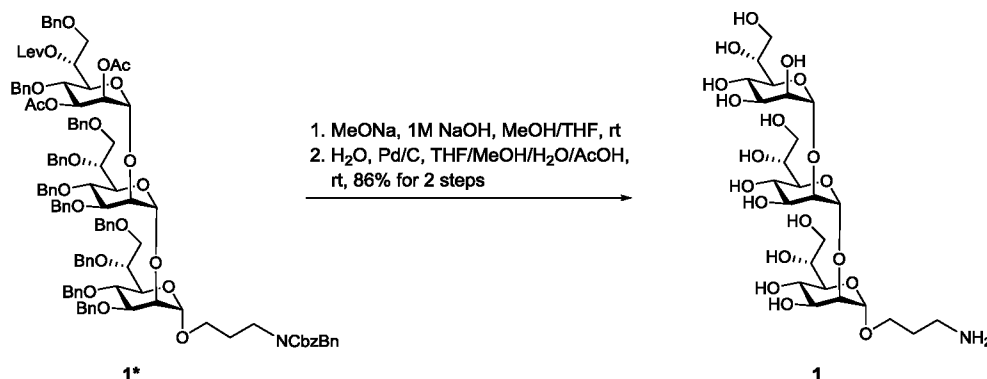
## 实施例 1 抗原寡糖化合物的合成：

抗原寡糖化合物如图 1 所示。

化合物 1、2、3、4、5、6 和 7 的合成，以相应的全保护化合物 1\*、2\*、3\*、4\*、5\*、6\*和 7\*为起始原料（这些化合物可参见专利 CN201910156533.1、CN109776632A 制备得到），在碱性条件下脱除所有的酰基，纯化后利用 10%的 Pd/C 和氢气的作用脱去所有的苄基和苄氧羰基得到全脱保护的目标分子 1、2、3、4、5、6 和 7。

具体试验操作和步骤：

### 化合物 1：

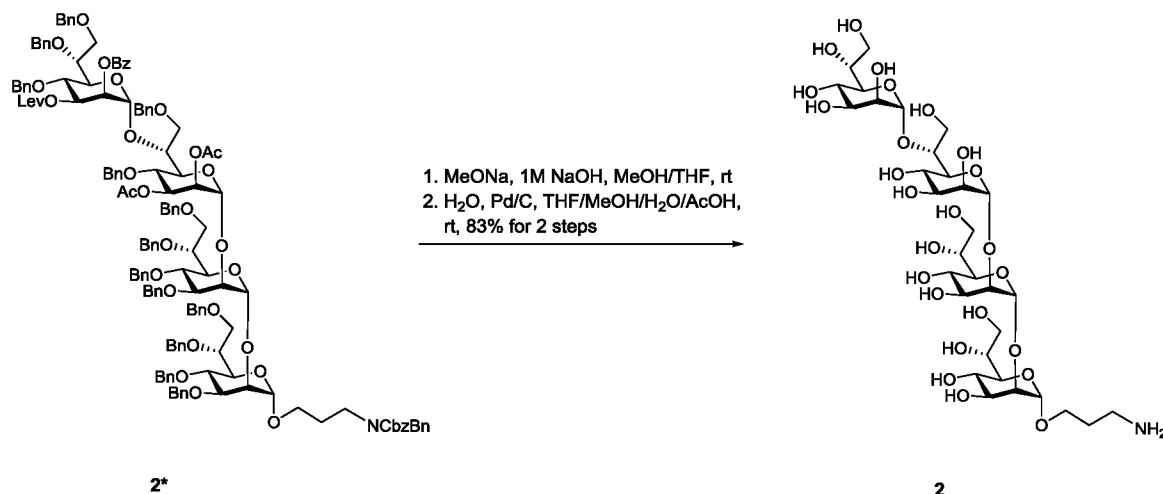


将化合物 1\* (28 mg, 0.0143 mmol) 溶于 THF/MeOH (1:1, v/v, 2.0 mL) 中，加入 CH<sub>3</sub>ONa (20 mg)，室温下搅拌 0.5 h，然后加入 NaOH (aq, 1 M, 100  $\mu$ L)，反应在室温下搅拌 12 h，TLC 检测反应完全后，加入 Amerlite IR 120 (H<sup>+</sup>) 树脂中和反应液 pH 小于 7，溶液过滤并减压浓缩，经硅胶柱层析（二氯甲烷/甲醇:50/1）分离纯化得到中间产物。将上述脱酰基化合物溶于 MeOH/THF/H<sub>2</sub>O/AcOH (10:5:4:1, v/v/v/v, 2 mL) 中，加入 10% Pd/C (50 mg)，反应混合物在氢气 (1 bar) 条件下搅拌 48 h，经飞行时间质谱检测反应完成后，溶液过滤并浓缩，真空干燥，后经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离纯化后得到化合物 1 (8 mg, 86% for two steps)。

<sup>1</sup>H NMR (700 MHz, Deuterium Oxide)  $\delta$  5.22 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, 1-H), 5.05 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, 1-H), 4.93 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, 1-H), 4.00 – 3.93 (m, 5H), 3.85 (dd,  $J$  = 3.3, 1.8 Hz, 1H), 3.82 – 3.74 (m, 5H), 3.73 (dd,  $J$  = 5.6, 3.0 Hz, 1H), 3.72 – 3.66 (m, 5H), 3.66 – 3.62 (m, 3H), 3.59 (dd,  $J$  = 10.0, 2.9 Hz, 1H), 3.57 – 3.49 (m, 2H), 3.12 – 3.00 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.92 (dddd,  $J$  = 15.0, 12.0, 6.1, 3.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>).

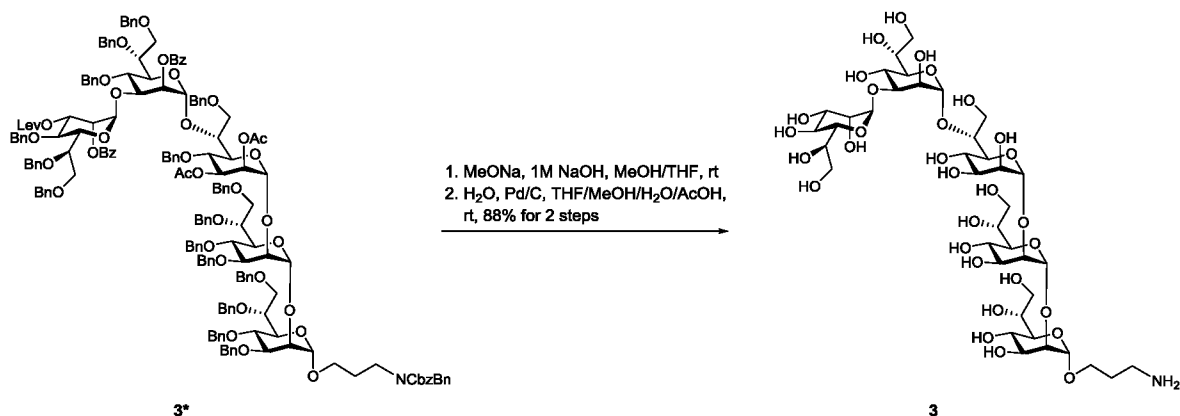
<sup>13</sup>C NMR (176 MHz, Deuterium Oxide)  $\delta$  102.3, 100.5, 98.0, 78.8, 78.6, 74.0, 73.6, 73.3, 71.8, 71.5, 71.4, 70.7, 70.3, 70.1, 69.8, 67.5, 67.4, 67.2, 65.0, 61.7, 61.7, 61.6, 61.5, 37.5, 26.6. HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C<sub>24</sub>H<sub>46</sub>O<sub>19</sub>N [M+H]<sup>+</sup> 652.2659, found 652.2700.

