

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6986970号
(P6986970)

(45) 発行日 令和3年12月22日(2021.12.22)

(24) 登録日 令和3年12月2日(2021.12.2)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q	1/04	
C 1 2 Q	1/10	(2006.01)	C 1 2 Q	1/10	
C 1 2 Q	1/12	(2006.01)	C 1 2 Q	1/12	
C 1 2 Q	1/14	(2006.01)	C 1 2 Q	1/14	

請求項の数 17 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2017-557432 (P2017-557432)
(86) (22) 出願日	平成28年5月3日 (2016.5.3)
(65) 公表番号	特表2018-518160 (P2018-518160A)
(43) 公表日	平成30年7月12日 (2018.7.12)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/059864
(87) 国際公開番号	W02016/177712
(87) 国際公開日	平成28年11月10日 (2016.11.10)
審査請求日	平成31年4月12日 (2019.4.12)
(31) 優先権主張番号	15166249.1
(32) 優先日	平成27年5月4日 (2015.5.4)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者	506316557
	サントル ナショナル ドウ ラ ルシェ
	ルシェ シアンティフィック
	フランス国 75016 パリ リュ ミ
	ケランジュ 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾された単糖化合物の使用を含む、生きている微生物を特異的に標識するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

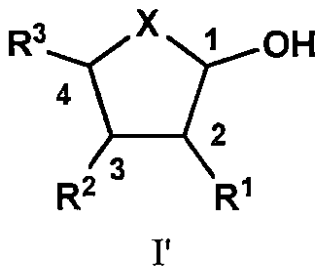
微生物を含む試料中の生きている微生物を特異的に標識するための方法であって、

a) 前記試料の前記微生物を、第2の反応性基と化学的に反応することができる第1の反応性化学基を含む少なくとも1つの修飾された単糖化合物と共にインキュベートし、その結果、前記第1の反応性基を有する残基が、前記生きている微生物に又は前記微生物の表面に組み込まれる工程と、

b) 前記微生物に組み込まれた前記残基を、前記第2の反応性基を含む標識分子と接触させて、前記生きている微生物内に組み込まれた前記残基の前記第1の反応性基と前記標識分子の前記第2の反応性基との化学反応を生じさせて、共有結合を生じさせる工程と

を含み、
前記修飾された単糖化合物は、以下の式(I'):

【化1】



10

(- Xは、Oであり、

- R1は、H、OH、NH₂であり、OH、NH₂は、アルキル、ヒドロキシアルキル、アシル、ホルミル及びイミドイル基から成る群から選択される保護基で置換されている又は置換されておらず、

- R2は、H、OH、NH₂であり、OH、NH₂は、アルキル、ヒドロキシアルキル、アシル、ホルミル及びイミドイル基から成る群から選択される保護基で置換されている又は置換されておらず、

- R3は、C₁~C₄アルキル鎖であり、各炭素はアルキル、ヒドロキシアルキル、アシル、ホルミル及びイミドイル基から成る群から選択される保護基で置換されているか又は置換されていないOH又はNH₂で置換されているか又は置換されておらず、

20

- R3が、前記第1の反応性基Raで置換されており、

- 前記第1の反応性基Raが、アジド基(-N₃)からなる又は有する基及びアルキン基(-C≡C-)からなる又は有する基から選択され、前記第2の反応性基は、アルキン基及びアジド基からそれぞれなる又は有する基から選択される)

を有する化合物又はその塩であることを特徴とし、

前記標識する微生物が、以下の微生物種：

a)細菌：アシネトバクター・バウマンニイ、バチルス・セレウス、バチルス・セレウス・パリ、バチルス・サブティリス、クロノバクター・サカザキ、エンテロコッカス・デュランズ、エンテロコッカス・フェカーリス、エシェリキア・コリ、クレブシエラ・ニューモニアエ(*Klebsiella pneumophila*)、レジオネラ・ニューモフィラ、リステリア・モノサイトゲネス、ミクロコッカス・ルテウス、ナイセリア・ゴノレエ、ナイセリア・メニンジティディス(*Neisseria meningitides*)、プロテウス・ミラビリス、プロビデンシア・スチュアーティイ、シュードモナス・フルオレッセンス・ミグラ、シュードモナス・フルオレッセンス・パリ、サルモネラ・ティフィムリウム、セラチア・マルセッセンス、スタフィロコッカス・アウレウス、スタフィロコッカス・アウレウス亜種アウレウス、スタフィロコッカス・エピデルミス、スタフィロコッカス・サブロフィティカス、ステノトロホモナス・マルトフィリア、ストレプトコッカス・アガラクティアエ、ビブリオ・コレラエ(*Vibrio cholera*)、

30

b)菌類：アスペルギルス・ニガー、カンジダ・アルピカンス、フサリウム及びジオトリカム・カンディダム、及び

40

c)アメーバ類：アカントアメーバ・カステラーニ

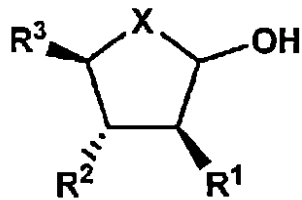
から選択される、

方法。

【請求項2】

前記修飾された単糖化合物は、式(1)：

【化2】



I

10

を有する立体異性体又はその塩である、請求項1に記載の方法。

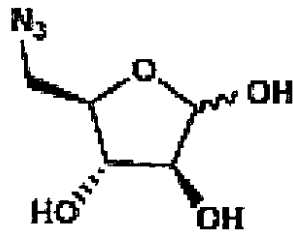
【請求項3】

前記修飾された単糖化合物は、以下の式を有する化合物又はその塩であって、式中、
 - R1及びR2は、保護基で置換されているか若しくは置換されていないOHであり、
 - R3は、前記第1の反応性基Raで置換されている-CH₃、-CH₂OH、又は-CH₂NH₂である、
 請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記修飾された単糖化合物は、以下の立体異性体の式(Ia):

【化3】



Ia

20

を有する化合物又はその塩である、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項5】

第1の反応性基Raが、アジド基からなる又は有する基及びアルキン基からなる又は有する基から選択され、前記第2の反応性基は、アルキン基及びアジド基からそれぞれなる又は有する基から選択され、前記アジド反応性基と前記アルキン反応性基との反応は、アジド-アルキン環化付加を実施する際に行われる、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記第1の反応性基Raはアジド基である、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記第2の反応性基はアルキン基である、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項8】

Raは、-N₃又は-C≡CHである、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記微生物が、

- 原核微生物、及び
- 単細胞真核微生物、

から選択される、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記微生物が、細菌、単細胞菌類及びアメーバから選択される、請求項9に記載の方法

50

【請求項 1 1】

(c)前記微生物が、前記生きている微生物に結合されている前記標識分子を含むかどうかを検出すること、及び/又は前記標識分子を有する前記生きている微生物を固体基質に固定化することで、前記生きている微生物を検出する更なる工程を含み、ここで、前記標識分子は、検出可能な物質を含むか若しくは検出可能な物質に反応若しくは結合することができる分子であるか、又は前記標識分子は、前記第2の反応性基を有する第1の分子であり、前記第1の分子は、第2の分子及び/又は固体基質に反応又は結合することができる、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

さらなる工程において、前記第2の分子は検出可能な物質を含む及び/又は前記第2の分子は前記固体基質に結合されている若しくは結合されうる、請求項11に記載の方法。

10

【請求項 1 3】

前記標識分子は、検出可能な物質を含む検出可能な分子であり、前記方法は、前記微生物が、前記微生物に結合されている前記検出可能な分子を含むかどうかを検出することで、生きている微生物を検出する工程c)を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記標識分子は、前記第2の反応性基を有する第1のリガンド又は第1の結合タンパク質であり、工程c)において、前記第1のリガンド又は第1の結合タンパク質に連結された前記生きている微生物は、前記第1のリガンド又は第1の結合タンパク質と、前記第1のリガンド又は第1の結合タンパク質に対して特異的に反応する又は結合する第2のリガンド又は第2の結合タンパク質とを接触させることにより、検出される及び/又は固定化される、請求項11から13のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 5】

請求項1から14のいずれか一項に記載の方法を実施するためのキットであって、
 - 式(1')の前記修飾された単糖化合物と、
 - 前記第1の反応性基と反応することができる前記第2の反応性基を含む前記標識分子と、
 - 必要であれば、前記第1の反応性基と、前記標識分子の前記第2の反応性基との反応を生じさせるための反応物質と
 を含む、キット。

30

【請求項 1 6】

- 前記検出可能な分子、又は蛍光色素若しくは発光分子若しくは酵素を含む検出可能な物質を有する前記第2の分子、及び/或いは
 - 前記標識分子に特異的に反応又は結合することができる、前記第2の分子を有する固体基質
 を更に含む、請求項15に記載のキット。

【請求項 1 7】

前記微生物の増殖を可能にする培養又はインキュベーション培地を更に含む、請求項16に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、反応性基を有する化合物残基を、生きている微生物に、好ましくはその表面に、より詳細には、特に前記微生物が細菌であるときはそのエンベロープに組み込むことで、前記微生物を標識するための方法に関する。

