

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5555230号  
(P5555230)

(45) 発行日 平成26年7月23日(2014.7.23)

(24) 登録日 平成26年6月6日(2014.6.6)

(51) Int. Cl.

C07H 5/06 (2006.01)  
 C07C 327/32 (2006.01)  
 C07D 207/404 (2006.01)  
 A61K 39/00 (2006.01)  
 A61K 39/39 (2006.01)

F 1

C07H 5/06  
 C07C 327/32  
 C07D 207/404 C S P  
 A61K 39/00 H  
 A61K 39/39

請求項の数 20 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-520030 (P2011-520030)  
 (86) (22) 出願日 平成21年7月21日 (2009.7.21)  
 (65) 公表番号 特表2011-528710 (P2011-528710A)  
 (43) 公表日 平成23年11月24日 (2011.11.24)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2009/004206  
 (87) 國際公開番号 WO2010/011284  
 (87) 國際公開日 平成22年1月28日 (2010.1.28)  
 審査請求日 平成24年7月20日 (2012.7.20)  
 (31) 優先権主張番号 61/208, 155  
 (32) 優先日 平成21年2月20日 (2009.2.20)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 61/135, 493  
 (32) 優先日 平成20年7月21日 (2008.7.21)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 503146324  
 ザ ブリガム アンド ウィメンズ ホスピタル インコーポレイテッド  
 The Brigham and Women's Hospital, Inc.  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン フランシス ストリート 75  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

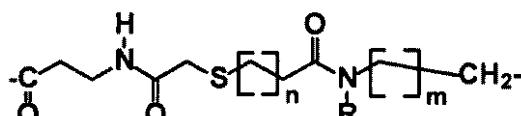
(54) 【発明の名称】  $\beta$ -1, 6-グルコサミンオリゴ糖を合成するための方法および組成物

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

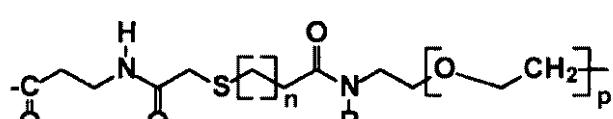
以下:

## 【化 3 9】



式VIIIa または

10



式VIIIb

(式中、nは、1より大きく、mは、1~10から選択される整数であり、pは1~20から選択される数字であり、そしてRはHまたはアルキル基である)

20

であるリンカーを介して担体に結合させられたオリゴ糖を含むオリゴ糖 - 担体結合体を含む組成物であって、ここで、

該リンカーは、該オリゴ糖の酸素原子に、末端  $\text{CH}_2$  基を介して連結され、該リンカーは、アミド結合によって該担体中のアミノ基に、末端  $\text{CO}$  基を介して連結され、そして該組成物は、免疫応答を刺激することができる、組成物。

【請求項 2】

(a) 薬学的に許容される担体、

(b) アジュバント、または

(c) 抗菌剤

をさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

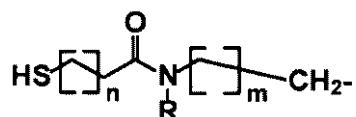
10

【請求項 3】

オリゴ糖 - 担体結合体を合成するための方法であって、

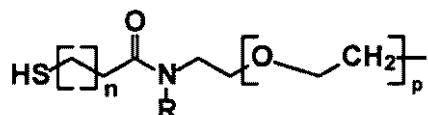
式 IXa または IXb のリンカー：

【化 4 0】



式 IXa

20



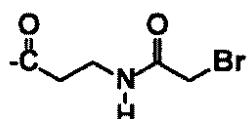
式 IXb

(式中、n は、1 より大きく、m は、1 ~ 10 から選択される整数であり、p は 1 ~ 20 から選択される数字であり、そして R は H またはアルキル基である)

30

に結合させられたオリゴ糖を、担体（該担体中の末端アミノ基が式 X

【化 4 1 - 1】

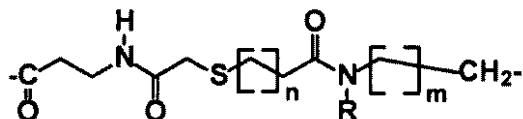


式 X

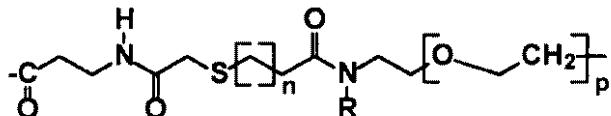
の化合物の結合により修飾される)と反応させて、式 V III a または V III b の構造

40

## 【化41-2】



式VIIIa



式VIIIb

10

(式中、nは、1より大きく、mは、1～10から選択される整数であり、pは1～20から選択される数字であり、そしてRはHまたはアルキル基である)

を有しているリンカーによって担体化合物に結合させられたオリゴ糖を生じさせる工程を含む、方法。

## 【請求項4】

20

前記オリゴ糖-担体結合体が、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、または100:1の担体に対するオリゴ糖の比を有する、請求項1に記載の組成物、または請求項3に記載の方法。

## 【請求項5】

前記担体が、

- (a) ペプチド、
- (b) タンパク質、または
- (c) 破傷風トキソイド

である、請求項1に記載の組成物、または請求項3に記載の方法。

30

## 【請求項6】

前記オリゴ糖が

- (a) -1-6結合グルコサミン
- (b) 2～20個の単量体の長さである、-1-6結合グルコサミン
- (c) 5～11個の単量体の長さである、-1-6結合グルコサミン
- (d) 7個、9個、または11個の単量体の長さである、-1-6結合グルコサミン、または
- (e) 0～40%がアセチル化された、-1-6結合グルコサミン

である、請求項1に記載の組成物、または請求項3に記載の方法。

## 【請求項7】

40

医薬としての使用のための、請求項1～2、または4～6のいずれか一項に記載の組成物、あるいは請求項3～6のいずれか一項に記載の方法により合成されたオリゴ糖-担体結合体。

## 【請求項8】

請求項7に記載の使用のための組成物またはオリゴ糖-担体結合体であって、

- (a) アジュvant、または
- (b) 抗菌剤

とともに使用される、組成物またはオリゴ糖-担体結合体。

## 【請求項9】

ポリN-アセチルグルコサミンを産生する細菌種によって引き起こされる感染を有する

50

か、または発症するリスクがある被験体において、感染の処置または予防に使用するための、請求項 1～2、または 4～6 のいずれか一項に記載の組成物、あるいは請求項 3～6 のいずれか一項に記載の方法により合成されたオリゴ糖 - 担体結合体。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の使用のための組成物またはオリゴ糖 - 担体結合体であって、前記感染は、

(a) *Staphylococcus* 感染  
 (b) *Staphylococcus aureus* 感染  
 (c) *Staphylococcus epidermidis* 感染、あるいは  
 (d) *E. coli* 感染、*Y. pestis* 感染、*Y. enterocolitica* 感染 10  
 、*Y. pseudotuberculosis* 感染、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 感染、*Actinobacillus pleuropneumoniae* 感染、*Bordetella pertussis* 感染、*B. parapertussis* 感染、*B. bronchiseptica* 感染、アシネトバクター感染、バークホルデリア感染、*Stenatrophomonas maltophilia* 感染、赤痢菌感染、またはクレブシエラ感染  
 である、組成物またはオリゴ糖 - 担体結合体。

【請求項 11】

請求項 9 に記載の使用のための組成物またはオリゴ糖 - 担体結合体であって、前記被験体は、

(a) *Staphylococcus* に曝されるリスクがある被験体、または  
 (b) *Staphylococcus* に曝された被験体  
 である、組成物またはオリゴ糖 - 担体結合体。

【請求項 12】

請求項 9 に記載の使用のための組成物またはオリゴ糖 - 担体結合体であって、前記被験体は、

(a) ヒト、または  
 (b) 非ヒト

である、組成物またはオリゴ糖 - 担体結合体。

【請求項 13】

請求項 9 に記載の使用のための組成物またはオリゴ糖 - 担体結合体であって、アジュバントとともに使用される、組成物またはオリゴ糖 - 担体結合体。

【請求項 14】

抗体を产生する細胞を得る方法であって、該方法は、

ポリ N - アセチルグルコサミン に特異的な抗体を产生するために有効な量の、請求項 1～2、または 4～6 のいずれか一項に記載の組成物、あるいは請求項 3～6 のいずれか一項に記載の方法により合成されたオリゴ糖 - 担体結合体を、非ヒト被験体に投与する工程、および

該非ヒト被験体から抗体を产生する細胞を採取する工程  
 を含み、該方法は、手術または治療によって動物の身体を処置する方法ではない、方法。 40

【請求項 15】

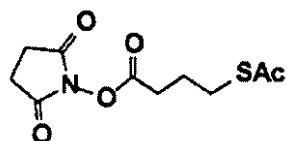
抗体を产生する方法であって、該方法は、

請求項 14 に記載の方法にしたがって、抗体を产生する細胞を得る工程、  
 前記非ヒト被験体由来の抗体を产生する細胞を骨髄腫細胞に融合させる工程、および  
 融合体のサブクローニングから產生された抗体を採取する工程  
 を含む、方法。

【請求項 16】

式 I I I の化合物または式 I V の化合物

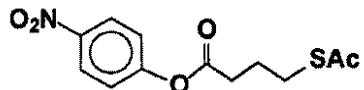
【化42】



式III

式III (スクシンイミジル4-アセチルスルファニルブチラート) 10

【化43】



式IV

式IV (パラ-ニトロフェニル4-アセチルスルファニルブチラート) 20

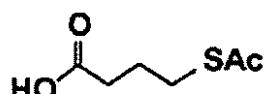
であって、式中、Acはアセチル基である、式IIIの化合物または式IVの化合物。

【請求項17】

スクシンイミジル4-アセチルスルファニルブチラート(式III)またはパラ-ニトロフェニル4-アセチルスルファニルブチラート(式IV)を合成するための方法であつて、

4-アセチルスルファニル酪酸(式V)：

【化44】



30

式V

(式中、Acはアセチル基である)：

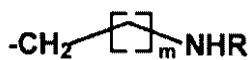
を、スクシンイミジルトリフルオロアセテート(CF<sub>3</sub>COOSu)またはパラ-ニトロフェニルトリフルオロアセテート(CF<sub>3</sub>COOpNp)と反応させて、それぞれ、スクシンイミジル4-アセチルスルファニルブチラート(式III)またはパラ-ニトロフェニル4-アセチルスルファニルブチラート(式IV)を生じさせる工程を含む、方法。

【請求項18】

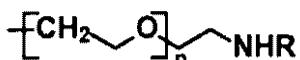
担体に結合させられたオリゴ糖を合成するための方法であつて、

該オリゴ糖を、最初に、式VaまたはVbの構造：

【化45】



式Va



式Vb

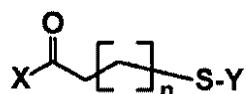
(式中、mは、1~10より選択される数字であり、pは1~20から選択される数字であり、そしてRはHまたはアルキル基である)を有する化合物と、

2番目に、式Iの化合物：

40

50

【化 4 6】

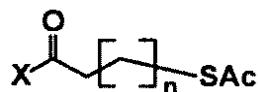


式

(式中、Xは任意の原子または基であり、Yは硫黄保護基であり、そしてnは1より大きい)；

### 式 II の化合物：

### 【化 4 7 - 1】

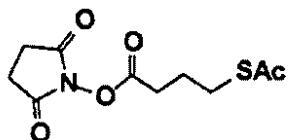


## 式II

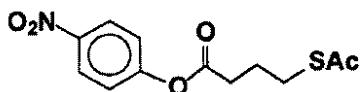
(式中、Xは任意の原子または基であり、nは1より大きく、そしてAcはアセチル基である)；

式 I I I の化合物、または式 I V の化合物

### 【化 4 7 - 2】



### 式III



#### 式IV

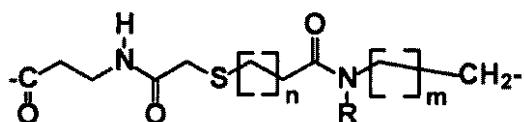
と、そして

### 3番目に、担体と

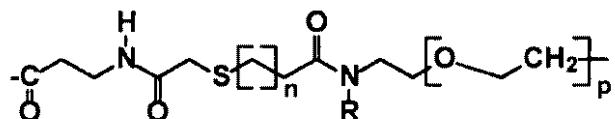
反応させる工程を含み、ここで、該オリゴ糖は  
ここで、該担体に結合させられたオリゴ糖は、

### - 1 - 6 結合グルコサミンであり、

【化47-3】



式VIIIa または



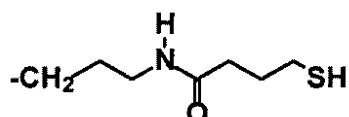
10

式VIIIb

(式中、nは、1より大きく、mは、1～10から選択される整数であり、pは1～20から選択される数字であり、そしてRはHまたはアルキル基である)  
であるリンカーを介して担体に結合させられたオリゴ糖を含む、方法。

【請求項19】

O結合リンカーを持つオリゴ糖を含む組成物であって、ここで、前記リンカーが  
【化48】



式VI.

を含み、該オリゴ糖は、結合グルコサミンである、組成物。

【請求項20】

30

前記結合グルコサミンは、

- (a) -1-6結合グルコサミンであるか、
- (b) 2～20個の単量体の長さである、-1-6結合グルコサミンであるか、
- (c) 5～11個の単量体の長さである、-1-6結合グルコサミンであるか、
- (d) 7個、9個、または11個の単量体の長さである、-1-6結合グルコサミンであるか、
- (e) 7個、9個、または11個の単量体の長さであり、100%がアセチル化された、-1-6結合グルコサミンであるか、
- (f) 7個、9個、または11個の単量体の長さであり、50%未満がアセチル化された、-1-6結合グルコサミンであるか、
- (g) 2～20個の単量体の長さであるか、
- (h) 5～11個の単量体の長さであるか、
- (i) 7個、9個、または11個の単量体の長さであるか、
- (j) 7個、9個、または11個の単量体の長さであり、100%がアセチル化されているか、または
- (k) 7個、9個、または11個の単量体の長さであり、50%未満がアセチル化されている、請求項19に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

50

## (関連出願への相互参照)

本願は、2008年7月21日に出願された米国仮特許出願第61/135,493号、および2009年2月20日に出願された米国仮特許出願第61/208,155号の利益を主張し、これらの米国仮特許出願の全体の内容は、本明細書中に参考として援用される。

## 【0002】

## 政府支援

本願は、米国国立衛生研究所R01AI046706からの助成金により一部が支援された。合衆国政府は、本発明に権利を有する。

## 【0003】

10

## 発明の分野

本発明は、合成のオリゴ- - (1-6) - 2 - アミノ - 2 - デオキシ - D - グルコピラノシド（これは、本明細書中では、オリゴ- - (1-6) - D - グルコサミンまたはオリゴグルコサミンと互換的に呼ばれる）に関する組成物および方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0004】

## 発明の背景

ブドウ球菌は、ヒトの皮膚および粘膜に常在し、コロニーをつくるグラム陽性細菌である。皮膚または粘膜が外科的処置あるいは他の外傷により損傷を受けると、ブドウ球菌は内部組織への接近手段を獲得し得、これは感染を起こす原因となり得る。ブドウ球菌が局所的に増殖するか、あるいはリンパ系または血液系に侵入すると、ブドウ球菌血症に付随する感染性の合併症のような重篤な感染性の合併症が起こり得る。これらの合併症としては、敗血性ショック、心内膜炎、関節炎、骨髄炎、肺炎、および様々な臓器の膿瘍が挙げられる。

20

## 【0005】

ブドウ球菌には、遊離のコアグラーーゼを生産するコアグラーーゼ陽性菌と、遊離のコアグラーーゼを生産しないコアグラーーゼ陰性菌の両方が含まれる。 *Staphylococcus aureus* は、ブドウ球菌の最も一般的なコアグラーーゼ陽性形態である。 *S. aureus* は一般的には、血管外または血管内のいずれかの局所部位で感染を引き起こし、最終的には、菌血症を生じ得る。 *S. aureus* はまた、急性骨髄炎の主要原因でもあり、ブドウ球菌性肺炎感染の原因となる。さらに、 *S. aureus* は、細菌性髄膜炎の症例のおよそ 1% ~ 9% を、そして脳膿瘍の原因の 10% ~ 15% を占める。

30

## 【0006】

少なくとも 31 種のコアグラーーゼ陰性ブドウ球菌が知られており、これには、 *S. epidermidis*、 *S. saprophyticus*、 *S. hominis*、 *S. warneri*、 *S. haemolyticus*、 *S. saprophiticus*、 *S. cohnii*、 *S. xylosus*、 *S. simulans*、および *S. capititis* が含まれる。 *S. epidermidis* は、静脈内投与デバイスに関係して最も頻繁に起こる感染の原因物質であり、原発性の院内感染菌血症における最も頻度の高い単離株である。 *S. epidermidis* はまた、人工弁心内膜炎とも関係がある。

40

## 【0007】

ブドウ球菌はまた、動物における細菌感染の共通の感染源でもある。例えば、ブドウ球菌乳房炎は、ウシ、ヒツジ、およびヤギのような反芻動物に共通する問題である。この疾患は一般的には、感染を軽減するために抗生物質で処置されるが、この処置は費用のかかる手法であり、これはさらに乳汁生産もできなくなる。今日までに同定された最も有効なワクチンは、皮下投与される *S. aureus* のインタクトな生ワクチンである。しかし、生ワクチンの投与には感染のリスクが伴う。そのため、多くの研究者らが、死滅 *S. aureus* ワクチンを作り出そう、および / または *S. aureus* に対する免疫を誘導するであろう莢膜多糖類または細胞壁成分を単離しようと試みてきた。

## 【発明の概要】

50

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

担体化合物は、抗原に対する免疫応答を増強させるためにワクチンにおいてしばしば使用される。例えば、いくつかのワクチンの担体は、抗原性部分に対する応答におけるT細胞ヘルプ(T cell help)を刺激するために有用である。自然界に存在している抗原性部分または自然界に存在している物質の断片はあまり適しておらず、簡単には操作することができない、そして／または例えば担体化合物のような他の部分には簡単には結合させることができないことが多い、これはそのようなワクチンの治療効果を低下させる可能性がある。

## 【課題を解決するための手段】

10

## 【0009】

本発明は、抗原性組成物(例えば、ワクチンであるがこれに限定されない)を作製するための新規の方法および化合物を提供する。具体的には、本発明は、オリゴ糖抗原を修飾するための新規の方法を提供する。これらの方法は、(a)予め決定された順序の単糖単量体からなり、(b)担体化合物に結合させられたオリゴ糖の制御合成を含む。得られる結合体は、目的の微生物多糖類抗原に対する免疫応答を(誘導によるかまたは増強によるかを問わず)よりうまく刺激できる。本明細書中に記載されるように、そのような免疫応答は、ブドウ球菌感染を含むがこれに限定されない様々な感染の処置および／または予防に有用である。

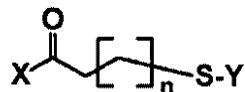
本発明は、例えば以下の項目を提供する。

20

## (項目1)

## 式Iの化合物：

## 【化31】



式I

式中、Xは任意の原子または基であり、Yは硫黄保護基であり、そしてnは1より大きい。

30

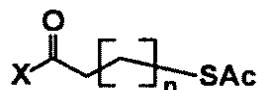
## (項目2)

Yがアシル基である、項目1に記載の化合物。

## (項目3)

Yがアセチル基であり、化合物が式IIの構造：

## 【化32】



式II

40

を有し、式中、Acはアセチル基である、項目1または2に記載の化合物。

## (項目4)

前記化合物が式Iの活性化エステルである、項目1に記載の化合物。

## (項目5)

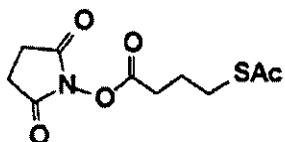
前記化合物が、式Iの活性化エステルのシアノ、アジド、またはハロゲン誘導体である、項目1に記載の化合物。

## (項目6)

前記化合物が式IIIの構造：

50

【化33】



式III

(N-ヒドロキシスクシンイミジル4-アセチルスルファニルブチラート)

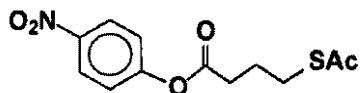
を有し、式中、A c はアセチル基である、項目4に記載の化合物。

10

(項目7)

前記化合物が式IVの構造：

【化34】



式IV

(N-ニトロフェニル4-アセチルスルファニルブチラート)

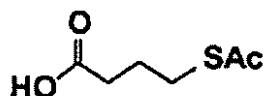
20

を有し、式中、A c はアセチル基である、項目4に記載の化合物。

(項目8)

N-ヒドロキシスクシンイミジル4-アセチルスルファニルブチラート(式III)を合成するための方法であって、4-アセチルスルファニル酪酸(式V)：

【化35】



30

式V

式中、A c はアセチル基である：を、N-ヒドロキシスクシンイミジルトリフルオロアセテート(CF<sub>3</sub>COOSu)と反応させて、N-ヒドロキシスクシンイミジル4-アセチルスルファニルブチラート(式III)を生じさせる工程を含む、方法。

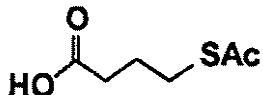
(項目9)

N-ニトロフェニル4-アセチルスルファニルブチラート(IV)を合成するための方法であって、

40

4-アセチルスルファニル酪酸(式V)：

【化36】



式V

式中、A c はアセチル基である：を、N-ニトロフェニルトリフルオロアセテート(CF<sub>3</sub>COOPNp)と反応させて、

50

N - ニトロフェニル 4 - アセチルスルファニルブチラート (式 IV) を生じさせる工程を含む、方法。

(項目 10)

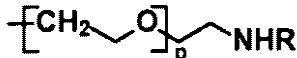
担体に結合させられたオリゴ糖を合成するための方法であって、

該オリゴ糖を、最初に、式 Va または Vb の構造：

【化 37】



式 Va



式 Vb

10

を有しており、式中、m は、1 ~ 10 より選択される数字であり、p は 1 ~ 20 から選択される数字であり、そして R は H またはアルキル基である化合物と、

2 番目に、式 I、II、III、または IV の化合物と、そして

3 番目に、担体と

反応させる工程を含み、ここで、該オリゴ糖は - 1 - 6 結合グルコサミンである、方法。

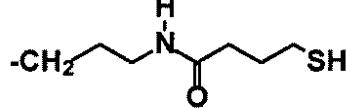
。

(項目 11)

O 結合リンカーを持つオリゴ糖を含む組成物であって、ここで、前記リンカーが

【化 38】

20



式 VI.