### 化合物 2：



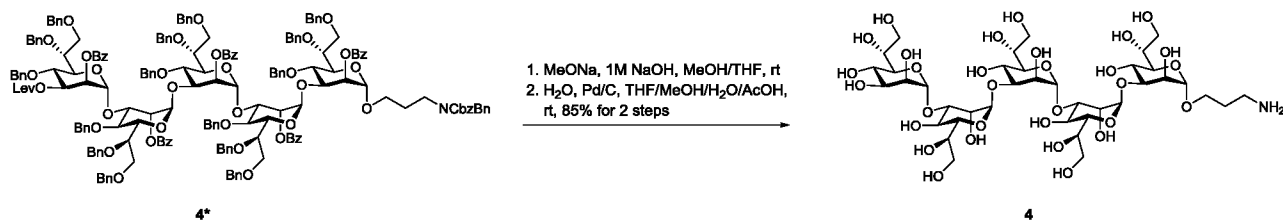
将化合物 **2\*** (30 mg, 0.0119 mmol) 溶于 THF/MeOH (1:1, v/v, 3.0 mL) 中, 加入 CH<sub>3</sub>ONa (20 mg), 室温下搅拌 0.5 h, 然后加入 NaOH (aq, 1 M, 200  $\mu$ L), 反应在室温下搅拌 12 h, TLC 检测反应完全后, 加入 Amerlite IR 120 (H<sup>+</sup>) 树脂中和反应液 pH 小于 7, 溶液过滤并减压浓缩, 经硅胶柱层析 (二氯甲烷/甲醇:50/1) 分离纯化得到半脱保护中间产物。将上述脱酰基化合物溶于 MeOH/THF/H<sub>2</sub>O/AcOH (10:5:4:1, v/v/v/v, 3 mL) 中, 加入 10% 的 Pd/C (60 mg), 反应混合物在氢气 (1 bar) 条件下搅拌 48 h, 经飞行时间质谱检测反应完成后, 溶液过滤并浓缩, 真空干燥, 后经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离纯化后得到化合物 **2** (8.3 mg, 83% for two steps)。<sup>1</sup>H NMR (700 MHz, Deuterium Oxide)  $\delta$  5.17 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H, 1-H), 5.04 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, 1-H), 4.99 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H, 1-H), 4.92 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, 1-H), 4.06 – 3.99 (m, 2H), 3.99 – 3.90 (m, 5H), 3.88 – 3.82 (m, 2H), 3.83 – 3.74 (m, 7H), 3.74 – 3.69 (m, 4H), 3.69 – 3.65 (m, 3H), 3.65 – 3.60 (m, 1H), 3.58 (dd,  $J$  = 10.1, 2.9 Hz, 1H), 3.06 (dddd,  $J$  = 20.3, 15.1, 12.8, 7.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.92 (dq,  $J$  = 14.1, 7.4, 7.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (176 MHz, Deuterium Oxide)  $\delta$  102.7, 100.6, 98.2, 98.0, 79.8, 78.6, 76.4, 74.0, 73.3, 72.7, 72.3, 72.1, 71.5, 71.1, 70.6, 70.6, 70.4, 70.3, 70.0, 69.7, 67.6, 67.5, 67.4, 66.7, 64.9, 62.1, 61.7, 61.4, 60.8, 37.5, 26.7. HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C<sub>31</sub>H<sub>58</sub>O<sub>25</sub>N [M+H]<sup>+</sup> 844.3292, found 844.3335.

### 化合物 3:



将化合物 **3\*** (25 mg, 0.0081 mmol) 溶于 THF/MeOH (1:1, v/v, 2.0 mL) 中, 加入 CH<sub>3</sub>ONa (20 mg), 室温下搅拌 0.5 h, 然后加入 NaOH (aq, 1 M, 200  $\mu$ L), 反应在室温下搅拌 12 h, TLC 检测反应完全后, 加入 Amerlite IR 120 (H<sup>+</sup>) 树脂中和反应液 pH 小于 7, 溶液过滤并减压浓缩, 经硅胶柱层析 (二氯甲烷/甲醇:50/1) 分离纯化得到半脱保护中间产物。将上述脱酰基化合物溶于 MeOH/THF/H<sub>2</sub>O/AcOH (10:5:4:1, v/v/v/v, 2 mL) 中, 加入 10% 的 Pd/C (50 mg), 反应混合物在氢气 (1 bar) 条件下搅拌 48 h, 经飞行时间质谱检测反应完成后, 溶液过滤并浓缩, 真空干燥, 后经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离纯化后得到化合物 **3** (7.4 mg, 88% for two steps)。<sup>1</sup>H NMR (700 MHz, Deuterium Oxide)  $\delta$  5.14 – 5.11 (m, 1H, 1-H), 5.09 – 5.08 (m, 1H, 1-H), 5.07 – 5.06 (m, 1H, 1-H), 5.04 – 5.00 (m, 1H, 1-H), 4.95 – 4.93 (m, 1H, 1-H), 4.12 (t,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 4.03 – 3.95 (m, 12H), 3.92 (dd,  $J$  = 9.3, 3.3 Hz, 1H), 3.90 – 3.87 (m, 2H), 3.84 (d,  $J$  = 9.7 Hz, 1H), 3.83 – 3.79 (m, 3H), 3.79 – 3.68 (m, 12H), 3.68 – 3.60 (m, 5H), 3.59 (dd,  $J$  = 10.0, 2.8 Hz, 1H), 3.57 – 3.49 (m, 3H), 3.05 (tq,  $J$  = 12.9, 7.4, 6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.98 – 1.86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>)。 <sup>13</sup>C NMR (176 MHz, Deuterium Oxide)  $\delta$  102.1, 102.0, 100.5, 99.1, 98.1, 78.7, 78.4, 78.2, 77.4, 74.0, 73.6, 73.3, 73.1, 72.3, 72.1, 71.6, 71.4, 70.7, 70.6, 70.4, 70.1, 69.9, 69.6, 69.6, 67.5, 67.5, 67.4, 66.8, 66.5, 64.9, 62.0, 62.0, 61.7, 61.6, 61.5, 37.5, 26.7. HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C<sub>38</sub>H<sub>70</sub>O<sub>31</sub>N [M+H]<sup>+</sup> 1036.3926, found 1036.3958.

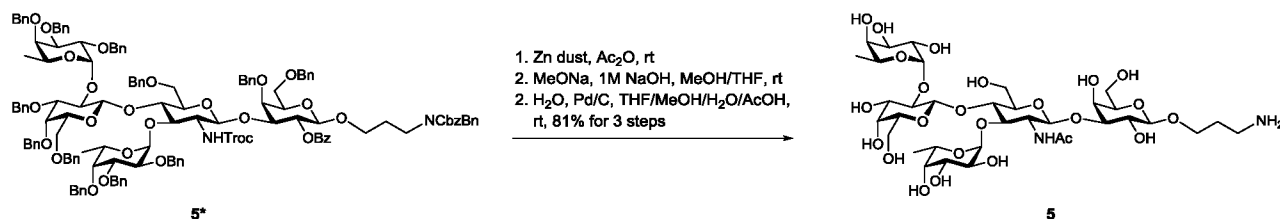
#### 化合物 4:



将化合物 **4\*** (20 mg, 0.0062 mmol) 溶于 THF/MeOH (1:1, v/v, 2.0 mL) 中, 加入 CH<sub>3</sub>ONa (15 mg), 室温下搅拌 0.5 h, 然后加入 NaOH (aq, 1 M, 100  $\mu$ L), 反应在室温下搅拌 12 h,

TLC 检测反应完全后, 加入 Amerlite IR 120 ( $H^+$ ) 树脂中和反应液 pH 小于 7, 溶液过滤并减压浓缩, 经硅胶柱层析 (二氯甲烷/甲醇:50/1) 分离纯化得到半脱保护中间产物。将上述脱酰基化合物溶于 MeOH/THF/H<sub>2</sub>O/AcOH (10:5:4:1, v/v/v/v, 2 mL) 中, 加入 10% 的 Pd/C (40 mg), 反应混合物在氢气 (1 bar) 条件下搅拌 48 h, 经飞行时间质谱检测反应完成后, 溶液过滤并浓缩, 真空干燥, 后经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离纯化后得到化合物 **4** (5.9 mg, 85% for two steps)。<sup>1</sup>H NMR (700 MHz, Deuterium Oxide)  $\delta$  5.05 (s, 1H, 1-H), 5.03 (s, 2H, 1-H), 5.02 (s, 1H, 1-H), 4.77 (s, 1H, 1-H), 4.17 (d,  $J = 3.6$  Hz, 2H), 4.04 (s, 1H), 3.99 (qd,  $J = 7.1, 3.5$  Hz, 5H), 3.93 – 3.87 (m, 3H), 3.86 – 3.71 (m, 13H), 3.71 – 3.61 (m, 7H), 3.59 – 3.50 (m, 2H), 3.14 – 2.98 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.92 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>)。 <sup>13</sup>C NMR (176 MHz, Deuterium Oxide)  $\delta$  102.2, 102.1, 102.1, 102.0, 99.6, 78.1, 77.9, 77.9, 77.8, 73.9 (d,  $J = 2.0$  Hz), 73.8, 73.8, 73.1, 71.5, 71.4, 71.3, 70.6, 69.9, 69.4, 69.4, 67.4, 66.8, 66.7, 66.7, 64.9, 61.6, 61.5, 37.5, 26.6. HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C<sub>38</sub>H<sub>70</sub>O<sub>31</sub>N [M+H]<sup>+</sup> 1036.3926, found 1036.3911.