【0002】

用語「生きている微生物」は、培養条件下で増加することができる任意の単細胞生物、より詳細には、原核及び単細胞真核微生物を含む。

【0003】

原核微生物は、細菌(真正細菌とも呼ばれる)及び古細菌(始原菌とも呼ばれる)を含む。

50

【 0 0 0 4 】

細菌は、グラム陽性細菌及びグラム陰性細菌、並びにグラム陰性でもグラム陽性でもない細菌を含む。

【 0 0 0 5 】

単細胞真核微生物は、単細胞菌類(特に酵母を含む)、アメーバ、及び単細胞原生生物を含む。

【 0 0 0 6 】

本発明は、より詳細には、細菌並びに単細胞菌類及びアメーバを含む微生物の標識化を可能にする方法を提供する。

【 0 0 0 7 】

本明細書で用語「エンベロープ」は、微生物の表面のいずれかの壁、層又は膜、特に微生物の細胞壁を含み、エンベロープは、より詳細には、細菌の内部形質膜及びペプチドグリカン層並びにグラム陰性細菌の外膜を含む。

【背景技術】

【 0 0 0 8 】

WO2013/107759は、生きている細菌、より詳細には、グラム陰性細菌を標識する方法を開示している。この方法は、前記細菌の膜に、資化により、アジド基(-N₃)又はアルキン基(-C≡CH)等のいわゆる第1の反応性化学官能基を有するように修飾されたウロソン酸型内因性単糖化合物のアナログを組み込んで、この第1の反応性基と対応する反応性基を有する分子との、特にいわゆるクリックケミストリー反応を介した反応を可能にすることから本質的に構成される。

【 0 0 0 9 】

より詳細には、WO2013/107759において、そのように修飾されたウロソン酸又はウロソン酸残基を含む内因性糖のアナログは、そのような残基が、細菌膜、特に全てのグラム陰性細菌のLPSのグリカンに見出すことができ、更にはグラム陰性細菌のLPSの前記グリカンに組み込まれるのと同じ形態で直接的に資化されうることにおいて、特に有利であることが開示されている。

【 0 0 1 0 】

ウロソン酸(ケトアルドン酸又はアルドウロソン酸とも称される)は、ケトース官能基がC-2位に、及びカルボン酸がC-1位に存在しているケトースファミリーの単糖である。オクタロソン酸及びノヌロソン酸は、様々な形態の細菌グリカン(特にLPS、莢膜多糖、糖タンパク質)を含む多様な天然グリカンで見出される。これらのグリカンの合成を導く生合成経路には、一般的に、後にCMP-糖ドナーの形態で直接的に活性化される遊離のウロソン酸が中間体として関与している。全てのグラム陰性細菌のLPSは、前記ウロソン酸残基を含む。

【 0 0 1 1 】

より明確には、WO2013/107759に開示されている方法は、細菌を含む試料中の所与のカテゴリの細菌の生きている細菌を特異的に標識するための方法であって、
a)前記試料の前記細菌を、単糖化合物の少なくとも1つのアナログと共にインキュベートする工程であり、前記単糖は、そのような所与のカテゴリの細菌の外膜のグリカンの内因性単糖残基であり、前記内因性単糖残基は、ウロソン酸又はウロソン酸塩残基を含み、前記単糖化合物のアナログは、標識分子の第2の反応性基と反応することができる第1の反応性化学基によって所与の位置で置換された修飾された単糖である、工程と、
b)前記細菌を前記第2の反応性基を含む前記標識分子と接触させて、前記生きている細菌の外膜の前記グリカン内に組み込まれた前記アナログ残基の前記第1の反応性基と、前記標識分子の前記第2の反応性基との反応を生じさせる工程とを含む方法である。

【 0 0 1 2 】

詳細には、WO2013/107759において、前記アナログ単糖は、以下の式(I"):

【 0 0 1 3 】

10

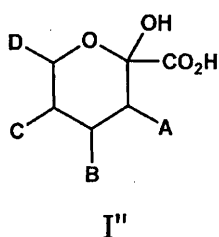
20

30

40

50

【化1】



【0014】

10

(式中、

- A、B及びCは、独立して、H、OH、NH₂、その保護基で置換されているか又は置換されていないOH及びNH₂であってよく、
- Dは、C₂~C₄アルキル鎖であり、
- A、B、C又はD基の少なくとも1つは、前記第1の反応性基で置換されている)の1つを有する置換されたウロソソ酸又はそのウロソソ酸塩である。

【0015】

WO2013/107759では、工程a)で生きている細菌と共にインキュベートされ、次いで、細菌による資化後にその外膜内に組み込まれている前記単糖のアナログは、前記第1の反応性基の置換によってのみ修飾されていることを除いて、外膜のグリカン鎖に組み込まれている内因性単糖と同一でありうる。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0016】

【特許文献1】WO2013/107759

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明は、広範囲の単細胞微生物、特により広い範囲の細菌、特にグラム陰性及びグラム陽性細菌の両方並びに単細胞菌類、アメーバ等の単細胞真核微生物及び単細胞原生動物において資化することができ、微生物の関与するカテゴリーに対する組込みの特異性に関して有利で異なる特性を示す、他の単糖化合物を見出すことを目的とした。

30

【課題を解決するための手段】

【0018】

より明確には、本発明は、微生物を含む試料中の生きている微生物を特異的に標識するための方法であって、

- a) 前記試料の前記微生物を、第2の反応性基と化学的に反応することができる第1の反応性化学基を含む少なくとも1つの修飾された単糖化合物と共にインキュベートし、その結果、前記第1の反応性基を有する残基が、前記生きている微生物に、好ましくは前記微生物の表面に組み込まれ、特に前記微生物のエンベロップに組み込まれる工程と、
- b) 前記生きている微生物に組み込まれた前記残基を、前記第2の反応性基を含む標識分子と接触させて、前記生きている微生物内に組み込まれた前記残基の前記第1の反応性基と前記標識分子の前記第2の反応性基との化学反応を生じさせて、共有結合を生じさせる工程と

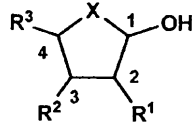
40

を含み、

前記修飾された単糖化合物は、以下の式(I'):

【0019】

【化2】



I'

【0020】

- (- Xは、O、NH、又はS、好ましくは、O及びNHであってよく、
 - R1及びR2は、独立して、H、OH、NH₂、その保護基で置換されているか又は置換されていない、好ましくはアルキル、ヒドロキシアルキル、アシル、ホルミル又はイミドイル基で置換されている、OH及びNH₂であってよく、
 - R3は、H又はC₁~C₄アルキル鎖であり、各炭素はその保護基で、好ましくはアルキル、ヒドロキシアルキル、アシル、ホルミル又はイミドイル基で置換されているか又は置換されていないOH又はNH₂で置換されているか又は置換されておらず、
 - X、R1、R2及びR3基の少なくとも1つ、好ましくはR3は、前記第1の反応性基Raで置換されている)
- を有する化合物又はその塩であることを特徴とする、方法を提供する。

10

【0021】

したがって、上記式I'に定義される化合物は、W02013/107759に記載の式I''の化合物及び平衡にある対応する式IIの化合物とは対照的に、式I'の環のC-1位にカルボン酸基(-CO₂H)を含まない。

20

【0022】

そのような式(I')の化合物は、広範囲のカテゴリの生きている微生物、例えば特に古細菌及び細菌を含む単細胞原核微生物並びにより詳細には単細胞菌類(とりわけ酵母を含む)、アメーバ及び単細胞原生動物を含む単細胞真核生物により資化される。

【0023】

本発明に従って、前記第1の反応性基を有する前記修飾された単糖が前記残基を組み込むことで微生物により資化される明確な機構は完全に決定されるわけではない。

30

【0024】

しかしながら、前記単糖化合物は、前記微生物の内因性単糖残基と異なり、特に前記微生物のエンベロープの内因性単糖残基と異なり、より詳細にはグラム陰性細菌の場合には、そのような細菌の外膜の多糖、例えば細菌のLPS又は莢膜多糖(CPS)の内因性単糖残基と異なる場合があるが、それにもかかわらず、前記微生物内へ入り込み、組み込まれる。

【0025】

表現「内因性単糖残基」は、前記微生物、特に、前記微生物のエンベロープ、より詳細には前記細菌のエンベロープに天然に存在する残基を意味する。

【0026】

本発明によれば、前記第1の反応性基によって修飾されている前記単糖化合物は、前記微生物、特に前記微生物のエンベロープ、より詳細には前記細菌のエンベロープにおいて、その生合成経路に内因性単糖の前駆体のアナログを含みうる。

40

【発明を実施するための形態】

【0027】

より詳細には、前記第1の反応性基が置換されている本発明の単糖化合物の一部は、前記微生物に組み込まれた内因性単糖残基と異なり、特に前記細菌のエンベロープのグリカンに組み込まれている内因性単糖残基と異なるが、前記細菌のエンベロープのグリカンに組み込まれた、前記第1の反応性基によって修飾されている、修飾された単糖残基において代謝される可能性がある。

【0028】

50

より詳細には、本発明の方法において、前記修飾された単糖化合物は、W02013/107759に開示及び特許請求された上記式(I')の細菌の修飾された内因性単糖の前駆体のアナログでありうる。本発明の化合物は、インキュベーション工程a)の間に代謝及び変換されて、前記細菌により資化されて、おそらくは前記細菌のエンベロープのグリカン内に組み込まれる、すなわち、そのような細菌のエンベロープのグリカンの修飾された単糖残基、すなわち前記第1の反応性基を有する点で修飾された単糖残基として、組み込まれうる。