を含む、組成物。

(項目 12)

前記オリゴ糖が、 - 1 - 6 結合グルコサミンである、項目 11 に記載の組成物。

30

(項目 13)

前記オリゴ糖が、2 ~ 20 個の単量体の長さである、項目 10 または 11 に記載の組成物

。

(項目 14)

前記オリゴ糖が、5 ~ 11 個の単量体の長さである、項目 10 または 11 に記載の組成物

。

(項目 15)

前記オリゴ糖が、7 個、9 個、または 11 個の単量体の長さである、項目 10 または 11 に記載の組成物。

(項目 16)

40

前記オリゴ糖は 100 % がアセチル化される、項目 15 に記載の組成物。

(項目 17)

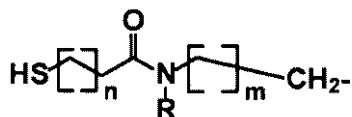
前記多糖は 50 % 未満がアセチル化される、項目 15 に記載の組成物。

(項目 18)

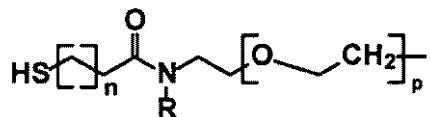
以下：



【化40】



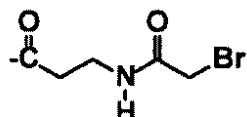
式IXa



10

式IXb

に結合させられたオリゴ糖を、アミノ基が修飾されている担体と反応させ、続いて、式  
【化41】



20

式X

の化合物と反応させて、式VIIIAまたはVIIIBの構造を有しているリンカーによ  
つて担体化合物に結合させられたオリゴ糖を生じさせる工程を含む、方法。

(項目32)

前記オリゴ糖 - 担体結合体が、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:  
1、8:1、9:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、  
70:1、80:1、90:1、または100:1の担体に対するオリゴ糖の比を有する  
、項目31に記載の方法。

30

(項目33)

前記担体がペプチドである、項目31に記載の方法。

(項目34)

前記担体がタンパク質である、項目31に記載の方法。

(項目35)

前記担体が破傷風トキソイドである、項目31に記載の方法。

(項目36)

前記オリゴ糖が-1-6結合グルコサミンである、項目31に記載の方法。

(項目37)

40

前記オリゴ糖が、2~20個の単量体の長さである、項目31に記載の方法。

(項目38)

前記オリゴ糖が、5~11個の単量体の長さである、項目31に記載の方法。

(項目39)

前記オリゴ糖が、7個、9個、または11個の単量体の長さである、項目31に記載の  
方法。

(項目40)

前記オリゴ糖は0~40%がアセチル化される、項目36に記載の方法。

(項目41)

被検体において免疫応答を刺激するための方法であって、

50

該被検体において免疫応答を刺激するために有効な量の、項目18～27のいずれか1項に記載のオリゴ糖-担体結合体または項目31～40のいずれか1項に記載の方法によつて合成されたオリゴ糖-担体結合体を、該刺激を必要とする被検体に投与する工程を含む、方法。

(項目42)

前記被検体がヒトである、項目41に記載の方法。

(項目43)

前記被検体が非ヒトである、項目41に記載の方法。

(項目44)

前記被検体から抗体または抗体を形成する細胞を単離する工程をさらに含む、項目41、42、または43に記載の方法。

10

(項目45)

前記被検体にアジュバントを投与する工程をさらに含む、項目41、42、43、または44に記載の方法。

(項目46)

前記被検体に抗菌剤を投与する工程をさらに含む、項目41～44、または45に記載の方法。

(項目47)

被検体の感染を処置または予防するための方法であつて、

免疫応答を誘導するための有効量の、項目18～27のいずれか1項に記載のオリゴ糖-担体結合体または項目31～40のいずれか1項に記載の方法によつて合成されたオリゴ糖-担体結合体を、感染を発症しているかまたは感染を発症するリスクがある被検体に投与する工程を含み、

20

ここで、該感染は、P N A Gを生産する細菌種によって引き起こされる、方法。

(項目48)

前記感染がブドウ球菌感染である、項目47に記載の方法。

(項目49)

前記ブドウ球菌感染がS t a p h y l o c o c c u s a u r e u s感染である、項目47に記載の方法。

(項目50)

30

前記ブドウ球菌感染がS t a p h y l o c o c c u s e p i d e r m i d i sである、項目47に記載の方法。

(項目51)

前記被検体がブドウ球菌に曝されるリスクがある、項目47～49、または50に記載の方法。

(項目52)

前記被検体がブドウ球菌に曝されている、項目47～49、または50に記載の方法。

(項目53)

前記感染が、E . c o l i感染、Y . p e s t i s感染、Y . e n t e r c o l i t i c a感染、Y . p s e u d o t u b e r c u l o s i s感染、A g g r e g a t i b a c t e r a c t i n o m y c e t e m c o m i t a n s感染、A c t i n o b a c i l l u s p l e u r o p n e u m o n i a e感染、B o r d e t e l l a p e r t u s s i s感染、B . p a r a p e r t u s s i s感染、B . b r o n c h i s e p t i c a感染、アシネトバクター感染、バークホルデリア感染、S t e n a t r o p h o m o n a s m a l t o p h i l i a感染、赤痢菌感染、またはクレブシエラ感染である、項目47～51、または52に記載の方法。

40

(項目54)

前記オリゴ糖-担体結合体が、アジュバントとともに投与される、項目47～52、または53に記載の方法。

(項目55)

50

抗体を生産するための方法であって：

P N A G に特異的な抗体を生産させるための有効量の、項目 1 8 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載のオリゴ糖 - 担体結合体または項目 3 1 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法によつて合成されたオリゴ糖 - 担体結合体を被検体に投与する工程、および

前記被検体から抗体を単離する工程

を含む、方法。

(項目 5 6 )

モノクローナル抗体を生産するための方法であって：

P N A G に特異的な抗体を生産させるための有効量の、項目 1 8 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載のオリゴ糖 - 担体結合体または項目 3 1 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法によつて合成されたオリゴ糖 - 担体結合体を被検体に投与する工程、

10

該被検体から抗体を生産する細胞を採取する工程、

該被検体由来の抗体を生産する細胞を骨髄腫細胞に融合させる工程、および

融合体のサブクローニによって生産された抗体を採取する工程

を含む、方法。

(項目 5 7 )

前記抗体がポリクローナル抗体である、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 5 8 )

前記被検体がウサギである、項目 5 5 または 5 6 に記載の方法。

(項目 5 9 )

前記被検体がヒトである、項目 5 5 または 5 6 に記載の方法。

20

**【0010】**

本発明の様々な態様は、特定のリンカー（または連結剤（linking agent）またはスペーサーまたは連結試薬（linking reagent）（これらの用語が本明細書中で互換的に使用されるとおりである））、および結合体の合成におけるそれらの使用に関する。特に興味深いのは、オリゴ糖と様々な担体化合物の結合体である。これらのオリゴ糖は、- (1 6) 結合によって互いに結合したグルコサミン単量体からなる（本明細書中で言われる場合には、グルコサミンに連結させられた）オリゴ - (1 6) - D - グルコサミンを含む。連結させられたグルコサミンを構成する様々な単量体の 1 つ以上は N アセチル化され得る。したがって、これらの単量体は D - グルコサミン単量体または N - アセチル - D - グルコサミン単量体であり得、連結させられたグルコサミンは、定義された順序でこれらの単量体（または単糖（これらの用語が本明細書中で互換的に使用されるとおりである））のうちの 1 つまたは両方のタイプを含み得る。本発明のオリゴグルコサミンはまた、それらの「還元性」末端にチオール含有基を有しているスペーサーも含む。このスペーサーは担体にオリゴグルコサミンを連結させるために使用される。この担体はアミノ酸（例えば、ペプチドまたはタンパク質）からなり得るが、そのように限定はされない。

30

**【0011】**

したがって、1つの態様においては、本発明は式 I の化合物を提供する。

40

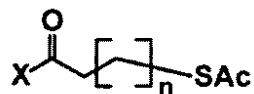
**【0012】****【化 1】****式I**

式中、X は任意の原子または基であり、Y は硫黄保護基であり、そして n は 1 より大きい。1 つの実施形態においては、Y はアシル基である。別の実施形態においては、Y はアセチル基であり、上記化合物は式 II の構造を有する。

50

【0013】

【化2】



式II

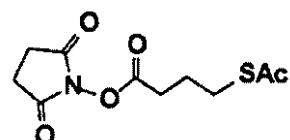
式中、A c はアセチル基である。

【0014】

なお別の実施形態においては、上記化合物は式Iの活性化エステルである。別の実施形態においては、上記化合物は、式Iの活性化エステルのシアノ、アジド、またはハロゲン(haloiod)誘導体である。別の実施形態においては、上記化合物は式IIIの構造を有する。

【0015】

【化3】

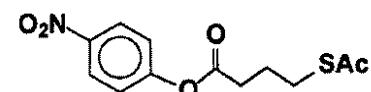


式III

式中、A c はアセチル基であり、上記化合物はN - ヒドロキシスクシンイミジル4 - アセチルスルファニルブチラートと呼ばれる。別の実施形態においては、上記化合物は式IVの構造を有する。

【0016】

【化4】



式IV

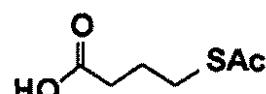
式中、A c はアセチル基であり、上記化合物はN - ニトロフェニル4 - アセチルスルファニルブチラートと呼ばれる。

【0017】

別の態様においては、本発明は、N - ヒドロキシスクシンイミジル4 - アセチルスルファニルブチラート(式III)を合成するための方法を提供し、この方法は、4 - アセチルスルファニルブチラート(式V)：

【0018】

【化5】



式V

をN - ヒドロキシスクシンイミジルトリフルオロアセテート(CF<sub>3</sub>COOSu)と反応させて、N - ヒドロキシスクシンイミジル4 - アセチルスルファニルブチラート(式III)を生じさせる工程を含む。

【0019】

別の態様においては、本発明は、N - ニトロフェニル4 - アセチルスルファニルブチラ

10

20

30

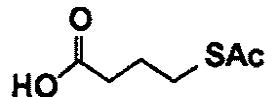
40

50

ート(IV)を合成するための方法を提供し、この方法は、4-アセチルスルファニル酷酸(式V)：

【0020】

【化6】



式V

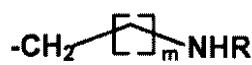
をN-ニトロフェニルトリフルオロアセテート(CF<sub>3</sub>COOpNp)と反応させて、N-ニトロフェニル4-アセチルスルファニルブチラート(式IV)を生じさせる工程を含む。

【0021】

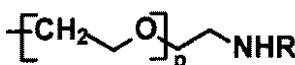
別の態様においては、本発明は、担体に結合させられたオリゴ糖を合成するための方法を提供し、この方法は、オリゴ糖を、(a)最初に式VaまたはVb：

【0022】

【化7】



式Va



式Vb

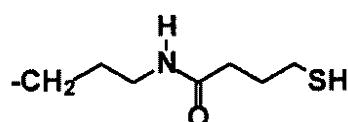
(式中、mは1～10より選択される数字であり、pは1～20から選択される数字であり、そしてRはHまたはアルキル基である)の構造を有している化合物と、(b)2番目に、式I、II、III、またはIVの化合物と、そして(c)3番目に担体と反応させる工程を含む。ここで、オリゴ糖は-1-6結合グルコサミンである。

【0023】

なお別の態様においては、本発明は、O結合リンカーを持つオリゴ糖を含む組成物を提供する。ここで、上記リンカーは、

【0024】

【化8】



式VI.

を含む。

【0025】

1つの実施形態においては、オリゴ糖は-1-6結合グルコサミンである。別の実施形態においては、オリゴ糖は、2～20個の単量体の長さである。別の実施形態においては、オリゴヌクレオチドは5～11個の単量体の長さである。なお別の実施形態においては、オリゴ糖は、7個、9個、または11個の単量体の長さである。

【0026】

1つの実施形態においては、オリゴ糖は0%がアセチル化されるか、または100%がアセチル化される。別の実施形態においては、オリゴ糖は0%～40%がアセチル化される。

【0027】

なお別の態様においては、本発明は、以下のリンカーを介して担体に結合させられたオリゴ糖を含む、オリゴ糖-担体結合体を含有する組成物を提供する：

【0028】

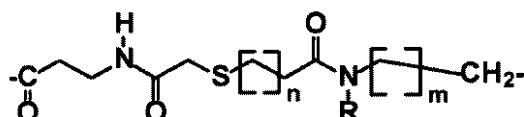
10

20

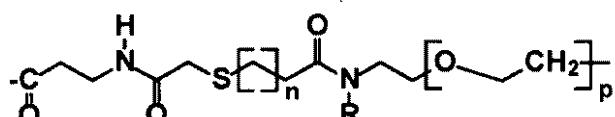
30

40

【化9】



式VIIIa



式VIIIb

10

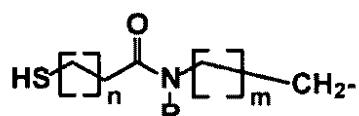
式中、リンカーはオリゴ糖にO結合され、担体にN結合される。

【0029】

なお別の態様においては、本発明は、オリゴ糖-担体結合体を合成するための方法を提供し、この方法は、式IXaまたは式IXbのリンカー：

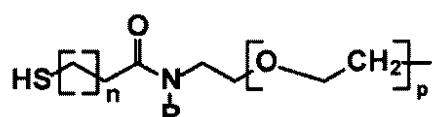
【0030】

【化10】



式IXa

20



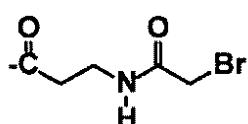
式IXb

30

に結合させられたオリゴ糖を、アミノ基が修飾された担体と反応させ、続いて、式Xの化合物：

【0031】

【化11】



式X

40

と反応させて、式VIIIAまたは式VIIIBの構造を有しているリンカーを介して担体化合物に結合させられたオリゴ糖を生じさせる工程を含む。

【0032】

1つの実施形態においては、担体はペプチドである。別の実施形態においては、担体はタンパク質である。担体の一例は、破傷風トキソイドである。

【0033】

1つの実施形態においては、オリゴ糖は-1-6結合グルコサミンである。

【0034】

1つの実施形態においては、組成物は、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6

50

: 1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、または100:1の担体に対するオリゴ糖の比を有する。

【0035】

いくつかの実施形態においては、オリゴ糖は2～20個の単量体の長さであるか、5～11個の単量体の長さであるか、または5個、7個、9個、もしくは11個の単量体の長さである。

【0036】

1つの実施形態においては、オリゴ糖は100%がアセチル化される。別の実施形態においては、オリゴ糖は0%がアセチル化される。なお別の実施形態においては、オリゴ糖は、0%～40%がアセチル化される。

10

【0037】

いくつかの実施形態においては、組成物はさらに、薬学的に許容される担体、アジュバント、および／または抗菌剤を含む。

【0038】

別の態様においては、本発明は、被検体において免疫応答を刺激するための方法を提供する。この方法は、被検体において免疫応答を刺激するために有効な量の上記のようなオリゴ糖-担体結合体または上記方法によって合成されたオリゴ糖-担体結合体を、その必要がある被検体に投与する工程を含む。

【0039】

20

1つの実施形態においては、被検体はヒトである。別の実施形態においては、被検体は非ヒトである。

【0040】

別の実施形態においては、この方法はさらに、被検体から抗体または抗体を形成する細胞を単離する工程を含む。

【0041】

別の実施形態においては、この方法はさらに、被検体にアジュバントを投与する工程を含む。別の実施形態においては、この方法はさらに、被検体に抗菌剤を投与する工程を含む。

【0042】

30

なお別の態様においては、本発明は、被検体の感染を処置または予防するための方法を提供する。この方法は、免疫応答を誘導するための有効量の上記のようなオリゴ糖-担体結合体または上記方法によって合成されたオリゴ糖-担体結合体を、感染を発症しているかまたは感染を発症するリスクがある被検体に投与する工程を含む。ここで、感染は、P N A G を作るかまたはP N A G を作ることができる細菌種によって引き起こされる。

【0043】

1つの実施形態においては、感染はブドウ球菌感染である。関連する実施形態においては、ブドウ球菌感染は *S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s* 感染である。別の関連する実施形態においては、ブドウ球菌感染は *S t a p h y l o c o c c u s e p i d e r m i d i s* である。1つの実施形態においては、被検体はブドウ球菌に曝されるリスクがある。別の実施形態においては、被検体はブドウ球菌に曝されている。

40

【0044】

他の実施形態においては、感染は、*E . c o l i* 感染、*Y . p e s t i s* 感染、*Y . e n t e r c o l i t i c a* 感染、*Y . p s e u d o t u b e r c u l o s i s* 感染、*A g g r e g a t i b a c t e r a c t i n o m y c e t e m c o m i t a n s* 感染、*A c t i n o b a c i l l u s p l e u r o p n e u m o n i a e* 感染、*B o r d e t e l l a p e r t u s s i s* 感染、*B . p a r a p e r t u s s i s* 感染、*B . b r o n c h i s e p t i c a* 感染、アシнетバクター感染、パークホルデリア感染（例えば、*B u r k h o l d e r i a c e n o c e p a c i a*）、*S t e n a t r o p h o m o n a s m a l t o p h i l i a* 感染、赤痢菌感染、またはクレブシエラ感染（例えば、*K l e*

50

bsiella pneumoniae)である。

【0045】

いくつかの実施形態においては、オリゴ糖-担体結合体は、アジュバントおよび/または抗菌剤とともに投与される。

【0046】

なお別の態様においては、本発明は抗体を生産するための方法を提供する。この方法は、天然のPNAGに特異的な抗体を生産させるための有効量の上記のようなオリゴ糖-担体結合体または上記方法によって合成されたオリゴ糖-担体結合体を被検体に投与する工程、および上記被検体から抗体を単離する工程を含む。

【0047】

10

別の態様においては、本発明は、モノクローナル抗体を生産するための方法を提供する。この方法は、天然のPNAGに特異的な抗体を生産させるための有効量の上記のようなオリゴ糖-担体結合体または上記方法によって合成されたオリゴ糖-担体結合体を被検体に投与する工程、被検体から抗体を生産する細胞を採取する工程、被検体由来の抗体を生産する細胞を骨髄腫細胞に融合させる工程、および融合体のサブクローンによって生産された抗体を採取する工程を含む。

【0048】

1つの実施形態においては、抗体はポリクローナル抗体である。1つの実施形態においては、被検体はウサギである。別の実施形態においては、被検体はヒトである。

【0049】

20

上記概念と以下にさらに詳細に議論されるさらなる概念のあらゆる組み合わせ(そのような概念が互いに矛盾しないという条件で)は、本明細書中に開示される発明性のある主題の一部であると当然考えられべきである。具体的には、本開示の最後に添付されている特許請求される主題の全ての組み合わせが、本明細書中に開示される発明性のある主題の一部であると考えられる。引用により組み入れられる任意の開示の中にも現れるであろう本明細書中で明確に使用される専門用語は、本明細書中に開示される特定の概念と最も矛盾のない意味が与えられるべきであることもまた当然のことである。

【図面の簡単な説明】

【0050】

30

【図1】図1AおよびBは、S. aureus由来のPNAG(A)またはdPNAG(B)に対する、非アセチル化ノナ-グルコサミン(9G1cNH<sub>2</sub>)に対して惹起させた抗血清の結合を示しているグラフである。

【図2】図2AおよびBは、S. aureus由来のPNAGまたはdPNAGに対する、完全にアセチル化されたノナ-グルコサミン(9G1cNAc)に対して惹起させた抗血清の結合を示しているグラフである。

【図3】図3AおよびBは、11G1cNAcまたは11G1cNH<sub>2</sub>に対する、結合型9G1cNAcまたは9G1cNH<sub>2</sub>に対して惹起させた抗血清の結合を示しているグラフである。

【図4】図4は、2匹のウサギ(一方には9G1cNH<sub>2</sub>-TT結合体を投与し、他方には9G1cNAc-TT結合体を、ワクチンの最後の注射の2週間後に採取した抗血清とともに投与した)において惹起させた抗血清を使用した、S. aureus株MN8細菌の死滅を示しているグラフである。

40

【図5】図5は、2匹のウサギ(その一方には9G1cNH<sub>2</sub>-TT結合体を投与し、他方には、9G1cNAc-TT結合体を、ワクチンの最後の注射の4週間後に採取した抗血清とともに投与した)において惹起させた抗血清を使用した、S. aureus株MN8細菌の死滅を示しているグラフであり、破傷風トキソイド(TT)に結合させ、さらに標識した(051)約100kDaのdPNAG分子からなる共役ワクチンに対して惹起させた抗血清による、同じ細菌の死滅もまた比較のために示す。