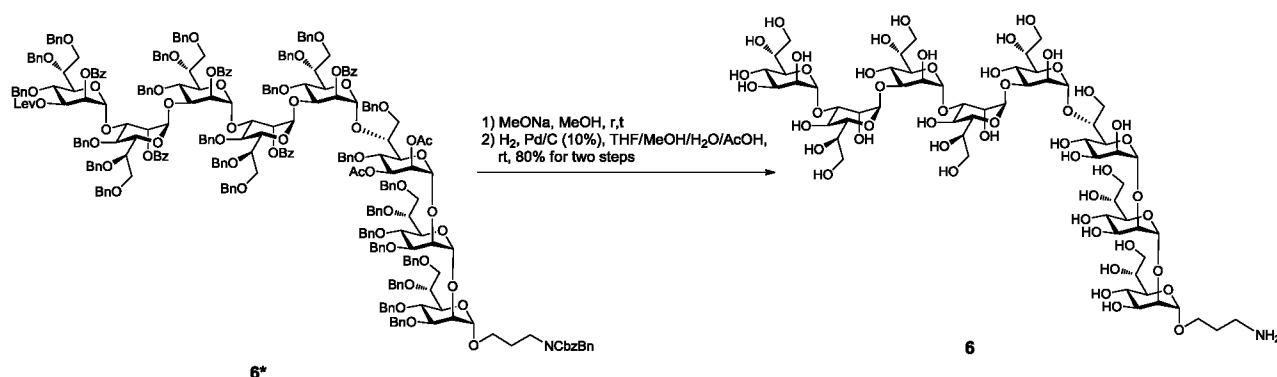
#### 化合物 5:



将化合物 **5\*** (12 mg, 0.0049 mmol) 溶于 Ac<sub>2</sub>O (1 mL) 中, 加入新活化的锌粉 (50 mg), 反应在室温下搅拌 15 h, TLC 检测原料消失后, 溶液过滤并减压浓缩, 真空干燥得到 NAc 中间产物。将上述中间产物溶于 THF/MeOH (1:1, v/v, 1 mL) 中, 加入 CH<sub>3</sub>ONa (10 mg), 室温下搅拌 0.5 h, 然后加入 NaOH (aq, 1 M, 100  $\mu$ L), 反应在室温下搅拌 12 h, TLC 检测反应完全后, 加入 Amerlite IR 120 ( $H^+$ ) 树脂中和反应液 pH 小于 7, 溶液过滤并减压浓缩, 硅胶柱层析 (二氯甲烷/甲醇: 50/1) 分离纯化得到中间产物。将上述脱酰基化合物溶于 MeOH/THF/H<sub>2</sub>O/AcOH (10:5:4:1, 1 mL) 中, 加入 10% 的 Pd/C (40 mg), 反应混合物在氢气 (1 bar) 条件下搅拌 48 h, 经飞行时间质谱检测反应完成后, 溶液过滤并浓缩, 真空干燥, 后经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离纯化后得到化合物 **5** (3.6 mg, 81% for three steps)。<sup>1</sup>H NMR (700 MHz, Deuterium Oxide)  $\delta$  5.20 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H, 1-H), 5.04 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H, 1-H), 4.80 (q,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 4.65 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.44 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.33 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.18 (q,  $J = 6.7$  Hz, 1H), 4.09 – 4.04 (m, 1H), 3.97 (dt,  $J = 11.3, 6.4$  Hz, 1H), 3.93 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H), 3.91 – 3.83 (m, 3H), 3.79 (dq,  $J = 12.5, 6.0, 4.6$  Hz, 3H), 3.76 – 3.68 (m, 6H), 3.67 – 3.58 (m,

5H), 3.58 – 3.51 (m, 4H), 3.49 (t,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 3.38 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 3.08 (h,  $J = 6.2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 1.92 (dt,  $J = 13.2, 6.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.19 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Fucose-CH<sub>3</sub>), 1.16 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Fucose-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (176 MHz, Deuterium Oxide)  $\delta$  174.7, 102.9, 102.4, 100.2, 99.4, 98.6, 82.3, 76.4, 75.4, 74.8, 74.7, 73.5, 73.0, 71.9, 71.7, 69.7, 69.7, 69.1, 68.7, 68.3, 68.2, 67.9, 67.7, 66.9, 66.8, 61.5, 61.4, 60.9, 59.8, 37.6, 26.8, 22.3, 15.4 (d,  $J = 2.4$  Hz). HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C<sub>35</sub>H<sub>63</sub>O<sub>24</sub>N<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 895.3765, found 895.3766.

### 化合物 6:



将化合物 **6\*** (20 mg, 4.2  $\mu$ mol) 溶于 THF/MeOH (1:1, 2 mL) 中, 加入 MeONa (50 mg), 室温下搅拌 0.5 h, 然后加入 NaOH (aq, 1 M, 100  $\mu$ L), 反应在室温下搅拌 12 h, TLC 检测反应完全后, 加入 Amerlite IR 120 (H<sup>+</sup>) 树脂中和反应液 pH 小于 7, 溶液过滤并减压浓缩, 经硅胶柱层析 (二氯甲烷/甲醇:50/1) 分离纯化得到中间产物。将上述脱酰基化合物溶于 MeOH/THF/H<sub>2</sub>O/AcOH (10:5:4:1, v/v/v/v, 2 mL) 中, 加入 10% 的 Pd/C (40 mg), 反应混合物在氢气 (1 bar) 条件下搅拌 48 h, 经飞行时间质谱检测反应完成后, 溶液过滤并浓缩, 真空干燥, 后经 Sephadex LH20 凝胶柱分离纯化后得到化合物 **6** (5.4 mg, 80% for two steps)。  
<sup>1</sup>H NMR (700 MHz, Deuterium Oxide)  $\delta$  5.13 (s, 1H, 1-H), 5.09 (s, 1H, 1-H), 5.04 (d,  $J = 2.0$  Hz, 2H, 1-H), 5.03 (s, 3H, 1-H), 5.02 (s, 1H, 1-H), 4.94 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, 1-H), 4.17 (p,  $J = 1.9$  Hz, 4H), 4.12 (t,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 3.98 (dt,  $J = 10.2, 3.5$  Hz, 16H), 3.90 (ddd,  $J = 13.9, 8.9, 2.9$  Hz, 8H), 3.85 – 3.72 (m, 23H), 3.72 – 3.68 (m, 3H), 3.68 – 3.61 (m, 8H), 3.60 (dd,  $J = 9.6, 6.7$  Hz, 1H), 3.58 – 3.56 (m, 1H), 3.56 – 3.50 (m, 3H), 3.03 (ddt,  $J = 14.7, 12.7, 6.5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.96 – 1.86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (176 MHz, Deuterium Oxide)  $\delta$  102.2, 102.1, 100.5, 98.1, 78.6, 78.2, 78.0, 77.8, 77.7, 73.9, 73.8, 73.7, 73.3, 73.2, 72.4, 72.1, 71.6, 71.4, 71.3, 70.7, 70.6, 70.4, 70.2, 69.9, 69.6, 69.5, 68.1, 67.5, 67.4, 66.8, 66.7, 65.0, 62.0, 61.7, 61.6, 61.5, 61.4, 37.5, 26.9, 25.3. HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C<sub>59</sub>H<sub>106</sub>O<sub>49</sub>N [M+H]<sup>+</sup> 1612.5828, found 1612.5831.