【0029】

より詳細には、前記組み込まれた残基は、単糖残基でありうる。しかしながら、代替的に、前記修飾された単糖化合物が、前記微生物に組み込まれた単糖残基以外の前記残基を生じる分子において、変換、代謝又は分解されるか、又は前記残基の前駆体を生じる可能性もある。

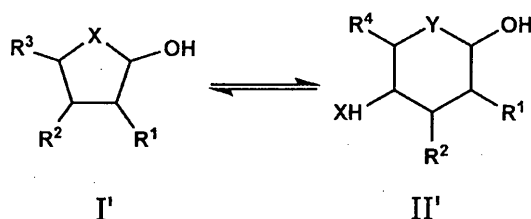
10

【0030】

フラノース環(I')は、以下のピラノース化合物(II')と部分的に平衡でありうるが、實際上、前記反応性基Raが、ピラノース環の形成を妨げる：

【0031】

【化3】



20

【0032】

式中、(I')及び(II')の化合物において、X、R1、R2及びR3は、上記に定義された通りであり、Y=O又はNH、及びR4はH又はC₁~C₃アルキル鎖であり、R3=CHYHR4で、各炭素は、保護基で、好ましくはアルキル、ヒドロキシアルキル、アシル、ホルミル又はイミドイル基で置換されているか又は置換されていないOH又はNH₂で置換されているか又は置換されていない。

【0033】

より詳細には、R3がC₁~C₄アルキル鎖である式(I')の化合物において、R3はCHYHR4以外であり、したがって化合物(I')は(II')と平衡でない。

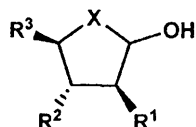
30

【0034】

好ましくは、前記修飾された単糖化合物は、式(I)を有する立体異性体又はその塩である。

【0035】

【化4】



I

40

【0036】

好ましくは、前記修飾された単糖化合物は、式(I)又は(I')を有する化合物又はその塩であって、式中：

- Xは、Oであり、
- R1は、H、OH、NH₂、前記保護基で置換されているか又は置換されていないOH及びNH₂であり、

50

- R2は、H、OH、NH₂、前記保護基で置換されているか又は置換されていないOH及びNH₂であり、
- 少なくともR1、R2又はR3が、前記第1の反応性基Raで置換されている。

【0037】

より詳細には、前記修飾された単糖化合物は、以下の式を有する化合物又はその塩であり、式中：

- R1及びR2は、OH、又は保護基で置換されているか若しくは置換されていないOHであり、
- R3は、前記第1の反応性基Raで置換されている-CH₃、-CH₂OH、又は-CH₂NH₂、好ましくは-CH₃又は-CH₂NH₂である。

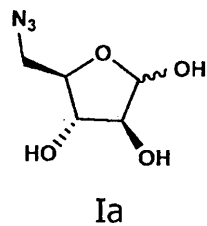
10

【0038】

より好ましくは、前記修飾された単糖化合物は、以下の立体異性体の式(Ia)を有する化合物(いわゆる本明細書の下記の「Ara-N₃」)又はその塩である：

【0039】

【化5】



20

【0040】

より詳細には、OHについて、保護基は、好ましくは、アルキル、ヒドロキシアルキル、アシル又はホルミル基でありうる。

【0041】

より詳細には、NH₂について、保護基は、アルキル、ヒドロキシアルキル、アシル、ホルミル又はイミドイル基から選択されうる。

【0042】

NH₂は、1つ又は2つの保護基、特に1つのCH₃基及び1つのアルキル、ヒドロキシアルキル、アシル、ホルミル又はイミドイル基、特にアセチル(Ac)、アセチミドイル(Am)、N-メチル-アセチミドイル、N,N-ジメチル-アセチミドイル、ホルミル(Fo)、又はヒドロキシブタノイル基で保護されていてもよい。

30

【0043】

前記修飾された単糖化合物(Ia)の前記単糖残基は、天然前駆体アラビノース5-P(A5P)のアラビノースアナログであり、この前駆体アラビノース5-Pは、WO2013/107759の図1Bの経路に示されるように、多数の細菌における内因性単糖残基のいわゆるKdo(1-1')のその生合成経路における前駆体である。アラビノース-5-Pが、KdoになるKdo-8-Pに変換される、細菌のKdo生合成経路において、酵素Kdo-8-ホスフェート(Kdo-8-P)シンターゼは、アラビノース-5-ホスフェートをKdo-8-Pに変換し、酵素Kdo-8-Pホスファターゼは、Kdo-8-PのOP

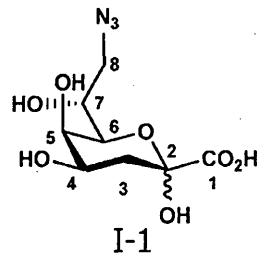
40

【0044】

したがって、化合物(Ia)は、以下の式(I-1)の修飾された内因性Kdo-N₃に変換されうる可能性がある：

【0045】

【化6】



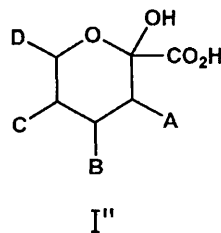
【0046】

10

より一般的には、式(I)及び(I')の化合物は、W02013/107759に開示されている細菌の外膜の式(I'')の内因性化合物の前駆体のアナログでありうる。

【0047】

【化7】



20

【0048】

式の慣用表示に従って、上記の様々なサイクルのC-1~C-n位の炭素原子及びこれらの炭素原子に結合している置換基Hは表していない。

【0049】

前記第1の反応性基と第2の反応性基の間の前記化学反応により、共有結合が生じ、いくつかの例では、共有結合は、リガンドが配位された金属錯体における共有結合的配位結合でありうる。

【0050】

好ましくは、前記第1の反応性基Raは、アジド基(-N₃)からなる又はアジド基(-N₃)を有する基及びアルキン基(-C≡C-)からなる又はアルキン基(-C≡C-)を有する基から選択され、前記第1の反応性基は好ましくはアジド基であり、前記第2の反応性基は、アルキン基及びアジド基からそれぞれなる又はアルキン基及びアジド基を有する基から選択され、前記第2の反応性基は好ましくはアルキン基であり、前記アジド反応性基と前記アルキン反応性基との反応は、アジド-アルキン環化付加を実施する際に行われる。

30

【0051】

より好ましくは、Raは、-N₃又は-C≡CHであり、好ましくは-N₃である。

【0052】

式(I)及び(I')の化合物は、生きている微生物、例えば特に古細菌及び細菌を含む単細胞原核微生物並びにより詳細には単細胞菌類(特に酵母を含む)及び単細胞原生生物を含む単細胞真核微生物を標識するために使用されうる。

40

【0053】

より詳細には、式(I)及び(I')の化合物は、グラム陰性又は陽性細菌及び単細胞菌類を含む全ての種類の細菌を標識するために使用されうる。

【0054】

より詳細には、式(I)及び(I')の化合物は、例えば、とりわけ以下の属の細菌から選択されうるグラム陰性細菌及びグラム陽性細菌を標識するために使用されうる：

a) グラム陰性細菌: アシネトバクター属(Acinetobacter)、バクテロイデス属(Bacteroides)、バルトネラ属(Bartonella)、ボルデテラ属(Bordetella)、ブラキスピラ属(Brachyspira)、ブルセラ属(Brucella)、バークホルデリア属(Burkholderia)、クラミドフィラ属(C

50

hlamydophila)、コクシエラ属(Coxiella)、クリセオバクテリウム属(Chryseobacterium)、クロノバクター属(Cronobacter)、クロストリジウム属(Clostridium)、カンピロバクター属(Campylobacter)、エシェリキア属(Escherichia)、フランシセラ属(Francisella)、カルディオバクテリウム属(Cardio bacterium)、エドワジエラ属(Edwardsiella)、エールリキア属(Ehrlichia)、エイケネラ属(Eikenella)、エリザベトキンギア属(Elizabethkingia)、エンテロバクター属(Enterobacter)、フソバクテリウム属(Fusobacterium)、ヘモフィルス属(Haemophilus)、ヘリコバクター属(Helicobacter)、クレブシエラ属(Klebsiella)、レジオネラ属(Legionella)、レプトスピラ属(Leptospira)、モルガネラ属(Morganelia)、ミクソコックス属(Myxococcus)、ナイセリア属(Neisseria)、ネオリケッチア属(Neori ckettsia)、パストツレラ属(Pasteurella)、プレシオモナス属(Plesiomonas)、ポルフィロ 10
 モナス属(Porphryomonas)、プレボテラ属(Prevotella)、プロテウス属(Proteus)、プロビ
 デンシア属(Providencia)、シュードアルテロモナス属(Pseudoalteromonas)、シュードモ
 ナス属(Pseudomonas)、リケッチア属(Rickettsia)、ロドシクルス属(Rhodocycclus)、サル
 モネラ属(Salmonella)、セラチア属(Serratia)、シノリゾビウム属(Sinorhizobium)、シ
 ゲラ属(Shigella)、シェワネラ属(Schewanella)、シェワマ属(Shewamma)、ステノトロ
 ホモナス属(Stenotrophomonas)、エルシニア属(Yersinia)、ストレプトバチルス属(Strep
 tobacillus)、テナシバキュラム属(Tenacibaculum)、トレポネーマ属(Treponema)、ビブ
 リオ属(Vibrio)、及び

b) グラム陽性細菌: バチルス属(Bacillus)、コクリア属(Kocuria)、エンテロコッカス属
 (Enterococcus)、ラクトコッカス属(Lactococcus)、ラクトバチルス属(Lactobacillus)、 20
 リステリア属(Listeria)、マイクロコッカス属(Micrococcus)、スタフィロコッカス属(Stap
 hylococcus)、ストレプトコッカス属(Streptococcus)。