【図6】図6~8は、TT(9G1cNH<sub>2</sub>-TT)に結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない9マーのオリゴグルコサミン(9G1cNH<sub>2</sub>)に対

50

するウサギ抗血清 (bleed 1) による、*S. aureus* 株 (図 6 および 8、LAC (NT、USA 300) ; 図 7、SF 8300 (NT、USA 300)) の死滅を比較しているグラフである。比較のために、破傷風トキソイド (TT) に結合させ、さらに標識した (051) 約 100 kDa の dPNAG 分子からなる共役ワクチンに対して惹起させた抗血清による同じ細菌の死滅もまた示す。

【図 7】図 6～8 は、TT (9G1cNH<sub>2</sub>-TT) に結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない 9 マーのオリゴグルコサミン (9G1cNH<sub>2</sub>) に対するウサギ抗血清 (bleed 1) による、*S. aureus* 株 (図 6 および 8、LAC (NT、USA 300) ; 図 7、SF 8300 (NT、USA 300)) の死滅を比較しているグラフである。比較のために、破傷風トキソイド (TT) に結合させ、さらに標識した (051) 約 100 kDa の dPNAG 分子からなる共役ワクチンに対して惹起させた抗血清による同じ細菌の死滅もまた示す。  
10

【図 8】図 6～8 は、TT (9G1cNH<sub>2</sub>-TT) に結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない 9 マーのオリゴグルコサミン (9G1cNH<sub>2</sub>) に対するウサギ抗血清 (bleed 1) による、*S. aureus* 株 (図 6 および 8、LAC (NT、USA 300) ; 図 7、SF 8300 (NT、USA 300)) の死滅を比較しているグラフである。比較のために、破傷風トキソイド (TT) に結合させ、さらに標識した (051) 約 100 kDa の dPNAG 分子からなる共役ワクチンに対して惹起させた抗血清による同じ細菌の死滅もまた示す。

【図 9】図 9～16 は、TT に結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない 9 マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ抗血清 (「bleed 2」と表示) による、*S. aureus* 株 (図 9、MN 8 (莢膜多糖類 (CP) 8) ; 図 10、LAC (判別不能 (NT)、USA 300) ; 図 11、SF 8300 (NT、USA 300)) ; 図 12、Newman (CP 5) ; 図 13、PS 80 ; 図 14、Reynolds (CP 5) ; 図 15、Reynolds (判別不能) ; 図 16、Reynolds (CP 8)) の死滅を比較しているグラフである。比較のために、破傷風トキソイド (TT) に結合させ、さらに標識した (051) 約 100 kDa の dPNAG 分子からなる共役ワクチンに対して惹起させた抗血清による同じ細菌の死滅もまた示す。  
20

【図 10】図 9～16 は、TT に結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない 9 マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ抗血清 (「bleed 2」と表示) による、*S. aureus* 株 (図 9、MN 8 (莢膜多糖類 (CP) 8) ; 図 10、LAC (判別不能 (NT)、USA 300) ; 図 11、SF 8300 (NT、USA 300)) ; 図 12、Newman (CP 5) ; 図 13、PS 80 ; 図 14、Reynolds (CP 5) ; 図 15、Reynolds (判別不能) ; 図 16、Reynolds (CP 8)) の死滅を比較しているグラフである。比較のために、破傷風トキソイド (TT) に結合させ、さらに標識した (051) 約 100 kDa の dPNAG 分子からなる共役ワクチンに対して惹起させた抗血清による同じ細菌の死滅もまた示す。  
30

【図 11】図 9～16 は、TT に結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない 9 マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ抗血清 (「bleed 2」と表示) による、*S. aureus* 株 (図 9、MN 8 (莢膜多糖類 (CP) 8) ; 図 10、LAC (判別不能 (NT)、USA 300) ; 図 11、SF 8300 (NT、USA 300)) ; 図 12、Newman (CP 5) ; 図 13、PS 80 ; 図 14、Reynolds (CP 5) ; 図 15、Reynolds (判別不能) ; 図 16、Reynolds (CP 8)) の死滅を比較しているグラフである。比較のために、破傷風トキソイド (TT) に結合させ、さらに標識した (051) 約 100 kDa の dPNAG 分子からなる共役ワクチンに対して惹起させた抗血清による同じ細菌の死滅もまた示す。  
40

【図 12】図 9～16 は、TT に結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない 9 マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ抗血清 (「bleed 2」と表示) による、*S. aureus* 株 (図 9、MN 8 (莢膜多糖類 (CP) 8) ; 図 10、LAC (判別不能 (NT)、USA 300) ; 図 11、SF 8300 (NT、USA 300)) ; 図 12、Newman (CP 5) ; 図 13、PS 80 ; 図 14、Reynolds (CP 5) ; 図 15、Reynolds (判別不能) ; 図 16、Reynolds (CP 8)) の死滅を比較しているグラフである。比較のために、破傷風トキソイド (TT) に結合させ、さらに標識した (051) 約 100 kDa の dPNAG 分子からなる共役ワクチンに対して惹起させた抗血清による同じ細菌の死滅もまた示す。  
50

00) ; 図12、Newman(CP5) ; 図13、PS80 ; 図14、Reynolds(CP5) ; 図15、Reynolds(判別不能) ; 図16、Reynolds(CP8))の死滅を比較しているグラフである。比較のために、破傷風トキソイド( TT )に結合させ、さらに標識した(051)約100kDaのdPNAG分子からなる共役ワクチンに対して惹起させた抗血清による同じ細菌の死滅もまた示す。

【図13】図9～16は、TTに結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない9マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ抗血清(「bleed 2」と表示)による、S. aureus株(図9、MN8(莢膜多糖類(CP)8) ; 図10、LAC(判別不能(NT)、USA300)) ; 図11、SF8300(NT、USA300)) ; 図12、Newman(CP5) ; 図13、PS80 ; 図14、Reynolds(CP5) ; 図15、Reynolds(判別不能) ; 図16、Reynolds(CP8))の死滅を比較しているグラフである。比較のために、破傷風トキソイド( TT )に結合させ、さらに標識した(051)約100kDaのdPNAG分子からなる共役ワクチンに対して惹起させた抗血清による同じ細菌の死滅もまた示す。

【図14】図9～16は、TTに結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない9マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ抗血清(「bleed 2」と表示)による、S. aureus株(図9、MN8(莢膜多糖類(CP)8) ; 図10、LAC(判別不能(NT)、USA300)) ; 図11、SF8300(NT、USA300)) ; 図12、Newman(CP5) ; 図13、PS80 ; 図14、Reynolds(CP5) ; 図15、Reynolds(判別不能) ; 図16、Reynolds(CP8))の死滅を比較しているグラフである。比較のために、破傷風トキソイド( TT )に結合させ、さらに標識した(051)約100kDaのdPNAG分子からなる共役ワクチンに対して惹起させた抗血清による同じ細菌の死滅もまた示す。

【図15】図9～16は、TTに結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない9マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ抗血清(「bleed 2」と表示)による、S. aureus株(図9、MN8(莢膜多糖類(CP)8) ; 図10、LAC(判別不能(NT)、USA300)) ; 図11、SF8300(NT、USA300)) ; 図12、Newman(CP5) ; 図13、PS80 ; 図14、Reynolds(CP5) ; 図15、Reynolds(判別不能) ; 図16、Reynolds(CP8))の死滅を比較しているグラフである。比較のために、破傷風トキソイド( TT )に結合させ、さらに標識した(051)約100kDaのdPNAG分子からなる共役ワクチンに対して惹起させた抗血清による同じ細菌の死滅もまた示す。

【図16】図9～16は、TTに結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない9マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ抗血清(「bleed 2」と表示)による、S. aureus株(図9、MN8(莢膜多糖類(CP)8) ; 図10、LAC(判別不能(NT)、USA300)) ; 図11、SF8300(NT、USA300)) ; 図12、Newman(CP5) ; 図13、PS80 ; 図14、Reynolds(CP5) ; 図15、Reynolds(判別不能) ; 図16、Reynolds(CP8))の死滅を比較しているグラフである。比較のために、破傷風トキソイド( TT )に結合させ、さらに標識した(051)約100kDaのdPNAG分子からなる共役ワクチンに対して惹起させた抗血清による同じ細菌の死滅もまた示す。

【図16A】図16Aは、最後の免疫化の6週間後に得た9G1cNH<sub>2</sub>-TTに対するウサギ抗血清による2種類のPNAG陽性E. coli株(E. coli JおよびE. coli P)(PNAG陰性E. coli株(E. coli H)ではない)の死滅を示しているグラフである。

【図17】図17、18、および19は、TTに結合させた9マーのアセチル化されていないオリゴグルコサミン(9G1cNH<sub>2</sub>-TT、bleed 2)に対して惹起させ、2×10<sup>4</sup>(図18)、2×10<sup>5</sup>(図19)、または2×10<sup>6</sup>(図20)CFUのS. aureus株LACでの感染の24時間前にマウスに投与した、抗血清での免疫化後のS. aureusによる皮膚の膿瘍感染の予防に関するインビボでの実験の結果を示し

10

20

30

40

50

ているグラフである。

【図18】図17、18、および19は、TTに結合させた9マーのアセチル化されていないオリゴグルコサミン(9GlcNH<sub>2</sub>-TT、bleed 2)に対して惹起させ、2×10<sup>4</sup>(図18)、2×10<sup>5</sup>(図19)、または2×10<sup>6</sup>(図20)CFUのS.aureus株LACでの感染の24時間前にマウスに投与した、抗血清での免疫化後のS.aureusによる皮膚の膿瘍感染の予防に関するインビボでの実験の結果を示しているグラフである。

【図19】図17、18、および19は、TTに結合させた9マーのアセチル化されていないオリゴグルコサミン(9GlcNH<sub>2</sub>-TT、bleed 2)に対して惹起させ、2×10<sup>4</sup>(図18)、2×10<sup>5</sup>(図19)、または2×10<sup>6</sup>(図20)CFUのS.aureus株LACでの感染の24時間前にマウスに投与した、抗血清での免疫化後のS.aureusによる皮膚の膿瘍感染の予防に関するインビボでの実験の結果を示しているグラフである。

【図20】図20は、図17～19の結果のまとめである。

【図21】図21、22、および23は、9マーのアセチル化されていないオリゴグルコサミンに対して惹起させ、1×10<sup>6</sup>CFUのS.aureus MN8(図21)、4×10<sup>6</sup>CFUのS.aureus Newman(図22)、および4×10<sup>6</sup>CFUのS.aureus Newman icaと1.5×10<sup>6</sup>CFUのS.aureus MN8 ica(図23)での感染の前にマウスに投与した、抗血清での免疫化後のS.aureus膿瘍感染の予防に関するインビボでの実験の結果を示しているグラフである。

【図22】図21、22、および23は、9マーのアセチル化されていないオリゴグルコサミンに対して惹起させ、1×10<sup>6</sup>CFUのS.aureus MN8(図21)、4×10<sup>6</sup>CFUのS.aureus Newman(図22)、および4×10<sup>6</sup>CFUのS.aureus Newman icaと1.5×10<sup>6</sup>CFUのS.aureus MN8 ica(図23)での感染の前にマウスに投与した、抗血清での免疫化後のS.aureus膿瘍感染の予防に関するインビボでの実験の結果を示しているグラフである。

【図23】図21、22、および23は、9マーのアセチル化されていないオリゴグルコサミンに対して惹起させ、1×10<sup>6</sup>CFUのS.aureus MN8(図21)、4×10<sup>6</sup>CFUのS.aureus Newman(図22)、および4×10<sup>6</sup>CFUのS.aureus Newman icaと1.5×10<sup>6</sup>CFUのS.aureus MN8 ica(図23)での感染の前にマウスに投与した、抗血清での免疫化後のS.aureus膿瘍感染の予防に関するインビボでの実験の結果を示しているグラフである。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0051】

本発明は、オリゴ糖結合体の合成と使用に広く関係する。本発明は、新規の組成物を生成するためにオリゴ糖結合体の合成と使用で使用される新しい合成方法と組成物を提供する。これらの合成経路は、別の方法では自然界に存在している多糖類抗原を使用することができないオリゴ糖または多糖類の修飾を容易にする。

##### 【0052】

本発明は、とりわけ、定義された順序の複数の単量体を有しているオリゴ- - (16)-D-グルコサミンオリゴ糖または多糖類の調製のための方法、その後の担体化合物への結合のためのリンカーに対するそのようなオリゴ糖または多糖類の結合のための方法、オリゴ糖-担体結合体または多糖-担体結合体の調製のための方法、およびこれらの様々な化合物の組成物を提供する。本発明はさらに、これらの調製方法において以前から知られているリンカーよりも思いのほかさらに有用である様々な新規のリンカーに関する。得られるオリゴ糖-担体結合体は、ヒトおよびヒト以外の被検体において、オリゴ糖自体に対する抗体の生成、ならびに対応する自然界に存在しているP N A G およびd P N A G

10

20

30

40

50

抗原の生成を含むインビボでの免疫応答の刺激に有用である。

【0053】

P N A G 抗原およびd P N A G 抗原は、公開されているP C T 出願番号W O 2 0 0 4 / 0 4 3 4 0 5においてさらに詳細に記載されている。簡単に説明すると、P N A Gは、ボリN - アセチルグルコサミンをいい、これは、ブドウ球菌（例えば、S . a u r e u s およびS . e p i d e r m i s ）を含むがこれに限定されない様々な細菌種によって作られる表面多糖である。P N A Gは自然界においては、高度にアセチル化された形態とほとんどアセチル化されていない形態の両方で存在する。P N A Gの「高度にアセチル化された」形態は、5 0 %を上回る酢酸塩置換を有しているP N A Gである。P N A Gのほとんどアセチル化されていない形態（本明細書中ではd P N A Gと呼ばれる）は、0 %～4 0 %のアセチル化を有し得る（存在するとすればR <sup>1</sup>がアセチル基の位置を示す式V I I を参照のこと）。天然のP N A Gは、様々なアセチル化の程度を有する複数のP N A G形態の混合物である。天然のP N A Gは、P N A Gのより高度にアセチル化された形態との混合物の中にd P N A Gを含み得る。P N A Gまたはd P N A Gは、数百または数千、あるいはそれ以上のグルコサミン単位（または単量体）からなり得る。

【0054】

本発明のオリゴ糖は、P N A Gまたはd P N A Gの複数の領域を模倣するように意図される。したがって、インビボで使用される場合には、オリゴ糖 - 担体結合体は、P N A Gおよび/またはd P N A Gと同様あるいは同じオリゴ糖の領域に特異的な免疫応答を誘導し、したがってそのような免疫応答は、P N A Gおよび/またはd P N A Gを作るまたは作ることができる細菌種を標的化することにおいて有用である。

【0055】

本発明のいくつかの態様においては、オリゴ糖はD - グルコサミン単位だけ、またはN - アセチル - D - グルコサミン卖位だけからなるか、あるいは、予め決定された比および順序の両方のタイプのこれらの単量体からなる。比と順序は、いくつかの実施形態においては、天然のP N A Gにおいて見られる比と順序を模倣するように意図される。オリゴ糖は、その末端（例えば、その還元性末端）にチオール基を有しているスペーサー（またはリンカー（これらの用語が本明細書中で互換的に使用されるとおりである））を含むように本発明にしたがって操作される。

【0056】

1つ以上の担体への結合に適しているアミン基を含むオリゴ糖（例えば、連結されたグルコサミンオリゴ糖（またはオリゴグルコサミン（これらの用語が本明細書中で互換的に使用されるとおりである））の調製は、当該分野では困難であることが立証されている。これは、連結されたグルコサミンの立体特異的合成には、単量体間に不可欠な - - グリコシド結合を形成させるために、グリコシルドナーの中の関与があるが一時的なアシルN保護基（いわゆる、「関与」基）の使用が必要であることに一部原因がある。N - フタロイル、N - トリクロロエトキシカルボニル、およびいくつかの他の部分が関与基として適している。しかし、本発明によって意図されるオリゴ糖のいくつかの中に存在するN - アセチル関与基を含む特定の他の関与基は、あまり適さない。一例として、N - アセチル化グリコシルドナーは反応性が低く、ごくわずかな量のグリコシル化産物しかもたらさない。加えて、グリコシルドナーの中のN - アセチル基の存在は、オキサゾリン中間体の形成、N - アセチル基の移動、および他の望ましくない化学反応が原因で、グリコシル化反応を複雑にする。

【0057】

連結されたグルコサミン、それらの構造、および特にアミノ基の数に関して、これらには、全てのアミノ基の遊離（l i b e r a t i o n ）の前にリンカーを導入することが必然的に伴う。遊離のオリゴ糖を調製するための上記一時的なN - 保護基の除去は、塩基性条件下で行われる。N - フタロイル関与基の除去に最も有効な試薬は、沸騰エタノール（b o i l i n g e t h a n o l ）中の抱水ヒドラジンである。この試薬は、目的のオリゴ糖の中に含まれ得るアセチル基およびベンゾイル基を含むO - アシル保護基もまた効率

よく除去する。

【0058】

タンパク質へのアミノ含有リガンドの結合に使用されてきた市販されているリンカーは、ペニタフルオロフェニルS-アセチルチオグリコレート（実施例に示す化学構造8）およびN-ヒドロキシスクシンイミジル3-アセチルスルファニル-プロピオネート（実施例に示す化学構造12）である。これらの連結試薬は、チオール部分をオリゴ糖に導入するためには使用できるが、実施例にさらに詳細に記載されるように、いずれもフタロイル基の除去の条件下では不安定であった。実施例5は、チオグリコール酸をベースとするリンカーが酸化的転位を受けることを示しており、実施例6は、3-メルカプトプロピオン酸の誘導体が副生成物の複合混合物を生じることを示す。いずれの変換によっても必要なチオール機能が失われる。10

【0059】

したがって、本発明は、オリゴ糖（そのアミン含有バージョンを含む）を担体（例えばタンパク質）に結合させるための、以前から知られているリンカーよりも効率がよく優れているリンカーの1つのクラスの発見と使用に一部基づく。このクラスのリンカーは、式Iの-アセチルスルファニル炭酸の誘導体（式中、 $n > 1$ ）と定義される。

【0060】

【化12】



式I

このクラスのリンカーは、オリゴ糖への結合の間に効率的なN-アセチル化を提供する。このリンカーは、式Iの活性化エステル、またはそのシアノ、アジド、もしくはハロゲン誘導体であり得る。これは、そのような誘導体がアシル化剤として活性であり、それにより本発明のオリゴ糖への結合に適しているとの条件で、式Iの別の誘導体であり得る。Yは、当該分野で公知であり、アシル基とアセチル基を含む、硫黄原子の一時的な保護基を示す。Y基の除去により、オリゴ糖の担体への結合に必要なSH基が遊離する。Xは、式Iの化合物に必要なアシル化能力を提供する任意の脱離基を示す。30

【0061】

本発明によって提供される任意のクラスのリンカーは、担体化合物にオリゴ糖を結合させるために使用できると理解される。

【0062】

一例として、1つのリンカークラスは、式IIの構造を含み得る（式中、 $n > 1$ ）：

【0063】

【化13】

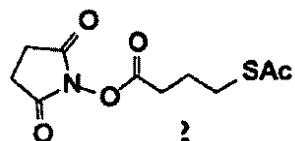


式II.

別の例として、別のリンカークラスは、N-ヒドロキシスクシンイミジル誘導体を含み得る。そのようなリンカーの例は、実施例1および3に記載されるように、N-ヒドロキシスクシンイミジル4-アセチルスルファニルブチラート（スキーム1の化合物2、実施例1および3）である。このリンカーは以下のような式IIIの構造を有する：

【0064】

【化14】



式III.