### 化合物 7:

将化合物 **7\*** (9 mg, 0.0014 mmol) 溶于 AcOH (1 mL) 中, 加入新活化的锌粉 (50 mg), 反应在室温下搅拌 12 h, TLC 检测原料消失后, 溶液过滤并减压浓缩, 然后加入适量的 DCM 稀释, 饱和 NaHCO<sub>3</sub> 洗涤, 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 溶液过滤后减压浓缩, 真空干燥得到 NAc 中间产物。将上述中间产物溶于 THF/MeOH (1:1, 1 mL) 中, 加入 MeONa (10 mg), 室温下搅拌 15 min, 然后加入 NaOH (aq, 1 M, 100  $\mu$ L), 反应在室温下搅拌 12 h, TLC 检测反应完全后, 加入 Amerlite IR 120 (H<sup>+</sup>) 树脂中和反应液 pH 达到 7, 溶液过滤并减压浓缩, 硅胶柱层析 (二氯甲烷/甲醇: 50/1) 分离纯化得到中间产物。将上述脱酰基化合物溶于 MeOH/THF/H<sub>2</sub>O/AcOH (10:5:4:1, 1 mL) 中, 加入 10% Pd/C (40 mg), 反应混合物在氢气 (1 bar) 条件下搅拌 24 h, 经飞行时间质谱检测反应完成后, 溶液过滤并浓缩, 真空干燥, 后经 Sephadex LH20 凝胶柱分离纯化后得到化合物 **7** (3 mg, 82% for three steps)。<sup>1</sup>H NMR (700 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  = 5.20 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 1H, anomeric H), 5.13 (s, 1H, anomeric H), 5.10 (s, 1H, anomeric H), 5.09 (s, 1H, anomeric H), 5.06-5.01 (m, 5H, anomeric H), 4.95 (s, 1H, anomeric H), 4.82-4.78 (m, 1H), 4.65 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, anomeric H), 4.44 (dd,  $J$  = 7.8, 4.1 Hz, 2H), 4.21-4.14 (m, 6H), 4.12 (s, 1H), 4.06 (s, 1H), 3.99 (t,  $J$  = 9.7 Hz, 10H), 3.95-3.86 (m, 8H), 3.86-3.68 (m, 37H), 3.64 (dt,  $J$  = 21.4, 9.9 Hz, 14H), 3.60-3.50 (m, 5H), 3.41-3.36 (m, 1H), 3.11-3.01 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 1.94-1.89 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.19 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, Fucose-CH<sub>3</sub>), 1.16 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, Fucose-CH<sub>3</sub>)。 <sup>13</sup>C NMR (176 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  = 158.8, 102.6 (anomeric), 102.1 (anomeric), 102.04 (anomeric), 101.99 (anomeric), 101.9 (anomeric), 101.7 (anomeric), 101.2 (anomeric), 100.5 (anomeric), 100.2 (anomeric), 99.4 (anomeric), 99.2 (anomeric), 98.5 (anomeric), 98.1 (anomeric), 82.1, 79.7, 79.0, 78.6, 78.6, 78.2, 77.9, 77.8, 76.3, 75.4, 74.8, 74.8, 74.0, 73.9, 73.8, 73.7, 73.5, 73.2, 73.1, 72.1, 71.9, 71.7, 71.5, 71.39, 71.36, 71.3, 70.6, 70.4, 70.1, 69.9, 69.7, 69.5, 69.45, 69.44, 69.41, 69.1, 68.7, 68.4, 68.3, 67.75, 67.68, 67.5, 67.46, 66.9, 66.81, 66.77, 66.7, 66.68, 66.67, 66.0, 65.9, 65.7, 64.9, 62.05, 62.0, 61.73, 61.69, 61.6, 61.5, 61.47, 61.46, 61.0, 59.8, 37.5, 26.6, 22.3, 15.4. HR-ESI-MS ( $m/z$ ): calcd for C<sub>91</sub>H<sub>160</sub>O<sub>72</sub>N<sub>2</sub> [M+2H]<sup>2+</sup> 1216.4455, found 1216.4287; C<sub>91</sub>H<sub>160</sub>O<sub>72</sub>N<sub>2</sub>K [M+2H+K]<sup>3+</sup> 823.9514, found 823.9442.

## 实施例 2: 幽门螺旋杆菌 O6 型的培养、灭活和脂多糖的提取

进行幽门螺旋杆菌 O6 型的培养时, 幽门螺旋杆菌 O6 型先在 37°C, 气体环境为 7% CO<sub>2</sub> 的条件下在血琼脂平板上培养 72 小时, 再转移到布鲁氏肉汤培养基 (ELITE-MEDIA) 中在 37°C, 气体环境为 7% CO<sub>2</sub> 的条件下培养 72 小时, 得到菌液。

进行幽门螺旋杆菌 O6 型的灭活时, 在  $1.7 \times 10^{11}$  CFU/mL, 50mL 的菌液中加入 5mL 4% 的多聚甲醛使得终浓度为 0.4%, 37℃ 下孵育 72 小时。离心收集菌体, 并用 PBS (pH 7.4) 洗涤两次, 最后用 PBS (pH 7.4) 稀释为  $5 \times 10^{12}$  CFU/mL, 保存在 4℃。

幽门螺旋杆菌 O6 型脂多糖使用酚水法提取: 离心收集菌体, 用磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.4) 洗涤菌体两次, 沉淀称取湿重。用菌体湿重的 3 倍质量的无菌水重悬, 得到菌悬液, 将菌悬液在反复冻融 5 次。与等体积 90% 苯酚混合, 恒温水浴震荡后, 将混合液冷却至 4℃, 离心吸取上层水相, 再加入等体积无菌水, 恒温水浴震荡后, 冷却至 4℃, 离心吸取上清。合并两次上清用蒸馏水透析, 至氯化铁检验无紫色, 冻干保存。

冻干 LPS 粉末溶于 Tris-HCl (100mmol, pH 8.0) 加入终浓度为 100μg/ml DNase I 和 50μg/ml RNase A, 37℃ 过夜消化后加入 100μg/ml 蛋白酶 K, 作用 2h 后, 100℃ 沸水煮 10min 使酶失活, 冷却至 4℃, 离心收集上清。在上清中加入水饱和酚混匀, 再次离心取上清液进行透析, 冻干。在冻干粉中加入无水乙醇至终浓度为 85%, -20℃ 过夜沉淀, 离心后弃掉上清, 沉淀冻干称重。得到的冻干粉经过  $^1\text{H}$  核磁检测 (图 2), 有碳链上多糖的特征峰, 在化学位移 1.95 处, 有氮乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 的特征峰, 在化学位移 1.18 处, 有岩藻糖 (Fucose-CH<sub>3</sub>) 的特征峰。提取的脂多糖经 SDS-PAGE 电泳、银染 (图 3 和 4) 可见纯度较好, 得到脂多糖的平均分子量多数分布在 29KDa 以下。

幽门螺旋杆菌 O:6 血清型脂多糖的免疫实验:

1.8-2.2 kg 的新西兰兔分为两组, 3 只实验组, 3 只对照组。第 0 天, 实验组一新西兰兔经皮下多点免疫注射 500μL 脂多糖与弗式完全佐剂 1:1 混合乳液; 对照组小鼠注射 500μL PBS 与弗式完全佐剂 1:1 混合乳液。第 14, 28 天, 使用弗式不完全佐剂代替弗式完全佐剂进行加强免疫。实验组一新西兰兔每只每次注射抗原量相当于 400μg 脂多糖抗原。取第 35 天新西兰兔血清进行 ELISA 检测。

幽门螺旋杆菌 O:6 血清型脂多糖抗血清的 ELISA 检测:

用 0.05 M CBS 缓冲液 (pH 9.6) 将 LPS 稀释成 20 μg/mL 后包被 ELISA 孔板, 100 μL/孔, 4℃ 包被 24 h, 使用 PBST (含 0.1% tween-20 的 PBS) 洗涤三次, 拍干。在包被好的 ELISA 孔板中按照 300 μL/孔加入封闭液 (含 5% 脱脂牛奶的 PBST), 封板膜封板, 25℃ 封闭 6 h; 弃封闭液, PBST 洗涤三次, 拍干。将 100 μL/孔用 1% BSA-PBS (w/v) 稀释的不同梯度的兔血清加入到已包被好的孔板中。37℃ 孵育 2 h, PBST 洗涤四次, 拍干。分别以 1:50000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗, 100 μL/孔, 37℃ 孵育 1 h, PBST 洗涤四次, 拍干。37℃ 下用 200 μL/孔的 TMB 显色液避光孵育, 显色后立即用 50 μL/孔的 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止。测

定 450 nm 处吸光度。得到如图 5 中的抗体效价。选取抗体效价最高的兔血清用于糖芯片筛选。在 ELISA 检测中，我们发现注射了幽门螺旋杆菌 O6 型 LPS 的新西兰兔的血清，能够与提取的 LPS 结合，并且血清中抗体有效效价达到 1:10000。

### 实施例 3：寡糖化合物在制备幽门螺旋杆菌疫苗中应用

寡糖化合物与 CRM-197 的糖蛋白缀合物的制备：

在双（己二酸对硝基苯酯）（PNP, 26.33 mg, 67.8  $\mu\text{mol}$ ）的 DMSO/吡啶溶液（1:1, 25 mL: 0.25 mL）中加入三乙胺（12  $\mu\text{L}$ , 86  $\mu\text{mol}$ ）室温搅拌 5 分钟。滴加溶于 DMSO/吡啶（1/1, 0.1 mL: 0.1 mL）的寡糖化合物（1.6 mg, 2.26  $\mu\text{mol}$ ），室温搅拌反应 7 小时，TLC 检测显示原料完全反应，sugar stain（0.1%（v/v）3-甲氧基苯酚，2.5%（v/v）硫酸-乙醇）显示有产物。冻干反应混合物。冻干固体使用氯仿（1 mL）洗 6 次，得到寡糖-PNP 酯。CRM<sub>197</sub> 蛋白（1 mg, 0.017  $\mu\text{mol}$ ）在超滤管中使用灭菌水（400  $\mu\text{L}$ ）洗 3 次，再使用磷酸盐溶液（pH 8.0, 400  $\mu\text{L}$ ）洗 1 次。清洗后的 CRM<sub>197</sub> 蛋白加入寡糖-PNP 酯中，室温搅拌 24 小时，反应后混合物使用灭菌水和磷酸盐溶液清洗，得到糖蛋白缀合物。使用 MALDI-TOF/TOF-MS 和 SDS-PAGE 鉴定得到的糖蛋白缀合物。