【 0 0 5 5 】

式(1)及び(1')、好ましくは(1a)の化合物を資化することができるグラム陰性細菌の中
 で、以下の種を挙げるることができる: アシネトバクター・バウマンニイ(Acinetobacter ba
 umannii)、クロノバクター・サカザキ(Cronobacter sakazakii)、エシェリキア・コリ(Es
 cherichia coli)、クレブシエラ・ニューモニアエ(Klebsiella pneumoniae)、レジオネラ
 ・ニューモフィラ(Legionella pneumophila)、ナイセリア・ゴノレエ(Neisseria gonorrh
 oae)、ナイセリア・メニンジティディス(Neisseria meningitidis)、プロテウス・ミラ
 ビリス(Proteus mirabilis)、プロビデンシア・スチュアルティイ(Providentia stuartii) 30
)、シュードモナス・フルオレッセンス(Pseudomonas fluorescens)、サルモネラ・ティフ
 ィムリウム(Salmonella typhimurium)、セラチア・マルセッセンス(Serratia marcescens
)、ステノトロホモナス・マルトフィリア(Stenotrophomonas maltophilia)、ビブリオ・
 コレラエ(Vibrio cholerae)。

【 0 0 5 6 】

より詳細には、式(1)及び(1')、好ましくは(1a)の化合物を資化することができるグラ
 ム陽性細菌の中で、以下の種を挙げるることができる: バチルス・サブティリス(Bacillus s
 ubtilis)、バチルス・セレウス(Bacillus cereus)、エンテロコッカス・デュランス(Ente
 rococcus durans)、エンテロコッカス・フェカーリス(Enterococcus faecalis)、リステ
 リア・モノサイトゲネス(Listeria monocytogenes)、マイクロコッカス・ルテウス(Microco
 ccus luteus)、スタフィロコッカス・アウレウス(Staphylococcus aureus)、スタフィロ
 コッカス・アウレウス亜種アウレウス(Staphylococcus aureus aureus)、スタフィロコッ
 カス・エピデルミス(Staphylococcus epidermis)、スタフィロコッカス・サブロフィティ
 カス(Staphylococcus saprophyticus)、ストレプトコッカス・アガラクティアエ(Strepto
 coccus agalactiae)。

【 0 0 5 7 】

より詳細には、式(1)及び(1')の化合物は、例えば、以下の属: アスペルギルス属(Asper
 gillus)、カンジダ属(Candida)、フサリウム属(Fusarium)及びジオトリカム属(Geotrichu
 m)から選択されうる菌類、並びにアカントアメーバ属(Acanthamoebae)のアメーバを標識
 するために使用されうる。

10

20

30

40

50

【0058】

より詳細には、前記式(1)及び(1')、好ましくは(1a)の化合物は、特に、以下の菌類及び酵母の種:アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)及びジオトリカム・カンディダム(*Geotrichum candidum*)、並びに以下のアメーバの種、アカントアメーバ・カステラーニ(*Acanthamoebae castellanii*)で資化されうる。

【0059】

上記微生物の中で、以下の細菌:バチルス・サブティリス、ナイセリア・ゴノレエ、エンテロコッカス・フェカーリス、リステリア・モノサイトゲネス、ミクロコッカス・ルテウス、スタフィロコッカス・アウレウス、スタフィロコッカス・アウレウス亜種アウレウス、スタフィロコッカス・エピデルミス、並びに以下の菌類:アスペルギルス・ニガー、カンジダ・アルビカンス、フサリウム、ジオトリカム・カンディダム及びアメーバのアカントアメーバ・カステラーニは、W02013/107759のKdo-N₃(1-1')を資化しなかった。

10

【0060】

より詳細には、工程a)のインキュベーション時間は、微生物の倍加時間に依存し、好ましくは 10^{11} 細胞/ml以下、より詳細には、 10^9 細胞/ml以下の微生物濃度を検出するために、インキュベーション時間は、より詳細には1時間~72時間、より詳細には1時間~36時間であり、修飾された単糖化合物の濃度は、 10^{-5} M~1Mである。

【0061】

衛生規則のほとんどが、増加可能な、特に固体又は液体増殖培地で増加可能な微生物の数を有利に参照するので、本発明は、より詳細には、増加することのできる微生物を特異的に標識するための方法であって、前記微生物が増加することのできる培養培地(液体培地)中又は(固体培地)上で前記微生物がインキュベートされる、方法を提供する。

20

【0062】

重症型の病原体は、上記微生物の間に隠れており、生きている微生物の迅速な標識化及び/又は検出は、重大な衛生的課題を示す。本発明の修飾された単糖は、微生物によって迅速に資化され、微生物を迅速に標識化及び検出することを可能にし、生きている野生型微生物に関する全工程が1日未満である。この方法は、微生物株に応じて生きている微生物の検出に通常2日から1カ月超を必要とする一般的検出法と比較して、非常に迅速である。

30

【0063】

有利には、本発明は、(c)前記微生物が、生きている微生物に結合されている前記標識分子を含むかどうかを検出すること、及び/又は前記標識分子を有する前記生きている微生物を固体基質に固定化することで、前記生きている微生物を検出する更なる工程を含み、ここで、前記標識分子は、検出可能な物質を含むか若しくは検出可能な物質に反応若しくは結合することができる分子であるか、又は前記標識分子は、前記第2の反応性基を有する第1の分子であり、前記第1の分子は、第2の分子及び/又は固体基質に反応又は結合することができるか、好ましくは、前記第2の分子は検出可能な物質を含む及び/又は前記第2の分子は前記固体基質に結合されている若しくは結合されうる。

【0064】

したがって、本発明は、(a)生きている微生物を標識すること、(b)生きている微生物を数える又は検出すること、並びに(c)固定担体、特に前記第2の反応性基を有する磁気ビーズで構成される固体担体に固定化されている、生きている微生物を濃縮及び/又は単離することを可能にする。

40

【0065】

より詳細には、前記標識分子は、検出可能な物質を含む検出可能な分子であり、方法は、c)前記微生物が、前記微生物に結合されている前記検出可能な分子を含むかどうかを検出することで、生きている微生物を検出する工程を含む。

【0066】

前記検出工程c)は、液体培地中又は固体基質上で行われてもよい。

50

【0067】

より詳細には、前記標識分子は、検出可能な分子、すなわち、検出可能な物質、すなわち当業者に既知の技術、例えば蛍光、呈色又は発色によって検出されうる物質からなる又はその物質を有する分子でありうる。

【0068】

より詳細には、前記標識分子は、前記第2の反応性基を有する第1のリガンド又は第1の結合タンパク質であり、工程c)において、前記第1のリガンド又は第1の結合タンパク質に連結された前記生きている微生物は、前記第1のリガンド又は第1の結合タンパク質と、前記第1のリガンド又は第1の結合タンパク質に対して特異的に反応する又は結合する第2のリガンド又は第2の結合タンパク質とを接触させることにより、検出される及び/又は固定化される。

10

【0069】

より詳細には、前記標識分子は、前記第2の反応性基を有する第1のリガンド、好ましくは、ピオチンであり、工程c)において、前記第1のリガンドに連結された前記生きている微生物は、前記微生物と、前記第1のリガンドに対して特異的な抗体又は別のタンパク質との反応により検出され、前記抗体は、検出可能な物質、好ましくは蛍光色素若しくは発光分子又は酵素を有する。

【0070】

また本発明は、本発明の方法を実施するためのキットであって、

- 式(1)の前記修飾された単糖化合物と、
- 前記第1の反応性基と反応することができる前記第2の反応性基を含む前記標識分子と、
- 必要であれば、前記第1の反応性基と、前記標識分子の前記第2の反応性基との反応を生じさせるための反応物質と、
- 好ましくは、前記微生物の増殖を可能にする、好ましくは前記微生物の増殖に特異的な、培養又はインキュベーション培地と

を含む、キットを提供する。

20

【0071】

好ましくは、前記第1の反応性基Raは、アジド基(-N₃)からなる又はアジド基(-N₃)を有する基及びアルキン基(-C≡C-)からなる又は有する基から選択され、前記第2の反応性基Rbは、アルキン基(-C≡C-)及びアジド基(-N₃)からそれぞれなる又はアルキン基(-C≡C-)及びアジド基(-N₃)を有する基から選択され、前記アジド反応性基と前記アルキン基(-C≡C-)との反応は、アジド-アルキン環化付加を実施する際に行われる。

30

【0072】

アジド-アルキン環化付加は、銅触媒の存在下又は非存在下における周知のいわゆるクリックケミストリー反応であって、アジド基とアルキン基とが反応してトリアゾールが生じる。より詳細には、反応は、トリス-トリアゾリルリガンド、好ましくは、TGTAの存在下、銅触媒条件で実施されうる。より詳細には、検出可能な分子は、末端アルキン基を有する蛍光色素である。