このリンカーは、炭水化物（例えば、オリゴ糖および多糖類）の脱保護の全体の条件下で安定である。

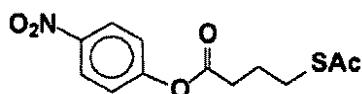
【0065】

10

活性化エカルボニルの別の例は、N-ニトロフェニル4-アセチルスルファニルブチラート（化合物3、実施例2および3）である。この化合物は以下のような式IVの構造を有する：

【0066】

【化15】



式IV

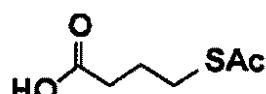
20

(N-ニトロフェニル4-アセチルスルファニルブチラート)

本発明は、N-ヒドロキシスクシンイミジル4-アセチルスルファニルブチラート（式III）を合成するための方法を提供する。この方法は、4-アセチルスルファニル酪酸（式V）

【0067】

【化16】



式V

30

をN-ヒドロキシスクシンイミジルトリフルオロアセテート（CF<sub>3</sub>COOSu）と反応させて、N-ヒドロキシスクシンイミジル4-アセチルスルファニルブチラート（式III）を生じさせる工程を含む。

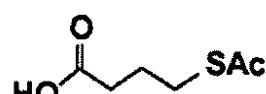
【0068】

本発明はさらに、N-ニトロフェニル4-アセチルスルファニルブチラート（式IV）を合成するための方法を提供する。この方法は、4-アセチルスルファニル酪酸（式V）：

【0069】

【化17】

40



式V

をN-ニトロフェニルトリフルオロアセテート（CF<sub>3</sub>COOPNp）と反応させて、N-ニトロフェニル4-アセチルスルファニルブチラート（式IV）を生じさせる工程を含む。

【0070】

これらの合成方法は実施例の中에서도詳細に記載される。

50

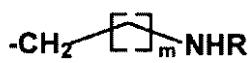
〔 0 0 7 1 〕

本発明はさらに、オリゴ糖の「還元性末端」でグルコサミン単位のO1原子に結合させられたリンカーを含むオリゴ糖を含有する組成物を提供する。このO1結合リンカーは、式Ⅰの化合物との反応によりSH含有リンカーに結合させるために使用される。O1結合リンカーは、アミノアルキル基を有している式Ⅴa(以下)の構造を有し、式中、mは1~10までで変化し得、RはHまたは簡単なアルキル基(例えば、メチル基またはエチル基)であり得る。あるいは、O1結合リンカーは、式Ⅴbの構造(以下)を有し得、式中、pは、1~20までで変化し得、Rは式Ⅴa中と同じである。

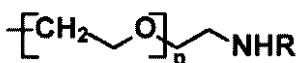
〔 0 0 7 2 〕

【化 1 8 】

10



式Va



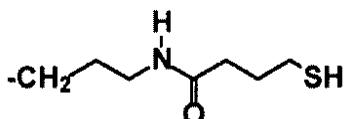
式Vb

したがって、本発明のオリゴ糖結合体は、式ⅤaまたはⅤbの化合物を式Ⅰの化合物とカップリングさせることによって合成され得る。一時的なS-保護基の変換とその後の除去（実施例8）、または対応する中間体ジスルフィドの還元（実施例7）により、オリゴ糖の担体化合物との結合に使用される最終的な連結基の生成が生じる。そのような最終的な連結基は実施例7および8に記載され、式ⅤIの構造を有する。

[ 0 0 7 3 ]

【化 1 9 】

20



式 VI.

オリゴ糖は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、または100個の単糖単量体を含み得る。いくつかの重要な実施形態においては、オリゴ糖は5個以上の単量体を含み、5、7、9または11個の単量体を含む。いくつかの実施形態においては、オリゴ糖は、2～20個の単量体、または3～20個の単量体、または4～20個の単量体、または5～20個の単量体を含む。

30

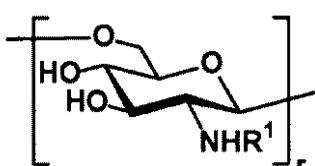
[ 0 0 7 4 ]

いくつかの重要な実施形態においては、単量体はグルコサミンであり、オリゴ糖は連結されたグルコサミンである。グルコサミン単量体の構造（連結されたグルコサミンの中に存在する場合）は以下のとおりである：

[ 0 0 7 5 ]

### 【化 20】

40



式VII

式中、R<sup>1</sup>は、「遊離の」アミノ基を持つグルコサミン単位の場合にはHであり、また、R<sup>1</sup>は、N-アセチル化グルコサミン単位の場合にはアセチル基(COCH<sub>3</sub>)である。これらの単位は-(1-6)-結合によって連結される。2、3、4、5、6、7、8、9、10、50個、またはそれ以上の単位から100単位まで(アセチル基で置換され

50

ているかまたは未置換であるかは問わない)を含む、任意の数のグルコサミン単位が連結され得る。

【0076】

式VIIの化合物中のN-アセチル化の程度は様々であり得る。これは、0~50%のN-アセチル化の範囲(すなわち、R<sup>1</sup>のうちの0~50%がアセチル基である)であり得、これには0~40%のN-アセチル化が含まれる。いくつかの実施形態においては、

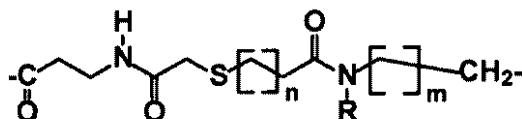
- (1-6)結合グルコサミンは、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10 10%未満、または5%未満がN-アセチル化グルコサミンである。いくつかの重要な実施形態においては、オリゴ糖の中でのN-アセチル化のレベルとアセチル基の位置は、合成方法によってわかる。すなわち、オリゴ糖は、N-アセチル基を有しているグルコサミン単位またはN-アセチル基を有さないグルコサミン単位の規則正しい配列から合成され得る。実施例は、定義された規則正しいアセチル置換を有しているオリゴ糖を生産するための方法を提供する。加えて、Geningら、Carbohydrate Research 2007 342:567-575, Geningら、Russian Journal of Bioorganic Chemistry 2006 32(4):389-399, Yang and Du Carbohydrate Research 2003 338:495-502, Yangら、Carbohydrate Research 2003 338:1313-1318、およびFridmanら、Organic Letters 2002 4(2):281-283を参照することができる。

【0077】

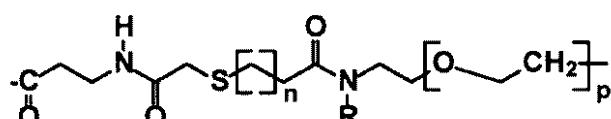
本発明はなおさらに、式VIIIfまたはVIIIfのリンカーを介して担体化合物に結合させられたオリゴ糖を含むオリゴ糖-担体結合体を含有する組成物を提供する。

【0078】

【化21】



式VIIIa



式VIIIb

式中、リンカーはオリゴ糖にO結合され、担体化合物にN結合される。

【0079】

本発明はさらに、オリゴ糖-担体結合体を合成するための方法を提供する。この方法は、式IXaまたはIXbの構造:

【0080】

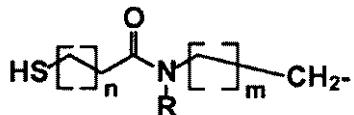
10

20

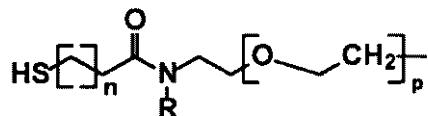
30

40

## 【化22】



式IXa



10

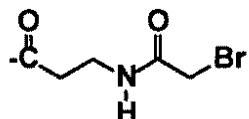
式IXb

(実施例7および8に由来する化合物の場合)

を有しているリンカーのような、SH終結リンカーを含むオリゴ糖結合体を、式Xの化合物:

【0081】

【化23】



20

式X

の結合によりその中の末端アミノ基が修飾されている担体化合物と反応させて、式VIIaまたはVIIbの構造を有しているリンカーを介して担体化合物に結合させられたオリゴ糖を生じさせる工程による。

【0082】

いくつかの実施形態においては、式VIIaまたはVIIbのリンカーは、その末端CH<sub>2</sub>基を介して、オリゴ糖の「還元性末端」でグルコサミン単位のO1原子に連結される。そのような連結はO結合とみなされ、このオリゴ糖はリンカーにO結合されていると言われる。

30

【0083】

いくつかの実施形態においては、式VIIaまたはVIIbのリンカーは、アミド結合によって担体化合物中のアミノ基に対して、末端CO基を介して連結される。そのような連結はN結合とみなされ、この担体はリンカーにN結合されていると言われる。

【0084】

アミノ基含有担体と、上記のような、実施例8および9に記載のSH終結リンカーを有しているオリゴグルコサミンとの結合体の調製には、試薬SBAPを使用することができる。しかし、本発明は、(特に、G. Hermansson, 'Biocconjugate Techniques', 第2版、Academic Press, 2008に記載されているような)アミノ基含有担体とSH終結オリゴ糖を連結させるために適している他の試薬の使用を意図する。

40

【0085】

担体化合物

「担体化合物」(または担体(これらの用語が本明細書中で互換的に使用されるとおりである))は、本明細書中で使用される場合は、本発明のリンカーの使用によりオリゴ糖に結合させられる化合物である。典型的には、担体化合物は、オリゴ糖リガンドに対する免疫応答を増強するものである。

【0086】

50

担体化合物としては、タンパク質、ペプチド、多糖類、核酸、または他のポリマー、脂質、および小さいオリゴマー分子 (small oligomeric molecules)、特にデンドリマーが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態においては、担体化合物は自然界に存在しているものであり得、また、自然界に存在しているものに由来するものもあり得る。タンパク質としては、例えば、以下が挙げられる：血漿タンパク質（例えば、血清アルブミン、免疫グロブリン、アポリポタンパク質、およびトランスフェリン）；細菌ポリペプチド（例えば、破傷風トキソイド（TT）、TR PLE、-ガラクトシダーゼ、ヘルペスgDタンパク質のようなポリペプチド、アレルギー誘発物質、ジフテリアトキソイド、サルモネラのフラジェリン（salmonell a flagellin）、ヘモフィルスの纖毛（hemophilus pilin）、ヘモフィルスの15 kDa、28～30 kDa、および40 kDaの膜タンパク質、Escherichia coliの易熱性エンテロトキシン（heat label enterotoxin）1tb、コレラ毒素、ならびにウイルスタンパク質（ロタウイルスVP、ならびに呼吸器合胞体ウイルスfおよびgタンパク質を含む）。本発明に有用な担体としては、哺乳動物への投与について安全であり、状況に応じて、免疫学的に有効な担体タンパク質である任意のタンパク質が挙げられる。したがって、いくつかの実施形態においては、担体化合物はそれ自体が免疫原性であり得る。例として、限定されないが本明細書中に列挙されるもののような細菌種に対するワクチンにおいて、またはそのようなワクチンとして使用されている化合物が挙げられる。

## 【0087】

10

免疫化に特に有用である担体化合物としては、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、または大豆トリプシン阻害剤のようなタンパク質が挙げられる。免疫化される動物の種において免疫原性である任意の他の化合物が同様に使用され得る。

## 【0088】

20

実施例に示されるように、本発明のオリゴ糖 - 担体結合体における担体に対するオリゴ糖の比は様々であり得る。例えば、オリゴ糖 - 担体結合体は、1：1、少なくとも2：1、少なくとも3：1、少なくとも4：1、少なくとも5：1、少なくとも6：1、少なくとも7：1、少なくとも8：1、少なくとも9：1、または少なくとも10：1の、担体に対するオリゴ糖の比を有し得る。なお他の実施形態においては、この比は、少なくとも20：1、少なくとも30：1、少なくとも40：1、少なくとも50：1、少なくとも60：1、少なくとも70：1、少なくとも80：1、少なくとも90：1、またはそれ以上であり得、例えば、オリゴ糖リガンドの結合についての担体化合物の能力に応じて100：1または700：1まであり得る。一例として、少なくとも3：1の担体に対するオリゴ糖の比を有する結合体は、1つの担体化合物に対して少なくとも3個のオリゴ糖部分が結合した結合体である。

30

## 【0089】

## 有用性

本発明の組成物は、多数のインピトロでの用途とインピボでの用途を有する。例えば、本発明の組成物は、抗体応答を生じさせるために、例えば、天然のP N A Gを作るかまたは作ることができる細菌の種（ブドウ球菌を含むがこれに限定されない）による感染を防ぐための、ヒトおよび動物の能動免疫化のためのワクチンとして；天然のP N A Gを作るかまたは作ることができる細菌の種（ブドウ球菌を含むがこれに限定されない）による感染を予防もしくは処置するために他のヒトあるいは動物に投与することができる抗d P N A G抗体を生産するようにヒトあるいは動物を免疫化するためのワクチンとして；天然のP N A Gを作るかまたは作ることができる細菌の種（ブドウ球菌を含むがこれに限定されない）による感染を予防することができるモノクローナル抗体、抗体を作ることに関係がある遺伝子のライブラリー、またはペプチド模倣物のような生物学的因子をスクリーニングするための抗原として；天然のP N A Gを作るかまたは作ることができる細菌の種（ブドウ球菌を含むがこれに限定されない）による感染についての診断試薬として；ならびに

40

50

、天然のP N A Gを作るかまたは作ることができる細菌の種（ブドウ球菌を含むがこれに限定されない）による感染に対するそれらの感受性に関してヒトまたは動物の免疫学的状態を決定するための診断試薬として有用である。

【 0 0 9 0 】

感染の処置および予防

本発明は、被検体において、天然のP N A Gを作るかまたは作 POSSIBILITY 10 ことができる細菌の種（ブドウ球菌を含むがこれに限定されない）による感染を処置または予防するための方法を提供する。この方法は、本発明のオリゴ糖-担体結合体の免疫応答を誘導するための有効量を、そのような感染を発症しているかまたはそのような感染を発症するリスクがある被検体に投与する工程を含む。

【 0 0 9 1 】

本発明の別の態様は、被検体において、天然のP N A Gを作るかまたは作 POSSIBILITY 10 ことができる細菌の種（ブドウ球菌を含むがこれに限定されない）による感染に対して防御する本発明の結合体の能力を評価するための方法を提供する。この方法は、有効量の結合体を被検体に投与する工程（ここで、結合体は、能動免疫を誘導する）、被検体を天然のP N A Gを作るかまたは作ことができる細菌種に曝す工程、および被検体における上記細菌種の存在を試験する工程を含む。

【 0 0 9 2 】

被検体は、上記細菌種への暴露のリスクがある被検体であり得、また、上記細菌種に暴露されている被検体でもあり得る。結合体は、他の薬剤（例えば、1種類以上のアジュバントおよび／または1種類以上の抗菌剤などであるがこれに限定されない）と一緒に組成物中で投与され得る。

【 0 0 9 3 】

感染はブドウ球菌感染であり得る。ブドウ球菌感染は、*Staphylococcus aureus*感染、*Staphylococcus epidermidis*感染であり得るが、そのように限定はされない。感染は、*E. coli*感染、*Y. pestis*感染、*Y. enterocolitica*感染、*Y. pseudotuberculosis*感染、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*感染、*Actinobacillus pleuropneumoniae*感染、*Bordetella pertussis*感染、*B. parapertussis*感染、*B. bronchiseptica*感染、アシネトバクター感染（アシネトバクター複合生物による感染を含む）、バークホルデリア感染（バークホルデリア複合生物による感染を含む）、*Stenatrophomonas maltophilia*感染、赤痢菌（様々な種）感染、またはクレブシエラ（様々な種）感染であり得る。

【 0 0 9 4 】

本発明にしたがって生成された抗体はまた、オリゴ糖-担体結合体に対する免疫応答によって誘導された抗体と反応する分子をつくる任意の感染性または病原性微生物による感染を予防あるいは処置するためにも使用され得る。

【 0 0 9 5 】

「免疫応答（例えば、抗体応答）を誘導するための有効量」は、本明細書中で使用される場合は、（i）例えば、被検体において抗体の生産を誘導すること、記憶細胞の生産を誘導すること、およびおそらく、細胞傷害性リンパ球反応などにより、その自身の免疫防御を生じるように被検体を支援するため、ならびに／あるいは（ii）P N A Gを作るかもしくは作ることができる感染性または病原性微生物（ブドウ球菌を含むがこれに限定されない）に曝される被検体において感染が起こることを防ぐために十分な量である。

【 0 0 9 6 】

いくつかの好ましい実施形態においては、免疫応答を刺激するためのワクチンの有効量は、少なくとも2種類のブドウ球菌（例えば、*S. aureus*および*S. epidermidis*）と交差反応性である抗体の生産を誘発することができるワクチンの量である。

## 【0097】

当業者は、ある量が能動免疫を誘導するために十分であるかどうかを、当該分野で公知の日常的に行われている方法によって評価することができる。例えば、哺乳動物において抗体を生産する特異的結合体の能力は、結合体またはそれらの対応するオリゴ糖を使用してマウスあるいは他の被検体において抗体についてスクリーニングすることによって評価することができる。

## 【0098】

本明細書中で使用される被検体としては、ヒトおよびヒト以外の被検体が挙げられる。ヒト以外の被検体としては、伴侶動物（例えば、イヌ、猫、フェレット、鳥類など）、農業用動物（例えば、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ニワトリなど）、動物園の動物（例えば、キリン、ライオン、トラ、ゾウ、クマなど）、実験動物（例えば、マウス、ラット、ウサギなど）が挙げられるが、これらに限定されない。被検体は60歳を超えたヒトであり得る。被検体は健常者であり得る。

10

## 【0099】

本発明にしたがって処置される被検体には、病院環境にある細菌への暴露の結果としてブドウ球菌感染を発症するリスクがある入院患者が含まれる。S. aureusによる感染を発症することについて特にハイリスクの集団には、例えば、透析を受けてる腎臓病患者、ハイリスクの外科手術を受けてる個体が含まれる。S. epidermidisによる感染を発症することについてハイリスクの集団（例えば、留置型の医療用デバイス（indwelling medical devices）（例えば、静脈ライン（例えば、中心静脈ライン）、またはプロテーゼ（例えば、腰または膝の人工関節置換プロテーゼ）を持つ患者）もまた、臨床単離株は、多くの場合に、プラスチックの表面に対して高度に付着性であるので含まれる。いくつかの実施形態においては、被検体は医療用デバイスが埋め込まれた被検体であり、他の実施形態においては、被検体は、医療用デバイスは埋め込まれていないが、埋め込まれるように予定され得る被検体である。S. epidermidisによる感染を発症するハイリスクの被検体にはさらに、例えば、早期新生児、および化学療法を受けてる患者が含まれる。本発明にしたがって処置されるさらなる被検体には、発病し、そして病因環境または地域集団環境における細菌への暴露の結果としてPNAGを作るかまたは作ることができる微生物の感染を発症するリスクがある地域集団の中の、入院患者あるいは個体が含まれる。

20

## 【0100】

## 免疫応答の誘導および抗体の作製

本発明はさらに、被検体において免疫応答を刺激するための方法を提供する。この方法は、被検体において免疫応答を刺激するために有効な量の本発明のオリゴ糖-担体結合体をそれが必要な被検体に投与する工程を含む。免疫応答は抗原特異的免疫応答であり得る。これは、細胞性免疫応答および/または体液性免疫応答であり得る。例えば、免疫応答は、抗体および/または抗体を生産する細胞の生産を生じ得る。

30

## 【0101】

「受動免疫」は、本明細書中で使用される場合は、被検体への抗体の投与（ここで、抗体は異なる被検体（同じ種の被検体および異なる種の被検体を含む）の中で生産される）を含み、その結果、抗体は細菌の表面に付着し、細菌の取り込みを生じる。

40

## 【0102】

本発明の結合体を使用して作製された抗体は、PNAGを作る種、または受動免疫を誘導するように抗体と反応する別の分子を作る種による感染を発症するリスクがある任意の被検体に投与され得、そしていくつかの実施形態においては、能動免疫を誘導することができない被検体に特に適し得る。抗原での予防接種は、ハイリスクの免疫不全被検体においては完全には有効ではない可能性があるので、これらの被検体には、感染（例えば、Staphylococcus aureusが原因である感染）を予防または処置するために、本発明のオリゴ糖-担体結合体に対して惹起された抗体調製物での処置が有効であろう。免疫応答を誘導することができない被検体は免疫不全被検体（例えば、化学療法を

50

受けている患者、AIDS患者など)または免疫系がまだ発達していない被検体(例えば、早期新生児)である。

【0103】

したがって、本発明は、抗体を生産するための方法を提供する。この方法は、本発明のオリゴ糖-担体結合体を使用して、生物(例えば、ブドウ球菌)によって発現されるPNA G分子に特異的な抗体を生産させるための有効量を被検体に投与する工程、および被検体から抗体を単離する工程を含む。抗体はポリクローナル抗体であり得る。抗体はさらに修飾され得る。

【0104】

本発明はさらに、モノクローナル抗体を生産するための方法を提供する。この方法は、本発明のオリゴ糖-担体結合体を使用して、PNA G分子に特異的な抗体を生産させるための有効量を被検体に投与する工程、抗体を生産する細胞を、被検体由来のそのような細胞を含む任意の組織(例えば、脾臓または血液)から採取する工程、被検体由来の抗体を生産する細胞を骨髄腫細胞に対して融合させる工程、および融合体のサブクローンによって生産された抗体を採取する工程を含む。

10

【0105】

本発明は、本発明のオリゴ- - (1-6)-D-グルコサミンに特異的な様々な抗体の作製を意図する。これらの抗体には、キメラ抗体(例えば、ヒト化抗体および抗体断片、ならびに完全なモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体)が含まれる。「ヒト化モノクローナル抗体」は、本明細書中で使用される場合は、少なくともヒト定常領域と、ヒト以外の種に由来する抗原結合領域(例えば、1、2、3、4、5、もしくは6個のCDR、または1もしくは2個の可変領域、またはFabもしくはF(ab)<sub>2</sub>断片)を有しているヒトモノクローナル抗体あるいはその機能的活性のある断片である。例えば、ヒト化モノクローナル抗体は、もとの抗体のエピトープ特異性を保ったまま、ヒト抗体の類似する領域でヒト以外の哺乳動物の抗体の非CDR領域を置き換えることによって構築され得る。例えば、非ヒトCDR、および状況に応じてフレームワーク領域のいくつかは、機能性抗体が生産されるように、ヒトFRおよび/またはFc/pFc'領域に共有結合され得る。欧州特許出願番号0239400(その内容全体が引用により本明細書中に組み入れられる)は、マウス(または他のヒト以外の哺乳動物)抗体の少なくともCDR部分がヒト化抗体に含まれている、ヒト化モノクローナル抗体の生産および使用についての例示的な教示を提供する。特異的なマウス抗体領域からヒト化抗体を商業的に合成できる団体(例えば、Protein Design Labs(Mountain View California)、Abgenix、およびMedarex)が米国に複数ある。