糖缀合物免疫实验：8 只六周大的 Balb/c 小鼠分为两组，5 只实验组，3 只对照组。第 0 天，实验组小鼠经皮下免疫注射 100  $\mu\text{L}$  糖缀合物与弗式完全佐剂 1:1 混合乳液；对照组小鼠注射 100  $\mu\text{L}$  PBS 与弗式完全佐剂 1:1 混合乳液。第 14、28 天，使用弗式不完全佐剂代替弗式完全佐剂进行加强免疫。实验组小鼠每只每次注射抗原量相当于 4  $\mu\text{g}$  糖抗原。取第 0，7，14，21，35 天小鼠血清进行芯片检测。

寡糖芯片的构建与测试：

将化学合成的寡糖抗原通过氨基连接臂固定在芯片表面，将抗血清与寡糖芯片孵育，再与二抗孵育。

在芯片扫描仪下，可得到寡糖片段与抗体结合的荧光。通过该方式，能够定量寡糖片段与血清中抗体结合的强弱，节约化学合成的寡糖的量和抗血清，并能清楚的反应结果。

以寡糖芯片应用于免疫原性研究中的抗血清中抗体的检测过程：

具体包括以下步骤：

（1）将活化的氨基玻片使用生物芯片点样仪进行点样。点样完成后在 26  $^{\circ}\text{C}$ , 55 %湿度的条件下孵育过夜。

（2）随后将玻片浸泡在溶液 B（50 nM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 100 nM 乙醇胺的水溶液）中，50  $^{\circ}\text{C}$ ,

1 小时。玻片使用超纯水洗 3 次，离心除去残留的水。

(3) 使用 3% BSA(w/v) 的 PBS 溶液, 4 °C 封闭过夜。使用 PBST (含 0.1 % tween 的 PBS) 清洗 1 次, PBS 清洗两次, 离心甩干。

(4) 玻片装入 16 孔孵育器中(ProPlate)。每孔加入 1: 50 稀释于 1% BSA (w/v) 的 PBS 溶液的小鼠血清样品 120 $\mu$ L, 37°C 湿盒中避光孵育 1 小时。移除样品, 使用 150 $\mu$ L PBST 洗 3 次。

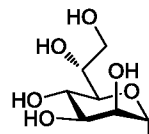
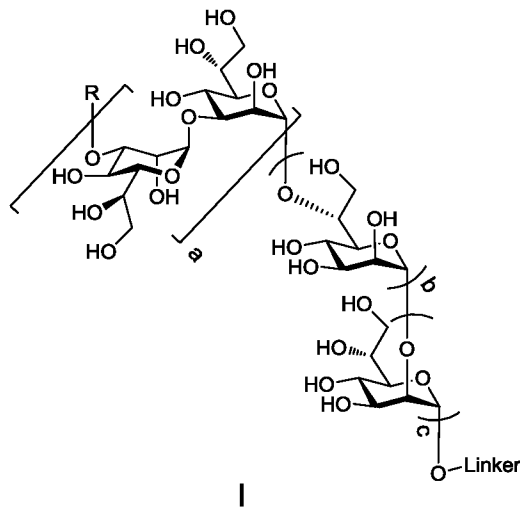
(5) 加入 1: 400 稀释于 1% BSA (w/v) 的 PBS 溶液的二抗, 在湿盒中, 37°C 避光孵育 45 分钟。移除二抗溶液, 使用 150 $\mu$ L PBST 洗 3 次。拆除 16 孔孵育器, 使用超纯水清洗, 再使用超纯水清洗 15 分钟。离心去除残余的水。使用芯片扫描仪扫描。

幽门螺旋杆菌 O:6 血清型合成寡糖片段的免疫原性检测:

将 NHS 玻片 (SurModics, DN01-0025) 使用生物芯片点样仪 (江苏瑞明生物科技有限公司) 进行点样。点样完成后在 26 °C, 55 %湿度的条件下孵育过夜。随后将玻片浸泡在溶液 B (50 nM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 nM 乙醇胺的水溶液) 中, 50 °C, 1 小时。玻片使用超纯水洗 3 次, 离心除去残留的水。使用 3% BSA (w/v) 的 PBS 溶液, 4 °C 封闭过夜。使用 PBST (含 0.1 % tween 的 PBS) 清洗 1 次, PBS 清洗两次, 离心甩干。玻片装入 16 孔孵育器中(ProPlate)。每孔加入 1: 50 稀释于 1% BSA (w/v) 的 PBS 溶液的小鼠血清样品 120 $\mu$ L, 37°C 湿盒中避光孵育 1 小时。移除样品, 使用 150 $\mu$ L PBST 洗 3 次, 加入 1: 400 稀释于 1% BSA (w/v) 的 PBS 溶液的二抗, 在湿盒中, 37°C 避光孵育 45 分钟。移除二抗溶液, 使用 150 $\mu$ L PBST 洗 3 次。拆除 16 孔孵育器, 使用超纯水清洗, 再使用超纯水清洗 15 分钟。离心去除残余的水。使用芯片扫描仪扫描。得到如图 6 结果: 五糖 3、五糖 4 和八糖 6 的荧光强度较强。根据该结果可知, 针对幽门螺旋杆菌 O:6 血清型提纯的多糖产生的血清抗体对含有  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-庚糖链的片段 (五糖 3、五糖 4、八糖 6) 有明显强烈的识别和结合, 但是却不识别 Lewis 结构 5 和同样含有  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-庚糖链的十三糖 7, 可见 Lewis 结构应当会阻碍抗体对庚糖的免疫识别。因此  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-庚糖链是重要的免疫表位, 可作为半合成糖疫苗的重要抗原物质。

## 权 利 要 求 书

1、通式 (I) 所示的含庚糖链的寡糖化合物在制备幽门螺旋杆菌疫苗中的应用，



其中, R 为 H 或者

\*; \*为连接位点; a=1~100; b=0~100; c=0~100; 连接臂 Linker 包括氨基连接臂  $-(CH_2)_n-NH_2$ ; n 代表连接臂可以为不同的碳链长度, n=2~40。

2、根据权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, a 为 1-5。

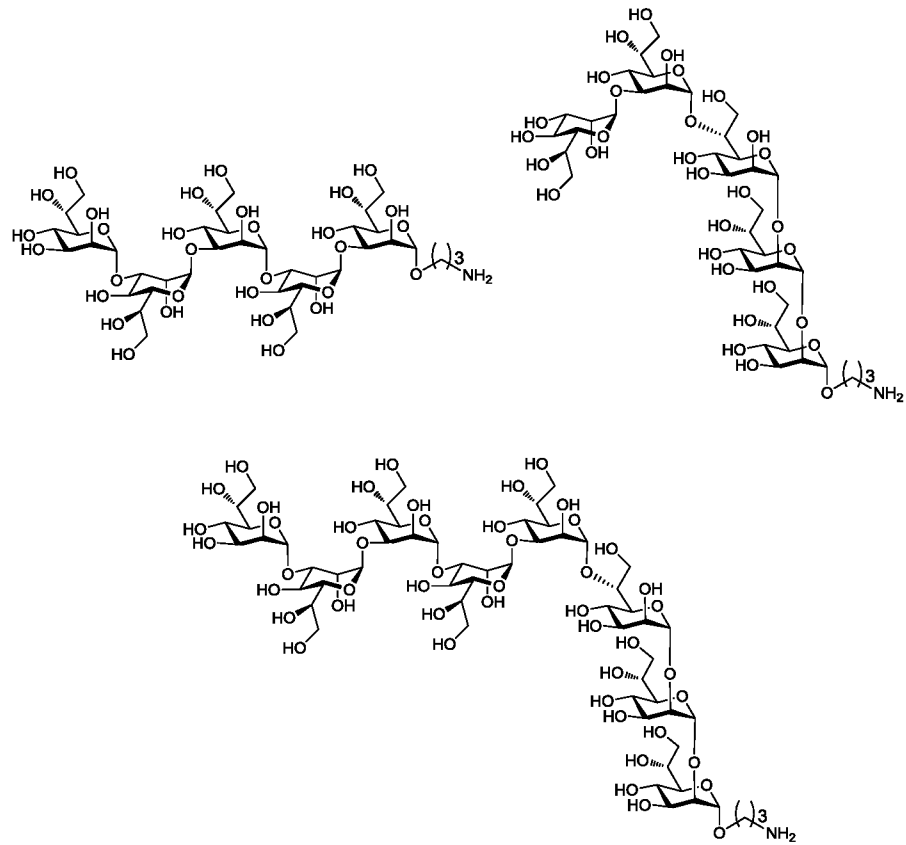
3、根据权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, b 为 0-2。