【0073】

より詳細には、反応は、トリス-トリアゾールリガンド、例えば、TGTA(トリス((1-(D-グルコピラノシル)-1H[1,2,3]-トリアゾール-4-イル)メチル)アミン)又はTBTA(トリス-[(1-ベンジル-1H-1,2,3-トリアゾール-4-イル)メチル]アミン)と末端アルキン基を有するAlexa標識分子との存在下に触媒を用いて行われ、前記蛍光色素と前記式(1)のアナログ化合物とのアジド-アルキン環化付加が実行されてもよい。

40

【0074】

頻繁に使用される他の適切なリガンドは、トリス(3-ヒドロキシプロピルトリアゾリルメチル)アミン(THPTA)、2-(4-((ビス((1-tert-ブチル-1H-1,2,3-トリアゾール-4-イル)メチル)アミノ)メチル)-1H-1,2,3-トリアゾール-1-イル)エタンスルホン酸(BTTES)、トリス((1-(0-エチル)カルボキシメチル)-(1,2,3-トリアゾール-4-イル))メチル)アミン、パソ

50

フェナントロリンジスルホネート、又はトリス(2-ベンゾイミダゾリルメチル)アミンである。

【0075】

代替的に、アジド-アルキン環化付加は、歪みアルキン、例えば、アザジベンゾシクロオクチン(ADIBO、DIBAC又はDBC0)又はテトラメトキシジベンゾシクロオクチン(TMDIBO)が使用される場合、銅の非存在下で実行されることもできる。

【0076】

銅フリー反応で頻繁に使用される他の適切な歪みアルキンとして、シクロオクチン(OCT)、アリール-レスシクロオクチン(ALO)、モノフルオロシクロオクチン(MOFO)、ジフルオロシクロオクチン(DIFO)、ジベンゾシクロオクチン(DIBO)、ジメトキシアザシクロオクチン(DIMAC)、ピアリールアザシクロオクチノン(BARAC)、ピシクロノニン(BCN)、テトラメチルチエピニウム(TMTI、TMTH)、ジフルオロベンゾシクロオクチン(DIFBO)、オキサ-ジベンゾシクロオクチン(ODIBO)、カルボキシルメチルモノベンゾシクロオクチン(COMBO)、又はベンゾシクロノニンが挙げられる。

【0077】

他の反応性基及び他の反応も可能であり、例えば、シュタウディンガーライゲーション(第1の反応性基=アジド及び第2の反応性基=ホスフィン)、銅フリークリックケミストリー(第1の反応性基=アジド及び第2の反応性基=歪みアルキン(環内アルキン))、カルボニル縮合(第1の反応性基=アルデヒド又はケトン及び第2の反応性基=ヒドラジド又はオキシアミン)、チオール-エンクリックケミストリー(第1の反応性基=チオール及び第2の反応性基=アルケン)、ニトリル-オキシド-エンクリックケミストリー(第1の反応性基=ニトリルオキシド又はアルデヒド、オキシム又はヒドロキシモイルクロリド又はクロロオキシム(chlororoxime)及び第2の反応性基=アルケン又はアルキン)、ニトリル-イミン-エンクリックケミストリー(第1の反応性基=ニトリルイミン又はアルデヒド、ヒドラゾン、又は塩化ヒドラゾノイル又はクロロヒドラゾン及び第2の反応性基=アルケン又はアルキン)、逆電子要請型ディールス・アルダーライゲーション(第1の反応性基=アルケン及び第2の反応性基=テトラジン)、イソニトリル-テトラジッククリックケミストリー(第1の反応性基=イソニトリル及び第2の反応性基=テトラジン)、鈴木-宮浦カップリング(第1の反応性基=ハロゲン化アリール及び第2の反応性基=ボロン酸アリール)、His-タグ(第1の反応性基=オリゴ-ヒスチジン及び第2の反応性基=ニッケル錯体又はニッケルリガンド)。

【0078】

上記の反応に関与する基の列挙において、第1の反応性基と第2の反応性基とは置き換えられてもよい。上述の化学反応の全ては共有結合を生じる。

【0079】

他の及びより高い検出特異性は、微生物試料を、2つの前記の異なる修飾された単糖化合物及び2つの異なる検出可能な分子と共にインキュベートすることで得ることができる。

【0080】

本発明の方法の別の特定の実施形態では、前記工程a)のインキュベーション及び工程b)の反応は、メンブレンフィルター上で行われ、同じ元の微生物から生じる増殖された培養微生物と一緒にグループ化し、顕微鏡で可視化してもよく、前記検出可能な分子は、可視化により前記顕微鏡を用いて検出してもよい。したがって、培養可能な微生物の数はそれにより定量することができる。

【0081】

この実施形態は、前記修飾された単糖の資化の前に、前記メンブレンフィルター、例えばポリエステルメンブレン上で試験試料を濾過することを可能にし、生きている微生物が資化期間中の可能な増殖によって過大評価されるのを防ぐことができる。実際に、そのような膜の上面に固定された細胞が増殖し始めると、細胞はまとまって存在して微小なコロニーを形成し、同じ単一の細胞から生じるものとして容易に検出することができる。したがって、培養可能な微生物を計数により数えることが可能になる。

【 0 0 8 2 】

また本発明は、前記微生物の増殖を可能にする培養又はインキュベーション培地を更に含む、本発明の方法を実施するためのキットを提供する。

【 0 0 8 3 】

好ましくは、前記培養又はインキュベーション培地は、前記所与のカテゴリーの微生物のコロニーを形成するための増殖速度及び/又は能力を増強及び/又は加速する薬剤を更に含む。より詳細には、インキュベーション培地は、少なくとも抗酸化剤、例えば、ピルベート又はカタラーゼを含む。

【 0 0 8 4 】

より詳細には、一実施形態では、キットは、更に
 - 前記検出可能な分子、又は検出可能な物質、好ましくは蛍光色素若しくは発光分子若しくは酵素を有する前記第2の分子、及び/或いは
 - 前記標識分子に特異的に反応又は結合することができる、前記第2の分子を有する固体基質を含む。

10

【 0 0 8 5 】

より詳細には、一実施形態では、本発明のキットは、更に
 - 前記第1の反応性基と反応することができる前記第2の反応性基を含む前記検出可能な分子と、
 - 前記修飾された単糖化合物、前記反応物質、及び前記検出可能な分子と共にインキュベートした後の微生物の可視化を可能にする固体培地とを含む。

20

【 0 0 8 6 】

またより詳細には、キットは、
 - アジド又はアルキン基を含む前記第1の反応性基により置換されている前記修飾された単糖化合物と、
 - アルキン基又はアジド基をそれぞれ有する検出可能な分子の前記第2の反応性基と、
 - 場合により、銅触媒及びトリストリアゾリルリガンドを含む、前記反応物質とを含む。

30

【 0 0 8 7 】

第1の特定の実施形態では、前記標識分子は、検出可能な分子、すなわち、検出可能な物質、すなわち、蛍光色素又は発光物質又は酵素、例えばペルオキシダーゼ等の検出される物質からなる又はその物質を有する分子であることができ、前記酵素は、より詳細には、共反応物質と反応した後に検出される。

【 0 0 8 8 】

生きている微生物の単離及び/又は濃縮に有用な、更なる特定の実施形態では、前記標識分子は、工程b)を行うときに、固体基質へ結合されていてもよい。

【 0 0 8 9 】

更なる特定の実施形態では、前記標識分子は、前記第2の反応性基を有する第1のリガンド又は第1の結合タンパク質である分子であり、工程c)において、前記第1のリガンド又は第1の結合タンパク質に連結された前記生きている微生物は、前記第1のリガンド又は第1の結合タンパク質と、前記第1のリガンド又は第1の結合タンパク質に対して特異的に反応する又は結合する第2のリガンド又は第2の結合タンパク質である第2の分子とを接触させることにより、検出される及び/又は固定化される。

40

【 0 0 9 0 】

したがって、前記第1の又は第2のリガンド又は結合タンパク質を、例えば、蛍光色素又は発光物質又は酵素、例えばペルオキシダーゼ等の前記検出可能な物質を有し、前記第1及び/又は第2のリガンド又は結合タンパク質に特異的に結合する第3の結合タンパク質と反応又は結合させることができる点で有利である。前記検出可能な物質を、前記第2のリガンド又は第2の結合タンパク質又は第3の結合タンパク質を介して検出することにより、

50

前記検出可能な物質のシグナルを増幅することができる。

【0091】

より詳細には、第1のリガンド又は第1の結合タンパク質は、

- ビオチンであり、次いで前記第2の結合タンパク質はアビジン若しくはストレプトアビジンであって、前記第3の結合タンパク質はビオチンに対して惹起される抗体であってもよく、又は
- アビジン若しくはストレプトアビジンであり、次いで前記第2のリガンド結合タンパク質はビオチンであって、前記第3の結合タンパク質はアビジン若しくはストレプトアビジンに対して惹起される抗体であってもよく、又は
- 第1の抗体であり、次いで前記第2の結合タンパク質は、前記第1の抗体に対して特異的な第2の抗体であって、前記第3の結合タンパク質は、前記第1の抗体に対して特異的な第3の抗体であってもよい。