20

【0106】

単離された形態の、または薬学的調製物中の完全なヒト化モノクローナル抗体は、本発明のいくつかの態様に特に適している。ヒト化抗体は、特定の臨床的有用性を有する。その理由は、これらはヒトにおいては、抗体自体に対して免疫応答を引き起こすことはないであろうからである。1つの好ましい実施形態においては、マウスCDRがヒト抗体のフレームワーク領域に移植されて、「ヒト化抗体」が調製される。例えば、L.Riechmannら、Nature 332, 323(1988); M.S.Neubergerら、Nature 314, 268(1985)、およびEPA 0239400(1987年9月30日に公開された)を参照のこと。

30

【0107】

ヒトモノクローナル抗体は、以下のような任意の当該分野で公知の方法によって作られ得る: Borrebaeckらに対して発行された米国特許第5,567,610号、Ostbergに対して発行された米国特許第565,354号、Bakerらに対して発行された米国特許第5,571,893号、Kozber, J. Immunol. 133:3001(1984)、Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,

40

50

p. 51 - 63 (Marcel Dekker, Inc, new York, 1987)、およびBoernerら、J. Immunol., 147: 86 - 95 (1991)の中で開示されている方法。

【0108】

ヒトモノクローナル抗体を調製するための従来法に加えて、そのような抗体はまた、ヒト抗体を生産することができるトランスジェニック動物を免疫化することによっても調製され得る(例えば、Jakobovitsら、PNAS USA, 90: 2551 (1993)、Jakobovitsら、Nature, 362: 255 - 258 (1993)、Bruggermannら、Year in Immunol., 7: 33 (1993)、およびLonbergに対して発行された米国特許第5,569,825号)。

10

【0109】

ヒト抗体はまた、ヒトの血液または他の組織から抗体を生産するリンパ球を回収することによっても得ることができる。これらのリンパ球は、研究室において適切な培養条件下で自然に増殖する(grow on their own)細胞を生じるように処理することができる。細胞培養物は、本発明の結合体に対する抗体の生産についてスクリーニングされ得、その後、クローニングされ得る。クローン培養が、ヒトモノクローナル抗体を生産させるために使用され得るか、または、抗体の重鎖および軽鎖の可変部分をコードする遺伝子エレメントがクローニングされ得、様々なタイプの抗体の生産のために核酸ベクターに挿入され得る。

【0110】

20

抗体断片もまた本発明に含まれる。周知の機能的活性のある抗体断片としては、抗体の $F(ab')、Fab、Fv、およびFd断片が挙げられるが、これらに限定されない。完全な抗体のFc断片を持たないこれらの断片は、循環からより迅速に消えてなくなり、完全な抗体よりも非特異的組織への結合が少ない場合がある(Wahlら、J. Nuc. Med. 24: 316 - 325 (1983))。例えば、単鎖抗体は、Ladnerらの米国特許第4,946,778号に記載されている方法にしたがって構築され得る。そのような単鎖抗体は、可動性リンカー部分によって連結された軽鎖および重鎖の可変領域を含む。単離された可変重鎖単一ドメインを含む単一ドメイン抗体(single domain antibody)('Fd')を得るための方法もまた報告されている(例えば、単離された形態でそれらに結合するその標的エピトープに対して十分な親和性を有している抗体重鎖可変領域( $V_H$ 単一ドメイン抗体)を同定するためのスクリーニング方法を開示している、Wardら、Nature 341: 644 - 646 (1989)を参照のこと)。既知の抗体重鎖可変領域配列と軽鎖可変領域配列に基づいて組み換え体Fv断片を作製するための方法は当該分野で公知であり、例えば、Mooreら、米国特許第4,462,334号に記載されている。抗体断片の使用と作製を記載している他の参考文献としては、例えば、Fab断片(Tijssen、Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam, 1985))、Fv断片(Hochmanら、Biochemistry 12: 1130 (1973); Sharonら、Biochemistry 15: 1591 (1976); Ehrlichら、米国特許第4,355,023号)、および抗体分子の一部(Audilore-Hargreaves、米国特許第4,470,925号)が挙げられる。したがって、当業者は、抗体の特異性を損なうことなく、完全な抗体の様々な部分に由来する抗体断片を構築できる。$

30

【0111】

組成物および薬学的調製物

例えば本発明のオリゴ糖-担体結合体を含む本発明の組成物は、薬学的に許容される賦形剤と一緒に処方され得る。用語「薬学的に許容される賦形剤」は、本明細書中で使用される場合は、ヒトまたは他の動物への投与に適している1種類以上の適合性の固体もしくは液体の增量剤、希釈剤、またはカプセル化物質(encapsulating substance)を意味する。本発明においては、用語「賦形剤」は、適用を容易にするた

40

50

めに有効成分がそれと組み合わせられる、有機もしくは無機の、天然または合成の成分を示す。薬学的組成物の成分はまた結合体とも、互いに、所望される薬学的効力を実質的に損なうであろう相互作用が起こらない様式で混合することができる。

【0112】

したがって、本発明の組成物は薬学的調製物とみなされ得る。これはインビボで使用され得るが、その使用はそのようには限定されない。インビボで使用される場合は、これは、治療的、予防的、または研究の目的を問わず、ヒトまたはヒト以外の被検体において使用され得る。一例として、組成物は、マウス、ウサギのようなヒト以外の被検体、および他の適している動物宿主において、抗体ならびに／あるいは抗体を生産する細胞を作製するためには使用され得る。

10

【0113】

したがって、本発明は、上記オリゴ糖・担体結合体のいずれかを含む薬学的調製物を提供する。これはワクチンとして使用され得る。これらの調製物は、免疫応答（例えば、抗原特異的免疫応答）を刺激するために有効な量の結合体を含み得る。これらの調製物は、他の構成要素または成分（例えば、アジュバントおよび抗菌剤であるが、これらに限定されない）を含み得る。そのような調製物は、通常は、薬学的に許容される濃度の塩、緩衝剤、保存剤、適合性担体、アジュバント、および状況に応じた他の治療用成分を含み得る。

【0114】

ワクチンの処方に適している担体媒体として、リン酸ナトリウム緩衝化生理食塩水（pH 7.4）、またはpH 6のリン酸ナトリウム緩衝化生理食塩水および他の従来からの媒体の中に懸濁させられた0.125Mのリン酸アルミニウムゲルが挙げられる。一般的には、ワクチンは、温血動物において抗体の有効なレベルを誘発するために、約5～約100μg、好ましくは約10～50μgの抗原を含む。

20

【0115】

アジュバントは、その中に抗原が取り込まれるかまたは投与される（同時に、または別の方法で）任意の物質であり、これは、被検体において抗原に対する免疫応答を強化する。アジュバントとしては、アルミニウム化合物（例えば、ゲル、水酸化アルミニウム、およびリン酸アルミニウム）、ならびにフロイトの完全なまたは不完全なアジュバント（例えば、その中に抗原が、パラフィン系オイルエマルジョン中の安定化させられた水の水相に取り込まれる）が挙げられるが、これらに限定されない。パラフィン系オイルは、様々なタイプのオイル（例えば、スクワレンまたはピーナッツ油）で置き換えられ得る。アジュバント特性を持つ他の材料としては、BCG（弱毒化Mycobacterium tuberculosis）、リン酸カルシウム、レバミゾール、イソブリノシン、多価陰イオン（例えば、ポリA:U）、レンチナン、百日咳毒素、リピッドA、サポニン、QS-21、およびペプチド（例えば、ムラミルジペプチド）、および免疫賦活オリゴヌクレオチド（例えば、CpGオリゴヌクレオチド）が挙げられる。希土類元素の塩（例えば、ランタンおよびセリウム）もまたアジュバントとして使用され得る。アジュバントの量は、被検体および使用される特定の抗原に応じて様々であり、過度の実験を行うことなく当業者によって容易に決定され得る。

30

【0116】

抗菌剤は、細菌を（例えば、溶解によって）死滅させるか、またはそれらの分裂を妨げる薬剤である。細菌感染の処置における抗生素質の使用は日常的に行われていることである。抗菌剤としては、以下が挙げられる：ペニシリンG、ペニシリンV、アンピシリン、アモキシシリン、バカンピシリン、シクラシリン（cyclacillin）、エピシリン、ヘタシリン、ピバンピシリン（pivampicillin）、メチシリン、ナフシリン、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、カルベニシリン、チカルシリン、アブロシリン（avlocillin）、メズロシリン、ピペラシリン、アムジノシリン（amidinocephillin）、セファレキシン、セフラジン、セファドロキシル（cefaadoxil）、セファクロール、セファゾリン、セフロキ

40

50

シムアキセチル (cefuroxime axetil) 、セファマンドール、セフォニシド、セフォキシチン、セフォタキシム、セフチゾキシム、セフメノキシン、セフトリアキソン、モキサラクタム、セフォテタン、セフォペラゾン、セフタジジム (ceftazidime) 、イミペネム、クラブランナート (clavulanate) 、チメンチン (timentin) 、スルバクタム、ネオマイシン、エリスロマイシン、メトロニダゾール、クロラムフェニコール、クリンダマイシン、リンコマイシン、バンコマイシン、トリメトプリム - スルファメトキサゾール、アミノグリコシド、キノロン、テトラサイクリン、およびリファンピン (Goodman and Gilman's, Pharmacological Basics of Therapeutics, 第8版、1993年、McGraw Hill Inc. を参照のこと)。

10

## 【0117】

結合体は、他の部分 (造影剤、蛍光色素分子、酵素などのような検出可能標識を含むがこれらに限定されない) に対して共有結合または非共有結合され得る。

## 【0118】

非経口投与に適している組成物は、通常は、レシピエントの血液と等張性であり得る滅菌の水性調製物を含む。中でも、使用され得る許容される賦形剤および溶媒は、水、Ringer's 溶液、および等張性の塩化ナトリウム溶液である。加えて、滅菌の固定油が、溶媒または懸濁媒体として便利に使用される。この目的については、合成のモノグリセリドまたはジグリセリドを含む任意の無刺激性の固定油が使用され得る。加えて、オレイン酸のような脂肪酸については、注射物質の調製における用途が見出される。皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内などでの投与に適している担体処方物は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. の中に見ることができる。

20

## 【0119】

本発明の調製物は有効量で投与される。有効量は、上記で議論されたように、いくつかの場合には、単独で、もしくはさらなる用量と一緒に、被検体に応じて能動免疫または受動免疫を誘導するであろう量である。投与の態様に応じて、1 ng / kg ~ 100 mg / kg の範囲の用量が有効であろうと考えられる。好ましい範囲は、500 ng ~ 500 μg / kg の間、そして最も好ましくは1 μg ~ 100 μg / kg の間であると考えられる。絶対量は、投与がまだ細菌に感染していないハイリスクの被検体に行われるかまたはすでに感染している被検体に行われるか、併用療法、投与回数、ならびに、年齢、健康状態、大きさおよび体重を含む個々の患者のパラメーターを含む様々な要因に応じて変わるであろう。これらは当業者に周知の要因であり、日常的に行われている実験以上を行わなくとも対応することができる。最大用量が使用され得る、すなわち、正常な医学的判断に従う最大の安全な用量が使用されることが、一般的には好ましい。

30

## 【0120】

本発明の組成物の反復投与が意図される。一般的には、免疫化スキームは、高用量の抗原の投与と、その後の、数週間の期間待った後より低用量の抗原の投与を含む。さらなる用量がさらに投与され得る。受動免疫化のための投与スケジュールは、必要に応じたより頻繁な投与とはかなり異なるであろう。細菌感染に対する免疫応答の増強および/またはそれに続く感染の防御を生じる任意のレジュメが使用され得る。特定の結合体の複数回投与の送達のための望ましい時間間隔は、日常的に行われている実験以上のものを使用することなく当業者によって決定され得る。

40

## 【0121】

様々な投与経路が利用可能である。選択される特定の態様は、もちろん、選択される特定の結合体、処置される特定の症状、および治療効力に必要な投与量に応じて様々であろう。一般的に言うと、本発明の方法は、医学的に許容される任意の投与の態様 (臨床的に許容されない副作用を生じることなく効果的なレベルの免疫応答を生じる任意の態様を意味する) を使用して実施され得る。好ましい投与の態様は非経口経路である。用語「非経口」は、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、および胸骨内 (intrasternal) 注

50

射または注入技術を含む。他の経路としては、経口、鼻、皮膚、舌下、および局所が挙げられるが、これらに限定されない。

【0122】

以下の実施例は説明の目的のために含まれ、本発明の範囲を限定するようには意図されない。

【実施例】

【0123】

本発明の複数の態様は、以下の限定ではない実施例によってさらに説明される。これらの実施例は、とりわけ、オリゴ-<sub>1-6</sub>-D-グルコサミンオリゴ糖を作製するための方法、および担体（例えば、タンパク質担体）に対してそのようなオリゴ糖を結合させるための方法を説明する。そのような結合体は、とりわけ、ワクチンとして使用され得る。

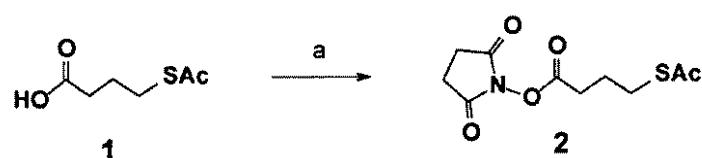
【0124】

（実施例1）

N-ヒドロキシスクシンイミジル4-アセチルスルファニルブチラート2の合成

【0125】

【化24-1】



スキーム1. 連結試薬2の合成。a: CF<sub>3</sub>COOSu, ピリジン

ジクロロメタン（4 mL）中の酸1（Hogg, J. Heather; Ollmann, Ian R.; Wetterholm, Anders; Andberg, Martin a Blomster; Haeggstroem, Jesper; Chem. Euro p. J.; EN; 4; 9; 1998; 1698-1713）（237 mg、1.46 mmol）とN-ヒドロキシスクシンイミジルトリフルオロアセテート（431 mg、2.02 mmol）の溶液に対して、ピリジン（355 μL、4.4 mmol）を添加し、得られた溶液を室温で2時間攪拌した。この混合物をジクロロメタン（50 mL）で希釈し、氷冷した1MのHClおよび水で洗浄し、そして濃縮した。残渣のシリカゲルカラムクロマトグラフィー（トルエン-酢酸エチル9:1）により、活性エステル2（359 mg、95%）を無色のシロップとして得た。

【0126】

【化24-2】

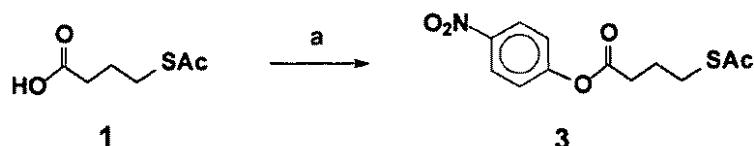
<sup>1</sup>H NMR データ(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ 2.00 (m, 2 H, β-CH<sub>2</sub>), 2.33 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>COS), 2.68 (t, 2 H, J 7.4 Hz, γ-CH<sub>2</sub>), 2.81 (s, 4 H, スクシンイミドの2CH<sub>2</sub>), 2.96 (t, 2 H, J 7.1 Hz, α-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR データ(62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 24.7 (β-CH<sub>2</sub>), 25.6 (スクシンイミドのCH<sub>2</sub>), 27.9 (γ-CH<sub>2</sub>), 29.7 (α-CH<sub>2</sub>), 30.7 (CH<sub>3</sub>COS), 168.0 (CO-ON), 169.2 (スクシンイミドのCO), 195.4 (CH<sub>3</sub>COS).

（実施例2）

4-ニトロフェニル4-アセチルスルファニルブチラート3の合成

【0127】

## 【化25-1】



スキーム2. 連結試薬3の合成。a:  $\text{CF}_3\text{COOPn}_p$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ .

ジクロロメタン中の酸1 (233 mg, 1.44 mmol) (Hogg, J. Heat her; Ollmann, Ian R.; Wetterholm, Anders; Andberg, Martina Blomster; Haeggstroem, Jesperら; Chem. Europ. J.; EN; 4; 9; 1998; 1698-1713) と4-ニトロフェニルトリフルオロアセテート (470 mg, 2 mmol) の溶液に対して、トリエチルアミン (400  $\mu\text{L}$ , 2.88 mmol) を添加し、この溶液を室温で2時間攪拌した。この混合物を2について記載したように処理し (worked-up)、活性エステル3 (385 mg, 94%) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン-酢酸エチル92:8) によって単離した。

## 【0128】

## 【化25-2】

$^1\text{H}$  NMR データ (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  2.03 (m, 2 H,  $\beta\text{-CH}_2$ ), 2.36 (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{COS}$ ), 2.68 (t, 2 H,  $J$  7.2 Hz,  $\gamma\text{-CH}_2$ ), 3.01 (t, 2 H,  $J$  7.1 Hz,  $\alpha\text{-CH}_2$ ), 7.28, 8.26 (2 d, 4 H, 芳香族).  $^{13}\text{C}$  NMR データ (62.9 MHZ,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  24.7 ( $\beta\text{-CH}_2$ ), 28.0 ( $\gamma\text{-CH}_2$ ), 30.7 ( $\text{CH}_3\text{COS}$ ), 32.7 ( $\alpha\text{-CH}_2$ ), 122.5, 125.2, 145.3, 155.3 (芳香族C), 170.4 (COO), 195.5 ( $\text{CH}_3\text{COS}$ ).

## (実施例3)

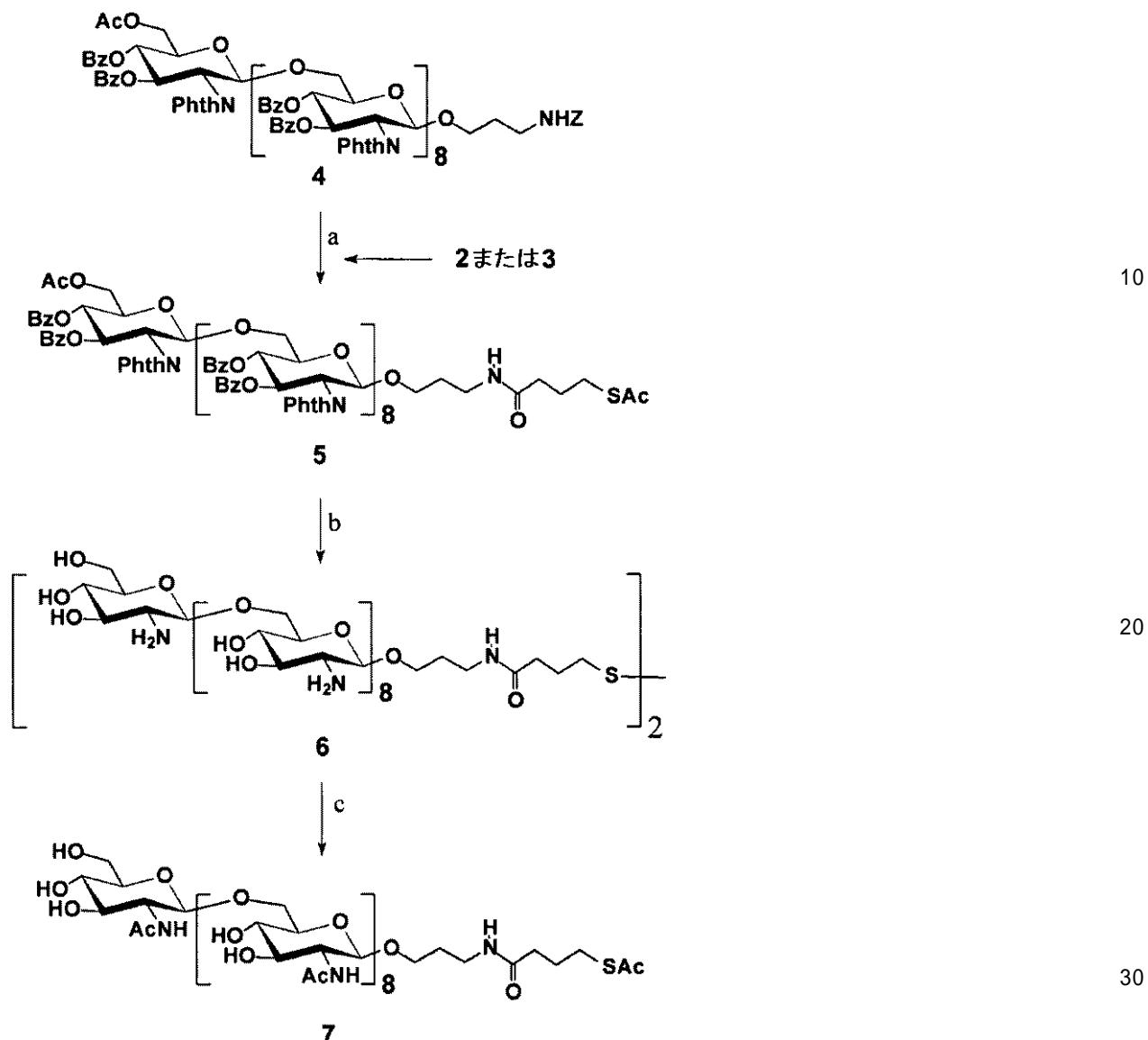
連結試薬2または3を使用したリガンド6および7の合成

## 【0129】

10

20

## 【化26-1】



スキーム3. リガンドの合成。a: 1)  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ ,  $\text{MeOH}/\text{THF}$  2) 2または3,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; b:  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{EtOH}$ ,  $\Delta$ ; c: DTT,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ .

ノナサッカライド4 (M. L. Gening, Y. E. Tsvetkov, G. B. Pier, N. E. Nifantiev, 'Synthesis of oligo-(1-6)-glucosamines corresponding to the fragments of the surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus*', Carbohydr. Res. 342 (2007), 567-575) (110 mg, 0.023 mmol) を、 $\text{MeOH}$  (3 ml)、 $\text{THF}$  (6 ml)、および1 Mの $\text{HCl}$  (0.2 ml) の混合物中に溶解させ、 $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  (110 mg) を添加した。得られた混合物を水素雰囲気下で1時間攪拌した。触媒を濾過して取り除き、溶媒を蒸発させた。残渣を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 ml) と  $\text{DMF}$  (1 ml) の混合物中に溶解させ、その後、リンカー試薬2 (1.2 mg, 0.046 mmol,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中の 1 ml の溶液) と  $\text{Et}_3\text{N}$  (100  $\mu$ l) を添加した。30分後、この混合物をトルエンで希釈し、濃縮し、そしてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン /  $\text{Me}_2\text{CO}$ , 4 : 1) を行い、5 (98 mg, 98%) を無色の発泡体として得た。リンカーの導入を、保護された炭水化物リガンドのNMRスペクトル

40

50

におけるその特徴的なシグナルの存在によって確認した。

【0130】

【化26-2】

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.88 (m, 2 H, β-CH<sub>2</sub>), 2.21 (t, 2 H, J 7.2 Hz, γ-CH<sub>2</sub>), 2.31 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>COS), 2.88 (t, 2 H, J 7.1 Hz, α-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR データ (125 MHZ, CDCl<sub>3</sub>): δ 25.7 (β-CH<sub>2</sub>), 28.5 (α-CH<sub>2</sub>), 30.6 (CH<sub>3</sub>COS), 35.1 (γ-CH<sub>2</sub>).

保護されたノナサッカライド5 (95 mg、0.02 mmol)、EtOH (5 ml) 10 およびN<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0.5 ml) の混合物を還流下で1時間攪拌し、その後、濃縮し、0.1 MのAcOH水溶液中でゲル浸透クロマトグラフィー (TSK gel Toyopearl HW 40S、2.5 × 40 cm) を行って、ノナサッカライド6 (28 mg、86%) とした。ゲルクロマトグラフィーの直後には、SH誘導体を、これが質量スペクトル分析法によって検出されるように得ることができるが、溶液中での保存後は、これは<sup>13</sup>C NMR実験によって確認されるように、対応するジスルフィドに変換された。

【0131】

【化26-3】

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 1.95 (m, 2 H, β-CH<sub>2</sub>), 2.32 (t, 2 H, J 7.2 Hz, γ-CH<sub>2</sub>SH), 2.71 (t, 2 H, J 7.1 Hz, α-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR データ (125 MHZ, D<sub>2</sub>O): δ 29.7 (β-CH<sub>2</sub>), 35.8 (γ-CH<sub>2</sub>SH), 38.5 (α-CH<sub>2</sub>), 42.1 (γ-CH<sub>2</sub>SS).

質量スペクトル: C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N<sub>1</sub>O<sub>3</sub>Sについて計算した 543.234 [M + 3H]<sup>3+</sup>、実験用 543.243 [M + 3H]<sup>3+</sup>。

【0132】

ノナサッカライド6 (15 mg) を水 / MeOH (2 ml、1:1 v/v) の混合物中に溶解させ、ジチオスレイトール (15 mg) とNaHCO<sub>3</sub> (20 mg) を添加した。得られた混合物を5分間攪拌し、その後、無水酢酸 (100 μl) を添加し、攪拌を30分間継続し、その後、溶媒を蒸発させた。生成物を0.1 MのAcOH水溶液中でのゲル浸透クロマトグラフィー (TSK gel Toyopearl HW 40S、2.5 × 40 cm) によって精製して、アセチル化産物7 (15 mg、95%)を得た。

【0133】

【化26-4】

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 1.75 (m, 2 H, β-CH<sub>2</sub>), 2.11 (t, 2 H, J 7.2 Hz, γ-CH<sub>2</sub>), 2.43 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>COS), 2.75 (t, 2 H, J 7.1 Hz, α-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR データ (125 MHZ, D<sub>2</sub>O): δ 25.7 (β-CH<sub>2</sub>), 28.5 (α-CH<sub>2</sub>), 30.6 (CH<sub>3</sub>COS), 35.1 (γ-CH<sub>2</sub>).

質量スペクトル: C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>N<sub>1</sub>O<sub>4</sub>Sについて計算した 1024.418 [M + 2H]<sup>2+</sup>、実験用 1024.427 [M + 2H]<sup>2+</sup>。

【0134】

(実施例4)

連結試薬3を使用した保護されたリガンド5の合成

ノナサッカライド4 (60 mg、0.013 mmol) を、MeOH (1.5 ml)、THF (3 ml)、および1 MのHCl (0.1 ml) の混合物中に溶解させ、Pd(OH)<sub>2</sub>/C (60 mg) を添加した。得られた混合物を水素雰囲気下で1時間攪拌した。触媒を濾過して取り除き、溶媒を蒸発させた。残渣を、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 ml) とDMF (1 ml) の混合物中に溶解させ、その後、リンカー試薬3 (20 mg、0.07 mmol、1 mlのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の溶液) とEt<sub>3</sub>N (50 μl) を添加した。20時間後、50

この混合物をトルエンで希釈し、濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（トルエン /  $\text{Me}_2\text{CO}$ 、4 : 1）を行って 5 (37 mg、68%) を無色の発泡体として得た。

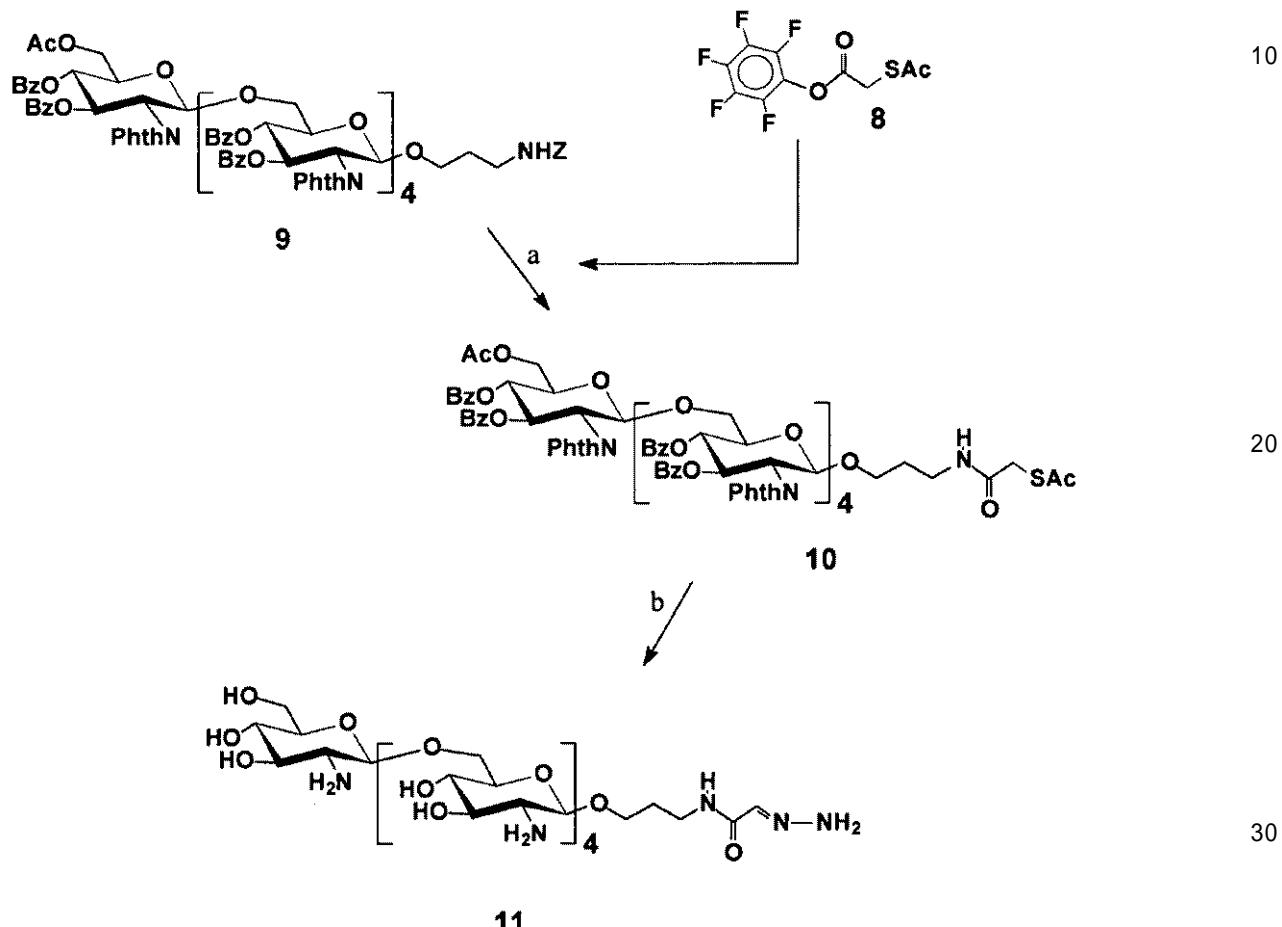
【0135】

（実施例5）

タンパク質とのさらなる結合のためのリガンドの調製のための連結試薬 8 の適用性の実験

【0136】

【化27-1】



## 【化27-2】

<sup>1</sup>H NMR データ (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COS), 3.53 (s, 2H, CH<sub>2</sub>S); <sup>13</sup>C NMR データ (125 MHZ, CDCl<sub>3</sub>): δ 30.2 (CH<sub>3</sub>COS), 32.9 (CH<sub>2</sub>S).

保護されたペントサッカライド 10 (100 mg、0.017 mmol)、EtOH (5 ml)、および N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>O (0.5 ml) の混合物を還流下で 1 時間攪拌し、その後、濃縮し、そして 0.1 M の AcOH 水溶液中でゲル浸透クロマトグラフィー (TSK gel Toyopearl HW 40S、2.5 × 40 cm) を行ってペントサッカライド 11 (32 mg、93%) とした。 10

## 【0138】

## 【化27-3】

<sup>1</sup>H NMR データ (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7.17 (s, 1H, CH=N); <sup>13</sup>C NMR データ (125 MHZ, D<sub>2</sub>O): δ 134.6 (C=N-NH<sub>2</sub>), 167.4 (C(O)-CH=N).

質量スペクトル: C<sub>35</sub>H<sub>67</sub>N<sub>8</sub>O<sub>22</sub> について計算した 951.438 [M + H]<sup>+</sup>、実験用 951.448 [M + H]<sup>+</sup>。

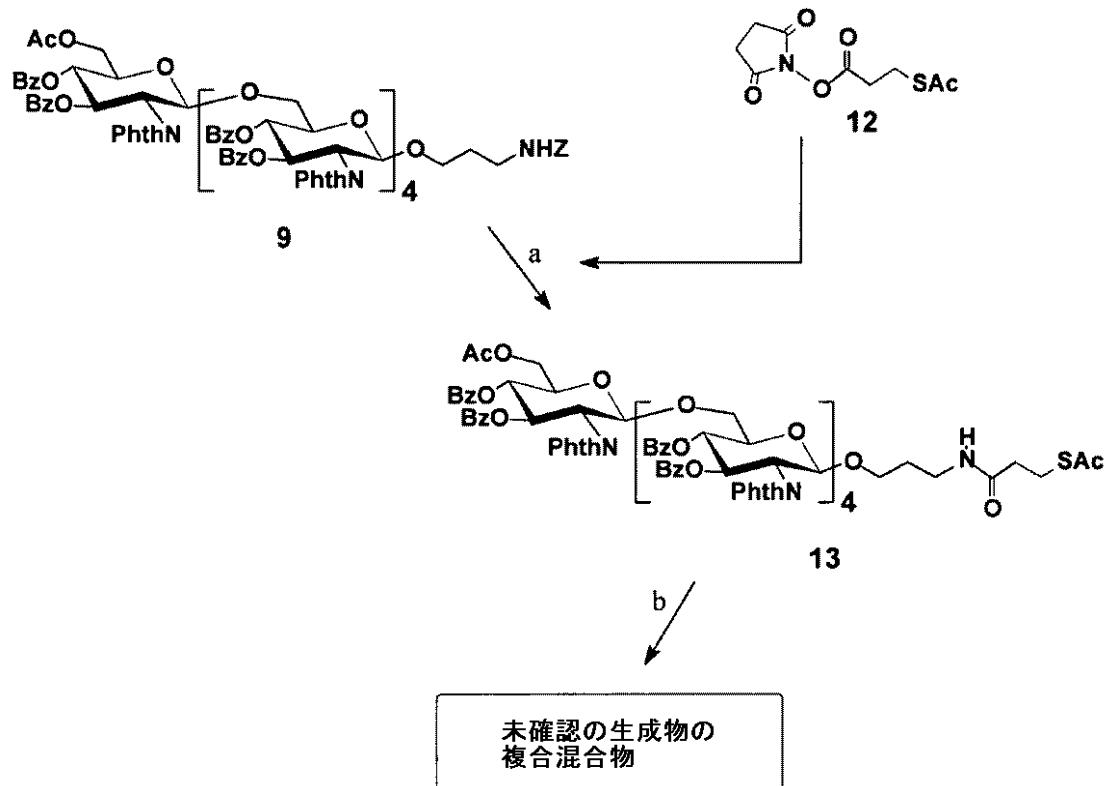
## 【0139】

## (実施例 6)

タンパク質とのさらなる結合のためのリガンドの調製のための連結試薬 12 の適用性の実験

## 【0140】

## 【化28-1】



スキーム5. リガンドの合成。a: 1)H<sub>2</sub>, Pd(OH)<sub>2</sub>/C, MeOH/THF 2) 12, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>;  
b: N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, EtOH,  $\Delta$

ペントサッカライド 9 (100 mg、0.017 mmol) (M. L. Gening, 50

Y. E. Tsvetkov, G. B. Pier, N. E. Nifantiev, 「Synthesis of oligo-(1-6)-glucosamines corresponding to the fragments of the surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus*」、Carbohydr. Res. 342 (2007), 567-575)を、MeOH (1.5ml)、THF (3ml)、および1MのHCl (0.1ml)の混合物中に溶解させ、Pd(OH)<sub>2</sub>/C (150mg)を添加した。得られた混合物を水素雰囲気下で1時間攪拌した。触媒を濾過して取り除き、溶媒を蒸発させた。残渣をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2ml)とDMF (1ml)の混合物中に溶解させ、その後、リンカーリンカーリー試薬12 (15mg、0.061mmol、0.1mlのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の溶液)とEt<sub>3</sub>N (50μl)を添加した。1時間後、この混合物をトルエンで希釈し、濃縮し、そしてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン/Me<sub>2</sub>CO、4:1)を行って13 (87mg、85%)を無色の発泡体として得た。

【0141】

【化28-2】

<sup>1</sup>H NMRデータ (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COS), 2.52 (m, 2H, COCH<sub>2</sub>), 3.15 (t, 2H, J 7.6, CH<sub>2</sub>S); <sup>13</sup>C NMRデータ (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 25.2 (CH<sub>3</sub>COS), 29.2 (COCH<sub>2</sub>), 35.9 (CH<sub>2</sub>S).

保護されたペンタサッカライド13 (80mg、0.015mmol)、EtOH (5ml)、およびN<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0.5ml)の混合物を還流下で1時間攪拌し、その後、濃縮し、そして0.1MのAcOH水溶液中でゲル浸透クロマトグラフィー (TSK gel Toyopearl HW 40S、2.5×40cm)を行って未確認の生成物の複合混合物を得た。

【0142】

(実施例7)

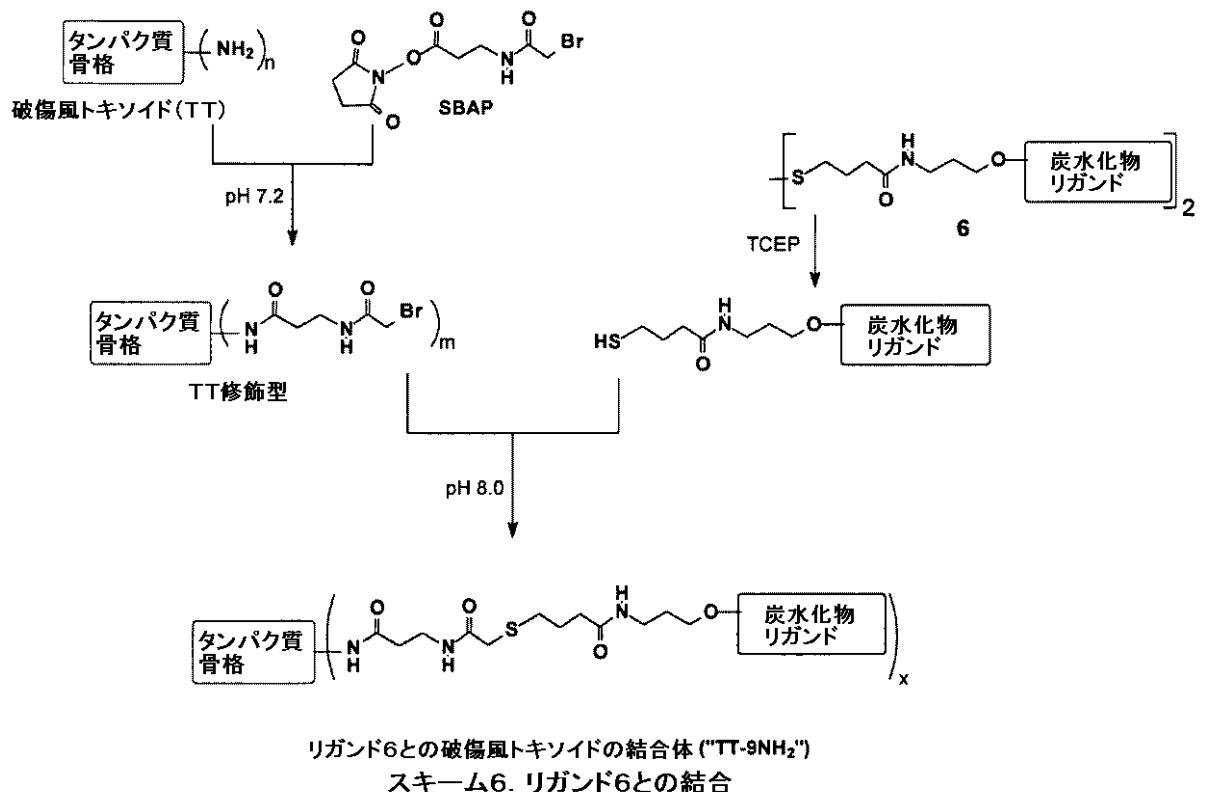
リガンド6との破傷風トキソイドの結合体「TT-9NH<sub>2</sub>」の調製

【0143】

10

20

## 【化29】



(工程1. タンパク質の修飾) 破傷風トキソイド (120 μl 中 4 mg、ストック溶液) を 400 μl の pH 7.2 緩衝液 (0.1 M のリン酸ナトリウム、0.15 M の NaCl、10 mM の EDTA) で希釈し、DMSO (80 μl) 中の SBAP (2.6 mg) の溶液を添加し、混合物を室温で 2 時間インキュベートした。未反応の SBAP を、pH 8.0 の泳動緩衝液 (0.1 M のリン酸ナトリウム、0.15 M の NaCl、10 mM の EDTA) 中で PD-10 カラムを使用して取り除き、得られた 3.5 ml の修飾されたタンパク質の溶液を 400 μl に濃縮した。

## 【0144】

(工程2. ジスルフィド還元) 固定 TCEP ジスルフィド還元ゲル (Immobilized TCEP Disulfide Reducing Gel) (200 μl の、水中の 50% スラリー) を遠心分離し、余分な水を取り除き、ジスルフィド 6 (100 μl の pH 8.0 の緩衝液 (0.1 M のリン酸ナトリウム、0.15 M の NaCl、10 mM の EDTA) 中 1.5 mg) を添加した。室温で 45 分間のローターラック (rotor rack) 上でのインキュベーション後、SH-誘導体の溶液を遠心分離によってゲルから分離し、固定した TCEP を同じ pH 8.0 緩衝液で洗浄した (3 × 100 μl)。

## 【0145】

(工程3. 結合) 工程2で得られたリガンドの溶液 (400 μl、pH 8.0 緩衝液中) を、修飾されたタンパク質 (400 μl、pH 8.0 緩衝液中、工程1) とすぐに混合し、室温で一晩攪拌した。この時間の後、結合体を、Superose 6 プレップグレード (prep-grade) カラム上でのゲルfiltration によって結合しなかった成分から分離した。TT-9NH<sub>2</sub> 結合体を含む画分をプールし、濃縮し、そして -20°で凍結保存した。

## 【0146】

(結合体の化学的分析) 結合体を、そのオリゴ糖の内容物について、Smith and Gilkerson (R. L. Smith and E. Gilkerson. 1979 Analytical Biochem. 98: 478-480) によって記載さ

10

20

30

40

50

れているヘキソサミンアッセイを使用して、標準物として化合物6を用いて分析し、そしてタンパク質についてはBradford assay (M. M. Bradford, 1976, *Analytical Biochem.* 72: 248-254) を用いて分析した。これらのアッセイにしたがうと、結合体TT-9NH<sub>2</sub>は、タンパク質分子1つあたり74個の炭水化物リガンドを含む (x = 74)。