4、根据权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, c 为 0-2。

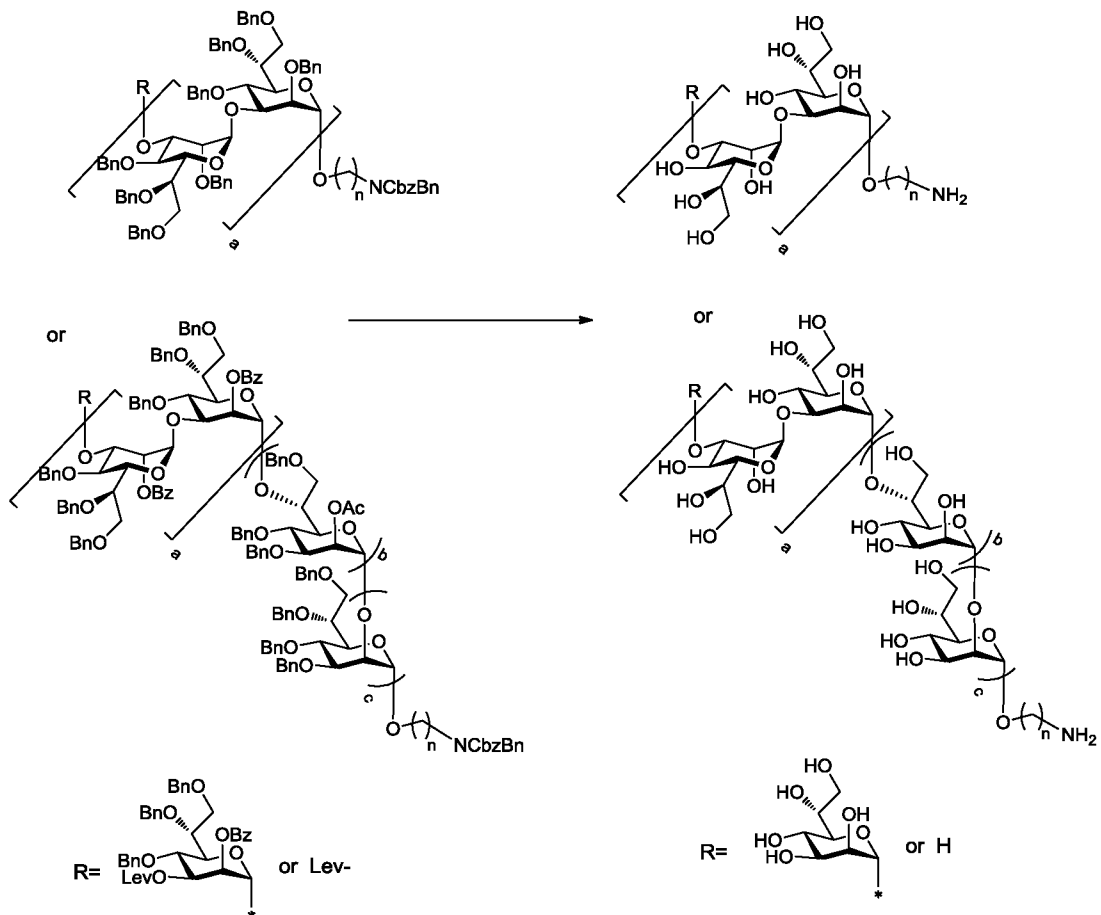
5、根据权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, n 为 2-10。

6、根据权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, 所述含庚糖链的寡糖化合物包含  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-庚糖链。

7、根据权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, 所述含庚糖链的寡糖化合物具体包括如下结构所示的化合物:



8、根据权利要求 1-7 任一所述的应用，其特征在于，所述含庚糖链的寡糖化合物的合成过程如下所示：



9、一种用于制备幽门螺旋杆菌疫苗的寡糖芯片，其特征在于，所述寡糖芯片是将权利要求 1-7 任一项中定义的含庚糖链的寡糖化合物通过结构中的氨基连接臂固定于芯片表面。

10、一种用于预防和治疗幽门螺旋杆菌感染的疫苗，所述疫苗是利用权利要求 1-7 任一项中定义的含庚糖链的寡糖化合物作为糖抗原。



图 1

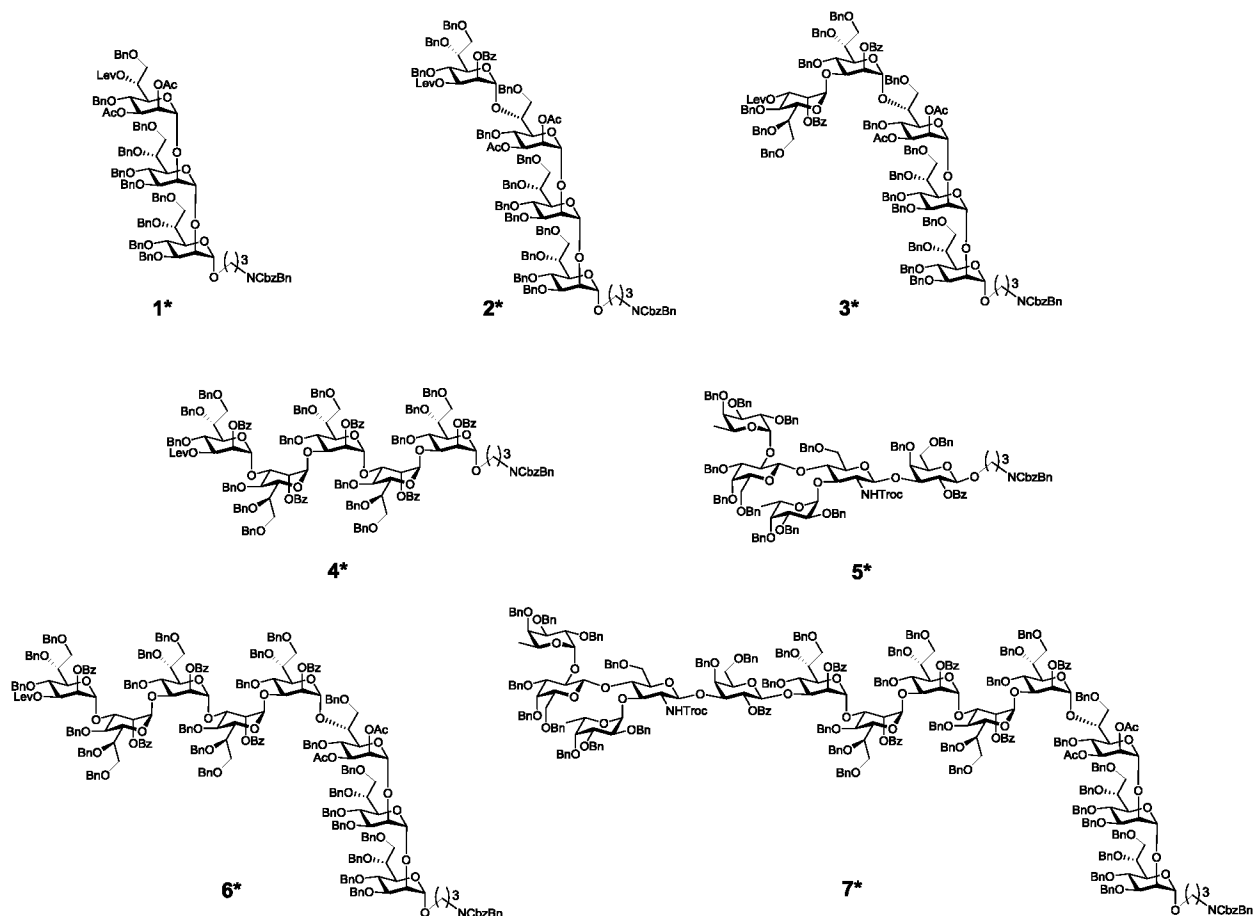


图 2

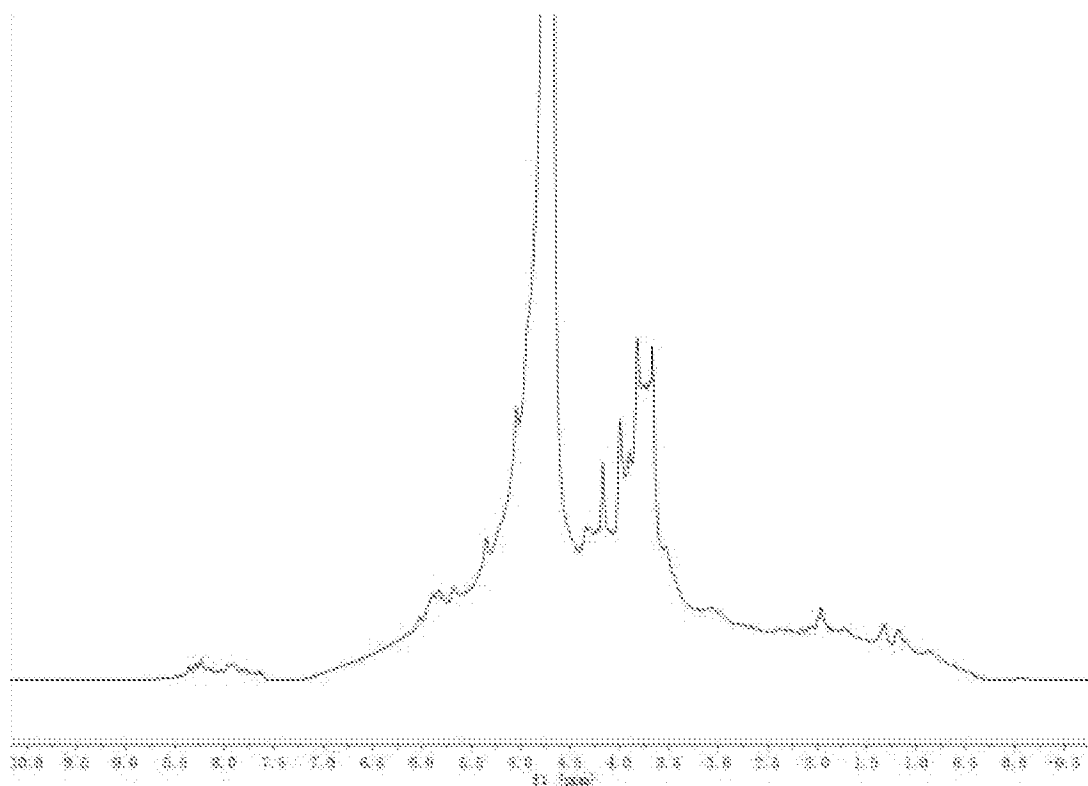


图 3

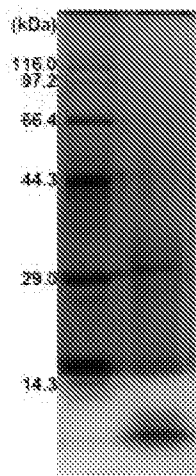


图 4

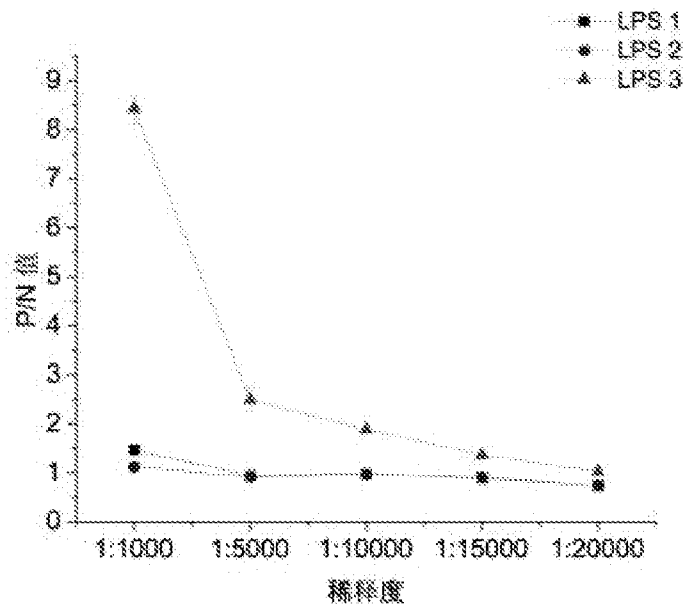


图 5

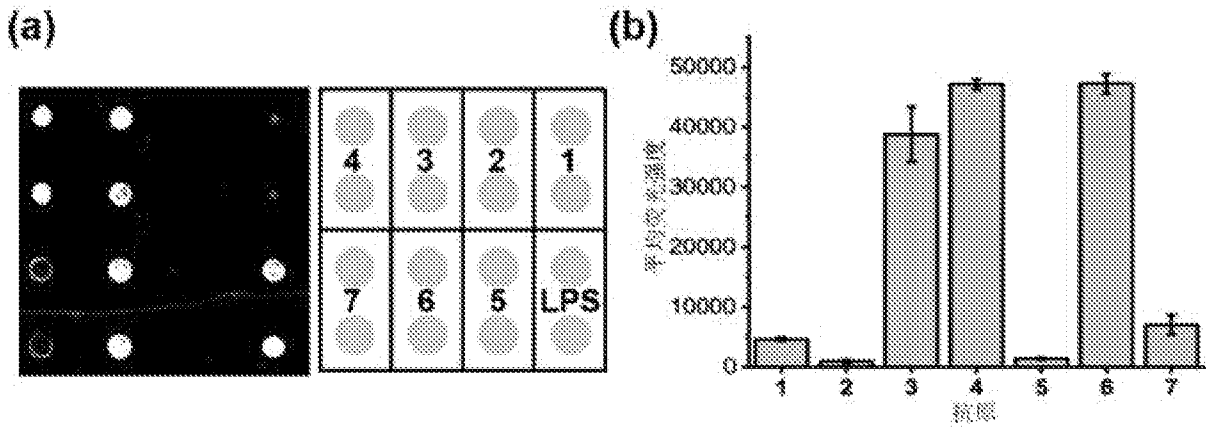


图 6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/097646

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61K 31/785(2006.01)i; C07H 1/00(2006.01)i; C07H 3/06(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; A61P 1/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; C07H; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

VEN, CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, PUBMED-CHEM, BING, STN, 百度学术, 读秀: 江南大学, 尹健, 胡静, 刘中华, 秦春君, 幽门螺旋杆菌, 庚糖, 七碳糖, 庚酮糖, 疫苗, heptose, heptoglycan+, heptulose, ketoheptose, helicobacter pylori, vaccine

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                   | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | CN 109776632 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 21 May 2019 (2019-05-21)<br>description paragraphs 43-52, 62-67, 73, figure 7                                                                                                                                                   | 1-10                  |
| PX        | TIAN Guangzong et al., "Chemical Synthesis and Immunological Evaluation of Helicobacter pylori Serotype O6 Tridecasaccharide O-Antigen Containing a DD-Heptoglycan,"<br><i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> , Vol. 59, No. 32, 03 May 2020 (2020-05-03),<br>pp. 13362-13370 | 1-10                  |
| A         | CN 109776634 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 21 May 2019 (2019-05-21)<br>entire document                                                                                                                                                                                     | 1-10                  |
| A         | CN 107955082 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 24 April 2018 (2018-04-24)<br>entire document                                                                                                                                                                                   | 1-10                  |
| A         | CN 110545840 A (EYEGENE INC.) 06 December 2019 (2019-12-06)<br>entire document                                                                                                                                                                                       | 1-10                  |
| A         | WO 2013178622 A1 (LABORATOIRE BIODIM) 05 December 2013 (2013-12-05)<br>entire document                                                                                                                                                                               | 1-10                  |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 December 2020

Date of mailing of the international search report

13 January 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/  
CN)  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing  
100088  
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/097646

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                    | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | 顾锐 等 (GU, Rui et al.). "糖芯片的制备和检测应用研究进展 (Research Progress on Fabrication and Detection Application of Carbohydrate Microarray)"<br><i>生物技术进展 (Current Biotechnology)</i> , Vol. 8, No. 6, 31 December 2018 (2018-12-31),<br>pp. 489-499                                                                              | 1-10                  |
| A         | ALTMAN Eleonora et al., "Occurrence of a nontypable <i>Helicobacter pylori</i> strain lacking Lewis blood group O antigens and DD-heptoglycan: evidence for the role of the core $\alpha$ 1, 6-glucan chain in colonization,"<br><i>Glycobiology</i> , Vol. 13, No. 11, 31 December 2003 (2003-12-31),<br>pp. 777-783 | 1-10                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2020/097646**

| Patent document<br>cited in search report |            |    | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) |            |    | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|------------|----|--------------------------------------|-------------------------|------------|----|--------------------------------------|
| CN                                        | 109776632  | A  | 21 May 2019                          | WO                      | 2020177234 | A1 | 10 September 2020                    |
| CN                                        | 109776634  | A  | 21 May 2019                          | WO                      | 2020155519 | A1 | 06 August 2020                       |
| CN                                        | 107955082  | A  | 24 April 2018                        | WO                      | 2019113889 | A1 | 20 June 2019                         |
|                                           |            |    |                                      | CN                      | 107955082  | B  | 10 May 2019                          |
| CN                                        | 110545840  | A  | 06 December 2019                     | EP                      | 3533463    | A1 | 04 September 2019                    |
|                                           |            |    |                                      | US                      | 2019290749 | A1 | 26 September 2019                    |
|                                           |            |    |                                      | EP                      | 3533463    | A4 | 17 June 2020                         |
|                                           |            |    |                                      | WO                      | 2018080252 | A1 | 03 May 2018                          |
|                                           |            |    |                                      | AU                      | 2017351899 | A1 | 06 June 2019                         |
|                                           |            |    |                                      | JP                      | 2020500213 | A  | 09 January 2020                      |
| WO                                        | 2013178622 | A1 | 05 December 2013                     | EP                      | 2669288    | A1 | 04 December 2013                     |

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/097646

| <b>A. 主题的分类</b><br>A61K 31/785(2006.01)i; C07H 1/00(2006.01)i; C07H 3/06(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; A61P 1/04(2006.01)i<br>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                    |                                    |      |                   |         |   |                                                                                |      |    |                                                                                                                                                                                                                                                    |      |   |                                                           |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                           |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------|-------------------|---------|---|--------------------------------------------------------------------------------|------|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|---|-----------------------------------------------------------|------|---|-----------------------------------------------------------|------|---|-------------------------------------------------------------|------|---|---------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>B. 检索领域</b><br>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)<br>A61K; C07H; A61P<br>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献<br>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))<br>VEN, CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, PUBMED-CHEM, BING, STN, 百度学术, 读秀, 江南大学, 尹健, 胡静, 刘中华, 秦春君, 幽门螺旋杆菌, 庚糖, 七碳糖, 庚酮糖, 疫苗, heptose, heptoglycan+, heptulose, ketoheptose, helicobacter pylori, vaccine                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                    |                                    |      |                   |         |   |                                                                                |      |    |                                                                                                                                                                                                                                                    |      |   |                                                           |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                           |      |
| <b>C. 相关文件</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 109776632 A (江南大学) 2019年 5月 21日 (2019 - 05 - 21)<br/>说明书第43-52、62-67、73段, 图7</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>TIAN Guangzong等, . "Chemical Synthesis and Immunological Evaluation of Helicobacter pylori Serotype 06 Tridecasaccharide O-Antigen Containing a DD-Heptoglycan, " Angew. Chem. Int. Ed., , 第59卷, 第32期, 2020年 5月 3日 (2020 - 05 - 03), 第13362-13370页</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 109776634 A (江南大学) 2019年 5月 21日 (2019 - 05 - 21)<br/>全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107955082 A (江南大学) 2018年 4月 24日 (2018 - 04 - 24)<br/>全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110545840 A (艾金株式会社) 2019年 12月 6日 (2019 - 12 - 06)<br/>全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2013178622 A1 (LABORATOIRE BIODIM) 2013年 12月 5日 (2013 - 12 - 05)<br/>全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table> |                                                                                                                                                                                                                                                    |                                    | 类 型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求 | X | CN 109776632 A (江南大学) 2019年 5月 21日 (2019 - 05 - 21)<br>说明书第43-52、62-67、73段, 图7 | 1-10 | PX | TIAN Guangzong等, . "Chemical Synthesis and Immunological Evaluation of Helicobacter pylori Serotype 06 Tridecasaccharide O-Antigen Containing a DD-Heptoglycan, " Angew. Chem. Int. Ed., , 第59卷, 第32期, 2020年 5月 3日 (2020 - 05 - 03), 第13362-13370页 | 1-10 | A | CN 109776634 A (江南大学) 2019年 5月 21日 (2019 - 05 - 21)<br>全文 | 1-10 | A | CN 107955082 A (江南大学) 2018年 4月 24日 (2018 - 04 - 24)<br>全文 | 1-10 | A | CN 110545840 A (艾金株式会社) 2019年 12月 6日 (2019 - 12 - 06)<br>全文 | 1-10 | A | WO 2013178622 A1 (LABORATOIRE BIODIM) 2013年 12月 5日 (2013 - 12 - 05)<br>全文 | 1-10 |
| 类 型*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                                                                                                                                                                                                  | 相关的权利要求                            |      |                   |         |   |                                                                                |      |    |                                                                                                                                                                                                                                                    |      |   |                                                           |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                           |      |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | CN 109776632 A (江南大学) 2019年 5月 21日 (2019 - 05 - 21)<br>说明书第43-52、62-67、73段, 图7                                                                                                                                                                     | 1-10                               |      |                   |         |   |                                                                                |      |    |                                                                                                                                                                                                                                                    |      |   |                                                           |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                           |      |
| PX                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | TIAN Guangzong等, . "Chemical Synthesis and Immunological Evaluation of Helicobacter pylori Serotype 06 Tridecasaccharide O-Antigen Containing a DD-Heptoglycan, " Angew. Chem. Int. Ed., , 第59卷, 第32期, 2020年 5月 3日 (2020 - 05 - 03), 第13362-13370页 | 1-10                               |      |                   |         |   |                                                                                |      |    |                                                                                                                                                                                                                                                    |      |   |                                                           |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                           |      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | CN 109776634 A (江南大学) 2019年 5月 21日 (2019 - 05 - 21)<br>全文                                                                                                                                                                                          | 1-10                               |      |                   |         |   |                                                                                |      |    |                                                                                                                                                                                                                                                    |      |   |                                                           |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                           |      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | CN 107955082 A (江南大学) 2018年 4月 24日 (2018 - 04 - 24)<br>全文                                                                                                                                                                                          | 1-10                               |      |                   |         |   |                                                                                |      |    |                                                                                                                                                                                                                                                    |      |   |                                                           |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                           |      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | CN 110545840 A (艾金株式会社) 2019年 12月 6日 (2019 - 12 - 06)<br>全文                                                                                                                                                                                        | 1-10                               |      |                   |         |   |                                                                                |      |    |                                                                                                                                                                                                                                                    |      |   |                                                           |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                           |      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | WO 2013178622 A1 (LABORATOIRE BIODIM) 2013年 12月 5日 (2013 - 12 - 05)<br>全文                                                                                                                                                                          | 1-10                               |      |                   |         |   |                                                                                |      |    |                                                                                                                                                                                                                                                    |      |   |                                                           |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                           |      |
| <input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                    |                                    |      |                   |         |   |                                                                                |      |    |                                                                                                                                                                                                                                                    |      |   |                                                           |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                           |      |
| * 引用文件的具体类型:<br>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件<br>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利<br>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)<br>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件<br>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件<br>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件<br>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性<br>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性<br>"&" 同族专利的文件                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                    |                                    |      |                   |         |   |                                                                                |      |    |                                                                                                                                                                                                                                                    |      |   |                                                           |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                           |      |
| 国际检索实际完成的日期<br>2020年 12月 15日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                    | 国际检索报告邮寄日期<br>2021年 1月 13日         |      |                   |         |   |                                                                                |      |    |                                                                                                                                                                                                                                                    |      |   |                                                           |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                           |      |
| ISA/CN的名称和邮寄地址<br>中国国家知识产权局(ISA/CN)<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088<br>传真号 (86-10)62019451                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                    | 授权官员<br>万光<br>电话号码 (86-10)53961859 |      |                   |         |   |                                                                                |      |    |                                                                                                                                                                                                                                                    |      |   |                                                           |      |   |                                                           |      |   |                                                             |      |   |                                                                           |      |

| C. 相关文件 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |         |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 类 型*    | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 相关的权利要求 |
| A       | 顾锐等, . "糖芯片的制备和检测应用研究进展, "<br>生物技术进展, , 第8卷, 第6期, 2018年 12月 31日 (2018 - 12 - 31),<br>第489-499页                                                                                                                                                                                                        | 1-10    |
| A       | ALTMAN Eleonora等, . "Occurrence of a nontypable Helicobacter pylori strain<br>lacking Lewis blood group O antigens and DD-heptoglycan: evidence for the<br>role of the core $\alpha$ 1, 6-glucan chain in colonization, "<br>Glycobiology, , 第13卷, 第11期, 2003年 12月 31日 (2003 - 12 - 31),<br>第777-783页 | 1-10    |

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/097646

| 检索报告引用的专利文件 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|------------|----|----------------|------|------------|----|----------------|
| CN          | 109776632  | A  | 2019年 5月 21日   | WO   | 2020177234 | A1 | 2020年 9月 10日   |
| CN          | 109776634  | A  | 2019年 5月 21日   | WO   | 2020155519 | A1 | 2020年 8月 6日    |
| CN          | 107955082  | A  | 2018年 4月 24日   | WO   | 2019113889 | A1 | 2019年 6月 20日   |
|             |            |    |                | CN   | 107955082  | B  | 2019年 5月 10日   |
| CN          | 110545840  | A  | 2019年 12月 6日   | EP   | 3533463    | A1 | 2019年 9月 4日    |
|             |            |    |                | US   | 2019290749 | A1 | 2019年 9月 26日   |
|             |            |    |                | EP   | 3533463    | A4 | 2020年 6月 17日   |
|             |            |    |                | WO   | 2018080252 | A1 | 2018年 5月 3日    |
|             |            |    |                | AU   | 2017351899 | A1 | 2019年 6月 6日    |
|             |            |    |                | JP   | 2020500213 | A  | 2020年 1月 9日    |
| WO          | 2013178622 | A1 | 2013年 12月 5日   | EP   | 2669288    | A1 | 2013年 12月 4日   |