10

【0092】

より詳細には、前記標識分子は、前記第2の反応性基を有する第1のリガンド、好ましくはビオチンであり、工程c)において、前記第1のリガンドに連結された前記生きている微生物は、前記微生物と、前記第1のリガンドに対して特異的な抗体との反応により検出され、前記抗体は、検出可能な物質、好ましくは蛍光色素若しくは発光分子又は酵素を有する。

【0093】

またより詳細には、前記標識分子は、前記第2の反応性基を有する第1のリガンド、好ましくはビオチンであり、工程c)において前記第1の結合タンパク質に連結された前記生きている微生物は、前記第1のリガンドと、前記第2の結合タンパク質、好ましくはアビジン又はストレプトアビジンに連結された固体基質、好ましくは磁気ビーズとの反応により固定化され、その後、前記生きている微生物は、細菌DNA酵素増幅により、又は前記細菌と前記第1のリガンド若しくは第2の結合タンパク質に特異的に反応若しくは結合する第3の結合タンパク質との反応により検出され、前記第3の結合タンパク質は、検出可能な物質、好ましくは、蛍光色素若しくは発光分子又は酵素を備え、前記第3の結合タンパク質は、好ましくは、前記第1のリガンド又は第1の結合タンパク質に対して特異的な抗体である。

20

【0094】

一実施形態では、より詳細には、標識分子は、第2の反応性基を有する酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)又はウレアーゼ酵素でありうる。

30

【0095】

前記生きている微生物を前記固体基質に固定化するそのような実施形態により、前記微生物内に試料を濃縮させることができ、また前記生きている微生物を任意の既知の方法、例えば、PCR、特にリアルタイムPCR等のDNA酵素増幅又は標識化された抗体を用いる免疫学的反応を含む方法、例えばELISA試験により定量することができる。

【0096】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明並びに例証的及び非限定的な実施形態の例に照らして、より明白となる。

40

【実施例1】

【0097】

化合物(1a):Ara-N₃の合成

合成において、以下の試薬及び条件を使用した:(i)TsCl、ピリジン、(ii)ピリジン、Ac₂O、(iii)NaN₃、DMF、(iv)CH₃ONa、CH₃OH。

【0098】

薄層クロマトグラフィーは、Merck社60F₂₅₄で、UVにより、及び/又は硫酸若しくはKMnO₄若しくはリンモリブデン酸水溶液を用いた炭化により検出して実施した。シリカゲル6040~63µmをフラッシュカラムクロマトグラフィーに使用した。

【0099】

50

NMRスペクトルは、Bruker社Avance300又は500MHz分光計で、内部標準として残留プロトン化溶媒を使用して取得した。化学シフトは、百万分率(ppm)で示し、結合定数はヘルツ(Hz)で報告する。分割パターンは、シングレット(s)、ダブルット(d)、トリプレット(t)、ダブルダブルット(dd)、ダブルダブルダブルット(ddd)として示す。解釈できなかった又は容易に可視化できなかった分割パターンは、マルチプレット(m)として示す。

【0100】

質量スペクトルは、Thermo Scientific社TSQで又はBruker社micrOTOFqで又はWaters社LC Premier XE(ToF)で、ポジティブ(ESI+)モードでのエレクトロスプレーイオン化により検出して取得した。

【0101】

IR-FTスペクトルは、Perkin Elmer社Spectrum100分光計で記録した。特徴的な吸収は cm^{-1} で報告する。

【0102】

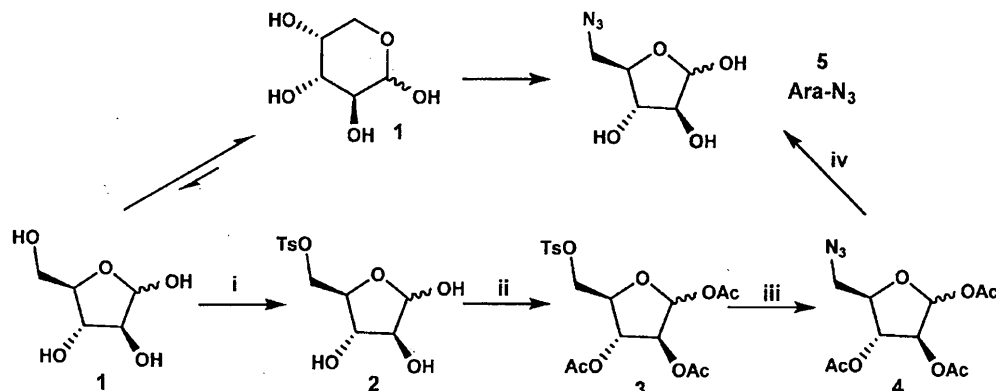
特定の光学的回転を、20℃でAnton Paar社MCP300旋光計を用いて、10cmセルで20、589nmで測定した。

【0103】

化合物(1a)は、その合成の工程に關与する様々な化合物を示す以下のスキーム1における化合物(5)であった。

【0104】

【化8】



【0105】

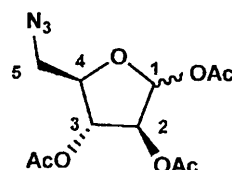
様々な工程における試薬及び条件は、以下の通りである：(i)TsCl(1.1当量)、ピリジン(1.0M)、100℃、室温、18時間。(ii)ピリジン/ Ac_2O (2:1、0.7M)、18時間。(iii) NaN_3 (2.0当量)、DMF(0.4M)、80℃、20時間、3工程にわたって15%。(iv) CH_3ONa (0.1当量)、 CH_3OH (0.2M)、室温、3時間、99%。

【0106】

1)5-アジド-5-デオキシ-1,2,3-トリ-O-アセチル-D-アラビノフラノース(4)の調製：

【0107】

【化9】



【0108】

市販のD-アラビノース(1)(6.00g、40mmol)を100℃で2時間、ピリジン(40mL)中で加熱した。溶液を冷却し、更に塩化トシル(8.38g、44mmol、1.1当量)で処理し、16時間、室温(20℃)で攪拌し、単離しなかった。次いで、無水酢酸(20mL)を加えた。TLCで決定されるように

10

20

30

40

50

完全にアセチル化した後、溶媒を蒸発させ、残渣痕跡は数回トルエン(3)と共蒸発させ、単離しなかった。残渣をDMF(100mL)に溶解し、アジ化ナトリウム(5.20g、80mmol、2.0当量)を加え、懸濁液を、80 で20時間加熱した。酢酸エチルで希釈し、水で洗浄した後、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濃縮した。残渣をフラッシュクロマトグラフィー(石油エーテル/酢酸エチル 7:3)で精製した。最初の溶出生成物は、予測された5-アジド-1,2,3-トリ-O-アセチル-D-アラビノフラノース(4)(1.83g、15%、 / 約2:1)と決定された。

【 0 1 0 9 】

【数 1】

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.41 (d, 0.33H, $J_{1,2}$ 3.5 Hz, H-1 β); 6.23 (d, 0.67H, $J_{1,2}$ \sim 1 Hz, H-1 α); 5.40-5.37 (m, 1.34H, H-2 β , H-3 β); 5.23 (d, 0.67H, $J_{1,2}$ \sim 1 Hz, H-2 α); 5.06 (d, 0.67H, $J_{3,4}$ 4.6 Hz, H-3 α); 4.30 (ddd, 0.67H, H-4 α); 4.16-4.10 (m, 0.33H, H-4 β); 3.69 (dd, 0.67H, $J_{5a,5b}$ 13.5, $J_{4,5a}$ 3.1 Hz, H-5 α); 3.61 (dd, 0.33H, $J_{5a,5b}$ 13.1, $J_{4,5a}$ 3.6 Hz, H-5 $\alpha\beta$); 3.51-3.43 (m, 1H, H-5 β); 2.15, 2.13, 2.12, 2.11, 2.11, 2.09 (6s, 18H, 6 CH_3CO).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.3, 170.0, 169.1 (3 C=O); 99.2 (C-1 α); 93.5 (C-1 β); 84.1 (C-4 α); 80.8 (C-4 β); 80.6 (C-3 α); 77.4 (C-2 α); 75.1 (C-2 β); 74.8 (C-3 β); 53.0 (C-5 β); 51.3 (C-5 α); 20.9, 20.6, 20.3 (3 CH_3).

LRMS (ESI $^+$): [M+H] $^+$ 324.0.

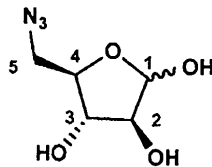
HRMS (ESI $^+$): [M+H] $^+$ ($\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{NaO}_7$) 計算値 m/z: 324.0802, 実測値: 324.0802.

【 0 1 1 0 】

2)5-アジド-5-デオキシ-D-アラビノフラノース(5)の調製:

【 0 1 1 1 】

【化 1 0】



【 0 1 1 2 】

保護された5-アジド-1,2,3-トリ-O-アセチル-D-アラビノース(4)を、次いで無水メタノール(30mL)に溶解し、 CH_3ONa ($0.2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、3mL)のメタノール溶液で処理し、アルゴン雰囲気下、室温で3時間攪拌した。中和(Dowex(登録商標)50(H^+))、濾過、及び濃縮後、5-アジド-5-デオキシ-D-アラビノフラノース(5)を、99%収率(1.03g)で得た。

Rf(ジクロロメタン/メタノール 92:8):0.28。

IR(cm^{-1}):3367、2106、1281、1040。

HRMS (ESI $^+$): [M+H-N $_2$] $^+$ ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_4$) 計算値 m/z: 148.0604、実測値: 148.0610。

アノマーアルファ(5):

【 0 1 1 3 】

10

20

30

40

【数2】

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 5.24 (d, 1H, $J_{1,2}$ 2.9 Hz, H-1); 4.17 (ddd, 1H, $J_{3,4}$ 6.4, $J_{4,5b}$ 5.8, $J_{4,5a}$ 3.5 Hz, H-4); 4.01 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 4.6, $J_{1,2}$ 2.9 Hz, H-2); 3.97 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 6.4, $J_{3,2}$ 4.6 Hz, H-3); 3.64 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 13.6, $J_{4,5a}$ 3.5 Hz, H-5a); 3.44 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 13.6, $J_{4,5b}$ 5.8 Hz, H-5b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ (ppm): 101.0 (C-1); 81.3 (C-4); 81.2 (C-2); 76.3 (C-3); 51.5 (C-5).

10

【0114】

アノマーベータ(5):

【0115】

【数3】

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 5.28 (br d, 1H, $J_{1,2}$ 3.1 Hz, H-1); 4.10-4.05 (m, 2H, H-2, H-3); 3.89 (ddd, 1H, $J_{3,4}$ 7.1, $J_{4,5b}$ 6.5, $J_{4,5a}$ 3.5 Hz, H-4); 3.59 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 13.3, $J_{4,5a}$ 3.5 Hz, H-5a); 3.42 (dd, 1H, $J_{5a,5b}$ 13.3, $J_{4,5b}$ 6.5 Hz, H-5b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ (ppm): 95.2 (C-1); 79.6 (C-4); 75.8 (C-2); 74.7 (C-3); 52.6 (C-5).

20

【実施例2】

【0116】

本発明の化合物Ara-N₃(1a)及び先行技術の化合物Kdo-N₃(1-1)を用いた、生きている微生物の標識化の比較

1)材料及び方法

1.1)微生物株及び増殖条件

Table1(表1)及びTable3(表3)に列挙した細菌及び菌株を、Table1(表1)及びTable2(表2)に列挙した培養培地及び条件で増殖させる。全ての株は、回転式振盪機(160rpm)内で30又は37で増殖させた。

30

【0117】

【表 1 A】

Table 1:

微生物	参照	増殖条件
細菌		
アシネトバクター・バウマンニイ	ATCC 17978	LB-24H-37°C
バチルス・セレウス	実験室株 (FIEROBEチーム LCB/CNRS)	TSB-24H-37°C
バチルス・セレウス	CIP 66.24T	TSB-24H-37°C
バチルス・セレウス・パリ (Paris)	実験室株 (N.HENRYチーム/CNRS)	TSB-24H-30°C
バチルス・サブティリス	実験室株 (GUISEPPIチーム LCB/CNRS)	LB-24H-37°C
クロノバクター・サカザキ	CIP 103183T	TSB-24H-37°C
エンテロコッカス・デュランス	実験室株 (FIEROBEチーム LCB/CNRS)	TSB-24H-37°C
エンテロコッカス・フェカーリス	実験室株 (FIEROBEチーム LCB/CNRS)	TSB-24H-37°C
エシェリキア・コリK12	MG1655	LB-24H-37°C
エシェリキア・コリO86	実験室株 (DENAMURチーム/INSERM)	LB-24H-37°C
クレブシエラ・ニューモニアエ	CIP 101114	TSB+5%ヒツジ血液- 24H-30°C
クレブシエラ・ニューモニアエ	臨床株 (LASCOLA/マルセイユ ラ ティ モーネ(Marseille, La Timone))	TSB-24H-37°C
コクリア・バリアンス(Kocuria varians)・パリ	実験室株 (HENRYチーム/CNRS)	TSB-24H-30°C
ラクトコッカス・ラクティス 種ラクティス(Lactococcus lactis lactis)	実験室株 (FIEROBEチーム LCB/CNRS)	TSB-24H-30°C
レジオネラ・ニューモフィラ sg1・パリ	CIP 33152	YEC+上清レジオネラ 10%-24H-37°C
レジオネラ・ニューモフィラ sg6	LG 0846 3022 (CNRL、環境株)	YEC+上清レジオネラ 10%-24H-37°C
リステリア・モノサイトゲネス 1/2	CIP 82.110T	BHI-24H-37°C
リステリア・モノサイトゲネス 1/2a	CIP 100607	BHI-24H-37°C
マイクロコッカス・ルテウス	実験室株 (FIEROBEチーム LCB/CNRS)	TSB-24H-30°C
ナイセリア・ゴノレエ	CIP 79.18T	TSB+10%ウマ血液- 24H-37°C

10

20

30

40

【 0 1 1 8 】

【表 1 B】

ナイセリア・メニンジティディス	CIP 107858	TSB+10%ウマ血液-24H-37°C	
プロテウス・ミラビリス	臨床株 (LASCOLA/マルセイユ ラ ティ モーネ)	TSB-24H-37°C	
プロビデンシア・スチュアーティイ	臨床株 (LASCOLA/マルセイユ ラ ティ モーネ)	TSB-24H-37°C	
シュードモナス・フルオレッセンス・ミグラ(Migula)	ATCC 4927	TSB-24H-37°C	10
シュードモナス・フルオレッセンス・パリ	実験室株 (HENRYチーム/CNRS)	TSB-24H-37°C	
ロドシクルス	実験室株 (HENRYチーム/CNRS)	TSB-24H-30°C	
サルモネラ・ティフィムリウム 12023	実験室株 (BARRASチーム LCB/CNRS)	LB-24H-37°C	
セラチア・マルセッセンス	CIP 102446	TSB-24H-30°C	
セラチア・マルセッセンス	臨床株 (LASCOLA/マルセイユ ラ ティ モーネ)	TSB-24H-37°C	20
シェワネラ・オネイデンシス (Shewanella oneidensis)	実験室株 (MEJEANチーム LCB/CNRS)	LB-24H-37°C	
スタフィロコッカス・アウレウス	臨床株 (DUKANチーム LCB/CNRS)	TSB-24H-37°C	
スタフィロコッカス・アウレウス亜種アウレウス	IP 53-156	TSB-24H-37°C	
スタフィロコッカス・エピデルミス	実験室株 (FIEROBEチーム LCB/CNRS)	TSB-24H-37°C	
スタフィロコッカス・サブロフィティカス	臨床株 (LASCOLA/マルセイユ ラ ティ モーネ)	TSB-24H-37°C	30
ステノトロホモナス・マルトフィリア	臨床株 (LASCOLA/マルセイユ ラ ティ モーネ)	TSB-24H-37°C	
ストレプトコッカス・アガラクティアエ	臨床株 (LASCOLA/マルセイユ ラ ティ モーネ)	TSB-24H-37°C	
ビブリオ・コレラエ	CIP 104151	TSB-24H-37°C	
真核生物			
アスペルギルス・ニガー	実験室株 (FIEROBEチーム LCB/CNRS)	TSB-24H-30°C	
カンジダ・アルビカンス	実験室株 (FIEROBEチーム LCB/CNRS)	TSB-24H-30°C	40
フサリウム	CNCM 1149-76	TSB-24H-30°C	
ジオトリカム・カンディダム	CNCM 1447-83	TSB-24H-30°C	

【 0 1 1 9 】

【表1C】

サッカロミセス・セレビスエ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	BY4741	YPD+10%グルコース
アカントアメーバ・カステラーニ	ATCC 30234	PYG

【0120】

【表2】

Table 2:

	組成	供給者	参照
トリプシン大豆ブロス (TSB)	カゼインペプトン(パンクレアチン分解物)17g/l+大豆ペプトン(パパン消化物)3g/l+塩化ナトリウム5g/l+リン酸水素二カリウム2.5g/l+グルコース2.5g/l pH7.3	Sigma Aldrich社 (米国)	22092
ブレインハートインフュージョン (BHI)	脳インフュージョン固体12.5g/l+ウシ心臓インフュージョン固体5g/l+プロテオースペプトン10g/l+グルコース2g/l+塩化ナトリウム5g/l+リン酸二ナトリウム2.5g/l	Oxoid社 (英国)	CM1135
YEC	酵母エキス10g/l+カザミノ酸	Becton Dickinson社 (米国)	Bacto 212720
PYG	プロテオースペプトン20g/L+酵母エキス1g/L+グルコース18g/L+塩化カルシウム+リン酸二ナトリウム+リン酸カリウム+硫酸マグネシウム+クエン酸ナトリウム PH=6.5	ATCC	712 PYG
ルリア-ベルターニ(Luria Bertani, LB)	Bactotryptone 10g/l+	Becton Dickinson社 (米国)	211699
	Bacto酵母エキス 5g/l+	Becton Dickinson社 (米国)	212720
	塩化ナトリウム+	Sigma Aldrich社 (米国)	55886
	pastagar 15g/l	Biorad社 (米国)	64946
	pH7.2		

【0121】

1.2) 銅触媒クリックケミストリー

一夜培養物を、Kdo-N₃(I-1)又はAra-N₃1(Ia)(10mM)を含有する新鮮培地(最終体積100 μl)で100倍希釈した。微生物を、30又は37 で24時間インキュベートし、次いでリン酸緩衝液(0.05M、pH7.5)を用いて13,000 × gにて室温で2分間遠心分離することにより3回洗浄した。

【0122】

以下の式の2つの蛍光色素-アルキンプローブA488-イン(6a)及びA594-イン(6b)を使用した。

10

20

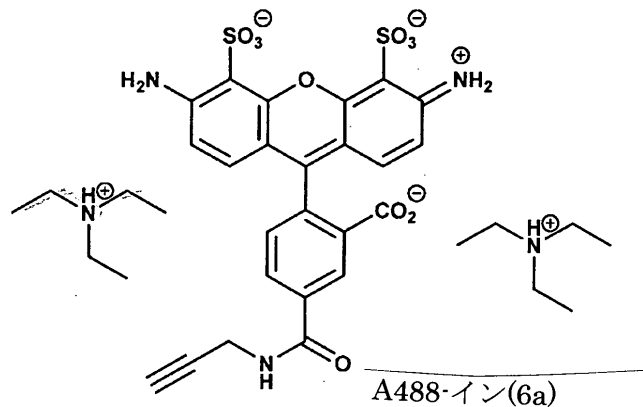
30

40

50

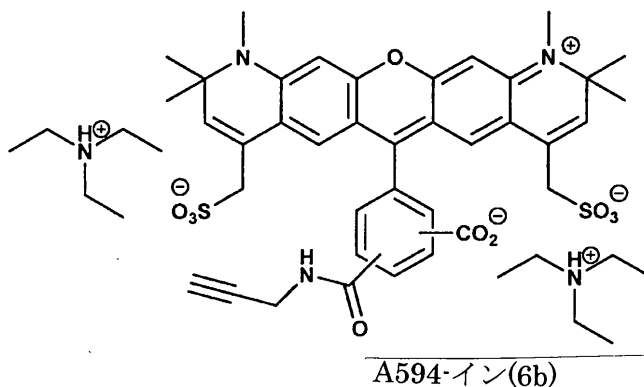
【 0 1 2 3 】

【 化 1 1 】



10

【 化 1 2 】



20

【 0 1 2 4 】

CuSO₄及びTGTAを、それぞれ2mM及び4mMの最終濃度で、リン酸緩衝液(0.05M、pH7.5)中37 で激しく振盪させながら一夜混合した。次に、アミノグアニジン、アスコルビン酸ナトリウム及びA488-イン(6a)又はA594-イン(6b)を、それぞれ4mM、5mM及び1mMの最終濃度で、CuSO₄/TGTA一夜混合物に加えた。最後に、この溶液中で微生物を再懸濁し、振盪させながら37 で30分間インキュベートした。最後に、細胞を、リン酸緩衝液を用いて14,000 × gにて室温で(at room)2分間遠心分離することにより3回洗浄し、顕微鏡により分析した。

30

【 0 1 2 5 】

1.3) 蛍光顕微鏡法

微生物を、ガラスカバースリップ上に接種し、希釈LB(リン酸緩衝液中1/10(0.05M、pH7.5))を用いて作製した薄い(厚さ1mm)半固体1%寒天パッドで覆った。画像は、CoolSNAP HQ 2カメラ(Roper Scientific、Roper Scientific SARL社、フランス)及び100 × /1.4DLL対物レンズを装備した落射蛍光自動化顕微鏡(Nikon TE2000-E-PFS、Nikon社、フランス)で記録した。励起光は120Wメタルハライド光によって発生させ、シグナルを適切なフィルターを使用して監視した。デジタル解析及び画像処理は、Metamorph7.5(Molecular Devices、Molecular Devices France社、フランス)でのカスタム自動化スクリプト(Visual Basic)により実施した。

40

【 0 1 2 6 】

2) 結果

21.) 本発明の化合物Ara-N₃(1a)及び先行技術のKdo-N₃(1-1)の両方を比較して用いて、細菌、菌類及びアメーバ類の様々な株を試験した。

【 0 1 2 7 】

50

これらの株を、最初に化合物(1a)又は(1-1)の存在下で増殖させ、続く工程で、微生物へのアジド化学リポーターの組込みを、先に記載した条件での銅触媒アジド-アルキン環化付加を利用して、硫酸銅、アスコルビン酸ナトリウム、TGTA、銅(I)に対する水溶性トリス(トリアゾリル)リガンド及び上記式(6a)又は(6b)に対する蛍光色素-アルキンプローブを上記のように30分間使用して、監視した。

【0128】

下記Table3(表3)において、これらの実験で、非常に顕著な蛍光を示し、化学リポーターの有効な代謝的組込みを示した株を「+」と記し、標識化無しは「-」と記し、試験されなかった細菌はTable3(表3)において「NT」と記している。

【0129】

【表 3 A】

Table 3:

微生物	<i>Kdo-N₃</i>	<i>Ara-N₃</i>	
細菌			
アシネトバクター・バウマンニイ	+	+	
バチルス・セレウス	NT	+	
バチルス・セレウス	NT	+	
バチルス・セレウス・パリ	NT	+	10
バチルス・サブティリス	-	+	
クロノバクター・サカザキ	+	+	
エンテロコッカス・デュランス	NT	+	
エンテロコッカス・フェカーリス	-	+	
エシェリキア・コリK12	+	+	
エシェリキア・コリO86	+	+	
クレブシエラ・ニューモニアエ	+	+	20
クレブシエラ・ニューモニアエ	+	+	
レジオネラ・ニューモフィラsg1 パリ	+	+	
レジオネラ・ニューモフィラsg6	+	+	
リステリア・モノサイトゲネス1/2	-	+	
マイクロコッカス・ルテウス	-	+	
ナイセリア・ゴノレエ	-	+	
ナイセリア・メニンジティディス	+	+	
プロテウス・ミラビリス	+	+	30
プロビデンシア・スチュアーティイ	+	+	
シュードモナス・フルオレッセンス・ミグラ	+	+	
シュードモナス・フルオレッセンス・パリ	+	+	
サルモネラ・ティフィムリウム12023	+	+	
セラチア・マルセッセンス	+	+	
セラチア・マルセッセンス	+	+	
スタフィロコッカス・アウレウス	-	+	40
スタフィロコッカス・アウレウス亜種アウレウス	-	+	
スタフィロコッカス・エピデルミス	-	+	
スタフィロコッカス・サブロフィティカス	NT	+	

【 0 1 3 0 】

【表 3 B】

ステノトロホモナス・マルトフィリア	+	+
ストレプトコッカス・アガラクティアエ	NT	+
ビブリオ・コレラエ	+	+
真核生物	<i>Kdo-N₃</i>	<i>Ara-N₃</i>
アスペルギルス・ニガー	-	+
カンジダ・アルビカンス	-	+
フサリウム	-	+
ジオトリカム・カンディダム	-	+
アカントアメーバ・カステラーニ	-	+

10

【 0 1 3 1 】

これらの実験は、本発明の化合物(1a)が、広範囲の細菌及び菌類並びにアメーバによって資化されることを示す(試験した微生物は全て標識された)。興味深いことに、化合物(1a)は以下の細菌(全てグラム陽性細菌)及び菌類(全て試験した菌類)の株によって資化されるが、これらの株は化合物(1-1)を資化しなかった:

20

- a) 細菌:バチルス・サブティリス、エンテロコッカス・フェカーリス、ナイセリア・ゴノレエ、リステリア・モノサイトゲネス、ミクロコッカス・ルテウス、スタフィロコッカス・アウレウス、スタフィロコッカス・アウレウス亜種アウレウス、及び
- b) 菌類:アスペルギルス・ニガー、カンジダ・アルビカンス、フサリウム及びジオトリカム・カンディダム、及び
- c) アメーバ:アカントアメーバ・カステラーニ。

フロントページの続き

(73)特許権者 511025226

ユニヴェルシテ デクス - マルセイユ
UNIVERSITE D' AIX - MARSEILLE
フランス、エフ - 13284 マルセイユ セデックス 07、ブルバール シャルル リヴォ
ン、ジャルダン ドュ ファロ、58
Jardin du Pharo, 58, Bld Charles Livon, F-13
284 Marseille cedex 07, France

(73)特許権者 510302412

ユニヴェルシテ・パリ・シュド
フランス・F - 91400・オルセイ・リュ・ジョルジュ・クレマンソー・15

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 サム・デュカン

フランス・13004・マルセイユ・リュ・エスペランデュ・6

(72)発明者 ボリス・ヴォゼル

フランス・92330・ソー・アヴェニュー・デュ・プレジダン・フラン克蘭・ルーズヴェルト・1
0

(72)発明者 ジョルディ・マス・ボンス

スペイン・08191・バルセロナ・ルビー・カリェ・カル・プリンセプ・39

(72)発明者 オレリー・バロン

フランス・95290・リラ・ダン・ボワ・ドゥ・ブローニュ・オートゥイユ・3

審査官 北村 悠美子

(56)参考文献 特表2015-505248(JP,A)

The Royal Society of Chemistry, 2007年, Vol.5, p.2257-2266

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2007年, Vol.189, No.1, p.151-159

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-3/00

CAplus/REGISTRY(STN)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)