## 【0147】

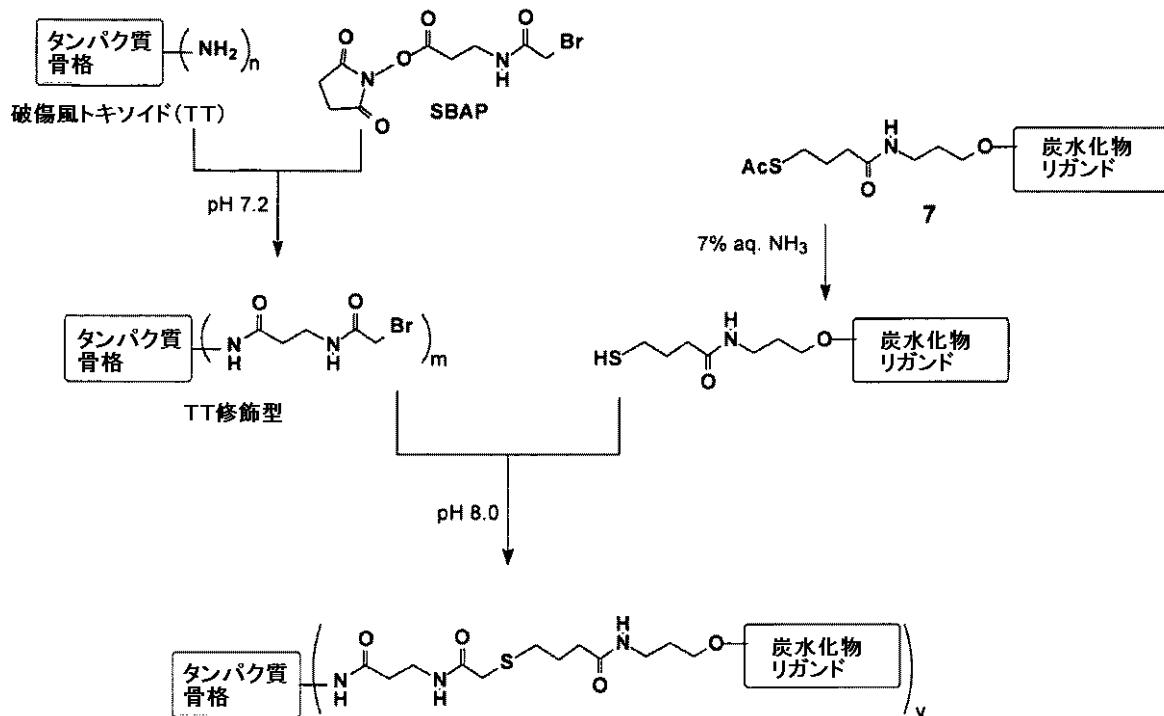
(実施例8)

リガンド7との破傷風トキソイドの結合体「TT-9NAC」の調製

## 【0148】

## 【化30】

10



20

30

(工程1. タンパク質修飾) TTを、結合体TT-9NH<sub>2</sub>について上記に記載したようにSBAPで修飾した。

## 【0149】

(工程2. S-アセチル脱保護) ノナサッカライド7 (2.1mg)を200μlの7%NH<sub>3</sub>水溶液に溶解させ、この混合物を室温で1時間維持し、その後、凍結乾燥させた。

## 【0150】

(工程3. 結合) 凍結乾燥させたオリゴ糖を、すぐに、400μlのpH8.0緩衝液 (0.1Mのリン酸ナトリウム、0.15MのNaCl、10mMのEDTA)中に溶解させ、同じ緩衝液中の400μlのTT修飾型の溶液と混合した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。この時間の後、結合体をSuperose 6 プレップグレードカラム上のゲルfiltrationによって結合しなかった成分から分離した。TT-9NAC結合体を含む画分をプールし、濃縮し、そして-20で凍結保存した。

40

## 【0151】

(結合体の化学的分析) 分析を、結合体TT-9NH<sub>2</sub> (実施例7)と同じ方法で行い、結合体TT-9NACがタンパク質分子1つあたり71個の炭水化物リガンドを含む (y = 71)ことを明らかにした。

## 【0152】

50

## (実施例 9 )

## オリゴ糖結合体を使用した抗体生産

(方法) ウサギを、10 µg の多糖等量の、破傷風トキソイド (TT) に結合させたノナグルコサミン (すなわち、9 個の単量体が連結されている) を、1 週間の間隔をあけて 2 回、等量の Specol アジュバントとともに皮下に免疫化した。3 週目に、ウサギを 3 回 (すなわち、月曜日、水曜日、および金曜日)、生理食塩水中の 10 µg の PS 当量の IV で免疫化した。最後の免疫化の後、ウサギを 2 週間回復させ、2 週間ごとに採血した。この発表のデータには、免疫化後に得た第 1 の血清 (bleed 1) と第 2 の血清 (bleed 2) による結果を包含する。

## 【0153】

10

(結果) 図 1 A および B は、S. aureus 由来の PNAG (A) または dPNAG (B) に対する非アセチル化ノナグルコサミン (9G1cNH<sub>2</sub>) に対して惹起させた抗血清の結合に関するデータを示す。この実験で使用した dPNAG は約 15 % がアセチル化されていた。しかし、アセチル化のレベルは 0 ~ 40 % の範囲であり得ると理解されるべきである。このデータは、抗血清が PNAG と dPNAG のいずれにも同程度に結合したことを示す。

## 【0154】

図 2 A および B は、S. aureus 由来の PNAG または dPNAG に対する、完全にアセチル化された非グルコサミン (9G1cNAc) に対して惹起させた抗血清の結合に関するデータを示す。このデータは、抗血清が、dPNAG よりも、高度にアセチル化された PNAG に対してより多く結合したことを示す。

20

## 【0155】

図 3 A および B は、非結合型 11G1cNAc または 11G1cNH<sub>2</sub> に対する、TT 結合型 9G1cNAc または 9G1cNH<sub>2</sub> に対して惹起させた抗血清の結合に関するデータを示す。このデータは、アセチル化された 9G1cNAc に対して惹起させた抗血清が、非アセチル化 9G1cNH<sub>2</sub> に対して惹起させた抗血清よりも、アセチル化された 11G1cNAc に対してより多く結合したことを示す。9G1cNH<sub>2</sub> - TT 結合体に対する抗血清が 6400 未満の血清希釈率で上限を超えた (off-scale) ように、9G1cNH<sub>2</sub> に対する結合については反対が真であった。

## 【0156】

30

図 4 および 5 は、S. aureus MN 8 および 2 種類の USA300 株に対する bleed 1 由来の抗血清を使用した結果を示す。図 4 は、破傷風トキソイド (TT) に結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない 9 マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ抗血清 (「bleed 1」と呼ぶ) による S. aureus MN 8 (CP8) の死滅を比較する。図 5 は、TT に結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない 9 マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ抗血清 (bleed 1) による S. aureus MN 8 の死滅を比較する。抗 dPNAG - TT 結合体抗血清をコンパレーター (comparator) として使用した。図 6 は、TT に結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない 9 マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ血清 (bleed 1) による S. aureus LAC (NT、USA300) の死滅を比較する。図 7 は、TT に結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない 9 マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ血清 (bleed 1) による S. aureus SF8300 (NT, USA300) の死滅を比較する。図 8 は、TT に結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない 9 マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ血清 (bleed 1) による S. aureus LAC (NT、USA300) の死滅を比較する。一般的には、9G1cNH<sub>2</sub> - TT に対して惹起させた血清が、全体として最も優れた活性を示したが、ほとんどのアッセイにおいては、9G1cNAc - TT に対して惹起させた血清よりもわずかに優れていたにすぎなかった。

40

## 【0157】

50

図9～16は、bleed 2血清の使用によって得られた死滅データを示す。ウサギ抗dPNAG-TT対照を株MN8、SF8300、およびLACについてのコンパレーターとして使用した。ヤギ抗dPNAG-TTを、Newman(CP5)、PS80(CP8)、および同系株Reynolds CP5、判別不能Reynolds、およびReynolds CP8についてのコンパレーターとして使用した。

#### 【0158】

図9は、TTに結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない9マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ血清(bleed 2)によるS. aureus MN8(CP8)の死滅を比較する。図10は、TTに結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない9マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ血清(bleed 2)によるS. aureus LAC(NT. USA300)の死滅を比較する。図11は、TTに結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない9マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ血清(bleed 2)によるS. aureus SF8300(NT, USA300)の死滅を比較する。図12は、TTに結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない9マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ血清(bleed 2)によるS. aureus Newman(CP5)の死滅を比較する。図13は、TTに結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない9マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ血清(bleed 2)によるS. aureus PS80の死滅を比較する。図14は、TTに結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない9マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ血清(bleed 2)によるS. aureus Reynolds(CP5)の死滅を比較する。図15は、TTに結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない9マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ血清(bleed 2)によるS. aureus Reynolds(判別不能)の死滅を比較する。図16は、TTに結合させた完全にアセチル化されたかまたはアセチル化されていない9マーのオリゴグルコサミンに対するウサギ血清(bleed 2)によるS. aureus Reynolds(CP8)の死滅を比較する。

#### 【0159】

一般的には、より高い死滅の程度は、dPNAG-TTに対して惹起させた抗血清を用いた場合ではなく、オリゴ糖結合体に対して惹起させた抗血清を使用した場合に得られた。株LACおよびSF8300の死滅は、bleed 1血清を用いた場合と比較してbleed 2血清を用いた場合に多かったが、それでもなおELISA結合曲線は同様であった。bleed 2を使用した場合には、9G1cNH<sub>2</sub>に対して惹起させた抗血清を使用した死滅において、9G1cNAcに対して惹起させた血清を使用した溶解と比較して、より大きな差異がみられる。

#### 【0160】

##### (実施例10)

ウサギ抗血清とE. coliのオプソニン作用による死滅(opsonic killing)

免疫化後のウサギ抗血清(上記)中のウサギ抗体は、PNAGを生産することがこれまでに示された2種類のE. coli株のオプソニン作用による死滅を媒介したが、E. coliにおけるPNAGの生合成酵素をコードするpg a遺伝子を持たない第3の株のオプソニン作用による死滅は媒介しなかった(図16A)。

#### 【0161】

##### (実施例11)

マウスの皮膚の膿瘍モデル

図17、18、および19は、マウスの皮膚の膿瘍モデルとS. aureus株LAC(USA300)でのチャレンジを使用したインビボでの実験の結果を示す。9G1cNH<sub>2</sub>に対して惹起させた抗血清は、S. aureus LAC(USA300)による皮膚感染に対して防御効果を示した。グループ1(9G1cNH<sub>2</sub>-TTと表示した)には

、0.2mlの9G1cNH<sub>2</sub>-TT抗血清(bleed 2)を、感染の24時間前に腹腔内に投与した。グループ2(NRSと表示した)には、0.2mlの正常なウサギの血清(NRS)を、感染の24時間前に投与した。マウスを、2×10<sup>4</sup> CFU(図17)、2×10<sup>5</sup> CFU(図19)、または2×10<sup>6</sup> CFU(図20)に、100μlの皮下注射(膿瘍1つあたり)においてマイクロデックスビーズ(microdex beads)(10g/ml)を用いて感染させた。S. aureus LAC株をTSB中で一晩増殖させ、その後、洗浄し、投与前にマイクロデックスビーズに対して添加した。72時間後、個々の膿瘍を切除し、1mlのTSB中に再懸濁し、ホモジナイズし、希釈し、その後、100μlのホモジネートを段階希釈物とともにプレートした。検出の下限値は10 CFU/膿瘍であった。図17、18、および19は、膿瘍1つあたりのCFUの数が、正常なウサギの血清と比較して、9G1cNH<sub>2</sub>-TT抗血清を投与したマウスにおいては大幅に減少したことを示す。図20は図18~20の結果をまとめ、これは、S. aureusのそれぞれの投与について、9G1cNH<sub>2</sub>を投与したマウスはS. aureusでのチャレンジに対してより防御されたことを示している。

## 【0162】

図21および22は、同じマウスの皮膚膿瘍モデルと、先の段落に記載した手法を使用したが、チャレンジ株が2種類のさらに別のS. aureus株MN8およびNewmanである、2つのインビオでの実験の結果を示す。マウスを、1×10<sup>6</sup> CFUの株MN8(図21)、または4×10<sup>6</sup> CFUの株Newman(図22)に、100μlの皮下注射(膿瘍1つあたり)においてマイクロデックスビーズ(10g/ml)を用いて感染させた。図21および22は、腫瘍1つあたりのCFUの数が、正常なウサギ血清と比較して、9G1cNH<sub>2</sub>-TT抗血清を投与したマウスにおいては有意に減少したことを示す。

## 【0163】

図23は、9G1cNH<sub>2</sub>-TT結合体ワクチンに対して惹起させた抗血清が、S. aureus株MN8 icaおよびNewman icaのCFU/膿瘍を有意(P > 0.05)減少させることができないことを示す。これらの2つの株は、ica遺伝子座が除去されており、もはやPNA G表面多糖を合成できない。PNA G抗原が存在しない場合には、9G1cNH<sub>2</sub>オリゴ糖に対する抗体は、S. aureusによる皮膚感染に対する防御免疫を全く提供することができない。

## 【0164】

## (実施例12)

## E. coliによる腹膜炎に対する防御効果

9G1cNH<sub>2</sub>-TTに対する抗体の防御効果を、E. coli感染の致死性腹膜炎モデルにおいて試験した。この抗体は、2種類のPNA G陽性E. coli単離株(表1、UTI株JおよびP)によって引き起こされる感染に対して、免疫化したマウス全てを防御したが、NRSを投与した全ての対照は生存できなかった。PNA G陰性E. coli株Hに対する9G1cNH<sub>2</sub>-TT抗血清に対する抗体によっては、防御はもたらされなかった。

## 【0165】

10

20

30

40

【表1】

表1. *E. coli*によって引き起こされる致死性腹膜炎に対する9GlcNH<sub>2</sub>-TTに対する抗体の防御効果

チャレンジ <i>E. coli</i> 株	全マウスのうち 生存している数		P値 (フィッシャーの正確確率検定)
	抗9GlcNH <sub>2</sub> TT	NRS <sup>a</sup>	
J (PNAG <sup>+</sup> )	8/8	0/8	0.0002
P (PNAG <sup>+</sup> )	8/8	0/8	0.0002
H (PNAG <sup>-</sup> )	0/8	0/8	1.0

<sup>a</sup> NRS:正常なウサギ血清

## (結果の考察)

全くアセチル化されていない合成のGlcNH<sub>2</sub>-TT結合体ワクチンを使用することにより、動物においてオプソニン作用性の防御抗体を高レベルに生成させるためには、酢酸塩は必要ないこと、健全な免疫応答に十分な大きさの5個のGlcNH<sub>2</sub>-単量体程度の少数の分子を結合させること、そしてこれらの抗体が高度にN-アセチル化されたPNAG、ほとんどアセチル化されていないdPNAGおよび非アセチル化オリゴ糖に対して容易に結合することが、本発明によって明らかにされている。したがって、これらの防御抗体は、そのアセチル化のレベルを含むその組成とは無関係に、自然界に存在しているPNAGに結合するであろう。

## 【0166】

本発明はさらに、本発明の非アセチル化オリゴ糖を含む多重抗原を含有するワクチンの生産を意図する。反応性スルフヒドリル基を含む還元性末端リンカーを用いたGlcNH<sub>2</sub>-オリゴマーの合成は、PNAGを作る微生物を標的化するワクチンが、毒性因子およびワクチン抗原として機能する微生物のタンパク質に対してGlcNH<sub>2</sub>-オリゴ糖を結合させることにより、さらに有効となり得ることを示唆する。例えば、*Y. pestis*のLcrVタンパク質は、伝染病に対する防御のための標的である(Garmoryら、Vaccine 22:947-57(2004); Overheimら、Infect. Immun. 73:5152-9(2005); Queneeら、Infect. Immun. 76:2025-2036(2008))が、このタンパク質の血清学的変異体は、中央アジアで流行している*Y. pestis*のうちでも知られている株であり(Anisimovら、Clin. Microbiol. Rev. 17:434-464(2004))、これは、そのような株が単独LcrVワクチン成分によって生じる免疫を潜り抜けることができる可能性を生じる。PNAGは*Y. pestis*によって発現されるので、LcrVに対してGlcNH<sub>2</sub>-オリゴマーを結合させることにより、伝染病ワクチンの防御範囲(protective coverage)は大きくなるであろう。ワクチン生産のためのこのアプローチは、dPNAGオリゴ糖の合成バージョンが相当安価に生産され得るとの理由から魅力的であり、重要なことは、これが任意の他の微生物の混入を含まないであることである。

## 【0167】

これらの知見全体が、担体タンパク質に結合させた(16)-結合グルコサミンの小さい大きさのオリゴマーが、オプソニン作用性抗体の高い力値を誘導することができ、これはまた、実験用の*S. aureus*皮膚感染および*E. coli*が原因である致死性の腹膜炎に対しても防御的であることを示す。

## 【0168】

## (等価物)

いくつかの本発明の実施形態が本明細書中に記載され、説明されてきたが、当業者は、

10

20

30

40

50

本明細書中に記載される機能を行う、ならびに / あるいは結果および / または 1 つ以上の利点を得るための、様々な他の手段および / または構造を容易に想像するであろう。そしてそのようなバリエーションおよび / または改変のそれぞれが、本明細書中に記載される本発明の実施形態の範囲内にあるとみなされる。さらに一般的には、当業者は、本明細書中に記載された全てのパラメーター、寸法、材料、および立体配置が例示と意味され、実際のパラメーター、寸法、材料、および / または立体配置は、本発明の教示が使用される具体的な用途（単数または複数）に応じて変わるであろうことを容易に理解するであろう。当業者は、日常的に行われている実験以上のものを使用することなく、本明細書中に記載された具体的な本発明の実施形態と等価である多くのことを理解するか、または確定することができるであろう。したがって、上記実施形態は例として提示されるにすぎず、添付の特許請求の範囲およびその等価物の範囲内で、本発明の実施形態が、具体的に記載された、特許請求されるものとは別 の方法で実施され得ることが理解される。本開示の発明性のある実施形態は、本明細書中に記載されたそれぞれの個々の特徴、システム、物品、材料、キット、および / または方法に関する。加えて、そのような特徴、システム、物品、材料、キット、および / または方法の 2 つ以上の任意の組み合わせが、そのような特徴、システム、物品、材料、キット、および / または方法が互いに相矛盾しなければ、本開示の本発明の範囲に含まれる。

#### 【 0 1 6 9 】

本明細書中で定義され、使用された全ての定義は、辞書的定義、引用により組み入れられた文献の中での定義、および / または定義された用語の通常の意味の全てを支配すると理解されるべきである。

#### 【 0 1 7 0 】

本明細書中で開示された全ての参考文献、特許、および特許出願は、それぞれが引用される対象物に関して引用により組み入れられる。いくつかの場合には、これにはその文献全体が含まれ得る。

#### 【 0 1 7 1 】

不定冠詞「 a 」および「 a n 」は、明細書および特許請求の範囲において本明細書中で使用される場合は、反対のことが明記されない限りは、「少なくとも 1 つ」を意味すると理解されるべきである。

#### 【 0 1 7 2 】

表現「および / または」は、明細書および特許請求の範囲において本明細書中で使用される場合は、そのように一緒にされた要素の「いずれかまたは両方」を意味する、すなわち、複数の要素が、場合によっては結合して存在し、そして場合によっては結合せずに存在すると理解されるべきである。「および / または」とともに列挙された複数の要素は同じ様式で、すなわち、そのように一緒にされた要素の「 1 つ以上」と解釈されるべきである。他の要素は、状況に応じて、具体的に特定されたそのような要素と関係があるか関係がないかにかかわらず、「および / または」の箇条によって具体的に特定された要素以外が存在し得る。したがって、限定ではない例として、「 A および / または B 」との言及は、「 ~ を含む ( c o m p r i s i n g ) 」のような無制限の言語と組み合わせて使用される場合は、1 つの実施形態においては、 A だけ（状況に応じて B 以外の要素を含む）；別の実施形態においては、 B だけ（状況に応じて A 以外の要素を含む）；なお別の実施形態においては、 A と B の両方（状況に応じて他の要素を含む）などを意味し得る。

#### 【 0 1 7 3 】

明細書および特許請求の範囲において本明細書中で使用される場合は、「または」は、上記で定義されたような「および / または」と同じ意味を有すると理解されるべきである。例えば、リストの中の要素を分ける場合は、「または」、あるいは「および / または」は、包括的である、すなわち、多数の要素または要素のリストのうちの少なくとも 1 つを含むが、これには 2 つ以上も含まれ、状況に応じて、さらに別の列挙されていない要素も含むと解釈されるものとする。反対のことが明白に示されている用語（例えば、「そのうちの 1 つだけ」、または「そのうちの正確に 1 つ」、または特許請求の範囲において使用

10

20

30

40

50

される場合は、「～からなる」)だけが、多数の要素または要素のリストのうちの正確に1つの要素を含むことを意味するであろう。一般的には、用語「または」は、本明細書中で使用される場合は、「いずれか」、「～のうちの1つ」、「～のうちの1つだけ」、または「～のうちの正確に1つ」のような排他性の用語が先行する場合には、排他的な選択肢(すなわち、「一方または他方であるが、両方ではない」)とのみ解釈されるものとする。「本質的に～からなる」は、特許請求の範囲において使用される場合は、特許法の分野で使用されるその通常の意味を有するものとする。

#### 【0174】

明細書中および特許請求の範囲においてここで使用される場合は、1つ以上の要素のリストに関する表現「少なくとも1つ」は、要素のリストの中の要素の任意の1つ以上から選択された少なくとも1つの要素を意味すると理解されるべきであるが、要素のリストの中に具体的に列挙された個々の全ての要素のうちの少なくとも1つを含むことは必ずしも必要ではなく、要素のリストの中の複数の要素の任意の組み合わせを排除するものではない。この定義はまた、表現「少なくとも1つ」が言及する要素(具体的に特定されたこれらの要素と関係があるかまたは無関係であるかは問わない)のリストの中に具体的に特定された要素以外の要素が状況に応じて存在し得ることもまた可能にする。したがって、限定ではない例として、「AおよびBの少なくとも1つ」(または同等に、「AまたはBの少なくとも1つ」、または同等に、「Aおよび/またはBの少なくとも1つ」)は、1つの実施形態においては、Bが存在しない少なくとも1つ(状況に応じて2つ以上を含む)のA(状況に応じてB以外の要素を含む)；別の実施形態においては、Aが存在しない少なくとも1つ(状況に応じて2つ以上を含む)のB(状況に応じてA以外の要素を含む)；なお別の実施形態においては、少なくとも1つ(状況に応じて2つ以上を含む)のAと少なくとも1つ(状況に応じて2つ以上を含む)のB(状況に応じて他の要素を含む)；などを意味し得る。

#### 【0175】

反対であることが明確に示されない限りは、2つ以上の工程または行動を含む本明細書中で特許請求される任意の方法においては、この方法の工程または行動の順序は、この方法の工程または行動が記載された順序に必ずしも限定されないことも理解されるべきである。

#### 【0176】

特許請求の範囲、ならびに上記の明細書においては、全ての移行句(例えば、「含む(comprising)」、「含む(including)」、「持つ(carrying)」、「有する(having)」、「含む(containing)」、「含む(involved)」、「保持する(holding)」、「～でできている(consisted of)」などは、無制限である、すなわち、含むが限定されないことを意味すると理解される。移行句「～からなる(consisting of)」と「本質的に～からなる(consisting essentially of)」だけが、米国特許庁特許審査便覧(United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures)、セクション2111.03に示されているように、それぞれ、閉じた移行句または半分閉じた移行句であるとする。

10

20

30

40

【図1】

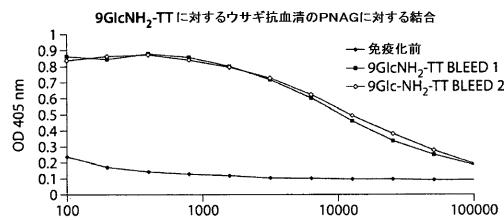


Fig. 1A

【図2】

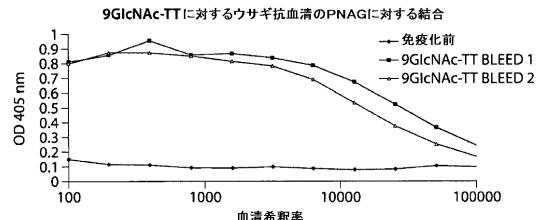


Fig. 2A

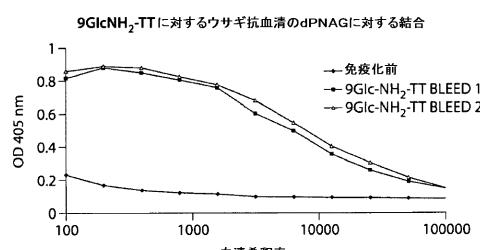


Fig. 1B

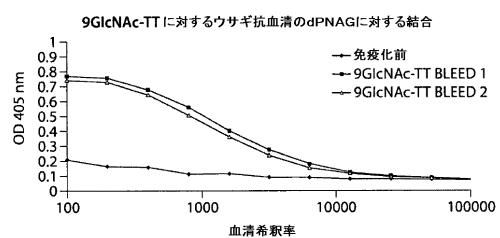


Fig. 2B

【図3】

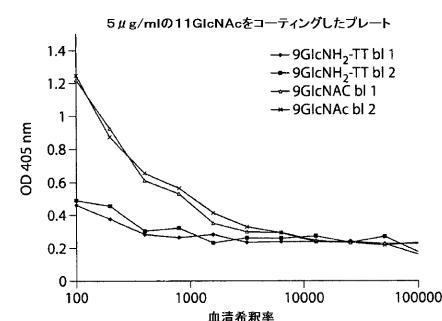


Fig. 3A

【図4】

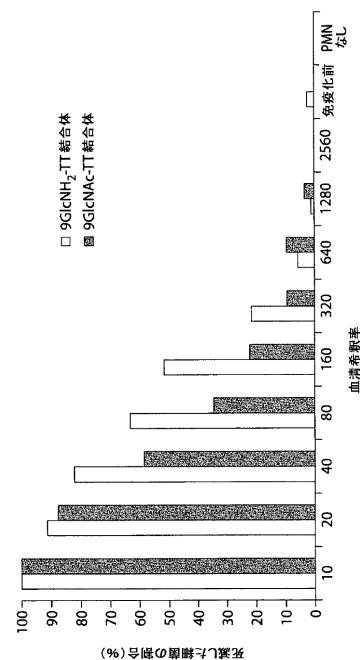


Fig. 4

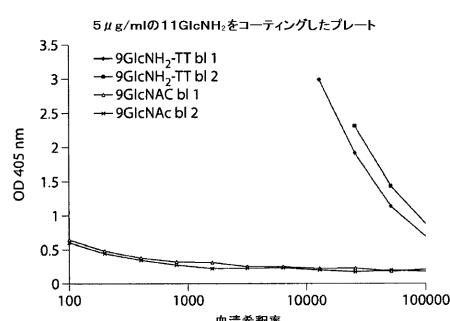


Fig. 3B

【図5】

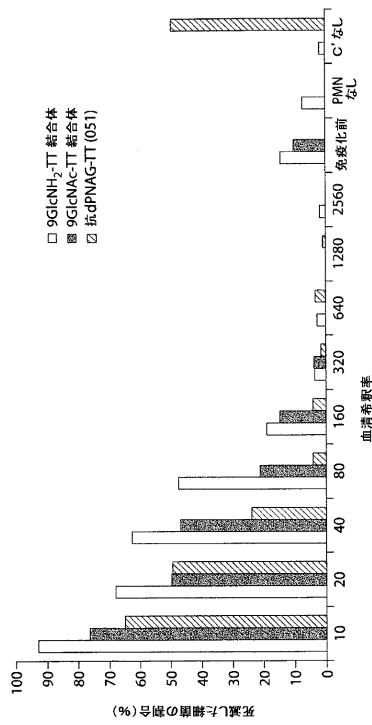


Fig.5

【図6】

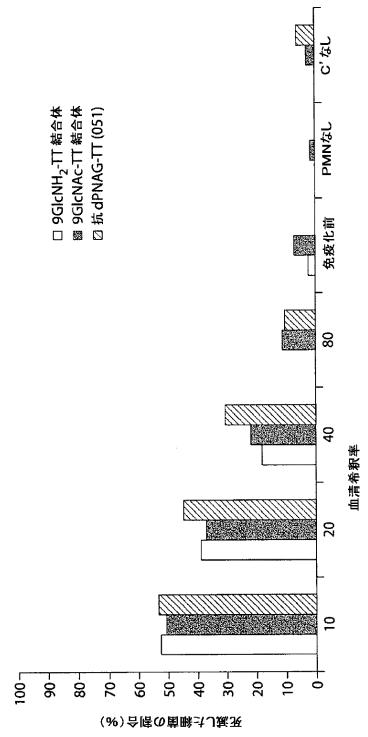


Fig.6

【図7】

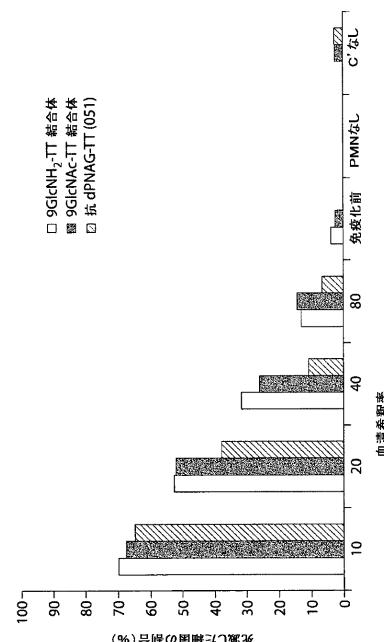


Fig.7

【図8】

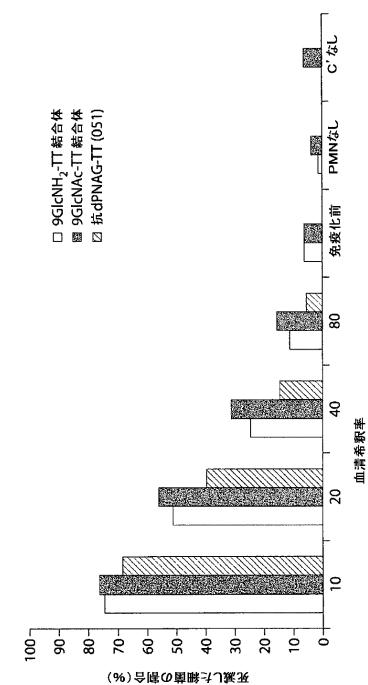
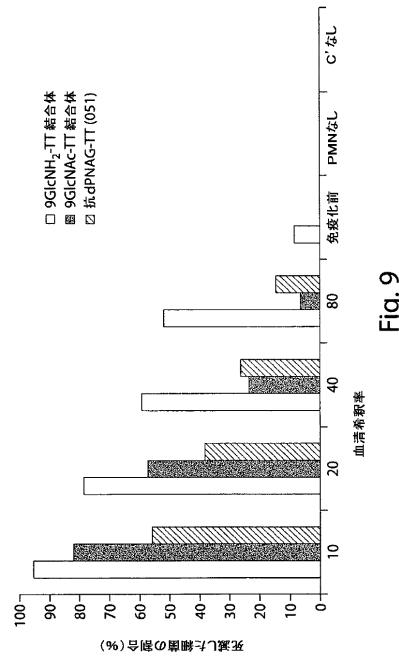
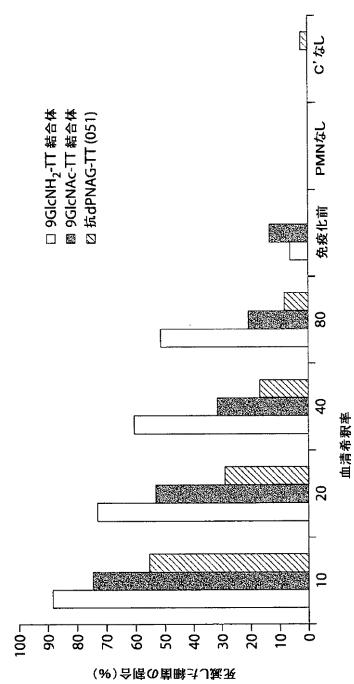


Fig.8

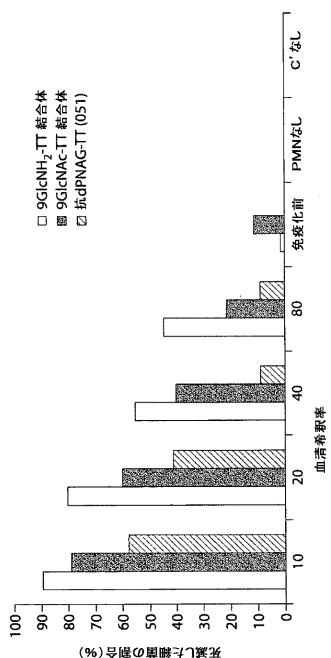
【図9】



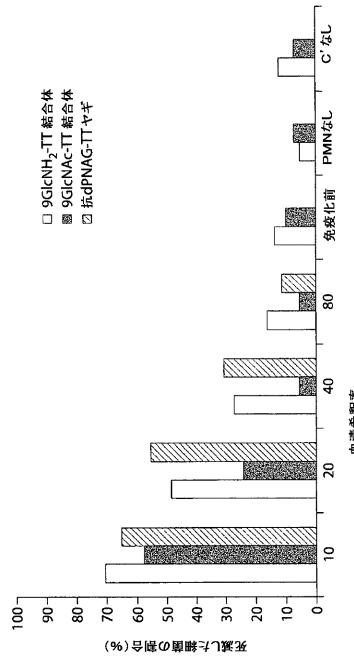
【図10】

Fig. 9  
Fig. 10

【図11】



【図12】

Fig. 11  
Fig. 12

【図 1 3】

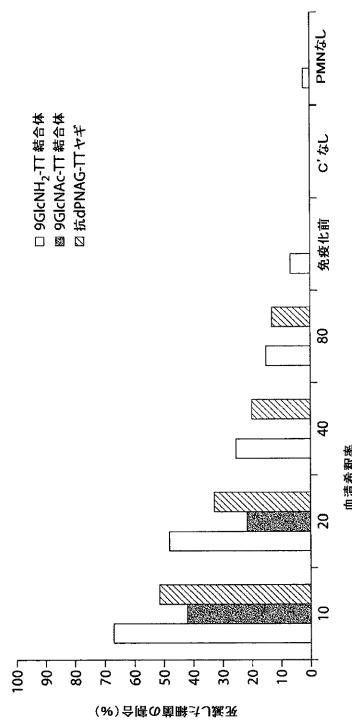


Fig. 13

【図 1 4】

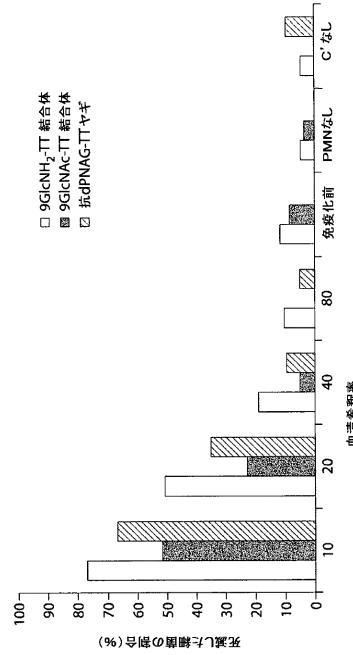


Fig. 14

【図 1 5】

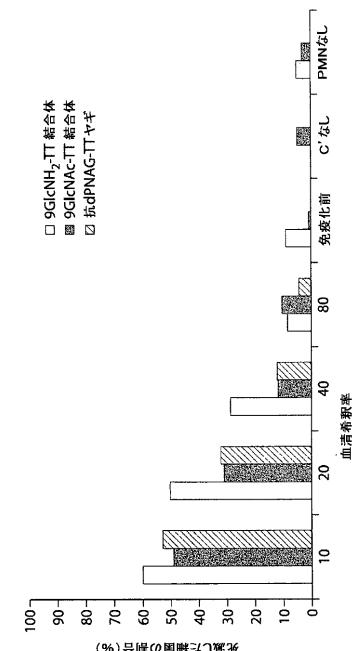


Fig. 15

【図 1 6】

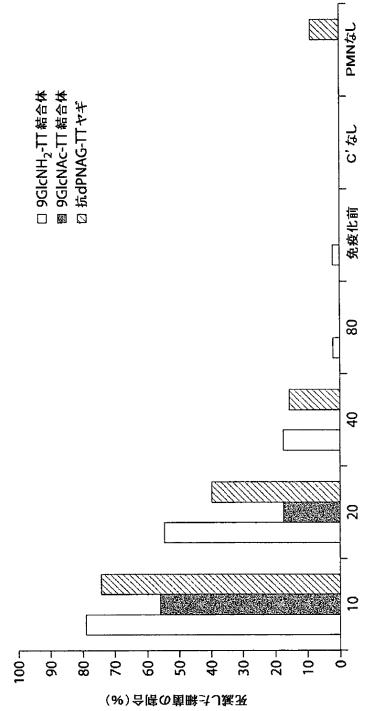


Fig. 16

【図 16 A】

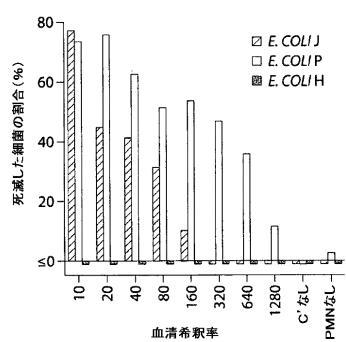


Fig. 16A

【図 17】

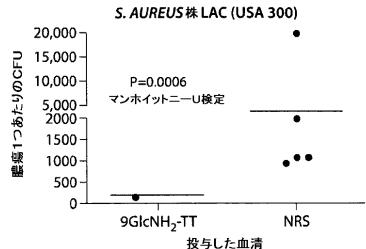


Fig. 17

【図 20】

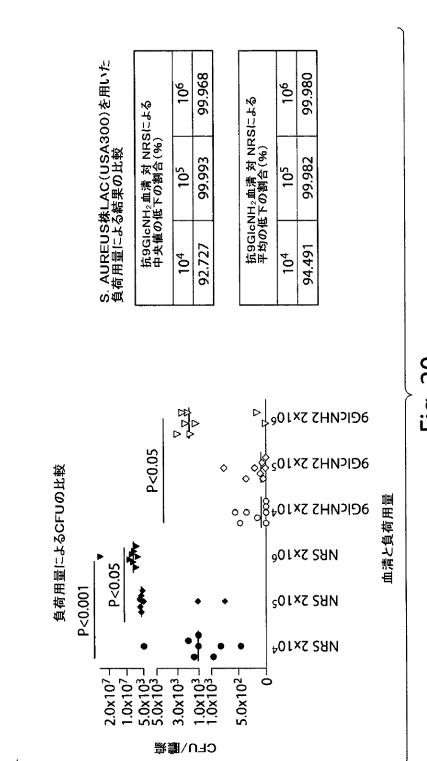


Fig. 20

【図 18】

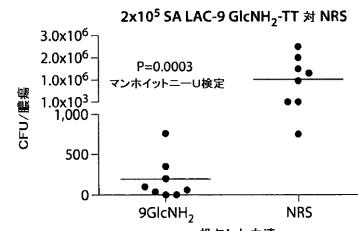


Fig. 18

【図 19】

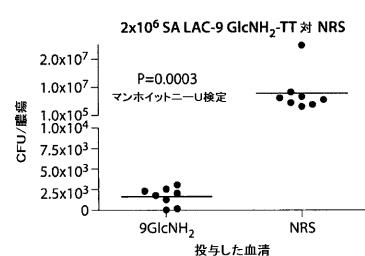


Fig. 19

【図 21】

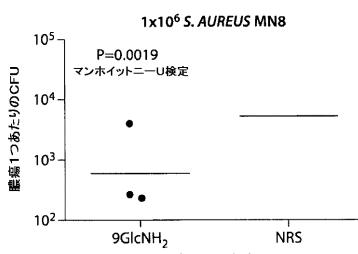


Fig. 21

【図 22】

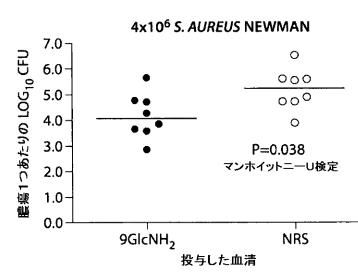


Fig. 22

【図 2 3】

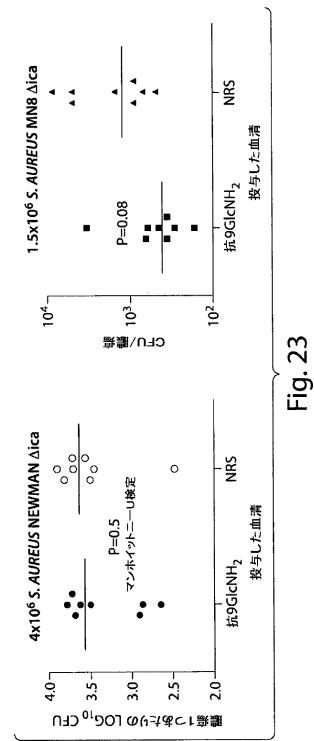


Fig.23

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
C 0 8 B	37/08 (2006.01)	C 0 8 B 37/08	A
C 0 7 H	15/04 (2006.01)	C 0 7 H 15/04	E

(72)発明者 ピアー, ジェラルド ピー。  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02446, ブルックライン, ソーンダイク ストリー  
 ト 21

(72)発明者 ニファンティエフ, ニコライ  
 ロシア国 117593, モスクワ, リトフスキーブールバール 13/12-481

(72)発明者 ツベトコフ, ユーリー  
 ロシア国 119421, モスクワ, ノバトロフ ストリート 34/4-208

(72)発明者 ジェニング, マリーナ  
 ロシア国 125047, モスクワ, ツベルスカヤ-ヤムスカヤ ストリート-3 12-3  
 1

審査官 高橋 直子

(56)参考文献 カナダ国特許出願公開第02475736 (CA, A1)  
 国際公開第2007/113224 (WO, A1)  
 特表2005-515237 (JP, A)  
 特表2002-503705 (JP, A)  
 特表2001-500528 (JP, A)  
 特表平11-509861 (JP, A)  
 Org. Biomol. Chem., 2006年, 4, 142-154

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 H	5 / 0 6
A 6 1 K	3 9 / 0 0
A 6 1 K	3 9 / 3 9
A 6 1 P	3 1 / 0 4
A 6 1 P	3 7 / 0 4
C 0 7 C	3 2 7 / 3 2
C 0 7 D	2 0 7 / 4 0 4
C 0 7 H	1 5 / 0 4
C 0 8 B	3 7 / 0 8
C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )	