

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-509292
(P2025-509292A)

(43)公表日 令和7年4月11日(2025.4.11)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 H	15/04 (2006.01)	C 0 7 H	15/04	D C S P	4 C 0 5 7
A 6 1 K	39/104 (2006.01)	A 6 1 K	39/104	Z N A	4 C 0 8 5
A 6 1 K	39/385 (2006.01)	A 6 1 K	39/385		4 H 0 4 5
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/39		
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全102頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-553416(P2024-553416)	(71)出願人	595006223	(74)代理人 ナショナル リサーチ カウンシル オブ カナダ カナダ国, オンタリオ ケー 1 エー 0 ア ール 6 , オタワ, モントリオール ロード 1 2 0 0	
(86)(22)出願日	令和5年3月7日(2023.3.7)				
(85)翻訳文提出日	令和6年10月2日(2024.10.2)				
(86)国際出願番号	PCT/CA2023/050297				
(87)国際公開番号	WO2023/168520			(74)代理人	100107456
(87)国際公開日	令和5年9月14日(2023.9.14)				弁理士 池田 成人
(31)優先権主張番号	63/317,245	(74)代理人	100162352		弁理士 酒巻 順一郎
(32)優先日	令和4年3月7日(2022.3.7)	(74)代理人	100123995		弁理士 野田 雅一
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	コックス, アンドリュウ デイビッド	(72)発明者 カナダ, ケー 1 ジュー 6 ケー 4 オン タリオ, オタワ, ダットン クレセント 最終頁に続く	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW), EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES, FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV 最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 緑膿菌感染症の予防 / 治療

(57)【要約】

本開示は、対象において免疫応答を発生及び利用するための、化合物、組成物、抗体、及び任意選択で担体タンパク質に複合糖質の形態で結合する、単離又は合成緑膿菌グリカンを対象に投与するステップを含む、方法に一般に関する。本開示に記載の緑膿菌グリカン又は複合糖質に選択的に結合する抗体が更に提供される。

【選択図】 図 1

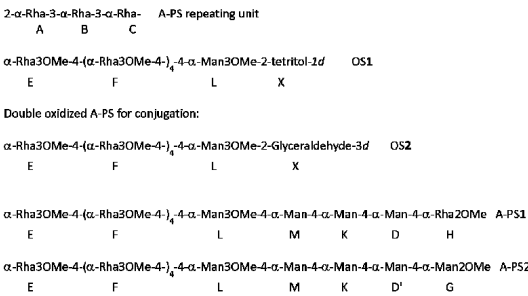


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 A :

 $\alpha\text{-Rha3OMe}(-4\alpha\text{-Rha3OMe})_n\text{-}$ 式 A

のオリゴ糖部分を含む抗原性化合物であって、

式中、 n は、1 ~ 5 であり、好ましくは、2 ~ 4 であり、

各 Rha3OMe 糖部分の 2 つの位置は、-OAc 又は -OH で独立して置換されている、抗原性化合物。

【請求項 2】

式 A 1 :

 $\alpha\text{-Rha3OMe}(-4\alpha\text{-Rha3OMe})_n\text{-X}$ 式 A 1

を有し、

式中、 n は、1 ~ 5 であり、 X は、-H 又は $-(4\alpha\text{-Man3OMe})_m\text{-}$ ハンドルであり、 m は、0、1 又は 2、好ましくは、0 又は 1 であり、

各 Rha3OMe 糖部分の 2 つの位置は、-OAc 又は -OH で独立して置換されている、請求項 1 に記載の抗原性化合物。

【請求項 3】

m が 1 又は 2 であるとき、ハンドルが、2 - グリセルアルデヒドであり、 m が 0 であるとき、ハンドルが、 $-(CH_2)_zNH_2$ であり、式中、 z は、1 ~ 5 からなる群から選択される整数である、請求項 2 に記載の抗原性化合物。

【請求項 4】

$\alpha\text{-D-Rha3OMe-4-(}\alpha\text{-D-Rha3OMe-4)}_4\text{-4-}\alpha\text{-D-Man3OMe-2-}$ グリセルアルデヒド - 1d(OS2)、

3 - O - メチル - $\alpha\text{-D-}$ ラムノピラノシド - (1 → 4) - 3 - O - メチル - $\alpha\text{-D-}$ ラムノピラノシド - (1 → 4) - 3 - O - メチル - $\alpha\text{-D-}$ ラムノピラノシド - (1 → 4) - 3 - O - メチル - $\alpha\text{-D-}$ ラムノピラノシド - (1 → 4) - 3 - O - メチル - $\alpha\text{-D-}$ ラムノピラノース (五糖)、

3 - O - メチル - $\alpha\text{-D-}$ ラムノピラノシド - (1 → 4) - 3 - O - メチル - $\alpha\text{-D-}$ ラムノピラノシド - (1 → 4) - 3 - O - メチル - $\alpha\text{-D-}$ ラムノピラノシド - (1 → 4) - 3 - O - メチル - $\alpha\text{-D-}$ ラムノピラノース (四糖)、

3 - O - メチル - $\alpha\text{-D-}$ ラムノピラノシド - (1 → 4) - 3 - O - メチル - $\alpha\text{-D-}$ ラムノピラノシド - (1 → 4) - 3 - O - メチル - $\alpha\text{-D-}$ ラムノピラノース (三糖)

10

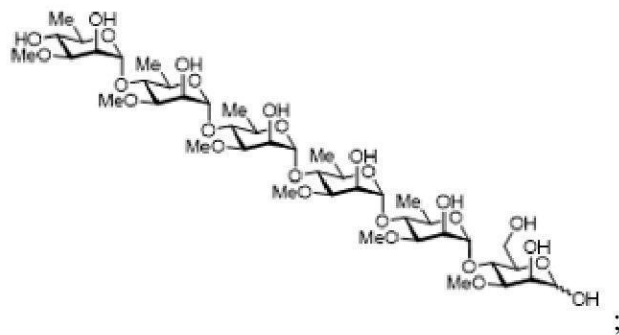
20

30

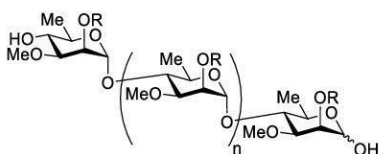
40

50

【化 1】



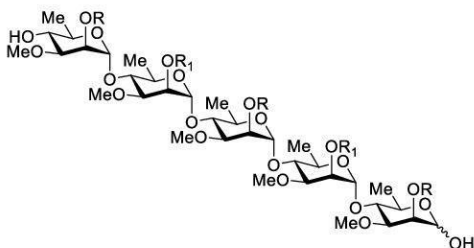
10



VIII: $n=0$, $R=H$
 IX: $n=3$, $R=Ac$
 X: $n=2$, $R=Ac$
 XI: $n=1$, $R=Ac$
 XII: $n=0$, $R=Ac$

; 及び

20



XIII: $R=Ac$, $R_1=H$
 XIV: $R=H$, $R_1=Ac$

30

からなる群から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

担体タンパク質への結合のためのリンカーを更に含み、式 A 2 :

$\alpha - Rha3OMe(-4\alpha - Rha3OMe)_n - X - \text{リンカー}$ 式 A 2

を有し、

式中、 n は、1 ~ 5 であり、

X は、 $-(4\alpha - Man3OMe)_m - (\text{ハンドル})_p -$ であり、

m は、0、1 又は 2、好ましくは、0 又は 1 であり、

p は、0 又は 1 であり、

各 $Rha3OMe$ 糖部分の 2 つの位置は、 $-OAc$ 又は $-OH$ で独立して置換されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗原性化合物。

40

【請求項 6】

担体タンパク質にコンジュゲートした請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の化合物を含むコンジュゲート。

【請求項 7】

担体タンパク質が、CRM197、破傷風トキソイド(TT)、緑膿菌タンパク質、ヒト血清アルブミン(HSA)、ウシ血清アルブミン(BSA)、ジフテリア毒素 B 断片(DTFB)、DTFB C 8、ジフテリアトキソイド(DT)、TT の C 断片、百日咳トキソイド、コレラトキソイド、大腸菌 LT、大腸菌 ST 又は緑膿菌由来の外毒素 A を含む、請求項 6 に記載のコンジュゲート。

50

【請求項 8】

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の化合物又は請求項 6 若しくは 7 に記載のコンジュゲート、及び
薬学的に許容される希釈剤、アジュバント、担体又は賦形剤
を含む医薬組成物。

【請求項 9】

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の化合物、請求項 6 若しくは 7 に記載のコンジュゲート又は請求項 8 に記載の医薬組成物を含むワクチン。

【請求項 10】

対象において免疫応答を発生させる方法であって、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の化合物、請求項 6 若しくは 7 に記載のコンジュゲート、請求項 8 に記載の医薬組成物又は請求項 9 に記載のワクチンを対象に投与するステップを含む、方法。 10

【請求項 11】

対象において緑膿菌感染症を予防する方法であって、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の化合物、請求項 6 若しくは 7 に記載のコンジュゲート、請求項 8 に記載の医薬組成物又は請求項 9 に記載のワクチンを対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項 12】

緑膿菌感染症の予防における使用のための、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の化合物、請求項 6 若しくは 7 に記載のコンジュゲート、請求項 8 に記載の医薬組成物又は請求項 9 に記載のワクチン。 20

【請求項 13】

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の化合物、
請求項 6 若しくは 7 に記載のコンジュゲート、
緑膿菌 L P S、及び / 又は
緑膿菌細胞
に選択的に結合する抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 14】

式：

$\alpha - D - R h a 3 O M e - 4 - (\alpha - D - R h a 3 O M e - 4) _4 - 4 - \alpha - D - M a n 3 O M e - 2 -$ グリセルアルデヒド - 1 d (O S 2)

の単離酸化 A バンド末端エピトープ抗原 (O S 2) に選択的に結合する抗体又はその抗原結合断片。 30

【請求項 15】

モノクローナル抗体又はその抗原結合断片である、請求項 13 又は 14 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 16】

キメラ又はヒト化抗体である、請求項 13 ～ 15 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 17】

可変重鎖 C D R 1、可変重鎖 C D R 2、及び可変重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変ドメイン 40
を含み、
前記可変重鎖 C D R 1 が、配列番号 1、配列番号 10、及び配列番号 19 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、
前記可変重鎖 C D R 2 が、配列番号 2、配列番号 11、及び配列番号 20 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、
前記可変重鎖 C D R 3 が、配列番号 3、配列番号 12、及び配列番号 21 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 13 ～ 16 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 18】

可変軽鎖 C D R 1、可変軽鎖 C D R 2、及び可変軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変ドメイン 50

を更に含み、

前記可変軽鎖 C D R 1 が、配列番号 6、配列番号 15、及び配列番号 24 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

前記可変軽鎖 C D R 2 が、G T S 及び R V S からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

前記可変軽鎖 C D R 3 が、配列番号 7、配列番号 16、及び配列番号 25 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 17 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 19】

重鎖可変ドメイン (V H) 及び軽鎖可変ドメイン (V L) の組合せを含み、前記組合せが、

配列番号 4 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 8 のアミノ酸配列を含む V L、

配列番号 13 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 17 のアミノ酸配列を含む V L、並びに

配列番号 22 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 26 のアミノ酸配列を含む V L

からなる群から選択される、請求項 13 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 20】

緑膿菌感染症の治療における使用のための、請求項 13 ~ 19 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 21】

緑膿菌感染症の診断における使用のための、請求項 13 ~ 19 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 22】

緑膿菌感染症を治療するための方法であって、請求項 13 ~ 19 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片を対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項 23】

動物、好ましくは、ヒトにおける緑膿菌細菌感染症の診断のための方法であって、検査試料を請求項 13 ~ 19 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片と接触させるステップと、それへの特異的結合を検出するステップとを含む、方法。

【請求項 24】

m が 0 である請求項 2 に記載の式 A 1 の化合物を生成する合成プロセスであって、

3 - O - メチル化ラムノピラノシドをアノマー脱保護して、3 - O - メチル化ラムノピラノースを形成するステップと、

3 - O - メチル化ラムノピラノースをアセチル化して、アセチル化 3 - O - メチル化ラムノピラノシドを形成するステップと、

アセチル化 3 - O - メチル化ラムノピラノシドの O - 4 を部分的に脱保護して、脱保護アセチル化 3 - O - メチル化ラムノピラノシドを形成するステップと、

O - 4 脱保護アセチル化 3 - O - メチル化ラムノピラノシドをカップリングさせて、アセチル化 3 - O - メチル化オリゴ糖を形成するステップと、

アセチル化 3 - O - メチル化オリゴ糖の O - 4 を脱保護して、O - 4 脱保護アセチル化 3 - O - メチル化オリゴ糖を形成するステップと、

部分的脱保護アセチル化 3 - O - メチル化オリゴ糖を脱アセチル化して、式 A 1 の化合物を形成するステップと

を含む、プロセス。

【請求項 25】

X がハンドルである請求項 2 に記載の式 A 1 の化合物を生成する合成プロセスであって、以下：

保護アミンを含むハンドルを有する、活性化 O - 3 メチル化ラムノピラノシド中間体を 1 - O でグリコシル化し、保護 1 - O グリコシド中間体を形成するステップであって、この活性化モノラムノピラノシド中間体が、グリコシル化部位 4 - O に保護基を含む、ステ

10

20

30

40

50

ップと、

4 - O から保護基を除去して脱保護 1 - O グリコシド中間体を形成するステップと、脱保護 1 - O グリコシド中間体を、活性化 O - 3 メチル化ラムノピラノシド中間体にカップリングするステップであって、前記活性化ラムノピラノシド中間体が、4 - O に保護基を含む、ステップ、及び保護メチル化二糖、三糖、四糖又は五糖を形成するステップと、保護二糖、三糖、四糖又は五糖から全ての保護基を除去するステップとを含む、プロセス。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0001】

本開示は、新規のメチル化ラムノースを含むグリカン、タンパク質 - グリカンコンジュゲートの同定及び合成、並びに抗原及びワクチンとしてのこれらの使用に関する。また、このグリカン及び複合糖質に選択的に結合する抗体を開示する。緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 感染症の治療及び予防における、このようなグリカン、複合糖質、対応する組成物、及び抗体の使用について考察する。

【背景】

【0002】

近年では、潜在的恩恵に比して開発に関するリスク及びコストが幾分高いために、大手製薬会社は、抗生剤の研究から離脱した [1]。新たな抗生剤に代わる選択肢は、抗生剤耐性細菌により引き起こされる感染症を予防するワクチンの開発である [2]。抗生剤耐性緑膿菌に対するワクチンは、一部のワクチンが臨床試験中ではあるが、未だ市場には届いていない [3 - 5]。

【0003】

緑膿菌は、その表面に広範なグリカンを有する。結果として、複合糖質ワクチンが探索されているが [5 - 7]、ヒトを対象とする使用に認可されたこのようなワクチンは皆無である [5]。

【0004】

ワクチンによる手法に加えて、表面の糖質標的に対する抗体の治療可能性も検討すべき事項である。この手法による現在の例としては、Medimmune 社による Psl の標的化及び Aridis 社による LP S O 抗原の標的化が挙げられる [8 - 11]。Medimmune 社の二重特異性抗体手法は、第 1 相試験を通過して追求することはできなかったが [12]、DNA コード mAb 療法 (DMab) の可能性は有望であり、特異的 mAb 治療薬の高コストを軽減し得る [13]。このような試験により、緑膿菌に対する抗体が、治療適用の可能性を有することが示唆される。

【発明の概要】

【0005】

本開示は、任意選択で担体タンパク質に複合糖質の形態で結合する、新規の単離又は合成緑膿菌グリカン抗原を含む、化合物及び組成物並びにワクチンに一般に関する。緑膿菌グリカン又は複合糖質に選択的に結合する抗体が更に提供される。また、治療の使用及び方法、並びに対象において免疫応答を発生及び利用するための方法を開示する。

【0006】

一態様では、本発明は、式 A :

$\alpha - Rha3OMe(-4\alpha - Rha3OMe)_n -$ 式 A

のオリゴ糖部分を含む抗原性化合物であって、

式中、n は、1 ~ 5 であり、好ましくは、2 ~ 4 であり、各 Rha3OMe 糖部分の 2 つの位置は、- OAc 又は - OH で独立して置換されている、抗原性化合物を提供する。

【0007】

一態様では、本発明は、式 A 1 :

$\alpha - Rha3OMe(-4\alpha - Rha3OMe)_n - X$ 式 A 1

のオリゴ糖部分を含む抗原性化合物であって、

10

20

30

40

50

式中、 n は、1～5であり（好ましくは、2～4であり）、 X は、 $-H$ 又は $-(4\alpha-Mann3OMe)_m$ -ハンドルであり、 m は、0、1又は2、好ましくは、0又は1であり、各Rha3OMe糖部分の2つの位置は、 $-OAc$ 又は $-OH$ で独立して置換されている、抗原性化合物を提供する。

【0008】

一態様では、本発明は、ハンドルが、 $-(CH_2)_zNH_2$ 又は2-グリセルアルデヒドであり、式中、 z は、1～5からなる群から選択される整数である、抗原性化合物を提供する。一態様では、 m が0であるとき、ハンドルが、 $-(CH_2)_2NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NH_2$ 又は $-(CH_2)_3NH_2$ である。

【0009】

10

一態様では、 m が1又は2である場合、ハンドルが、2-グリセルアルデヒドである。

【0010】

一態様では、本発明は、

$\alpha-D-Rha3OMe-4-(\alpha-D-Rha3OMe-4)_4-4-\alpha-D-Mann3OMe-2$ -グリセルアルデヒド-1d(OS2)、
 3-O-メチル- $\alpha-D$ -ラムノピラノシド-(1→4)-3-O-メチル- $\alpha-D$ -ラムノピラノシド-(1→4)-3-O-メチル- $\alpha-D$ -ラムノピラノシド-(1→4)-3-O-メチル- $\alpha-D$ -ラムノピラノシド-(1→4)-3-O-メチル- $\alpha-D$ -ラムノピラノース(五糖)、
 3-O-メチル- $\alpha-D$ -ラムノピラノシド-(1→4)-3-O-メチル- $\alpha-D$ -ラムノピラノシド-(1→4)-3-O-メチル- $\alpha-D$ -ラムノピラノシド-(1→4)-3-O-メチル- $\alpha-D$ -ラムノピラノース(四糖)、
 3-O-メチル- $\alpha-D$ -ラムノピラノシド-(1→4)-3-O-メチル- $\alpha-D$ -ラムノピラノシド-(1→4)-3-O-メチル- $\alpha-D$ -ラムノピラノース(三糖)

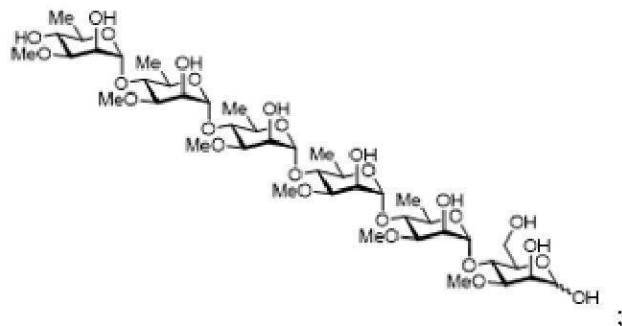
20

30

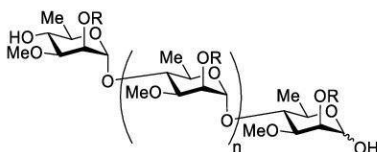
40

50

【化 1】



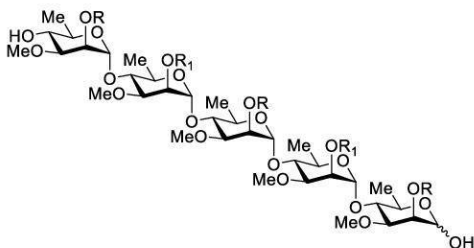
10



VIII: $n=0$, $R=H$
 IX: $n=3$, $R=Ac$
 X: $n=2$, $R=Ac$
 XI: $n=1$, $R=Ac$
 XII: $n=0$, $R=Ac$

; 及び

20



XIII: $R=Ac$, $R_1=H$
 XIV: $R=H$, $R_1=Ac$

30

からなる群から選択される、抗原性化合物を提供する。

【0011】

一態様では、本発明は、担体タンパク質への結合のためのリンカーを含み、式 A 2 :

$\alpha - Rha3OMe(-4\alpha - Rha3OMe)_n - X - \text{リンカー}$ 式 A 2

を有する、抗原性化合物であって、

式中、 n は、1 ~ 5 であり、 X は、 $-(4\alpha - Man3OMe)_m - (\text{ハンドル})_p -$ であり、 m は、0、1 又は 2、好ましくは、0 又は 1 であり、 p は、0 又は 1 であり、各 $Rha3OMe$ 糖部分の 2 つの位置は、 $-OAc$ 又は $-OH$ で独立して置換されている、抗原性化合物を提供する。

40

【0012】

一態様では、本発明は、担体タンパク質にコンジュゲートした抗原性化合物のコンジュゲートを含む抗原性化合物を提供する。

【0013】

一態様では、このコンジュゲートは、次の式：

$\alpha - Rha3OMe(-4\alpha - Rha3OMe)_n - X - (\text{リンカー})_q - \text{担体タンパク質}$ 式 A 3

を有し、式中、 n は、1 ~ 5 であり (好ましくは、2 ~ 4 であり)、 X は、 $-(4\alpha - Man3OMe)_m - (\text{ハンドル})_p -$ であり、 m は、0、1 又は 2、好ましくは、0 又は 1 であり、 p は、0 又は 1 であり、 q は、0 又は 1 であり、各 $Rha3OMe$ 糖部分の 2 つの位置は、 $-OAc$ 又は $-OH$ で独立して置換されている。

50

【 0 0 1 4 】

本発明の一態様では、担体タンパク質は、CRM 197、破傷風トキソイド（TT）、緑膿菌タンパク質、ヒト血清アルブミン（HSA）、ウシ血清アルブミン（BSA）、ジフテリア毒素B断片（DTFB）、DTFB C8、ジフテリアトキソイド（DT）、TTのC断片、百日咳トキソイド、コレラトキソイド、大腸菌（E. coli）LT、大腸菌ST又は緑膿菌由来の外毒素Aを含む。一態様では、担体タンパク質は、CRM 197、TT又は緑膿菌タンパク質である。

【 0 0 1 5 】

一態様では、本発明は、本明細書に記載の化合物又はコンジュゲート、及び薬学的に許容される希釈剤、担体又は賦形剤を含む医薬組成物を提供する。一態様では、この医薬組成物は、ワクチンである。

10

【 0 0 1 6 】

一態様では、本発明は、対象において免疫応答を発生させる方法であって、本明細書に記載の化合物、コンジュゲート又は医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法を提供する。

【 0 0 1 7 】

一態様では、本発明は、対象において緑膿菌感染症を予防する方法であって、本明細書に記載の化合物、コンジュゲート又は医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法を提供する。

【 0 0 1 8 】

一態様では、本発明は、緑膿菌感染症の予防における使用のための、化合物、コンジュゲート、ワクチン又は医薬組成物を提供する。

20

【 0 0 1 9 】

一態様では、本発明は、本明細書に記載の化合物若しくはコンジュゲート、緑膿菌LPS、及び/又は緑膿菌細胞に選択的に結合する抗体又はその抗原結合断片であって、任意選択で、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片である、抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0 0 2 0 】

一態様では、本発明は、単離酸化Aバンド末端エピトープ抗原（OS2）に選択的に結合する抗体又はその抗原結合断片であって、任意選択で、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片である、抗体又はその抗原結合断片を提供する。

30

【 0 0 2 1 】

一態様では、本発明は、キメラ又はヒト化抗体である、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0 0 2 2 】

一態様では、本発明は、可変重鎖CDR1、可変重鎖CDR2、及び可変重鎖CDR3を含む重鎖可変ドメインを含む、抗体又はその抗原結合断片であって、

可変重鎖CDR1が、配列番号1、配列番号10、及び配列番号19からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

可変重鎖CDR2が、配列番号2、配列番号11、及び配列番号20からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

40

可変重鎖CDR3が、配列番号3、配列番号12、及び配列番号21からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0 0 2 3 】

一態様では、本発明は、可変軽鎖CDR1、可変軽鎖CDR2、及び可変軽鎖CDR3を含む軽鎖可変ドメインを含む、抗体又はその抗原結合断片であって、

可変軽鎖CDR1が、配列番号6、配列番号15、及び配列番号24からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

可変軽鎖CDR2が、GTS及びRVSからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

50

可変軽鎖 C D R 3 が、配列番号 7、配列番号 16、及び配列番号 25 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0024】

一態様では、本発明は、重鎖可変ドメイン (VH) 及び軽鎖可変ドメイン (VL) の組合せを含む、抗体又はその抗原結合断片であって、この組合せが、

配列番号 4 のアミノ酸配列を含む VH 及び配列番号 8 のアミノ酸配列を含む VL、

配列番号 13 のアミノ酸配列を含む VH 及び配列番号 17 のアミノ酸配列を含む VL、並びに

配列番号 22 のアミノ酸配列を含む VH 及び配列番号 26 のアミノ酸配列を含む VL からなる群から選択される、抗体又はその抗原結合断片を提供する。

10

【0025】

一態様では、本発明は、緑膿菌感染症の治療における使用のための、抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0026】

一態様では、本発明は、緑膿菌感染症の診断における使用のための、抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0027】

一態様では、本発明は、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合断片を動物に投与するステップを含む、動物において緑膿菌細菌感染症を治療するための方法を提供する。

【0028】

一態様では、本発明は、動物における緑膿菌細菌感染症の診断のための方法であって、検査試料を本明細書に記載の抗体又はその抗原結合断片と接触させるステップと、それへの特異的結合を検出するステップとを含む、方法を提供する。

20

【0029】

一態様では、本発明は、m が 0 である、式 A 1 の化合物を生成する合成プロセスであって、

3 - O - メチル化ラムノピラノシドをアノマー脱保護して、3 - O - メチル化ラムノピラノースを形成するステップと、

3 - O - メチル化ラムノピラノースをアセチル化して、アセチル化 3 - O - メチル化ラムノピラノシドを形成するステップと、

30

アセチル化 3 - O - メチル化ラムノピラノシドの O - 4 を部分的に脱保護して、脱保護アセチル化 3 - O - メチル化ラムノピラノシドを形成するステップと、

O - 4 脱保護アセチル化 3 - O - メチル化ラムノピラノシドをカップリングさせて、アセチル化 3 - O - メチル化オリゴ糖を形成するステップと、

アセチル化 3 - O - メチル化オリゴ糖の O - 4 を脱保護して、O - 4 脱保護アセチル化 3 - O - メチル化オリゴ糖を形成するステップと、

部分的脱保護アセチル化 3 - O - メチル化オリゴ糖を脱アセチル化して、式 A 1 の化合物を形成するステップと

を含む、プロセスを提供する。

【0030】

40

一態様では、本発明は、X がハンドルである式 A 1 の化合物を生成する合成プロセスであって、以下：

保護アミンを含むハンドルを有する、活性化 O - 3 メチル化ラムノピラノシド中間体を 1 - O でグリコシル化し、保護 1 - O グリコシド中間体を形成するステップであって、この活性化モノラムノピラノシド中間体が、グリコシル化部位 4 - O に保護基を含む、ステップと、

4 - O から保護基を除去して脱保護 1 - O グリコシド中間体を形成するステップと、

脱保護 1 - O グリコシド中間体を、活性化 O - 3 メチル化ラムノピラノシド中間体にカップリングするステップであって、この活性化ラムノピラノシド中間体が、4 - O に保護基を含む、ステップ、及び保護メチル化二糖、三糖、四糖又は五糖を形成するステップと

50

、保護オリゴ糖から全ての保護基を除去するステップであって、オリゴ糖が、好ましくは、三糖、四糖又は五糖である、ステップとを含む、プロセスを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1は、本明細書に記載の単離化合物の一部の構造を示す。

【図2】図2は、アルカリ処理によりLPSから得られるバンドA多糖（下部トレース）及びこのNaIO₄酸化生成物OS1（上部トレース）の¹H NMRスペクトルを示す。^{*}は不純物、R-ラムナン繰返し単位由来のラムノースH-1、Rm-3-OMe-Rhaのアノマーシグナルを示す。 10

【図3】図3は、LPSの弱酸加水分解により緑膿菌PAO1 wzy変異体から単離したA-PS（アノマー領域）のgCOSYスペクトル（70%灰色）、TOCSYスペクトル（50%灰色）、及びROESYスペクトル（黒色）のオーバーラップを示す。

【図4】図4は、OS1のポジティブイオンモードESI-MSスペクトルを示す。m/z 1117.8及び1122.6で標識された2つのピークは、Rha₅Man₁テトリール-1d₁Me₆のアンモニウム付加体及びナトリウム付加体に対応する。

【図5】図5A及び図5Bは、CD₃ODにより記録した、L-単糖（図5A）及びD-単糖（図5B）の¹H NMRスペクトルを示す。

【図6】図6は、生成したOS1オクチルグリコシド及び標準物質のGC-MSトレースを示す。 20

【図7】図7は、CRMへのコンジュゲーション前に3-O-メチルD-マンノース及びグリセルアルデヒドに結合する緑膿菌Aバンド3-O-メチルDラムノース五糖チップの構造を示す。

【図8】図8A、図8B、図8C、及び図8Dは、BSA（図8A）、BSA-3-O-メチルラムナンコンジュゲート（図8B）、CRM（図8C）、及びCRM-3-O-メチルラムナンコンジュゲート（図8D）のMALDI-MS解析を示す。

【図9】図9A及び図9Bは、CRM-3-O-メチルラムナンコンジュゲートで免疫したマウス（M1～M6）由来のD56血清の、BSA-3-O-メチルラムナンコンジュゲート（上部曲線）及びPAO1 wt LPS（下部曲線）に対する、IgM抗体（左）及びIgG抗体（右）によるELISA滴定（図9A）、又はCRM-3-O-メチルラムナンコンジュゲートで免疫したウサギ（R1～R2）由来のD72血清の、PAO1 wt LPS（左）及びBSA-3-O-メチルラムナンコンジュゲート（右）に対するELISA滴定（図9B）を示す。 30

【図10】図10は、1B1、3B8、及び3C4のmAb含有ハイブリドーマ上清（希釈せずに使用）と緑膿菌株PAO1 wt、PAO1（wzy::Gm）（Δpa5457）、及びPAO1（wzy::Gm）（Δpa5458）の精製LPS抗原との結合のELISA解析を示す。

【図11】図11A、図11B、及び図11Cは、1B1（図11A）、3B8（図11B）、及び3C4（図11C）の精製モノクローナル抗体（mAb）（全て100 μg/ml）と緑膿菌株NRCC#6678、6668～70、6954～60並びに陰性対照株であるカタル球菌（*M. catarrhalis*）6541及び髄膜炎菌（*N. meningitidis*）6263の殺菌全細胞との結合のELISA解析を示す（株の詳細は表1を参照）。 40

【図12】図12は、3C4（パネルa）、3B8（パネルb）、及び1B1（パネルc）の精製mAb（全て100 μg ml⁻¹）と緑膿菌株NRCC#6678、6944～53の臨床単離株の殺菌全細胞との結合のELISA解析を示す（株の詳細は表1を参照）。

【図13】図13A及び図13Bは、mAb 1B1（実線）、mAb 3B8（破線）、及びmAb 3C4（点線）の、緑膿菌株PAO1 BAA-47（図13A）及び緑 50

膿菌株 537 (図 13B) に対するオプソニン貪食作用アッセイ滴定曲線を示す。

【図 14】図 14A は、精製 PAO1 LPS に対する mAb 1B1 と mAb 3C4 との間の競合 ELISA を示す。mAb 1B1 を、x 軸に示す希釈により、PAO1 LPS でコーティングした ELISA プレート上で滴定した。プレートを洗浄し、mAb 3C4 を定濃度 ($62.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) で加えた。mAb 3C4 に対して特異的な二次 mAb を加え、発色試薬を加えた後、吸光度を測定した (四角形のマーカーを有する線)。1B1 の競合なく 3C4 をプレートに加えたときに得た吸光度は、三角形のマーカーを有する線により示す。図 14B は、精製 PAO1 LPS に対する mAb 3B8 と mAb 3C4 との間の競合 ELISA を示す。mAb 3B8 を、x 軸に示す濃度により、PAO1 LPS でコーティングした ELISA プレート上で滴定した。プレートを洗浄し、mAb 3C4 を定濃度 ($62.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) で加えた。mAb 3C4 に対して特異的な二次 mAb を加え、発色試薬を加えた後に吸光度を測定した (四角形のマーカーを有する線)。3B8 の競合なく 3C4 をプレートに加えたときに得られた吸光度は、三角形のマーカーを有する線により示す。

【図 15】図 15A、図 15B、及び図 15C は、LPS (左手のパネル; 四角形のマーカー - 緑膿菌 PAO1 BAA-47、逆三角形のマーカー - 緑膿菌 (wzy::Gm) (Δ pa5458)、菱形のマーカー - 髄膜炎菌 galE/lpt3、及び円形のマーカー - PBS 対照)、又は末端メチル化ラムナンを代表する合成オリゴ糖 (右手のパネル; 塗りつぶした円形のマーカー - 五糖、白抜きの四角形のマーカー - 四糖、白抜きの円形のマーカー - 三糖、逆三角形のマーカー - 二糖、菱形のマーカー - リンカーを有する二糖、三角形のマーカー - L 単量体、塗りつぶした四角形のマーカー - D 単量体) を用いた、緑膿菌 PAO1 BAA-47 LPS に対する、mAb 1B1 (図 15A)、mAb 3C4 (図 15B)、及び mAb 3B8 (図 15C) の阻害 ELISA を示す。LPS 又は合成オリゴ糖のいずれかの、x 軸に示す段階希釈物を等量で、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の mAb と混合した。1 時間のインキュベーション後、この阻害混合物 $100 \mu\text{l}$ を PAO1 BAA-47 LPS コーティングプレートに加えた。一次 mAb に対して特異的な二次 mAb を加え、発色試薬を加えた後に吸光度を測定した。更なる LPS 又は合成オリゴ糖により mAb が阻害されなくなったときに得られた吸光度は、PBS による阻害と等しい。図 15D、図 15E、及び図 15F は、LPS (左手のパネル s; 四角形のマーカー - 緑膿菌 PAO1 BAA-47、逆三角形のマーカー - 緑膿菌 (wzy::Gm) (Δ pa5458)、菱形のマーカー - 髄膜炎菌 galE/lpt3、及び円形のマーカー - PBS 対照)、又は末端メチル化ラムナンを代表する合成オリゴ糖 (右手のパネル; 塗りつぶした円形のマーカー - 五糖、白抜きの四角形のマーカー - 四糖、白抜きの円形のマーカー - 三糖、逆三角形のマーカー - 二糖、菱形のマーカー - リンカーを有する二糖、三角形のマーカー - L 単量体、青色 - D 単量体) を用いた、緑膿菌 PAO1 BAA-47 全細胞に対する、mAb 1B1 (図 15D)、mAb 3C4 (図 15E)、及び mAb 3B8 (図 15F) の阻害 ELISA を示す。LPS 又は合成オリゴ糖のいずれかの、x 軸に示す段階希釈物を等量で、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の mAb と混合した。1 時間のインキュベーション後、この阻害混合物 $100 \mu\text{l}$ を PAO1 BAA-47 全細胞コーティングプレートに加えた。一次 mAb に対して特異的な二次 mAb を加え、発色試薬を加えた後に吸光度を測定した。更なる LPS 又は合成オリゴ糖により mAb が阻害されなくなったときに得られた吸光度は、PBS による阻害と等しい。

【図 16】図 16 では、合成オリゴ糖と高密度 1B1 IgM 表面との結合を示す SPR センサーグラムを提示する。種々の濃度範囲の合成オリゴ糖 (実験を参照) を IgM 1B1 及び無関係な IgM である Fn4F1 上に流した。動態及び親和性は、表 5 に報告する。McA1gt2/4: 対照オリゴ糖。

【図 17】図 17 は、二糖化合物の ^1H NMR スペクトルを示す (600 MHz 、 CD_3OD)。

【図 18】図 18 は、三糖化合物の ^1H NMR スペクトルを示す (500 MHz 、 CD_3OD)。

10

20

30

40

50

【図 19】図 19 は、四糖化合物の ^1H NMR スペクトルを示す (500 MHz、 CD_3OD)。

【図 20】図 20 は、五糖化合物の ^1H NMR スペクトルを示す (600 MHz、 CD_3OD)。

【図 21】図 21 は、二糖化合物の ^1H NMR スペクトルを示す (600 MHz、 D_2O)。

【図 22】図 22 は、D - 単糖合成の反応スキームを示す (スキーム 1)。

【図 23】図 23 は、L - 単糖合成の反応スキームを示す (スキーム 2)。

【図 24】図 24 は、3 - O - メチル D - ラムノースオリゴ糖合成の反応スキームを示す (スキーム 3)。

【図 25】図 25 は、二糖へのアミノエチルハンドル付加の反応スキームを示す (スキーム 4)。

【図 26】図 26 A は、HSA (レーン 2) 及び HSA - 3 - O - メチルラムナン五糖コンジュゲート (2つの濃度レーン 3 及び 4) の SDS - PAGE (左) を示し、図 26 B は、HSA (レーン 2) 及び HSA - 3 - O - メチルラムナン五糖コンジュゲート (2つの濃度レーン 3 及び 4) のウエスタンブロット (mAb 1B1 を使用; 右) 解析を示す。分子量マーカーは、レーン 1 に示す。

【図 27】図 27 は、a) HSA、b) HSA - 3 - O - メチルラムナン五糖コンジュゲートの MALDI - MS 解析を示す。

【図 28】図 28 A、図 28 B、図 28 C、図 28 D、図 28 E、図 28 F、図 28 G、及び図 28 H は、合成コンジュゲート免疫化によるマウス血清を使用する、緑膿菌 LPS を認識する能力についての ELISA を示す。種々の時点における、IgM 抗体及び IgG 抗体の滴定を示す。

【図 29】図 29 は、合成オリゴ糖コンジュゲート由来抗血清の、殺菌全細胞に対する ELISA を示す。

【図 30】図 30 は、ハンドル及び任意選択でリンカーを含む、三糖、四糖、及び五糖の合成の反応スキームを示す。

【図 31 A】図 31 A は、3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - (2, 2 - ジメトキシブチルカルボニル) アミノ] エチル 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (S22)、 ^1H NMR、600 MHz、 CD_3OD の NMR を示す。

【図 31 B】図 31 B は、3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - (2, 2 - ジメトキシブチルカルボニル) アミノ] エチル 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (S23)、 ^1H NMR、600 MHz、 CD_3OD の NMR を示す。

【図 32】図 32 は、3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - (2, 2 - ジメトキシブチルカルボニル) アミノ] エチル 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (S24)、 ^1H NMR、600 MHz、 CD_3OD の NMR を示す。

【図 33】図 33 は、LPS (左手のグラフ; 緑膿菌 PAO1 BAA - 47 (wt); 髄膜炎菌 galE / lpt3; PBS 対照)、又は末端メチル化ラムナンを代表する、リンカーを有する合成オリゴ糖 (右手のグラフ; 五糖; 四糖; 三糖) を用いた、緑膿菌 PAO1 BAA - 47 (wt) LPS に対する、mAb 1B1 の阻害 ELISA を示す。段階希釈は、x 軸に示す通りである。

【図 34 A】図 34 A は、CRM - オリゴ糖コンジュゲート免疫化前の免疫前マウス血清 IgM (1:40 希釈) による BSA - オリゴ糖コンジュゲートに対する認識を決定する ELISA を示す。MRha3V 1 ~ 5 マウスに三糖 CRM コンジュゲートを投与し、MRha4V 6 ~ 10 マウスに四糖 CRM コンジュゲートを投与し、MRha5V 1

10

20

30

40

50

1 ~ 15 マウスに五糖 CRM コンジュゲートを投与する。

【図 3 4 B】図 3 4 B は、CRM - オリゴ糖 コンジュゲート免疫化前の免疫前マウス血清 Ig M 滴定による Pa w t L P S に対する認識を決定する E L I S A を示す。MR h a 3 V 1 ~ 5 マウスに三糖 CRM コンジュゲートを投与し、MR h a 4 V 6 ~ 10 マウスに四糖 CRM コンジュゲートを投与し、MR h a 5 V 11 ~ 15 マウスに五糖 CRM コンジュゲートを投与する。

【図 3 5 A】図 3 5 A は、CRM - オリゴ糖 コンジュゲート免疫化後の最終放血マウス血清 Ig M 滴定による B S A - 三糖 コンジュゲートに対する認識を決定する E L I S A を示す。MR h a 3 V 1 ~ 5 マウスに三糖 CRM コンジュゲートを投与し、MR h a 4 V 6 ~ 10 マウスに四糖 CRM コンジュゲートを投与し、MR h a 5 V 11 ~ 15 マウスに五糖 CRM コンジュゲートを投与した。

10

【図 3 5 B】図 3 5 B は、CRM - オリゴ糖 コンジュゲート免疫化後の最終放血マウス血清 Ig M 滴定による B S A - 四糖 コンジュゲートに対する認識を決定する E L I S A を示す。MR h a 3 V 1 ~ 5 マウスに三糖 CRM コンジュゲートを投与し、MR h a 4 V 6 ~ 10 マウスに四糖 CRM コンジュゲートを投与し、MR h a 5 V 11 ~ 15 マウスに五糖 CRM コンジュゲートを投与した。

【図 3 5 C】図 3 5 C は、CRM - オリゴ糖 コンジュゲート免疫化後の最終放血マウス血清 Ig M 滴定による B S A - 五糖 コンジュゲートに対する認識を決定する E L I S A を示す。MR h a 3 V 1 ~ 5 マウスに三糖 CRM コンジュゲートを投与し、MR h a 4 V 6 ~ 10 マウスに四糖 CRM コンジュゲートを投与し、MR h a 5 V 11 ~ 15 マウスに五糖 CRM コンジュゲートを投与した。

20

【図 3 5 D】図 3 5 D は、CRM - オリゴ糖 コンジュゲート免疫化後の最終放血マウス血清 Ig M 滴定による L P S に対する認識を決定する E L I S A を示す。MR h a 3 V 1 ~ 5 マウスに三糖 CRM コンジュゲートを投与し、MR h a 4 V 6 ~ 10 マウスに四糖 CRM コンジュゲートを投与し、MR h a 5 V 11 ~ 15 マウスに五糖 CRM コンジュゲートを投与した。

【図 3 6 A】図 3 6 A は、CRM - オリゴ糖 コンジュゲート免疫化前の免疫前マウス血清 Ig G (1 : 40 希釈) による B S A - オリゴ糖 コンジュゲートに対する認識を決定する E L I S A を示す。MR h a 3 V 1 ~ 5 マウスに三糖 CRM コンジュゲートを投与し、MR h a 4 V 6 ~ 10 マウスに四糖 CRM コンジュゲートを投与し、MR h a 5 V 11 ~ 15 マウスに五糖 CRM コンジュゲートを投与する。

30

【図 3 6 B】図 3 6 B は、CRM - オリゴ糖 コンジュゲート免疫化前の免疫前マウス血清 Ig G 滴定による Pa w t L P S に対する認識を決定する E L I S A を示す。MR h a 3 V 1 ~ 5 マウスに三糖 CRM コンジュゲートを投与し、MR h a 4 V 6 ~ 10 マウスに四糖 CRM コンジュゲートを投与し、MR h a 5 V 11 ~ 15 マウスに五糖 CRM コンジュゲートを投与する。

【図 3 7 A】図 3 7 A は、CRM - オリゴ糖 コンジュゲート免疫化後の最終放血マウス血清 Ig G (1 : 20 希釈) による、指示された通り、B S A - オリゴ糖 及び Pa w t L P S に対する認識を決定する E L I S A を示す。MR h a 3 V 1 ~ 5 マウスに三糖 CRM コンジュゲートを投与し、MR h a 4 V 6 ~ 10 マウスに四糖 CRM コンジュゲートを投与し、MR h a 5 V 11 ~ 15 マウスに五糖 CRM コンジュゲートを投与した。Pa w t L P S に対して、免疫前血清 (P r e) を陰性対照として使用し、m A b 3 C 4 (アイソタイプ Ig G 2 b) を陽性対照として使用した。

40

【図 3 7 B】図 3 7 B は、CRM - オリゴ糖 コンジュゲート免疫化後の貯蔵した免疫前マウス血清 Ig G 及び最終放血マウス血清 Ig G (1 : 40 希釈) による、指示された通り、Pa w t L P S、Pa w z y 5 4 5 7 L P S、Pa w z y 5 4 5 8 L P S、及び Nm w t L P S (陰性対照) に対する認識を決定する E L I S A を示す。MR h a 3 V 1 ~ 5 マウスに三糖 CRM コンジュゲートを投与し、MR h a 4 V 6 ~ 10 マウスに四糖 CRM コンジュゲートを投与し、MR h a 5 V 11 ~ 15 マウスに五糖 CRM コンジュゲートを投与した。免疫前血清 (P r e) を陰性対照として使用した。

50

【図 3 8 A】図 3 8 A は、CRM - オリゴ糖コンジュゲート免疫化前後の免疫前後 (D 7 0) ウサギ血清 (1 : 5 0 0 及び 1 : 1 5 0 0 希釈) による、BSA - オリゴ糖コンジュゲートに対する認識を決定する ELISA を示す。RRha3V 1 ~ 2 ウサギに三糖 CRM コンジュゲートを投与し、RRha4V 3 ~ 4 ウサギに四糖 CRM コンジュゲートを投与し、RRha5V 5 ~ 6 ウサギに五糖 CRM コンジュゲートを投与した。

【図 3 8 B】図 3 8 B は、CRM - オリゴ糖コンジュゲート免疫化前後の免疫前後 (D 7 0) ウサギ血清滴定による、PawtLPS、Pawzy5457LPS、及び Pawzy5458LPS に対する認識を決定する ELISA を示す。RRha3V 1 ~ 2 ウサギに三糖 CRM コンジュゲートを投与し、RRha4V 3 ~ 4 ウサギに四糖 CRM コンジュゲートを投与し、RRha5V 5 ~ 6 ウサギに五糖 CRM コンジュゲートを投与した。

10

【図 3 9 A】図 3 9 A は、貯蔵した免疫前後マウス血清 (IgM 及び IgG は全て 1 : 4 0 希釈) と緑膿菌株 NRCC # 6 6 7 8、6 6 6 7 ~ 7 0、6 9 5 4 ~ 6 0、及び陰性対照株カタル球菌 6 5 4 1 の殺菌全細胞との結合の ELISA 解析を示す (株の詳細は表 7 を参照)。

【図 3 9 B】図 3 9 B は、個々の免疫前後ウサギ血清 (全て 1 : 1 5 0 0 希釈) と緑膿菌株 NRCC # 6 6 7 8、6 6 6 7 ~ 7 0、6 9 5 4 ~ 6 0、及び陰性対照株カタル球菌 6 5 4 1 の殺菌全細胞との結合の ELISA 解析を示す (株の詳細は表 7 を参照)。

【図 3 9 C】図 3 9 C は、個々の免疫前後ウサギ血清 (全て 1 : 1 5 0 0 希釈) と緑膿菌臨床株 NRCC # 6 6 7 8、6 9 4 4 ~ 4 6、6 9 4 8 ~ 5 3 並びに陰性対照株である髄膜炎菌 6 2 6 3 及びカタル球菌 6 5 4 1 の殺菌全細胞との結合の ELISA 解析を示す (株の詳細は表 7 を参照)。

20

【詳細な説明】

【0 0 3 2】

本発明は、NMR 及び化学解析による新規の緑膿菌多糖構造の同定に部分的に基づく。本明細書において提供される構造は、緑膿菌 A バンド末端エピトープ抗原 (A - PS) を最初に同定するもの、即ち最初に正確に同定するものであると考える。

【0 0 3 3】

緑膿菌 (*P. aeruginosa* と呼ばれる) は、日和見性細菌病原体であり、医療ケア関連肺炎及び人工呼吸器関連肺炎、嚢胞性線維症 (CF) 患者における慢性肺感染症、並びに熱傷及び軟部組織感染症を含む、潜在的に生命を脅かすいくつかの感染症の病原物質である。薬物耐性緑膿菌感染症の有病率の上昇が認められている。したがって、一部の例では、「緑膿菌」という用語は、緑膿菌の病原株を指し、抗生剤耐性株、例えば、βラクタム抗生剤 (例えば、ペニシリン)、ピペラシリン、イミペネム、トブラマイシン又はシプロフロキサシンに対して耐性の緑膿菌株が挙げられるが、これらに制限されない。一部の実施形態では、「緑膿菌」という用語は、嚢胞性線維症患者に感染する病原株を指す。

30

【0 0 3 4】

「感染症」という用語は、対象身体の任意の微生物感染症を指す。感染症は、微生物による患者身体への侵入及びその後の対象身体における微生物の複製を含む。特定の例では、微生物は、緑膿菌である。

40

【0 0 3 5】

「対象」という用語は、本明細書において使用する場合、動物を指し、例えば、飼育動物、例えば、ネコ、イヌ等、家畜 (例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ等)、実験動物 (例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット等)、哺乳動物、非ヒト哺乳動物、霊長類、非ヒト霊長類、げっ歯類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、及び他の任意の動物を含み得る。特定の例では、対象は、ヒトである。

【0 0 3 6】

グリカン

本明細書において使用する場合、「糖質」、「グリカン」、「糖」、「オリゴ糖」、及

50

び「多糖」という用語は、互換的に使用し、糖単量体で構成され、典型的には、本明細書において結合とも呼ぶグリコシド結合により連結される、オリゴマー又はポリマーを指す。グリカンでは、単糖単量体は、全て同一であり得るか、又は異なり得る。一般的な単量体としては、三炭糖、四炭糖、五炭糖、グルコース、フルクトース、ガラクトース、ラムノース及び3-O-メチルラムノース、キシロース、アラビノース、リキソース、アロース、アルトロース、マンノース及び3-O-メチルマンノース、グロース、イオドース(iodose)、リボース、マンノヘプツロース、セドヘプツロース、並びにタロースが挙げられるが、これらに制限されない。グリカンでは、アミノ糖も単量体であり得る。このような糖を含むグリカンは、本明細書においてアミノグリカンと呼ぶ。アミノ糖は、本明細書において使用する場合、ヒドロキシ基の代わりにアミン基を含む糖分子であるか、又は一部の実施形態では、このような糖由来の糖である。アミノ糖の例としては、グルコサミン、ガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、シアル酸(N-アセチルノイラミン酸及びN-グリコリルノイラミン酸を含むが、これらに制限されない)、並びにL-ダウノサミンが挙げられるが、これらに制限されない。

10

【0037】

一部の場では、グリカンは、制限されないが、標識、ハンドル、リンカー、スペーサー、担体等を含む1つ又は複数の非グリカン成分により修飾し得る。一部の実施形態では、グリカンは、複合糖質を含み得る。複合糖質は、糖タンパク質、糖脂質又はプロテオグリカンを含み得るが、これらに制限されない。糖タンパク質は、共有結合するオリゴ糖鎖を含む任意のタンパク質(グリカン)を含む。他に特定しない限り、本明細書において使用する多糖命名法は、IUB-IUPAC Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBM) Recommendations 1980に従う。JCBN, 1982, J. Biol. Chem. 257: 3352-3354を参照されたい。

20

【0038】

「D-単糖」という標識は、本明細書において、例えば図において使用する場合、詳細には、3-O-メチル-D-ラムノースを指し、「L-単糖」という標識は、本明細書において、例えば図において使用する場合、詳細には、3-O-メチル-L-ラムノピラノースを指し、「二糖」という標識は、本明細書において、例えば図において使用する場合、詳細には、3-O-メチル- α -D-ラムノピラノシド-(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-メチル-D-ラムノピラノースを指し、これらは文脈から明らかとなる。

30

【0039】

「抗原」という用語は、本明細書において使用する場合、免疫応答を開始及び媒介可能な物質を指す。抗原により刺激される免疫応答は、液性又は細胞性の一方又は両方であってもよく、一般には、抗原に特異的である。免疫応答を刺激又は増強する抗原は、免疫原性であると言われ、免疫原と呼ばれ得る。抗原を含む組成物は、「抗原性組成物」又は「免疫原性組成物」と呼ばれ得る。

【0040】

したがって、抗原は、抗体分子又はT細胞受容体が結合し得る物質である。多くの種類の生体分子及び他の分子が、抗原として作用し得る。例えば、抗原は、制限されないが、タンパク質、ペプチド、糖質、多糖、オリゴ糖、糖、脂質、リン脂質、糖リン脂質、及び他の分子、並びにこれらの断片及び/又は組合せを含む分子に由来し得る。

40

【0041】

抗原は、生得的ソース又は特定の哺乳動物若しくは他の動物に対して外因的なソース(例えば、感染性物質)に由来し得る。抗原は、複数の抗原決定基を有することにより、哺乳動物を抗原に曝露すると、対応する複数の抗体又は様々な特異性を有する細胞性免疫応答が生じ得る。

【0042】

上記のように、特定の例では、緑膿菌由来の単離又は化学合成グリカン抗原を記載する。

50

【 0 0 4 3 】

抗原は、細胞表面において M H C 分子と会合して抗原提示することにより宿主を感作するように作用し得る。加えて、抗原特異的 T 細胞又は抗体が産生されて、免疫化宿主のその後の防御が可能となり得る。したがって、免疫原性組成物は、細菌による感染症から宿主を防御し、重症度を低下させることができ、即ち細菌感染症による死から宿主を防御し得る。また、抗原を使用してポリクローナル又はモノクローナル抗体を生成してもよく、これらを使用して受動免疫を対象に付与し得る。また、抗原を使用して、動物有効性モデル又はオプソニン貪食作用傷害アッセイのいずれかによる細菌の殺菌によって測定した場合に機能性の抗体を生成し得る。

【 0 0 4 4 】

本明細書において使用する場合、多糖に関連する「単離」という用語は、遠心分離、深層濾過、沈降、限外濾過、活性炭による処理、透析濾過、及び/又はカラムクロマトグラフィーの使用を含む当技術分野において公知の精製技術を使用する、精製多糖からの A バンド末端エピトープ抗原 (A - P S) の単離を指す。一般には、多糖の単離は、タンパク質、核酸、及び非特異的内因性多糖の部分的除去を指す。単離多糖は、10%、8%、6%、4%又は2%未満のタンパク質不純物及び/又は核酸を含む。

【 0 0 4 5 】

本明細書において使用する場合、細菌性多糖に関連する「精製」という用語は、遠心分離、沈降、及び限外濾過のような手段による細胞溶解物からの多糖の精製を指す。一般には、多糖の精製は、細胞デブリ及び D N A の除去を指す。

【 0 0 4 6 】

細菌性グリカンは、天然に存在する細菌、遺伝子改変細菌に由来し得るか、又は合成的に生成し得る。多糖は、典型的には、使用前に1つ又は複数の処理ステップ、例えば、精製、官能基化、弱酸性又は酸化条件を使用する解重合、脱アセチル化等に供する。また、必要に応じて、後処理ステップを使用することができる。合成、調製、及び/又は精製に適する当技術分野において公知の任意の方法、適する多糖、並びにオリゴ糖を利用することができる。

【 0 0 4 7 】

緑膿菌は、多様な細胞表面グリカンを産生する。これまでの試験では、A バンド P S と呼ばれることが多い共通多糖 (P S) 抗原を同定し、これは、相対的に保存された細胞表面糖質としての中性 D ラムナン三糖繰返し単位で構成される。ある試験では、中性 D ラムナン三糖による免疫原性作用は示されなかった [2 5]。上述のように、本発明者らは、新規の緑膿菌多糖構造を同定し、糖質抗原が、A バンド P S の非還元末端の免疫原性メチル化ラムナンオリゴ糖からなることを示した。

α - D - R h a 3 O M e - 4 - (α - D - R h a 3 O M e - 4 -) ₄ -

【 0 0 4 8 】

特には、発明者らは、A - P S 1 及び A - P S 2 を単離及び特性決定した (図 1 参照)。本明細書において提供される構造は、緑膿菌 A バンド末端エピトープ抗原を最初に同定するもの、即ち最初に正確に同定するものであると考える。この A - P S チップ (図 1 の A - P S 1 及び A - P S 2 を参照) を抗原性成分に更に単離して O S 1 及び O S 2 を生成した。メチル化ラムノース部分が抗原性をもたらすことを決定した。ジ 3 O M e ラムノースオリゴ糖、トリ 3 O M e ラムノースオリゴ糖、テトラ 3 O M e ラムノースオリゴ糖、及びペンタ - 3 O M e ラムノースオリゴ糖を、還元末端にハンドル有り無しで合成した。

【 0 0 4 9 】

したがって、一態様では、本発明は、式 A :

α - R h a 3 O M e (- 4 α - R h a 3 O M e) _n - 式 A

のオリゴ糖部分を含む抗原性化合物であって、式中、n は、1 ~ 5 であり、好ましくは、2 ~ 4 であり、各 R h a 3 O M e 糖部分の 2 つの位置は、- O A c 又は - O H で独立して置換されている、抗原性化合物を提供する。

【 0 0 5 0 】

10

20

30

40

50

一態様では、本発明は、式 A 1 :



のオリゴ糖部分を含む抗原性化合物であって、式中、nは、1～5であり（好ましくは、2～4であり）、Xは、-H又は-(4 α -Man3OMe)_m-ハンドルであり、mは、0、1又は2、好ましくは、0又は1であり、各Rha3OMe糖部分の2つの位置は、-OAc又は-OHで独立して置換されている、抗原性化合物を提供する。

【0051】

糖単量体部分は、独立してD又はL配置であり得る。

【0052】

一部の例では、糖部分の2-Oを独立してアセチル化し得る。他の例では、アセチル化及び非アセチル化した3-O-メチルラムノースの交互パターンを使用し得る。他の例では、2-Oを酢酸以外の基、例えば、グリコリル及びラクチルと置換して免疫原性を向上させ得る。

【0053】

メチル化ラムノースオリゴ糖の特定の例としては、

$\alpha - D - Rha3OMe - 4 - (\alpha - D - Rha3OMe - 4)_4 - 4 - \alpha - D - Man3OMe - 2 - \text{グリセルアルデヒド} - 1d(OS2)$ 、
 $3 - O - \text{メチル} - \alpha - D - \text{ラムノピラノシド} - (1 \rightarrow 4) - 3 - O - \text{メチル} - \alpha - D - \text{ラムノピラノシド} - (1 \rightarrow 4) - 3 - O - \text{メチル} - \alpha - D - \text{ラムノピラノシド} - (1 \rightarrow 4) - 3 - O - \text{メチル} - \alpha - D - \text{ラムノピラノース}(\text{五糖})$ 、
 $3 - O - \text{メチル} - \alpha - D - \text{ラムノピラノシド} - (1 \rightarrow 4) - 3 - O - \text{メチル} - \alpha - D - \text{ラムノピラノシド} - (1 \rightarrow 4) - 3 - O - \text{メチル} - \alpha - D - \text{ラムノピラノース}(\text{四糖})(III)$ 、
 $3 - O - \text{メチル} - \alpha - D - \text{ラムノピラノシド} - (1 \rightarrow 4) - 3 - O - \text{メチル} - \alpha - D - \text{ラムノピラノシド} - (1 \rightarrow 4) - 3 - O - \text{メチル} - \alpha - D - \text{ラムノピラノース}(\text{三糖})$ 、
 $3 - O - \text{メチル} - \alpha - D - \text{ラムノピラノシド} - (1 \rightarrow 4) - 3 - O - \text{メチル} - \alpha - D - \text{ラムノピラノシド} - (1 \rightarrow 4) - 3 - O - \text{メチル} - \alpha - D - \text{ラムノピラノシド} - (1 \rightarrow 4) - 4 - 3 - O - \text{メチル} - \alpha - D - \text{マンノピラノシド}$

が挙げられる。

10

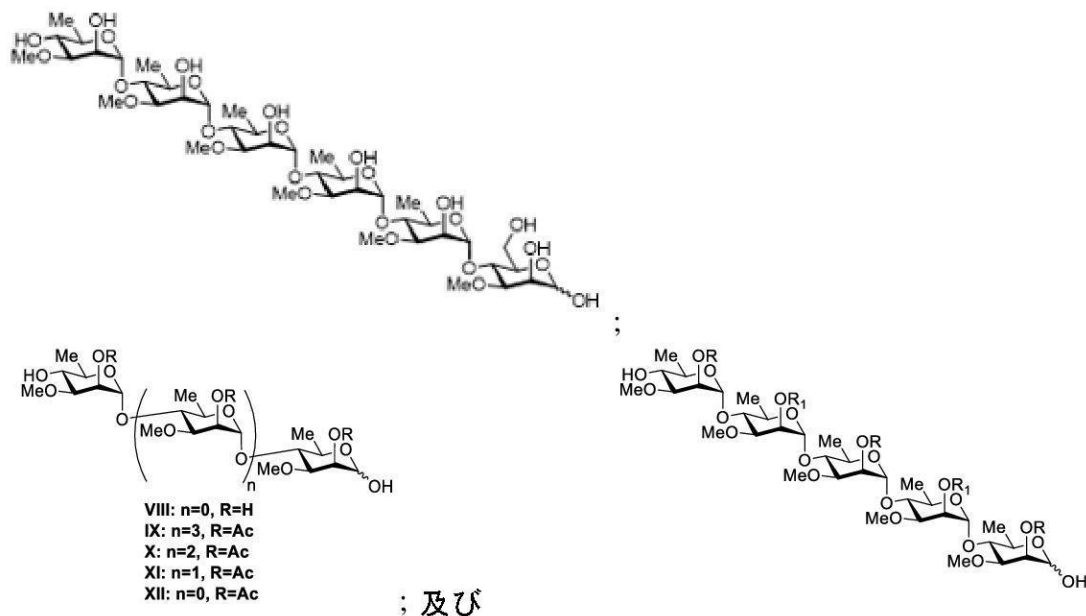
20

30

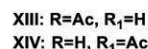
40

50

【化 2】



10



20

【0054】

本発明のメチル化ラムノースオリゴ糖は、単離又は化学的に合成することができる。或いは、単離オリゴ糖は、更に化学的に修飾することができる。

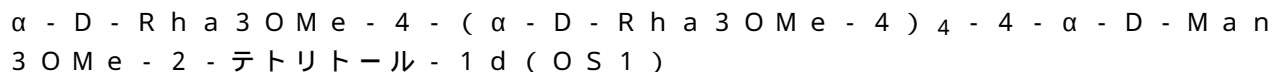
【0055】

Aバンド末端エピトープ抗原の単離：本発明者らは、Aバンド末端エピトープ抗原（A-P S）を単離するための方法を開発した。一態様では、緑膿菌由来の単離L P S（リボ多糖）を酸又はアルカリ加水分解に供して高分子画分を生成するステップを含む、Aバンド末端エピトープ抗原（O S 1）を生成するための方法が提供される。一例では、高分子画分は、例えば、酢酸により、酸加水分解に供する。一例では、高分子画分は、例えば、K O Hとの反応による、アルカリ加水分解の後、H C lによる処理に供する。

30

【0056】

次いで、高分子画分は、酸化ステップの後、酸加水分解に供して、O S 1を生成する。一例では、この第1の酸化ステップは、この高分子画分をN a I O₄と反応させるステップ、エチレングリコール及びN a B D₄と反応させるステップ、A c O Hと反応させるステップ、及び脱塩して生成物を生成するステップと、生成物を酸加水分解に供して単離Aバンド末端エピトープ抗原（O S 1）を生成するステップとを含む。特定の例では、次の式：

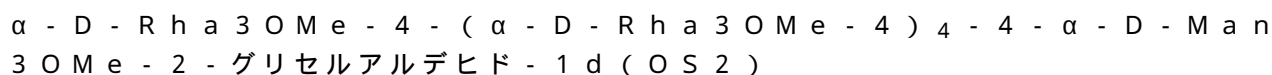


40

を有する、緑膿菌由来の単離Aバンド末端エピトープ抗原（O S 1）を記載する。

【0057】

O S 1を更なる酸化ステップに供する場合、更なる単離Aバンド末端エピトープが得られ、本明細書においてO S 2と同定する。一例では、この第2の酸化ステップは、O S 1をN a I O₄と反応させるステップ、エチレングリコール及びN a B D₄と反応させるステップ、A c O Hと反応させるステップ、及び脱塩して生成物を生成するステップと、生成物を酸加水分解に供して単離Aバンド末端エピトープ抗原（O S 2）を生成するステップとを含む。特定の例では、式：



50

の化合物のグリカンである、緑膿菌由来の単離酸化 A バンド末端エピトープ抗原 (OS 2) を記載する。

【0058】

一部の例では、化合物は、抗原である。

【0059】

化学合成：本発明の化合物の化学合成を、実施例において詳細に記載し、図 22 ~ 24 及び 30 に例示する。

【0060】

一態様では、本発明の化合物を生成する合成プロセスであって、

3 - O - メチル化ラムノピラノシドをアノマー脱保護して、3 - O - メチル化ラムノピラノースを形成するステップと、 10

3 - O - メチル化ラムノピラノースをアセチル化して、アセチル化 3 - O - メチル化ラムノピラノシドを形成するステップと、

アセチル化 3 - O - メチル化ラムノピラノシドの O - 4 を部分的に脱保護して、脱保護アセチル化 3 - O - メチル化ラムノピラノシドを形成するステップと、

O - 4 脱保護アセチル化 3 - O - メチル化ラムノピラノシドをカップリングさせて、アセチル化 3 - O - メチル化オリゴ糖を形成するステップと、

アセチル化 3 - O - メチル化オリゴ糖の O - 4 を脱保護して、O - 4 脱保護アセチル化 3 - O - メチル化オリゴ糖を形成するステップと、

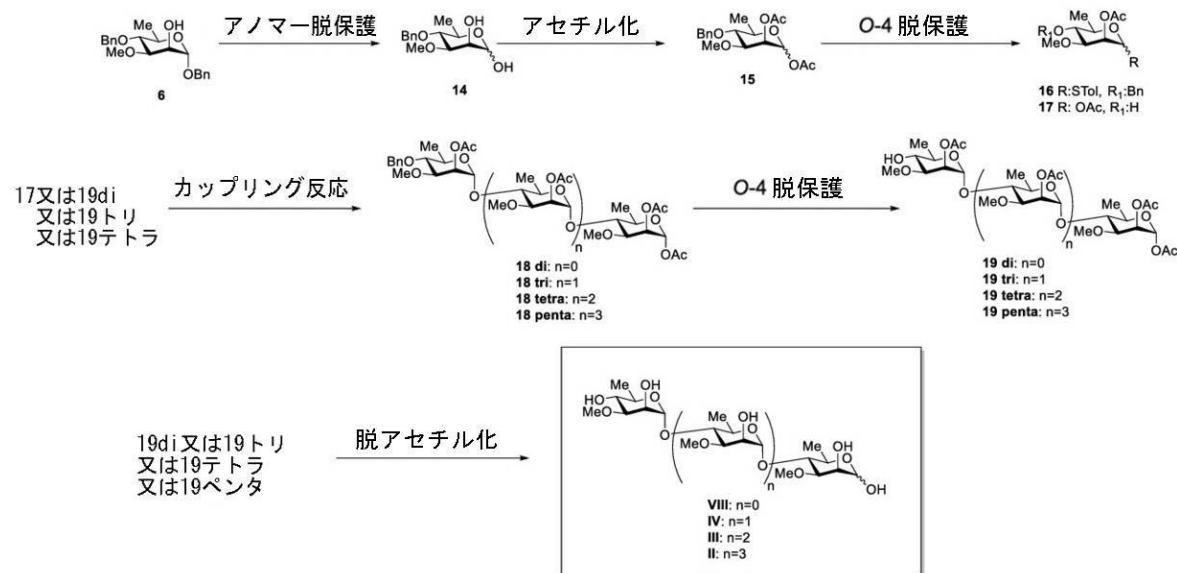
部分的脱保護アセチル化 3 - O - メチル化オリゴ糖を脱アセチル化して、化合物を形成 20

を含む、プロセスが提供される。

【0061】

一態様では、本発明の化合物を生成する合成プロセスであって、

【化 3】



を含む、プロセスが提供される。

【0062】

ハンドル：また、本発明の化合物は、「ハンドル」を含む、化合物を含む。「ハンドル」は、本発明の文脈では、末端 α - R h a 3 O M e 繰返し配列より遠位の部位において化学修飾して反応基を形成するものである。例としては、2 - グリセルアルデヒド、 $-CH_2-NH_2$ 、 $-(CH_2)_2NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NH_2$ 、 $-(CH_2)_4NH_2$ 、 $-(CH_2)_5NH_2$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)H$ 、 $-C(O)NH_2$ 、及び $-CH_2N_3$ が挙げられる。化合物が 4α - M a n 3 O M e を含む (即ち、m が 1 又は 2 である) ととき、ハンドルは、好ましくは、2 - グリセルアルデヒドである。化合物が 4α - M a n 3 O 50

Me を含まない（即ち、m が 0 である）とき、ハンドルは、好ましくは、 $-CH_2-NH_2$ 、 $-(CH_2)_2NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NH_2$ 、 $-(CH_2)_4NH_2$ 、 $(CH_2)_5NH_2$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)H$ 、 $-C(O)NH_2$ 、及び $-CH_2N_3$ 、より好ましくは、 $-CH_2-NH_2$ 、 $-(CH_2)_2NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NH_2$ 、 $-(CH_2)_4NH_2$ 又は $-(CH_2)_5NH_2$ である。

【0063】

一例では、合成プロセスは、以下：

保護アミンを含むハンドルを有する、活性化 O-3 メチル化ラムノピラノシド中間体を 1-O でグリコシル化し、保護 1-O グリコシド中間体を形成するステップであって、この活性化モノラムノピラノシド中間体が、グリコシル化部位 4-O に保護基を含む、ステップと、

4-O から保護基を除去して脱保護 1-O グリコシド中間体を形成するステップと、

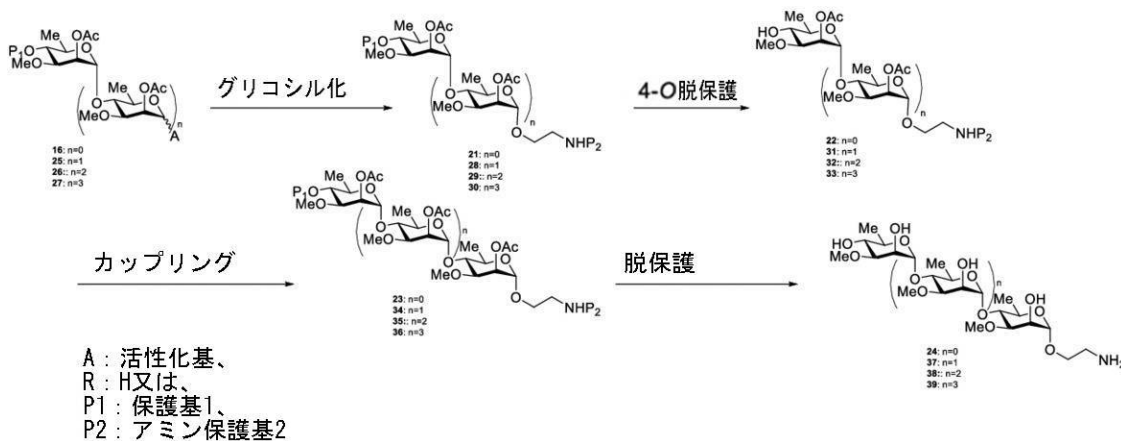
脱保護 1-O グリコシド中間体を、活性化 O-3 メチル化ラムノピラノシド中間体にカップリングするステップであって、この活性化ラムノピラノシド中間体が、4-O に保護基を含む、ステップ、及び保護メチル化二糖、三糖、四糖又は五糖を形成するステップと、

保護二糖、三糖、四糖又は五糖から全ての保護基を除去するステップとを実施することにより、ハンドルを付加するステップを更に含む。

【0064】

一例では、合成プロセスは、以下：

【化 4】



を実施することにより、本発明の化合物にハンドルを付加するステップを更に含む。

【0065】

リンカー：精製又は合成オリゴ糖は、任意選択で、本発明のオリゴ糖に直接的に又はオリゴ糖上のハンドルを介してコンジュゲートし得るリンカーを含み得る。当業者に理解されるように、リンカーは、所望の目的のため、例えば、 4α 結合グリカン担体タンパク質にコンジュゲートするための適する任意のリンカーであり得る。両端に官能基、例えば、酸又は N H S エステル若しくは P F P エステルを含む、適するリンカーは、当業者に公知であり、例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、線状ポリアミドアミン (PAA)、ポリ(2-オキサゾリン) (POx)、ポリ(アジピン酸グリセロール) (PGA)、ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA)、及び複合糖質の調製に適する他のリンカー、例えば、Munneke et al [42] に記載のリンカーが挙げられるが、これらに制限されない。適するリンカーの例は、例えば、Broad Pharm (登録商標) から BCN PEG 及び BCN 試薬として入手可能である。

【0066】

特定の実施形態では、オリゴ糖をリンカーにカップリングさせて、リンカーの遊離末端がエステル基である多糖リンカーを形成することができる。したがって、リンカーは、少なくとも一方の末端が、エステル基であるリンカーである。他方の末端は、オリゴ糖と反

応してオリゴ糖リンカー中間体を形成可能であるように選択される。

【 0 0 6 7 】

特定の実施形態では、リンカーは、オリゴ糖のハンドル上の一級アミン基と反応させるための第 1 のエステル基及び担体分子内の一級アミン基と反応させるための第 2 のエステル基を生成する二官能性リンカーである。典型的リンカーは、アジピン酸 N - ヒドロキシスクシンイミドジエステル (S I D E A) である。一態様では、リンカーは、活性化 N - ヒドロキシスクシンイミド及びヘミアセタール保護アルデヒドを含む二価リンカーであってもよく、この一方の末端は、オリゴ糖のハンドル上の一級アミンと反応させる。

【 0 0 6 8 】

他の適する技術では、カルボジイミド、ヒドラジド、活性エステル、ノルボルナン、p - ニトロ安息香酸、N - ヒドロキシスクシンイミド、S - N H S、E D C、T S T U を使用する。多くは国際公開第 9 8 / 4 2 7 2 1 号に記載されている。コンジュゲーションは、糖の遊離ヒドロキシ基を C D I と反応させた後 (B e t h e l l e t a l . , [4 3] 参照)、タンパク質と反応させてカルバミン酸結合を形成することにより形成し得る、カルボニルリンカーを含み得る。このコンジュゲーションは、アノマー末端から一級ヒドロキシ基へ還元し、任意選択で、一級ヒドロキシ基を保護 / 脱保護し、一級ヒドロキシ基を C D I と反応させて C D I カルバミン酸中間体を形成し、C D I カルバミン酸中間体をタンパク質上のアミノ基とカップリングさせるステップを含み得る。

【 0 0 6 9 】

一部の例では、リンカーは、アノマー位において結合させるために使用し得る。一部の例では、リンカーは、合成プロセスの初期に配置し得る。これは、二糖、三糖、四糖若しくは五糖上に、又はこのような糖のアセチル化バージョン及び非アセチル化パターン / アセチル化パターンに加えて配置し得る。他の例では、タンパク質への潜在的コンジュゲーションのために、オリゴ糖を任意の結合官能基に結合させることが可能であり得る。

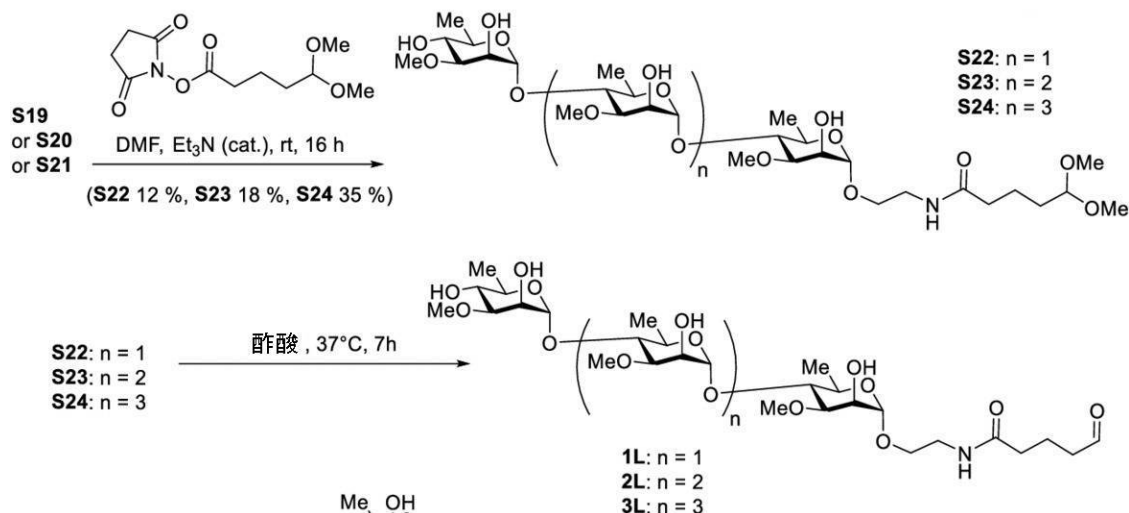
【 0 0 7 0 】

一態様では、リンカーは、例えば、アミノ - p e g、並びに官能基は、例えば、アジド保護基及びアルデヒド保護基を使用し得る。

【 0 0 7 1 】

一例では、リンカーは、次のプロセスに従って付加し得る。

【 化 5 】



【 0 0 7 2 】

コンジュゲート：担体タンパク質へのコンジュゲーションにより、免疫原性が向上し得る。適するクラスのタンパク質としては、ピリン、外膜タンパク質、及び病原性細菌の排出毒素、無毒性又は「トキシイド」形態のこのような毒素、細菌性毒素と抗原性に類似する無毒性タンパク質（即ち、交差反応物質又は C R M）、並びに他のタンパク質が挙げられる。一態様では、C R M、例えば、C R M 1 9 7 を担体タンパク質として使用することが

10

20

20

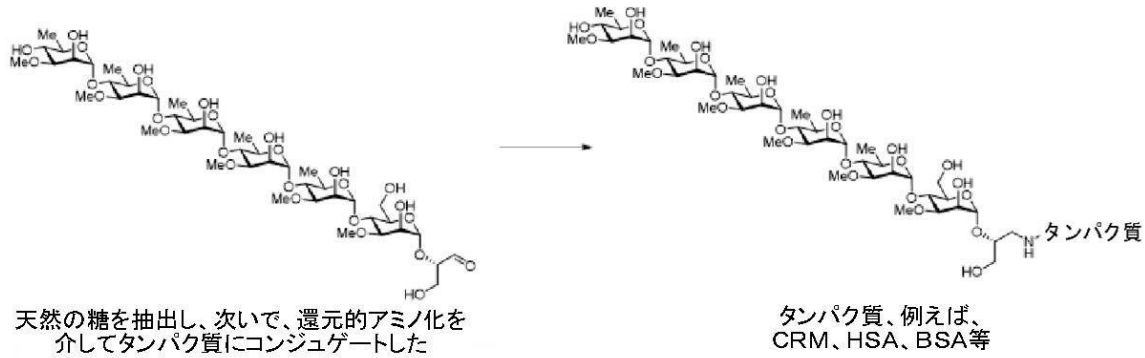
30

30

40

40

【化 7】

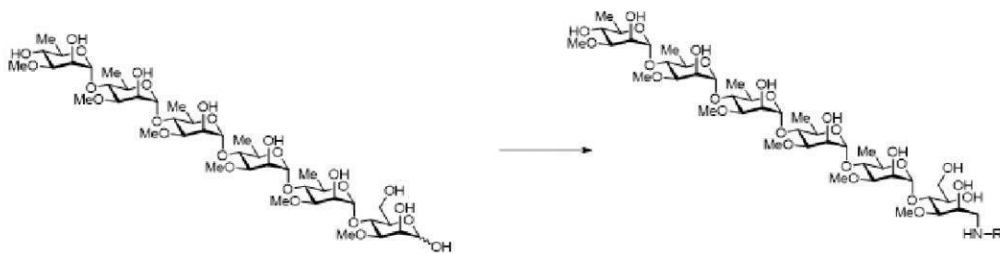


10

【0078】

一部の例では、抗原は、次を含むか又はこれからなる。

【化 8】



20

天然の糖を抽出し、次いで、還元的アミノ化を介してタンパク質にコンジュゲートした。
R: タンパク質又はリンカー由来のアミンによる直接的な還元的アミノ化

【0079】

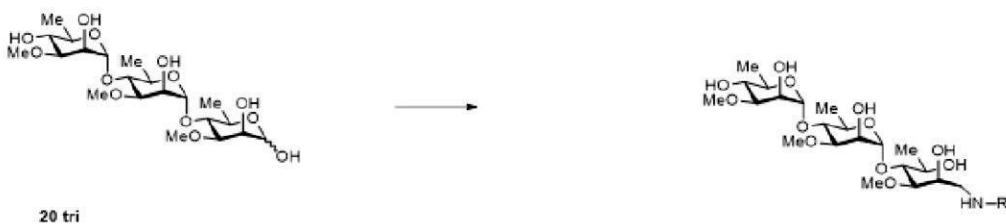
一部の例では、タンパク質によるヘミアセタールの直接的な還元的アミノ化を例として使用し得る。一部の例では、これは、合成抗原の還元末端を介して達成する。一部の例では、リンカーを最初にハンドルを介して糖に付加し、公知の結合技術により結合したリンカーにコンジュゲートし得る。

30

【0080】

一態様では、担体タンパク質又はリンカーは、担体タンパク質又はリンカー由来のアミンによる直接的な還元的アミノ化により、それぞれコンジュゲートし得る（R は、タンパク質又はリンカーである）。次は例である。

【化 9】



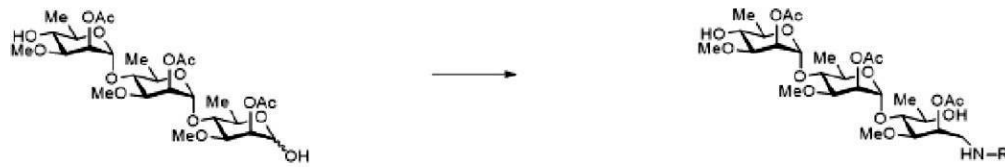
40

【0081】

一部の例では、オリゴ糖の 2 - O をアセチル化し得る。

50

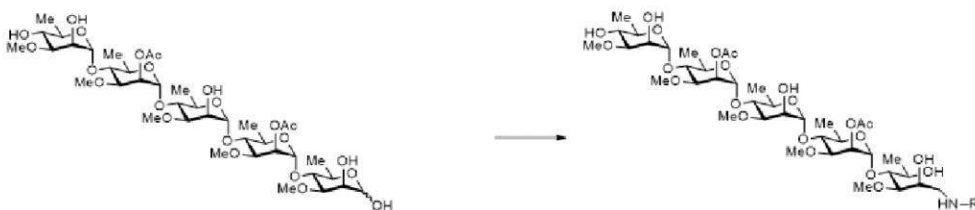
【化 1 0】



【0 0 8 2】

他の例では、非アセチル化単糖及びアセチル化単糖の組合せを使用し得る。他の例では、アセチル化及び非アセチル化した3-O-メチラムノースの交互パターンを使用し得る。

【化 1 1】



【0 0 8 3】

以上では特定の化合物を例示するが、この化学的技術は、対応する五糖、四糖、三糖、及び二糖を含む本発明の他のオリゴ糖にも適用する。

【0 0 8 4】

医薬 / ワクチン 組成物

本発明では、担体タンパク質に対するコンジュゲート又は非コンジュゲートの両グリカンを含む本明細書に記載のグリカンのいずれかを、薬学的に許容される担体、賦形剤、及び / 又はアジュバントとともに含むか、これから本質的になるか、或いは、これからなる、医薬組成物、免疫原性組成物、及びワクチン組成物を含む、組成物が更に提供される。

【0 0 8 5】

製剤化は、当技術分野において認められている方法を使用して達成することができる。例として、グリカンは、生理学的に許容されるビヒクルにより製剤化して、組成物を調製することができる。このようなビヒクルの例としては、水、緩衝生理食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール）、及びデキストロース溶液が挙げられるが、これらに制限されない。

【0 0 8 6】

一部の態様では、コンジュゲート及び薬学的に許容される賦形剤を含む、組成物を記載する。一部の態様では、コンジュゲート、薬学的に許容される賦形剤、及びアジュバントを含む、組成物を記載する。

【0 0 8 7】

一部の例では、グリカンが、ワクチンの抗原性成分である、ワクチンを記載する。

【0 0 8 8】

「ワクチン」という用語は、本明細書において使用する場合、抗体の産生を刺激するため及び / 又は1つ又は複数の疾患に対する免疫をもたらすために使用し、疾患の原因物質、この生成物又は合成代替物から調製し、疾患を誘発することなく抗原として作用するように処理した、物質を指す。

【0 0 8 9】

ワクチンは、典型的には、疾患原因物質に似ているか、又は弱毒若しくは殺菌形態の疾患原因物質から生成される抗原を含む。例えば、ワクチンは、細菌由来の1つ若しくは複

数の抗原、この表面タンパク質の1つ若しくは複数、又はこの膜成分の1つ若しくは複数を有し得る。ワクチンは、予防的（発症のリスクを低下させるか又は天然若しくは「野生の」病原体による将来の感染症の作用を回復させるのに）或いは治療的（例えば、調査する疾患又は障害に対するワクチン）であり得る。一部の実施形態では、本明細書に記載のワクチンは、予防的ワクチンである。一部の実施形態では、本明細書に記載のワクチンは、治療的ワクチンである。一部の実施形態では、ワクチンは、予防的ワクチン及び治療的ワクチンの両方であり得る。

【0090】

単離抗原を用いて実施した最初の試験により、マウス及びウサギを免疫してモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を生成するのに使用するコンジュゲートの生成が可能となった。ポリクローナル抗体は、発明者らのコレクションにおける緑膿菌株の大多数を認識することが可能であり、生成した3つのモノクローナル抗体のうちの1つは、緑膿菌株の大多数を認識し、このオプソニン貪食作用による傷害を容易とすることが可能であった。このモノクローナル抗体は、臨床株及び血清型株を含む発明者らのコレクションにおいて、殆どの緑膿菌株を認識することが可能であった。

10

【0091】

アジュバントを使用して、対象における高度な免疫応答を誘発し得る。したがって、本発明により使用するアジュバントは、抗体力価に影響する能力に基づいて選択され得る。

【0092】

「アジュバント」という用語は、本明細書において使用する場合、特定のワクチン抗原と組み合わせて使用するとき、抗原特異的免疫応答を促進、延長又は増強するように作用する任意の物質を指す。アジュバントは、弱毒又は殺菌免疫原に含まれる、天然に存在する成分であり得る。例えば、アジュバントは、全細胞、タンパク質若しくはタンパク質断片、又は細菌細胞の脂質膜の成分であり得る。また、アジュバントは、合成化合物であり得る。例えば、アジュバントは、アルミニウム塩、リン脂質又はこれらの誘導体であり得る。

20

【0093】

一般には、アジュバント化ワクチンは、非アジュバント化ワクチンと比較して強力な局所免疫反応だけでなく全身的免疫反応の誘発に役立ち得る。

【0094】

一部の例では、免疫応答を発生させる方法は、アジュバントを投与するステップを更に含む。

30

【0095】

一部の例では、油中水乳濁液は、アジュバントとして有用であり得る。油中水乳濁液は、可動性抗原デポを形成し、抗原の徐放を容易とし、免疫成分への抗原提示を増強することにより作用し得る。フロイントアジュバントは、乾燥及び不活化したマイコバクテリア粒子を含む完全フロイントアジュバント（CFA）として、又はこのような粒子を含まない不完全フロイントアジュバント（IFA）として使用し得る。他の油中水に基づくアジュバントは、EMULSIGEN（登録商標）を含み得る。EMULSIGEN（登録商標）は、動物系成分を含まないミクロンサイズの油液滴を含み、単独で、又は制限されないが、水酸化アルミニウム及びCARBIGEN（商標）を含む他のアジュバントと組み合わせて使用し得る。

40

【0096】

他の例では、免疫刺激性オリゴヌクレオチドもアジュバントとして使用し得る。このようなアジュバントは、CpGオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）を含み得る。CpG ODNは、Toll様受容体9（TLR9）により認識されて、強力な免疫刺激作用を引き起こす。C型CpG ODNは、形質細胞様樹状細胞（pDC）の強力なIFN- α 産生及びB細胞刺激、並びにヘルパーT（Tx）細胞のIFN- γ 産生を誘導する。CpG ODNアジュバントは、肺炎球菌多糖（19F及び6B型）特異的IgG2a及びIgG3をマウスにおいて著しく増強することがわかっている。また、CpG ODNは、タン

50

バク質担体CRM197、特に、CRM197特異的IgG2a及びIgG3に対する抗体応答を増強する。加えて、CpG-ODNと混合した肺炎球菌莢膜多糖血清型14（PPS14）による老齢マウスの免疫化では、IgG抗PPS14応答が若年成体レベルに回復することがわかっている。本発明により使用するCpG-ODNは、クラスA、B又はCのODNを含み得る。一部の実施形態では、ODNは、市販のもの、例えば、ODN-1585、ODN-1668、ODN-1826、ODN-2006、ODN-2007、ODN-2216、ODN-2336、ODN-2395、及び/又はODN-M362のいずれかを含み得る。一部の場 合では、ODN-2395を使用し得る。ODN-2395は、ヒトTLR9並びにマウスTLR9を著しく刺激するクラスC CpG-ODNである。このようなODNは、ホスホロチオエート骨格及びCpG回文構造モチーフを含む。

10

【0097】

一部の例では、本開示によるワクチンの調製において、グリカンを免疫原性担体分子に共有結合させるか、さもなければコンジュゲートする。典型的には、免疫原性担体分子は、タンパク質又はポリペプチドである。

【0098】

「賦形剤」又は「薬学的に許容される賦形剤」という用語は、本明細書において使用する場合、本発明の化合物及び/又は組成物と使用前に混合する任意の物質を指す。一部の実施形態では、賦形剤は、不活性であり、本発明の化合物及び/又は組成物用の担体、希釈剤又はビヒクルとして主に使用する。賦形剤は、生理学的に適合性である場合、薬学的に許容される。即ち、必要に応じてヒト又は非ヒト動物を含む、動物に投与した場合、有害又は不都合な反応を生成しない。

20

【0099】

本明細書に記載の医薬組成物の製剤は、薬理学の技術分野において公知の又は今後開発される任意の方法により調製し得る。一般には、このような調製方法としては、活性成分を賦形剤及び/又は1つ若しくは複数の他の副成分と会合させるステップが挙げられる。

【0100】

本開示による医薬組成物は、単回単位用量として及び/又は複数の単回単位用量として、大量に調製、包装、及び/又は販売し得る。

【0101】

医薬組成物の製造において使用する薬学的に許容される賦形剤としては、不活性希釈剤、分散物質及び/若しくは造粒物質、表面活性物質及び/若しくは乳化剤、崩壊物質、結合物質、保存剤、緩衝物質、潤滑物質、並びに/又は油が挙げられるが、これらに制限されない。このような賦形剤は、任意選択で、医薬組成物に含み得る。

30

【0102】

希釈剤の例としては、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、リン酸カルシウム、リン酸二カルシウム、硫酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、リン酸ナトリウム、ラクトース、スクロース、セルロース、結晶セルロース、カオリン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、塩化ナトリウム、乾燥デンプン、コーンスターチ、粉糖等、及び/又はこれらの組合せが挙げられるが、これらに制限されない。

40

【0103】

本明細書に記載のワクチンは、好ましくは、対象において緑膿菌により引き起こされる感染症を予防、回復、及び/又は治療し得る。

【0104】

本明細書において使用する場合、「予防（prevent）」及び「予防（preventing）」という用語は、緑膿菌感染症の再発、伝播又は発症の予防を含む。本開示を完全に予防するものとして制限することは意図しない。一部の実施形態では、予防は、感染症の発症の遅延又は重症度の低下を含む。

【0105】

「治療（treatment）」、「治療する（treat）」又は「治療すること（

50

t r e a t i n g)」という用語は、本明細書において使用する場合、臨床結果を含む、有利な又は所望の結果を得ることを指す。有利な又は所望の臨床結果としては、1つ又は複数の症候又は症状の軽減又は回復、疾患の程度の低下、病状の安定化（即ち、悪化していない）、疾患伝播の予防、疾患増悪の遅延又は緩徐化、病状の回復又は緩和、疾患再発の低下、並びに寛解（部分的又は全体的にかかわらず）、検出可能であるか否かが挙げられ得るが、これらに制限されない。また、「治療すること」及び「治療」は、治療を受けない場合の予測生存と比較した生存の延長を意味し得る。したがって、「治療」及び「治療すること」という用語は、対象（例えば、患者）が治癒し、疾患が根絶する場合に制限されない。むしろ、本開示の例では、症候を低減し、及び／又は疾患増悪を遅延させる治療をも検討する。

10

【0106】

疾患又は障害（例えば、緑膿菌による感染症）の「症候」という用語は、対象が経験し、疾患を示す、任意の病的現象又は正常な構造、機能若しくは感覚からの逸脱である。

【0107】

「回復（amelioration）」又は「回復（ameliorates）」という用語は、本明細書において使用する場合、異常又は症候を含む症状、疾患、障害又は表現型の減少、低下又は除去を指す。

【0108】

緑膿菌は、免疫抑制又は免疫低下患者において、生命を脅かす多様な感染症を引き起こす、重大な日和見性病原体である。緑膿菌感染症を発症するリスクを有する個人は、嚢胞性線維症患者、熱傷患者、重度の好中球減少症患者（例えば、化学療法を受けている、がん患者）、及び呼吸器補助を受けている集中治療室患者を含む。

20

【0109】

本明細書に記載のワクチンは、他の既存のワクチンと同時に投与し得る。

【0110】

本発明のワクチンは、筋肉内経路、皮下経路、皮内経路、経口経路、吸入経路、鼻腔内経路、直腸内経路、及び静脈内経路を含む任意の経路により、対象に投与し得る。経口投与は、錠剤、カプセル又は懸濁液若しくは乳濁液により好適に投与し得る。或いは、ワクチンは、微粉末又はエアロゾルの形態でD i s c h a l e r（登録商標）又はT u r b o h a l e r（登録商標）を介して投与し得る。鼻腔内投与は、微粉末若しくはエアロゾル点鼻スプレー又は改変したD i s c h a l e r（登録商標）又はT u r b o h a l e r（登録商標）の形態で好適に投与し得る。直腸内投与は、坐剤によって好適に投与し得る。

30

【0111】

ワクチンの免疫防御量は、単回用量又は一連の用量で投与し得る。2回以上の用量を投与する場合、用量は、数日、数週又は数カ月おきに投与し得る。一部の例では、ワクチンは、単回用量として又は1回若しくは複数のブースターを含む一連の用量で投与し得る。

【0112】

対象に投与するワクチンの投与量及び投与計画は、薬学的分野及び獣医学的分野の当業者に周知の標準技術に従い、意図する使用、特定の抗原、アジュバント（存在する場合）、年齢、性別、体重、種、一般状態、病歴及び／又は治療歴、並びに投与経路のような因子を考慮に入れて、決定し得る。

40

【0113】

一部の例では、ワクチン又は免疫原性組成物の治療有効量を使用する。

【0114】

治療有効量は、その物質により治療する対象において所望の作用を達成するのに十分な、特定の物質の量を指す。例えば、これは、対象における免疫応答の誘発及び／又は感染症の予防に有用なワクチンの量であり得る。対象の感染症に対する抵抗性、予防、回復、及び／又は治療に有用なワクチン（又は免疫原性組成物）の有効量は、例えば、治療する対象、治療組成物の投与方法、及び他の因子に依存する。

【0115】

50

抗体

一部の例では、本明細書に記載のグリカン抗原に対して特異的な抗体を生成する方法が提供される。

【0116】

一部の例では、抗体は、特定の抗原による宿主の免疫化によって作製し得る。上に考察するように、このような免疫応答は、外来物質、例えば、抗原又は抗原の部分に対する1つ又は複数の抗体の生物による産生を典型的に引き起こす。一部の例では、免疫化の方法は、所望の1つ又は複数の免疫化結果に基づいて変更し得る。本明細書において使用する場合、「免疫化結果」という用語は、免疫化による所望の1つ又は複数の作用を指す。例としては、高抗体価及び/又は目的の標的に対する抗体特異性の向上が挙げられる。抗体を採取する方法は、当技術分野において公知である。 10

【0117】

本明細書において使用する場合、「抗体」という用語は、広義において使用し、制限されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、例として、少なくとも2つのインタクトな抗体から形成される二重特異性抗体）、及び抗体断片、例えば、ダイアボディを含む種々の実施形態を、所望の生物学的活性を示す限り、詳細に包含する。抗体は、主に、アミノ酸に基づく分子であるが、例えば、糖部分、リンカー、検出可能な標識等による1つ又は複数の修飾をも含み得る。

【0118】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書において使用する場合、実質的に同種の細胞（又はクローン）の集団から得られる、即ち、モノクローナル抗体の生成中に生じる可能性を有し、一般には少量存在する可能性バリエーションを除いて、集団を含む個々の抗体が同一であり、及び/又は同一のエピトープに結合する抗体を指す。種々の決定基（エピトープ）に対して特異的な種々の抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して特異的である。 20

【0119】

一部の例では、本明細書に記載の抗体は、ヒト化抗体であり得る。

【0120】

「ヒト化」形態の非ヒト（例えば、マウス）抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含むキメラ抗体である。殆どは、ヒト化抗体は、レシピエントの抗体の高頻度可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有する非ヒト種、例えば、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類の抗体（ドナー抗体）の高頻度可変領域由来の残基によって置換されている、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。 30

【0121】

本発明の方法は、このような方法において使用する化合物及び/又は組成物をキットの形態で用意することにより、好都合に実践される。このようなキットは、好ましくは、本明細書に記載の組成物を含む。このようなキットは、好ましくは、その使用のための説明書を含む。

【0122】

本明細書に記載の本発明のより良い理解を得るために、次の例を記載する。このような例は、単に例示目的のためのものであることが理解されるべきである。したがって、これらにより本発明の範囲を決して制限すべきではない。 40

【0123】

方法及び使用

一般には、対象において免疫応答を発生させる方法であって、単離又は合成グリカン、好ましくは、緑膿菌由来の単離又は合成グリカン抗原、より好ましくは、担体タンパク質に複合糖質の形態で結合する緑膿菌由来の単離又は合成グリカン抗原を対象に投与するステップを含む、方法を本明細書において記載する。

【0124】

一部の態様では、単離又は合成グリカン、好ましくは、緑膿菌由来の単離又は合成グリ 50

カン抗原、より好ましくは、担体タンパク質に複合糖質の形態で結合する緑膿菌由来の単離又は合成グリカン抗原を対象に投与するステップを含む、緑膿菌感染症を有するか、緑膿菌感染症を有することが疑われるか、又は緑膿菌感染症を発症するリスクを有する対象を治療する方法が提供される。

【0125】

一部の態様では、本文書において同定する緑膿菌由来のグリカン抗原に対して特異的な抗体又はこの誘導体を投与するステップを含む、緑膿菌感染症を有するか、緑膿菌感染症を有すると疑われるか、又は緑膿菌感染症を発症するリスクを有する対象を治療する方法が提供される。

【0126】

一般には、緑膿菌感染症を診断又は治療するための抗体、例えば、本明細書に記載のモノクローナル抗体を使用する方法を本明細書において記載する。一態様では、この抗体は、本明細書に記載の1B1 MA bである。

【0127】

一態様では、抗体又はその抗原結合断片は、緑膿菌感染症の治療のために使用し得る。

【0128】

一態様では、抗体又はその抗原結合断片は、緑膿菌感染症の診断において使用し得る。

【0129】

一態様では、緑膿菌感染症を治療するための方法であって、抗体又は抗原結合断片を対象に投与するステップを含む、方法が提供される。

【0130】

一態様では、動物における緑膿菌細菌感染症の診断のための方法であって、検査試料を抗体又はその抗原結合断片と接触させるステップと、それへの特異的結合を検出するステップとを含む、方法が提供される。

【実施例】

【0131】

緑膿菌は、多様な細胞表面グリカンを産生する。これまでの試験では、AバンドPSと呼ばれることが多い共通多糖(P S)抗原を同定し、これは、相対的に保存された細胞表面糖質としての中性Dラムナン三糖繰返し単位で構成される。しかし、本発明者らは、これまでに同定されていなかった新規のエピトープを発見した。A - P S調製物の核磁気共鳴(N M R)スペクトル及び化学解析により、更なるいくつかの成分の存在が示された。実際、糖質抗原は、AバンドPSの非還元末端の免疫原性メチル化ラムナンオリゴ糖からなる。単離抗原を用いて実施した最初の試験により、マウス及びウサギを免疫してモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を生成するのに使用するコンジュゲートの生成が可能となった。ポリクローナル抗体は、検査した緑膿菌株の大多数を認識することが可能であり、生成した3つのモノクローナル抗体のうちの1つは、緑膿菌株の大多数を認識し、このオブソニン貪食作用による傷害を容易とすることが可能であった。このモノクローナル抗体は、臨床株及び血清型株を含む発明者らのコレクションにおいて、全ての緑膿菌株を認識することが可能であった。末端3 - O - メチル - D - ラムナンを代表する合成オリゴ糖(単糖 ~ 五糖)を調製し、広範な交差反応性モノクローナル抗体により認識される天然抗原の効率的模倣に必要とされる最小エピトープとして三糖を同定した。合成五糖と担体タンパク質とのコンジュゲートにより、マウスにおいてポリクローナル抗体が生じた。また、このような抗体は、検査した緑膿菌株の全細胞を認識することが可能であり、これにより天然抗原を効率的に模倣する合成抗原の能力が更に強調される。このような実験により、このような新規の抗原及び対応する抗体の、ワクチン、治療標的としての有用性及びPa感染症の治療の方法における有用性が実証される。

【0132】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. 本試験に使用した株の詳細

種	株	NRCC #	血清型	詳細	ソース
緑膿菌	PAO1	6678	5	野生型	ATCC
	BAA-47				
	PAO1	6667	-	PAO1 (wzy ::Gm)	Lam lab
	PAO1	6668	-	PAO1	Lam lab
				(wzy ::Gm)(Δpa5457)	
	PAO1	6669	-	PAO1	Lam lab
				(wzy ::Gm)(Δpa5458)	
	PAO1	6670	-	PAO1	Lam lab
				(wzy ::Gm)(Δpa5459)	
	5933	6954	1	33348	ATCC
	5934	6955	2	33349	ATCC
	5939	6956	6	33354	ATCC
	5943	6957	10	33357	ATCC
	5944	6958	11	33358	ATCC
	170003	6959	16	33363	ATCC
	5937	6960	5	33352	ATCC
	001S4-1	6944	-	臨床単離株	Sad lab
	003S-20	6945	-	臨床単離株	Sad lab
	003E-9	6946	-	臨床単離株	Sad lab
	004S-3	6947	-	臨床単離株	Sad lab
	004E-8	6948	-	臨床単離株	Sad lab
	006S3-1	6949	-	臨床単離株	Sad lab
	006S4-1	6950	-	臨床単離株	Sad lab
	009S-7	6951	-	臨床単離株	Sad lab
	014S-1	6952	-	臨床単離株	Sad lab
	014E-31	6953	-	臨床単離株	Sad lab
カタル球菌	lgt2/lgt4	6541	-	陰性対照	Cox lab
髄膜炎菌	8047 lpt3	6263	-	陰性対照	Cox lab

10

20

30

【0133】

実施例 1 A : A - P S の単離及び酸化

次の方法を使用して、A バンド末端エプトープを単離した。L P S からの単離に加えて、細胞から直接単離した。この場合の E D T A 抽出による A - P S 収率は、L P S からの単離と比較して高かったが、E D T A 抽出を使用すると、精製は、より困難であった。

【0134】

A バンド P S を、P A O 1 W z y : : G m (バンド B O P S を含まない変異体) L P S から、酢酸加水分解とその後のサイズ排除クロマトグラフィーにより単離した。次いで、P S 画分をアニオン交換又は逆相 H P L C により精製した。収率は通常低く、L P S 1 0 0 m g から A - P S 約 5 m g であり、スケールアップは、出発 L P S 量の増加と比例しなかった。

【0135】

或いは、A - P S は、同一の変異細胞から E D T A により抽出した。この方法は L P S 抽出方法としてこれまでに報告されているが、この方法では、相当量の L P S は抽出されなかった。調製では、3 つの主成分 : A - P S 、これまでに記載の構造を有する p s 1 - 多糖 [1 5] 、及び環状リン酸化グルカン [1 6] が見出された。全混合物によるスペク

40

50

トルにおける環状グルカンのシグナルは、良好には可視化されなかったが、高塩濃度で溶出した画分のアニオン交換分離後、Aバンド及びp s l多糖の後に純粋形態で得られた。単離化合物のNMRスペクトルは、LPSの脂質又は他の成分に起因し得るシグナルを示さなかった。したがって、少なくとも一部分のバンドAラムナンは、これまでに示唆されたように[17]、LPSに結合しなかった。この場合のEDTA抽出によるA-P S収率は、LPSからの単離と比較してはるかに高かったが、精製は、より困難であった。

【0136】

A-P Sは、水中に完全に保持され、30%のエタノールで溶出可能な、逆相HPLCカラム又はSep-Pak C18カートリッジで精製した。NMRスペクトルにおいて微量なアノマーシグナル及びメチルシグナルを生成するものを含むA-P Sの全ての成分を、ともに溶出した。C18カラムクロマトグラフィーでは、水-メタノール勾配溶出を用いて、約20% MeOHから開始する広域なメタノール勾配によりA-P Sを溶出したところ、ピークは可視化されなかった。

10

【0137】

A-P Sは、酸性成分を含むため、いくつかの画分のNaCl勾配により溶出するアニオン交換カラム上に部分的に保持された。この挙動は、A-P Sと、リン酸化により酸性のLPSコアとの結合を示し得る。

【0138】

緑膿菌株の増殖：BバンドLPSを含まないことが知られる緑膿菌株PAO1(wzy : : Gm)(NRCC6667)を増殖させて、Aバンド多糖(P S)を単離した。凍結保存液から100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ の硫酸ゲンタマイシンを画線したDifco Brain Heart Infusion(BHI)アガープレート1枚を、37 °CのFormaインキュベーター内でインキュベートした。7時間のインキュベーション後、全てのプレート増殖物質を、BHIブロス1.5 mL中に懸濁させ、十分にボルテックスして物質を懸濁させた。100 mg L^{-1} の硫酸ゲンタマイシンを加えたBHIアガープレート10枚に、懸濁物質を等しく播種し、ホッケースティック法を使用して拡散させ、37 °Cでインキュベートした。100 mg L^{-1} の硫酸ゲンタマイシンを加えたBHIブロスを有する1 L / 4 Lのバッフルフラスコ2つに、プレート10枚の生成物を16時間のインキュベーション後に播種した。フラスコは、Forma振盪インキュベーター内で37 °C及び200 RPMにより2時間インキュベートした。A600 nmが光学密度2に達すると、このようなフラスコ培養物を、100 mg L^{-1} の硫酸ゲンタマイシンを加えたBHIブロス2.2 Lに、30 Lの新たなMBR(Multiple Bioreactors)発酵槽内で播種した。溶存酸素は、必要に応じて、可変の気流、攪拌速度、及び酸素の混合により飽和度15%に制御した。8.3 / 4時間の増殖後、回収まで温度を10 °Cに低下させた。22時間後、A600 nmは13.4に達し、pHは8.35となった。培養物は、Millipore社のタンジェンシャルフローPellicon回収装置(3 $\times$ 0.22 μm)を使用して4 Lに濃縮した。濃縮細胞4 Lを95%(w/v)のフェノール溶液90 mLの追加により傷害し、10 °CのForma振盪インキュベーター内に配置して175 RPMで4時間振盪させた。PBSによる3回の洗浄後に物質のバイアビリティチェックを実施した。濃縮物4 LをSorval RC6+遠心機により11 K RPMで30分間遠心して、細胞を沈殿させた。ゼラチン質の水っぽい沈殿物2767 gの湿潤重量を得、1 Lの容器3つの内に分散させた。1つの容器を、更に30分間11 K RPMで遠心すると、最終湿重量1110 gが生じた。細胞を凍結乾燥させ、後の使用のために保存した。

20

30

40

【0139】

表1に詳述する他のいくつかの株をも増殖させ、本試験に使用した。上記のようにインキュベーションを準備し増殖させた後、全てのバイオマスをも24 Lの発酵槽から回収した。

【0140】

全細胞のEDTA抽出によるA-P Sの単離：緑膿菌株PAO1(wzy : : Gm)(

50

N R C C 6 6 6 7) の乾燥細胞 2 0 g を、1 0 % (w / v) の E D T A ニナトリウム中に 1 時間 2 5 で攪拌した。溶液を透析し、酢酸を最終濃度 1 0 % まで加えて核酸を沈降させた。沈降物を遠心分離により除去し、溶液を透析して凍結乾燥させた。物質を水に溶解し、超遠心分離し、生じた透明な溶液を B i o g e l P 6 カラムで分離した。高分子画分を採取し、アニオン交換クロマトグラフィーにより分離した。

【 0 1 4 1 】

L P S からの A - P S の単離：これまでに記載のように [1 4]、P A O 1 (w z y : : G m) (N R C C 6 6 6 7) 株由来の緑膿菌細胞から L P S を単離した。L P S (1 0 0 m g) を 2 % の酢酸 (1 0 0 、 2 時間) により加水分解した。生じた溶液を遠心分離して沈降物を除去し、B i o g e l P 6 カラムで分離した。高分子画分を採取し、アニオン交換クロマトグラフィーにより分離した。

10

【 0 1 4 2 】

過ヨウ素酸酸化：上の両単離物由来の高分子画分 (1 回 1 0 m g) を水 (2 m L) に溶解し、N a I O ₄ (2 0 m g) を加えた。溶液を R T で暗所に 2 4 時間保持した後、エチレングリコール (0 . 2 m L) 及び過剰量の N a B D ₄ を加え、溶液を更に 1 時間維持し、A c O H 0 . 2 m L で中和し、S e p h a d e x G - 1 5 カラムで脱塩した。生成物を 2 % の A c O H により 2 時間 1 0 0 で加水分解し、S e p h a d e x G - 1 5 カラムで分離して O S 1 を得た。O S 1 からの O S 2 の生成では、類似の方法に従い、これによって、O S 1 を過ヨウ素酸により酸化し、水素化ホウ素還元を行わずに反応をエチレングリコールによりクエンチし、S e p h a d e x G - 1 5 カラムで精製した。O S 1 及び O S 2 の構造は、図 1 に示す。

20

【 0 1 4 3 】

ゲルクロマトグラフィー：ゲルクロマトグラフィーを S e p h a d e x G - 1 5 カラム (1 . 5 × 6 0 c m) 又は B i o g e l P 6 カラム (2 . 5 × 6 0 c m) 上で 1 % 酢酸により実施し、屈折率検出器 (G i l s o n 社) によって監視した。

【 0 1 4 4 】

アニオン交換クロマトグラフィー：試料最大 5 0 m g を H i T r a p Q カラム (A m e r s h a m、それぞれ 5 m L の 2 つのカラムが相互に接続する) 内の水中に 3 m L m i n⁻¹ で注射して水で 5 分間洗浄し、次いで、水から 1 M の N a C l までの線形勾配により 1 時間にわたって溶出して、2 2 0 n m による U V 検出及びシリカ T L C プレート上でのスポット検査を行い、エタノール中 5 % H ₂ S O ₄ への浸漬、及び茶色のスポットが可視化されるまでのヒートガンによる加熱により展開した。糖質陽性試料を貯蔵し、S e p h a d e x G - 1 5 カラムで 1 % の A c O H により脱塩し、屈折率検出器によって監視した。

30

【 0 1 4 5 】

実施例 1 B：緑膿菌 (P a) の A バンドラムナンのチップの免疫優性エピトープの構造的
特性決定

中性糖及びアミノ糖のアルジトールアセテートとしての決定：試料 (0 . 2 ~ 1 m g) を 3 M の T F A で加水分解し (1 2 0 、 3 時間)、乾燥させ、N a B D ₄ で還元し、A c O H 0 . 5 m L を用いて過剰量の試薬の破棄を行った。気流下で溶液を乾燥させ、M e O H (1 m L) の追加後に 2 回乾燥させ、ピリジン 0 . 2 m L を加えた A c ₂ O 0 . 2 m L により 3 0 分間 1 0 0 でアセチル化した。反応混合物を乾燥させ、T h e r m o T r a c e 1 3 1 0 機器上で、I T Q 1 1 0 0 イオントラップ検出器、キャピラリーカラム H P - 5、1 6 0 ~ 2 6 0 を用いて、4 m i n⁻¹ により G C - M S 解析を行った。

40

【 0 1 4 6 】

絶対配置：試料及び調製した標準物質 (約 0 . 5 m g) に、(R) - 又は (R S) - 2 - オクタノール (0 . 2 m L) 及び塩化アセチル (2 0 μ L) を R T で加え、密閉したバイアル内で加熱した (1 0 0 、 2 時間)。反応混合物を気流により乾燥させ、アセチル化し (ピリジン 0 . 2 m L を加えた A c ₂ O 0 . 2 m L、1 0 0 、 3 0 分)、乾燥さ

50

せ、次いで、上記のようにGC - MSにより解析した。

【0147】

NMR分光法：NMR実験は、Bruker社のAVANCE III 600 MHz (^1H) 分光計上で5 mmのZ勾配プローブを用い、アセトン内部標準 (^1H では2.25 ppm及び ^{13}C では31.45 ppm) により、標準パルス配列cosygpprqf (gCOSY)、mlevphpr (TOCSY、ミキシングタイム120 ms)、roesyphpr (ROESY、ミキシングタイム500 ms)、hsqcetdgpp (HSQC)、hsqcetgpm1 (HSQC - TOCSY、80 ms TOCSY デイレイ)、及びhmbcgp1pndqf (HMBC、100 ms ロングレンジトランスファー・デイレイ) を使用して行った。分解能は、プロトン間相関におけるF2では3 Hz / pt未満、H - C相関におけるF2では5 Hz / pt未満に保持した。スペクトルを処理し、Bruker社のTopspin 2.1プログラムを使用して解析した。

10

【0148】

単糖は、COSY、TOCSY、及びNOESYによる交差ピークパターン並びに ^{13}C NMR化学シフトにより同定した。アミノ基の位置は、アミノ化炭素のシグナル位置が高磁場であることから結論づけられた (CHは45 ~ 60 ppm)。単糖間の結合は、グリコシド交換によるNOE相関及びHMBC相関から決定した。

【0149】

質量分析：ESI MSをWaters社のSQ Detector 2機器を使用して得た。試料を、0.1%のTFAを加えた50%のMeCNに注射した。

20

【0150】

構造：緑膿菌A - PSは、D - ラムノース三糖繰返し単位：

- 2 - α - Rha - 3 - α - Rha - 3 - α - Rha - A - PS 繰返し単位
A B C

で構成される主成分を含む。

【0151】

A - PS調製物のNMRスペクトルは、繰返し単位のシグナル及び更なるシグナルを含んだ (図2)。微量なアノマーシグナルの一部は、3 - O - メチル - ラムノースに属するものとしてこれまでに同定されており [18]、およそ3.3 ppmのO - メチル基のシグナルを有するが、完全な構造は決定されていなかった。

30

【0152】

LPSからEDTA抽出により得られた多糖は、類似のNMRスペクトルを有した。微量な差は存在するが、スペクトルの性質が複雑であったため、このような微量な成分の同定及びA - PSの実成分からの不純物の識別は不可能であった。A - PSがLPSコアに結合することが推定されるため、LPSから得られたA - PSがコア成分を含むはずであることが予測されたが、これらは確実に同定されなかった。

【0153】

A - PSの単糖解析 (アルジトールアセテートによるGC - MS) により、主成分としてのRhaとともに少量のMan、Glc、2 - O - メチル - Rha、3 - O - メチル - Rha (他の微量成分の約5 ~ 8倍)、2 - O - メチル - Man、及び3 - O - メチル - Manの存在が示された。七炭糖誘導体は検出されなかった。

40

【0154】

A - PSの過ヨウ素酸酸化とその後のNaBD₄還元、弱加水分解、及びSephadex G - 15カラムでの生成物の分離により、予想されたD - ラムナン酸化生成物 α - D - Rha - 3 - α - D - Rha - 2 - Gro1d及びオリゴ糖OS1の単離が可能となった (図1)。OS1は、NMR及びESI - MSにより解析した。OS1の2D NMRスペクトルの解釈 (表2、図3) により、末端3 - O - メチル - α - Rha残基 (E) 及び4 - 置換3 - O - メチル - α - Rha残基 (F) のホモオリゴマーのいくつかのオーバーラップするスピン系の同定が可能となった。このオリゴマーの残基数は、NMRデータから明らかではなかったが、MSにより、3 - O - メチル - Rha残基が5つ存在するこ

50

とが確立された（図 4）。OS 1 の糖鎖における 3 - OMe ラムナンオリゴ糖の後の次の残基は、3 - O - メチル - α - Man（L）で表され、これは次いで、1 - 重水素化エリスリトール X の O - 2 に結合した。3 - O - メチル - Man は、GC - MS（アルジトールアセテート）により、K . ニューモニエ（K . pneumoniae）O5OPS を標準物質のソースとして使用して同定された [19]。エリスリトールは、4 - 置換ヘキソピラノースの酸化還元によってのみ生成可能であった。メチル基の位置は、NOE 及び HMB C のデータ並びにメチル化位置における 13 C シグナルの大型低磁場シフトから推定した。

【 0 1 5 5 】

【 表 2 】

表 2. A-PS から単離した OS1 及び遊離 3-O-メチル-ラムノースの NMR デー

タ(δ, ppm, 500 MHz 25°C)。遊離 Rha3Me 中 Me: 3.44/57.3 ppm.

	H/C-1	H/C-2	H/C-3	H/C-4	H/C-5	H/C-6
Rha3OMe E, 1	5.16	4.23	3.43	3.50	3.80	1.29
	102.4	67.3	80.6	71.8	70.6	17.7
Rha3OMe F, 1	5.15	4.21	3.58	3.59	3.89	1.33
	102.4	67.4	81.7	79.1	69.0	18.3
Man3OMe L, 1	5.12	4.24	3.67	3.83	3.83	3.78;
	99.8	67.3	81.9	73.8	72.9	67.1
テトリトールX, 1	3.75;	3.79	3.90	3.63;		
	59.7	78.5	72.3	63.7		
遊離α-Rha3Me	5.15	4.17	3.48	3.47	3.88	1.27
	95.1	67.6	80.6	72.3	69.4	18.1
遊離β-Rha3Me	4.85	4.20	3.31	3.39	3.41	1.29
	94.8	68.1	83.0	72.0	73.2	18.1

【 0 1 5 6 】

3 - OMe ラムノースの絶対配置の明解な決定を可能とするために、ラムノースの両異性体が緑膿菌 LPS において同定されているように [20]、D ラムノース単糖及び L ラムノース単糖の合成標準物質を調製した。NMR 解析により、このような標準物質の確実性が確認された（図 5 A 及び図 5 B）。3 - O - メチル - Rha の絶対 D 配置を、OS 1 のアセチル化 2 - オクタノール誘導体の GC - MS により、合成標準物質から得た同一の誘導体と比較して決定した（図 6）。

【 0 1 5 7 】

OS 1 化合物の ESI MS のポジティブモードにより、1 : 1 の比による m / z 1117 . 8 及び 1122 . 6 において、Rha₅Man₁テトリトール - 1d₁Me₆ のアンモニウム付加体及びナトリウム付加体に対応する、2 つのピークが示され、精密質量 1099 . 5 が算出された（図 4）。したがって、OS 1 は、1 - 4 結合が結合する 3 - O - メチル - D - Rha の残基 5 つを含む。

【 0 1 5 8 】

類似のオリゴ糖がこれまでに示唆されていたが [18]、その試験では、3 - O - メチル - α - Man の代わりにキシロースが検出され、結合位置は同定されなかった。

【 0 1 5 9 】

インタクトな A - PS の NMR スペクトルの解釈により、ラムナン三糖繰返し配列 - A

10

20

30

40

50

- B - C - のシグナルが確認され（データ不提示）、完全OS1に対応する、それほど強くはないスピン系の存在も示され、2つの残基G及びHが2-O-メチル-Man（G）及び2-O-Me-Rha（H）として同定された（表3）。スペクトルは、末端α-Glc（N，N'）の2つの弱いスピン系を常に関わり、緑膿菌LPSコア由来のGlcであると想定されたが、このような残基は、解釈可能なNOEを生成しなかった。

【0160】

【表3】

表3. A-PSのNMRデータ(δ, ppm, 600 MHz, 40℃)。メチル基: G, H: 3.47/59.7

ppm; E, F, L: 3.46/57.5 ppm.

	H/C-1	H/C-2	H/C-3	H/C-4	H/C-5	H/C-6
Rha A	5.21	4.09	3.97	3.52	3.85	1.32
	102.1	79.4	71.2	73.6	70.5	18.0
Rha B	5.05	4.15	3.91	3.58	3.89	1.32
	103.5	71.2	79.1	72.8	70.5	18.0
Rha C	4.97	4.17	3.85	3.58	3.77	1.29
	103.3	71.2	79.3	72.8	70.7	18.0
Rha3OMe E	5.15	4.22	3.42	3.50	3.82	1.29
	102.5	67.5	80.8	72.0	69.1	18.0
Rha3OMe F	5.13	4.20	3.55	3.58	3.86	1.33
	102.5	67.6	81.9	79.3	69.0	18.0
Man3OMe L	5.27	4.28	3.62	3.85	3.78	3.78;
	102.5	67.4	81.8	73.9	73.3	62.2
Man M	5.23	4.03	3.94	3.85	3.74	3.78;
	102.6	71.9	72.1	75.4	73.5	62.2
Man K	5.21	4.01	3.94	3.85	3.74	3.78;
	102.5	71.9	72.1	75.4	73.5	62.2
Man D	5.25	4.02	3.94	3.85	3.74	3.78;
	102.5	71.9	72.1	75.4	73.5	62.2
Man2OMe G	5.37	3.66	3.96	3.76		
	99.4	83.1	71.2	75.6		
Rha2OMe H	5.20	3.68	4.02	3.55	3.83	1.33
	102.1	83.1	71.9	80.7		
α-Glc N	5.00	3.57	3.71	3.42	3.76	3.87
	99.2	72.7	74.5	70.8		
α-Glc N'	5.03					
	100.3					

【0161】

A-PSの3-O-メチル-Man Lは、α-Man MのO-4に結合し、このため、OS1のエリスリトールXは、酸化Man Mに由来した。α-Manのいくつかのスピン

10

20

30

40

50

系が存在し、これらは三糖 - 4 - α - M a n - 4 - α - M a n - 4 - α - M a n - (M - K - D) を形成し、2 - O - メチル - R h a H 又は 2 - O - メチル - M a n G のいずれかに結合した。他の成分を同定できなかったため、鎖の更なる追跡は不可能であった。D - ラムナン三糖繰返し単位とメチル化オリゴ糖との間の結合は、同定されなかった。

【 0 1 6 2 】

O S 1 の全てのシグナルが A - P S 及び O S 1 において同一の位置を維持したため、3 - O - メチル - R h a のオリゴマーは、A - P S 鎖の非還元末端を占有し、この末端位置により、免疫原性であり得ると結論づけることができる。

【 0 1 6 3 】

本明細書に記載のように、A バンド P S の非還元末端の詳細な構造は決定されており、中性ラムナン三糖繰返し単位を単に含むのではなく、このポリマーが、メチルマンノース分子を介して中性マンノース三糖に結合する 3 - O - メチルラムノース残基の五糖でキャッピングされていることがわかっている。中性ラムナンへの結合点は確立されていないが、3 - O - メチル R h a 残基に対する同一シグナルが A - P S 及び O S 1 において同一の位置を維持するという事実により、3 - O - メチル - R h a のオリゴマーが A - P S 鎖の非還元末端を占有することが強力に示唆される。その他では、A - P S 調製において、3 - O - メチルラムノース残基と一致するシグナルを観察したが、本明細書に記載の構造単位を解明したものは皆無であった [1 8 , 2 1] 。

【 0 1 6 4 】

実施例 2 : 単離 A バンドエピトープ (O S 2) により生成した複合糖質 (B S A - O S 2 及び C R M - O S 2) の生成及び免疫学的評価

A - P S 末端に対して特異的な 3 つの m A b が同定されており、エピトープマッピング予備試験により、これらがこの末端単位内の種々の領域を認識することが示唆される。このような m A b と、比較的程度の低い A - P S 末端に対して産生されたポリクローナル血清とは、S B A 実験及び O P A 実験において緑膿菌株の傷害を促進することが可能であった。中性ラムナンに基づく合成複合糖質ワクチンを利用する M a k a r e n k o e t a l によるこれまでの試験では、認識可能な抗体の産生が不可能であり、単独で緑膿菌株の傷害を促進させる [2 5] 。加えて、L a m の研究所による試験では、中性ラムナンに対して特異的な m A b N 1 F 1 0 が、緑膿菌株のおよそ 7 0 % を認識可能であることが観察されたが [2 6] 、N 1 F 1 0 又はこの s c F v 誘導体を用いた最近の試験では、いかなる機能性も示さなかった [2 7] 。保存されたこの抗原の鍵となる領域が、これまでの試験において見過ごされていた可能性を有すると思われ、このため、本明細書に記載の実施例では、A - P S のメチル化チップ領域が実際、免疫原性であり、免疫応答がオプソニン貪食作用活性を促進可能であることを実証する。一般に遭遇する病原性血清型及び最近の臨床単離株を含む検査した緑膿菌株の大多数が認識されたため、本明細書に記載の 3 つの m A b のうちの 1 つである 1 B 1 は、高度に保存されたエピトープを認識すると思われる。本明細書に記載の他の 2 つの m A b である 3 B 8 及び 3 C 4 は、1 B 1 m A b よりも特異的であり、これらの認識は、w t 血清型 5 株である P A O 1 B A A - 4 7 及び 5 9 3 7 に制限される。末端メチル化五糖に基づく合成オリゴ糖を用いた試験では、本明細書に記載の他の m A b と比較した場合、m A b 1 B 1 の広範な特異性が確認された。合成オリゴ糖を用いた阻害 E L I S A データにより、m A b 1 B 1 が、3 - O - メチルラムナン三糖によって効率的に阻害され得ることが明らかとなった。発明者らのコレクシオンの臨床単離株の大多数を認識し、緑膿菌により生じる疾患の大多数の原因となる A T C C 血清型株を認識する、m A b 1 B 1 の広範な交差反応性を考慮すると、本明細書に記載の合成オリゴ糖は、ワクチン抗原として、又は広範な交差反応性治療薬を生成する手段として、有望であると思われる。

【 0 1 6 5 】

A - P S 抗原の重要性は、依然として、当分野における一部の考察の論題となっているが、C F の肺において、血清型特異的 O 抗原はもはや確立されないが、A - P S は維持されるという知見により、A - P S 免疫原性チップ構造が、臨床適所において標的とする、

鍵となるエピトープであり得ることが示唆される。

【 0 1 6 6 】

コンジュゲート：B S A 及び C R M コンジュゲートを、これまでに記載のような直接的な還元的アミノ化の標準化学技術により調製した [2 2]。簡潔には、酸化 A バンド末端エピトープ物質 (O S 2) (4 . 5 m g 及び 2 m g) を C R M (2 . 3 m g) 又は B S A (1 m g) と、水中の 2 つの反応物の溶液を混合することにより、それぞれ反応させ、R T で放置した後、凍結乾燥させた。凍結乾燥物質を 1 0 0 m M の NaPO_4 1 0 m L に溶解し、次いで、 NaCNBH_3 (5 m g mL^{-1}) を加え、生じた溶液を室温 (R T) で 1 6 時間放置した。コンジュゲートは、3 0 K D a 分子量カットオフスピンカラム上の P B S 中、1 0 m M のクエン酸ナトリウムにより精製し、上清のタンパク質を定量し、10 濾過滅菌し、- 2 0 度で凍結させた。一定分量を、これまでに記載のように M A L D I - M S によって調べた [2 3]。

10

【 0 1 6 7 】

抗緑膿菌 A バンド末端エピトープ抗体の生成：緑膿菌 A バンド末端エピトープを標的とする抗体を生成するために、B a l b / C マウス (6 ~ 8 週) 6 匹及びニュージーランドホワイトウサギ (1 . 5 ~ 2 k g) 2 匹を、精製及び酸化した末端 A バンド分子と担体タンパク質としての C R M との複合糖質で免疫した。免疫化は、これまでに記載のように、計画的に行い、アジュバント投与を行った [2 2]。

【 0 1 6 8 】

m A b 生成：ポリクローナル血清に対して免疫化したマウスを A バンド P S の認識についてスクリーニングし、最も高い力価を示すマウスを最終 i . v . 注射後の融合のために選択した。免疫化マウスから回収した脾臓細胞の融合、ハイブリドーマ選択、並びに高密度 m A b 上清の増殖及び精製についての全ての操作は、これまでに記載のように実施した [2 4]。

20

【 0 1 6 9 】

抗緑膿菌 A バンド末端エピトープ m A b の特性決定

抗体可変領域シーケンシング：生成した 3 つの m A b (1 B 1、3 C 4、及び 3 B 8) の再編成した可変重鎖 (V H) ドメイン及び可変軽鎖 (V L) ドメインをコードする D N A 配列を、I l l u m i n a 社の M i S e q アンプリコンシーケンシングにより、これまでに記載のように決定した [2 4]。3 つの m A b の V H 及び V L ドメインのアミノ酸配列は、表 4 に提示する。

30

【 0 1 7 0 】

40

50

【表 4】

表 4. 抗体配列

配列番号	配列	説明
1	GFPFSDYY	1B1 VH CDR1
2	INGDGGTT	1B1 VH CDR2
3	VRGRRITGTGAIDY	1B1 VH CDR3
4	DVKLVESGGGLVKVGGSLKISCAAS GFPFSDYY MA WVGQTPEKRLELVAA INGDGGTTY PD TVKGRFIISR DNAKNTLYLQMSSLRSED TALYYC VRGRRITGTGAI DY WGQGTSVTVSS	1B1 VH
5	gacgtgaagctcgtggagctctgggggaggcttagtgaaggttgagggtc cctaaaaatttcatgtgcagcctctggattccccttcagtactattatggct tgggttgccagactccagagaagaggctggagttggtcgagccattaa tggtgatggtgtaccacactactatccagacactgtgaagggccgattcat catttcagagacaatgccaagaacaccctgtacctgcaaatgagcagtc tgaggctctgaggatacagccttgattattgtgaagagggagaaggataa ctggaactggggctatagactactgggggtcaaggaacctcagtcaccgtc tcctca	1B1 VH コード 配列
6	SNISY	1B1 VL CDR1
-	GTS	1B1 VL CDR2
7	QIYHSYPYT	1B1 VL CDR3
8	QIFLTQSPVILSASPGEKVTMTCSAT SNISY MYRYQQ KPGSSPKPWIYGTSNLASRVPARFSGSGS GTSY SLT ISNMEAEDAATYYC QIYHSYPY TFGGGTKLEIK	1B1 VL
9	caaattttctcaccagctctccagttatcctgtctgcactctccaggggagaa ggtcacatgacctgcagtgccacctcaaataaagttacatgtacaggta ccagcagaagccaggatcctcaccctggatttatggcacatcc aacctggcttctcgagctccctgtctcgcttcagtggcagtgatctgggacct cttattctctcacaatcagcaacatggaggctgaagatgctgccacttattac tgccagatatatcatagttacccgtacacgttcggaggggggaccaagct ggaaataaaa	1B1 VL コード 配列
10	GYSFTDYN	3B8 VH CDR1
11	IDPYNGGT	3B8 VH CDR2
12	AKGGYRYDAWFAY	3B8 VH CDR3
13	EIQLQQSGPELVKPGASVKVSKKAS GYSFTDYN MY WVKQSHGKSLEWVG IDPYNGG TTYNQKFKGKATL TVDKSSSTAFMHLNSLTSEDSAVYYC AKGGYRYDA WFAY WGQGLTVTVSA	3B8 VH

10

20

30

40

50

14	gagatccagctgcagcagctctggacctgagctggtgaagcctggggcttc agtgaaggtatcctgcaaggcttctggttactcattcactgactacaacatgt actgggtgaagcagagccatggaaagagccttgagtgggttgatatatt gaccttacaatggtgtactacctaaccagaagttcaagggcaaggc cacattgactgttgacaagtcctccagcacagcctcatgcatctcaacag cctgacatctgaggactctgcagctctattactgtgcaaagggcggctatag gtacgacgcctggttcttactggggccaagggactctggtcactgtctctg ca	3B8 VH コード 配列
15	QSLNNGNTY	3B8 VL CDR1
-	RVS	3B8 VL CDR2
16	LQVTHVPWT	3B8 VL CDR3
17	DAVMTQTPLSLPVSLGDHASISCRSS QSLNNGNT YLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSNR FSGVLD RFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDLG VYFCL QVTHVPWTF GGGK LEIK	3B8 VL
18	gatgctgtgatgacccaaactccactctcctgcctgtcagctctggagatc acgcctccatctctgcaggtctagtcagagcctgaaaacaataatggaa acacctattgaactggtacctccagaaaccaggccagctctccacagctcc tgatctacagggttccaaccgatttctgggtcctagacaggttcagtggt agtggatcagggacagatttcacactgaaaatcagcagagtgaggctg aggattgggagtttattctgcctccaagttacacatgtcccgtagcgttcg gtggaggcaccaagctggaaatcaaa	3B8 VL コード 配列
19	GFTFTDYY	3C4 VH CDR1
20	IRNKANGYTT	3C4 VH CDR2
21	TRAIYYGYDGFAY	3C4 VH CDR3
22	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSG FFTDY MS WVRQPPGKALEWLG FIRNKANGYTTE YSASVKGRF TISRDNSQSILYLQMNTLRAEDSATYY CTRAIYYGYD GFAYWGQGLTV SA	3C4 VH
23	gaggtgaagctggtggagtctggaggaggctggtacagcctgggggttc tctgagactctcctgtgcaacttctgggtcacctcactgattactacatgag ctgggtccgccagcctccaggaaaggcacttgagtgggtgggtttattaga aacaaagctaattggttacacaacagagtacagtgcattgtgaagggtcg gttcaccatctccagagataattcccaaagcattctcttcaaatgaac accctgagagctgaggacagtgccacttattactgtacaagggccatctac tatgggtacgacgggttgcttactggggccaagggactctggtcactgtctc tgca	3C4 VH コー ド配列
24	QSLNSNGNTY	3C4 VL CDR1
-	RVS	3C4 VL CDR2
25	LQVTHVPFT	3C4 VL CDR3

10

20

30

40

50

26	DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS QSLENSNGNT YLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSNR FSGVLD RFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDLGVYF CLQVTHVPFTFGSGTKL EIK	3C4 VL
27	gatgctgtgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtccttgagatc aagcctccatctctgcaggtctagtcagagccttgaaaacagtaatggaa acacctattgaactggtacctccagaaaccaggccagtcctccacagctcc tgatctacaggggttccaaccgatttctggggctctagacaggttcagtggt agtggatcaggacagatttcacactgaaaatcagcagagtgaggctg aggattgggagttattctgcctccaagttacacatgtccattcacgttcg gctcggggacaaagttggaaataaaa	3C4 VL コード 配列

10

*太字の強調は CDR 配列の位置を示す

【 0 1 7 1 】

E L I S A : 抗緑膿菌 A バンド末端エピトープ m A b 及びポリクローナル血清と B S A コンジュゲート、精製 L P S 、及び全細胞との結合を、E L I S A により、これまでに記載のように評価した [2 4] 。

【 0 1 7 2 】

m A b 競合 E L I S A : N u n c M a x i s o r p E I A プレートのウェルを、P B S 中の緑膿菌 L P S 1 μ g により一晚 4 でコーティングし、次いで、R T にした後、使用した。プレートを 1 % の B S A - P B S により 1 時間 R T でブロッキングし、次いで、ウェルを P B S - T で洗浄した。1 つの m A b (1 B 1 又は 3 B 8) を滴定し、プレートに 1 時間 R T で加えた。P B S - T による洗浄後、第 2 の m A b (3 C 4) を予め定められた濃度に加え、1 時間 R T でインキュベートさせた。P B S - T による洗浄後、m A b 3 C 4 に対して特異的な A P 標識ヤギ抗マウス I g G 2 b (S o u t h e r n B i o t e c h 社) を 1 : 2 5 0 で 1 % の B S A - P B S により希釈したものを 1 時間 R T で加えた。次いで、プレートを P B S - T で洗浄し、P h o s p h a t a s e S u b s t r a t e S y s t e m (K i r k e g a a r d a n d P e r r y L a b o r a t o r i e s 社) により展開した。6 0 分後、4 0 5 n m の吸光度を、マイクロタイタープレートリーダーを使用して測定した。

20

30

【 0 1 7 3 】

m A b 阻害 E L I S A : N u n c M a x i s o r p E I A プレートのウェルを、P B S 中の緑膿菌 L P S 1 μ g により一晚 4 又は d H ₂ O 中の緑膿菌殺菌全細胞により乾燥器内で一晚のいずれかでコーティングし、次いで、R T にした後、使用した。プレートを 1 % の B S A - P B S により 1 時間 R T でブロッキングし、次いで、ウェルを P B S - T で洗浄した。ブロッキングステップ中に、阻害を設定した。L P S 又は合成オリゴ糖のいずれかを 1 m g / m l 又は 3 m g / m l のいずれかでチューブに加え、次いで、1 % の B S A - P B S による段階希釈を実施した後、等量の m A b (1 B 1 、 3 B 8 又は 3 C 4) を 1 0 μ g / m l の定濃度で 1 % の B S A - P B S に加え、この混合物を 1 時間 R T でインキュベートした。E I A プレートの P B S - T による洗浄後、混合チューブから 1 0 0 μ l をプレートに加え、L P S コーティングプレートは 1 時間 R T で、又は殺菌全細胞コーティングプレートは 3 時間 R T でインキュベートさせた。P B S - T による洗浄後、使用した m A b に対して特異的な、適切な A P 標識ヤギ抗マウス I g (S o u t h e r n B i o t e c h 社) を 1 : 2 5 0 で 1 % の B S A - P B S により希釈したものを 1 時間 R T で加えた。次いで、プレートを P B S - T で洗浄し、P h o s p h a t a s e S u b s t r a t e S y s t e m (K i r k e g a a r d a n d P e r r y L a b o r a t o r i e s 社) により展開した。6 0 分後、4 0 5 n m の吸光度を、マイクロタイタープレートリーダーを使用して測定した。

40

【 0 1 7 4 】

50

血清殺菌アッセイ：選択した緑膿菌株の殺菌傷害を促進するポリクローナル血清及びmAbの能力を、これまでに記載のように決定した〔22〕。

【0175】

【0176】

オプソニン貪食作用アッセイ：選択した緑膿菌株のオプソニン貪食作用性傷害を促進するポリクローナル血清及びmAbの能力をこれまでに記載のように決定した〔23〕。

【0177】

表面プラズモン共鳴（SPR）：SPR結合アッセイを25℃によりBiacore T200機器上のHBS-EPランニングバッファ（Cytiva Life Sciences社、Mississauga、カナダ）中で本質的にこれまでに記載のように実施した〔24〕。簡潔には、IgMおよそ13000RU（PA1B1及び対照Fn4F1）をCM7センサーチップに10mM、pH4.0の酢酸緩衝液（Cytiva社）中でアミンカップリングした。合成オリゴ糖は、HBS-EPにより25mMに再構成し、一連の希釈物を調製してIgM表面にわたって注射した。接触時間は、60秒であり、解離時間は、120秒（モノ-、ジ-）又は180秒（トリ-、テトラ-、ペンタ-）であった。次の濃度範囲で注射した：モノ-（1mM～62.5μM）、ジ-（200μM～12.5μM）、並びにトリ-、テトラ-、及びペンタ-（10μM～625nM）。カタル球菌（Moraxella catarrhalis）由来のMcat1gt2/4オリゴ糖は、対照として作用し、10μMで注射した。表面は、HBS-EPによる大規模な洗浄により再生させた。参照フローセルを減算したセンサーグラムを1：1の結合モデルにフィッティングさせて結合動態及び親和性を決定するか、又は定常状態解析により親和性を決定した。

10

20

【0178】

実施例2：結果

コンジュゲーション：OS1の還元末端エリスリトールは、過ヨウ素酸酸化により効率的に標的とすることによって反応性アルデヒド基を生成してコンジュゲーションを行った。酸化オリゴ糖OS2（図7）は、直接的な還元的アミノ化により担体タンパク質BSA及びCRM197にコンジュゲートし、MALDI-MS解析により、生じた複合糖質に約13及び約10kDaの糖質コンジュゲート（10～13糖鎖/タンパク質）がそれぞれ結合することが例示された（図8A～8D）。

30

【0179】

免疫化：マウス6匹及びウサギ2匹に、実験に記載のCRM複合糖質のプライム1回ブースト2回による免疫化戦略を行った。最終放血血清によるELISAでは、両動物は、オリゴ糖コンジュゲートに対して血清転換したことが強調され、これは、BSAコンジュゲート及びLPSに対する滴定により証明された（図9A及び図9B）。マウスは、BSAコンジュゲートに対してLPSよりも強力な力価を示したが、ウサギは、両抗原に対して広範に類似する滴定曲線を示した。

【0180】

mAb作製：複合糖質免疫化後にPAO1 LPS（NRCC6667）に対する力価が最良のマウスをmAb作製のために選択し、実験の節に記載のように、この脾臓を骨髓細胞株に融合させた。3C4（IgG2b）、3B8（IgM）、及び1B1（IgM）の3つのmAbを得た。このようなmAbの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をシーケンシングした。これらのアミノ酸配列は、表4に示す。各mAbは、相同PAO1（wzy：Gm）LPSを認識可能であり、mAb1B1の場合では、Aバンド遺伝子座変異体由来の緑膿菌精製LPS PAO1（wzy：Gm）（Δpa5457）及びPAO1（wzy：Gm）（Δpa5458）を認識可能であった（図10）。同様に、各mAbは、wt血清型5の株PAO1 BAA-47及び5937の殺菌全細胞を認識可能であり、再度、LPS ELISAデータを裏付けて、mAb1B1は、Aバンド遺伝子座変異体PAO1（wzy：Gm）（Δpa5457）、PAO1（wzy：Gm）（Δpa5458）、及びPAO1（wzy：Gm）（Δpa5459）、並びに最も

40

50

一般に遭遇する臨床血清型に対応する A T C C 型株を含むサブセットの殺菌全細胞に対して交差反応性である唯一の m A b であった (図 1 1 A ~ 1 1 C)。この挙動は、臨床単離株のセットを調べたときに再現され、m A b 1 B 1 は、広範な交差反応性を示した (図 1 2)。

【 0 1 8 1 】

S B A 及び O P A : 最初の試みでは、ポリクローナルウサギ血清が P A O 1 w t 緑膿菌株の血清殺菌傷害を促進する能力の例示に焦点を置いた。しかし、ポリクローナルウサギ血清による傷害の証拠は限られていることが観察された。次の試みでは、文献の報告において O P A を利用して緑膿菌に対する抗血清の潜在的可能性を例示するように [8 - 1 0]、オブソニン貪食作用アッセイ (O P A) に焦点を置いた。S B A と同様に、ウサギ血清が P A O 1 O 抗原欠損株に対するオブソニン貪食作用活性を促進し得るという仮の証拠を得た。しかし、m A b を調べると、P A O 1 血清型 5 株 P A O 1 B A A - 4 7 及び 5 9 3 7 に対してオブソニン貪食作用力価が高いことが観察された (図 1 3 A 及び図 1 3 B)。

【 0 1 8 2 】

m A b エピトープマッピング : 予備実験を行って、m A b が、3 - O - M e ラムナンの同一か、異なるか、又はオーバーラップするエピトープを認識するかどうかを調べた。競合 E L I S A 試験では、m A b 1 B 1 は、3 C 4 と比較して、ユニークなエピトープを認識するが、3 C 4 及び 3 B 8 は、類似のオーバーラップするエピトープを認識することが示唆され (図 1 4 A 及び図 1 4 B)、1 B 1 m A b が、m A b 3 B 8 及び 3 C 4 と比較して、株の広範なサブセットを認識する能力を有することと一致した。

【 0 1 8 3 】

合成オリゴ糖を用いた阻害 E L I S A : m A b により認識される免疫原性エピトープを更に特性決定するために、3 - O - メチル D - ラムナン末端単位の単糖 (D - 異性体及び L - 異性体)、二糖 (リンカー有り無し)、三糖、四糖、及び五糖を代表する合成オリゴ糖を本明細書に記載のように調製し、阻害 E L I S A 実験において調べた。最初に、3 つの m A b により認識されるか否かがわかっている L P S 分子を使用して、実験を検証した。その後、合成オリゴ糖を阻害剤として使用して、三糖、四糖、及び五糖が、m A b 1 B 1 と標的 L P S 及び殺菌全細胞との結合の阻害において効率的に等価であることを明らかにした (図 1 5 A ~ 1 5 F)。二糖及び単糖 (D - 異性体のみ) が阻害する一部の証拠が存在したが、三糖及びそれ以上のオリゴ糖に観察された程ではなかった。L - 単糖による阻害は完全に無効であり、D - 異性体が 3 - O - メチルラムナンにおいてラムノース糖の正しい配置に存在することを確認した。合成オリゴ糖のいずれによっても、m A b 3 C 4 又は 3 B 8 とこれらの L P S 又は殺菌全細胞標的との結合の阻害は無効であった。このような結果は前のデータと一致しており、これにより、m A b 1 B 1 が、末端 3 - O - メチルラムナンを認識可能であり、三糖が、天然構造を十分有効に模倣可能であり得ることが示唆される。

【 0 1 8 4 】

S P R 解析 : S P R を使用して、1 B 1 により認識される最小エピトープを更に明らかにし、合成オリゴ糖に対する親和性を決定した (図 1 6 及び表 5)。単糖から五糖に及び合成糖質を 1 B 1 I g M 及び無関係な I g M である F n 4 F 1 の高密度表面に流した。1 m M までの単糖では、観察可能な結合は検出されなかった。二糖では、1 B 1 表面に対する特異的結合とともに速い会合速度及び解離速度が示され、 $K D = 84 \mu M$ の定常状態親和性を決定した。三糖、四糖、及び五糖は全て、1 B 1 に特異的に結合し、親和性は二糖よりもかなり高かった (それぞれ、 $K D = 1.42$ 、 0.66 、及び $0.55 \mu M$)。3 つ全ての合成オリゴ糖は測定可能な動態を有し、これは、糖質 - 抗体相互作用において一般には観察されない遅い解離速度によって強調された。観察された R m a x 値は、理論 R m a x のおよそ 25 % であり、許容される 1 B 1 I g M 表面活性を示した。カタル球菌由来の無関係なオリゴ糖 M c a t 1 g t 2 / 4 (886 D a) を $10 \mu M$ で注射すると、いずれの I g M 表面においても観察可能な結合は検出されなかった。まとめると、

このようなデータにより、四糖及び五糖では、高い 1 B 1 結合親和性が観察されたが、三糖が、天然構造を模倣する最小抗原認識ドメインである可能性を有することが示唆される。

【 0 1 8 5 】

【 表 5 】

表 5. SPR による合成オリゴ糖に対する 1B1 結合親和性

オリゴ糖	Theo $R_{\max}$	Obs $R_{\max}$	k_a (s^{-1})	k_d ($M^{-1} s^{-1}$)	K_D (μM)
Mono-	31	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
		n.b	n.b.	n.b.	n.b.
Di-	59	14	-	-	85.8 ^a
		15	-	-	82.5 ^a
Tri-	87	21	1.28×10^4	1.76×10^{-2}	1.37
		21	1.23×10^4	1.79×10^{-2}	1.46
Tetra-	115	28	5.69×10^3	3.72×10^{-3}	0.65
		29	5.26×10^3	3.48×10^{-3}	0.66
Penta-	142	34	3.43×10^3	1.86×10^{-3}	0.54
		34	5.43×10^3	1.90×10^{-3}	0.55

^a 定常状態親和性

Theo $R_{\max}$: 理論的最大結合応答; Obs $R_{\max}$: 観察的最大結合応答; n.b.: 結合は観察されず

【 0 1 8 6 】

実施例 3 A - 3 - O - メチラムノースオリゴ糖の合成

この実施例では、標的の五糖の合成を記載する（図 2 2 ~ 2 4 のスキーム 1 ~ 3 を参照）。3 - O - D - ラムノース及び 3 - O - L - ラムノースの合成並びに 2 - オクチルグリコシドを有するそれぞれのアセチル化物質への誘導体化によって、GC - MS により生成された各鏡像異性体の純度が実証された。中間体チオグリコシドのドナー 1 6 及びアクセプター 1 7 の大規模合成により、二糖 1 8 d i が生じた。ベンジル脱保護後、新たなアクセプター 1 9 d i を得、更なる反復的グリコシル化及び水素化反応により、最終的に 1 8 ペンタが生じた。包括的脱保護の後、標的五糖を合成すると、D - マンノースからの全収率は 1 . 0 % であった。加えて、アミノエチルリンカーを二糖に付加して、更なるコンジュゲートワクチン作製のための方法を構築した。この実施例に記載の方法では、合成により十分な量の純粋な五糖を得、このグリカンを使用して緑膿菌複合糖質ワクチンの作製を促進することができることを例示する。

【 0 1 8 7 】

全ての化学物質は、A l d r i c h 社、F i s h e r S c i e n t i f i c 社、A l p h a A e s e r 社又は C o m b i B l o c k s 社から購入した。これらは、更なる精製は行わずに使用した。NMR スペクトルは、V a r i a n 社の分光計（ 1H 5 0 0 M H z、 ^{13}C 1 2 5 M H z、 ^{31}P 2 0 0 M H z）上で測定し、溶剤残留シグナルとともに報告した（ $CDCl_3$ 、 1H では 7 . 2 6 p p m 及び ^{13}C では 7 7 . 1 p p m、 CD_3OD 、 1H では 3 . 3 1 p p m 及び ^{13}C では 4 9 . 0 p p m、 D_2O 、 1H では 4 . 7 9 p p m 及び ^{13}C では外部ジオキサン（6 7 . 2 p p m）及び ^{31}P ではスペクトル測定前の別々の実験において 8 5 % の H_3PO_4 を使用）。化合物の割当ては、標準的二次元 NMR 実験、例えば、HMBC、COSY、HSQC、及び ^{13}C NMR を使用して確認した。化合物は、C o m b i F l a s h（登録商標）RF システム及び R e d i S e p（登録商標）RF シリカカラムを使用して精製した。MS データは、W a t e r s 社の S Q 2 上で記録し、HRMS データは、W a t e r s 社の U l t i m a 上で A g i l e n t 社の LC / MS C a l i b r a n t M i x を用いて、内部標準として記録した。

【0188】

1, 4 - O - ジベンジル - 2, 3 - O - イソプロピリデン - α - D - ラムノピラノシド (4)

1 - O - ベンジル - 2, 3 - O - イソプロピリデン - α - D - ラムノピラノシド (9.70 g、32.9 mmol) を無水 DMF (200 mL) に溶解し、溶液を 0 に冷却した。鉱物油中 60% の水素化ナトリウム (1.97 g、49.3 mmol) を小分けして加え、溶液を窒素ガス下で 30 分間 0 により攪拌した。次いで、臭化ベンジル (4.70 mL、39.5 mmol) を滴下して加え、反応物を 1 時間攪拌した後、完了に達したことを TLC により確認した。完了すると、反応物を Et₃N (8 mL) でクエンチし、飽和 NH₄Cl の冷却溶液 (500 mL) 中に注いだ。生成物が溶液に急速に沈殿したため、これを濾過し、水で洗浄し、高真空下で一晩乾燥させて生成物 4 (12.6 g、32.9 mmol、100%) をベージュ色の固体として生成した。R_f = 0.75, (EtOAc/ヘキサン, 2/8) [α]_D²⁵ 23.45 (c 0.22, CHCl₃) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.38-7.26 (m, 10H, 2x Bn), 5.05 (s, 1H, H1 α), 4.89 (d, 1H, J_{A,B} = 11.6 Hz, CHA, OBn), 4.69 (d, 1H, J_{A,B} = 11.8 Hz, CHA, OBn), 4.64 (d, 1H, J_{B,A} = 11.6 Hz, CHB, OBn), 4.51 (d, 1H, J_{B,A} = 11.8 Hz, CHB, OBn), 4.29 (dd, 1H, J_{3,4} = 6.2 Hz, J_{3,2} = 6.2 Hz, H3), 4.19 (d, 1H, J_{2,3} = 5.8 Hz, H2), 3.80-3.73 (m, 1H, H5), 3.24 (dd, 1H, J_{4,3} = 7.2 Hz, J_{4,5} = 9.9 Hz, H4), 1.51, 1.36 (2 x s, 3H, CH₃), 1.29 (d, 3H, J_{6,5} = 6.3 Hz, H6) ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 138.4, 137.2, 128.6 (x2), 128.4 (x2), 128.3 (x2), 128.1 (x2), 128.0, 127.7 (Bn), 109.3 (C(CH₃)₂), 96.3 (C1), 81.3 (C4), 78.7 (C3), 76.2 (C2), 73.1, 69.1 (2 x CH₂(Bn)), 64.8 (C5), 28.1, 26.4 (2 x CH₃), 17.9 (C6) J_{C1, H1} = 174 Hz, HRMS: m/z C₂₃H₂₈NaO₅ [M+Na]⁺ の計算値, 407.1834; 実測値, 407.1828.

10

20

【0189】

1, 4 - O - ジベンジル - α - D - ラムノピラノシド (5)

化合物 4 (0.46 g、1.21 mmol) を 80% (v/v) AcOH (8 mL) の溶液に溶解し、溶液を 60 で 4 時間加熱した。次いで、溶液を減圧下で蒸発させ、粗生成物を CH₂Cl₂/ヘキサンにより結晶化して 5 (395 mg、1.15 mmol、95%) を白色の結晶として生成した。R_f = 0.6 (EtOAc/ヘキサン, 7/3) [α]_D²⁵ 1.49 (c 0.09, CHCl₃) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.36-7.26 (m, 10H, 2x Bn), 4.86 (s, 1H, H1), 4.78-4.73 (m, 2H, CHA, CHB, OBn), 4.69 (d, 1H, J_{A,B} = 11.9 Hz, CHA, OBn), 4.51 (d, 1H, J_{B,A} = 11.9 Hz, CHB, OBn), 3.99-3.94 (m, 2H, H2, H3), 3.83-3.76 (m, 1H, H5), 3.37 (dd, 1H, J_{4,3} = J_{4,5} = 9.1 Hz, H4), 2.26 (d, 1H, J_{OH,2} = 3.6 Hz, OH), 2.24 (d, 1H, J_{OH,3} = 4.8 Hz, OH), 1.36 (d, 3H, J_{6,5} = 6.3 Hz, H6). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 138.3, 137.3, 128.7 (x2), 128.6 (x2), 128.1, 128.1 (x2), 128.0 (x2), 128.0, (Bn), 98.6 (C1), 81.8 (C4), 75.2 (CH₂, Bn), 71.6 (C3), 71.3 (C2), 69.2 (CH₂, Bn), 67.5 (C5), 18.1 (C6) J_{C1, H1} = 167 Hz LRMS m/z C₂₀H₂₄NaO₅ [M+Na]⁺ の計算値, 367.4; 実測値, 367.3

30

40

【0190】

1, 4 - ジ - O - ベンジル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (6)

化合物 5 (25.1 g、72.9 mmol) を 3 回トルエンと同時蒸発させ、高真空下で一晩乾燥させた。次いで、5 を無水トルエン (500 mL) に溶解して窒素ガスでパージし、ジブチルスズ (IV) オキシド (21.8 g、87.5 mmol) を加えた。反応混合物を還流により 16 時間、RT に冷却されるまで攪拌し、真空下で蒸発させた。粗混合物を高真空下で 5 時間、無水 DMF 500 mL に再溶解するまで更に乾燥させた。混合物を窒素ガスでパージし、次いで、フッ化セシウム (16.5 g、109 mmol) 及びヨードメタン (51.7 mL、830.4 mmol) を加えた。反応物を窒素ガス下で 40 により 16 時間攪拌した後、完了に達したことを TLC により確認した。反応混合物

50

をRTに冷却してEtOAc (300 mL) で希釈し、水 (5 × 60 mL)、飽和NaHCO₃ (1 × 60 mL)、及び鹼水 (1 × 60 mL) で洗浄した。次いで、混合有機層をNa₂SO₄により乾燥させ、蒸発させてフラッシュクロマトグラフィーにより精製して (溶出液: EtOAc / ヘキサン) 6 を蒼白色の油として得た (23.7 g、66.3 mmol、91% - 2ステップ)。R_f = 0.35 (EtOAc / ヘキサン, 7/3) [α]_D²⁵ 58.3 (c 0.43, CHCl₃) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.37-7.26 (m, 10H, 2x Bn), 4.91 (d, 1H, J_{1,2} = 1.2 Hz, H1), 4.86 (d, 1H, J_{A,B} = 11.0 Hz, CHA, OBn), 4.71 (d, 1H, J_{A,B} = 11.8 Hz, CHA, OBn), 4.64 (d, 1H, J_{B,A} = 11.6 Hz, CHB, OBn), 4.47 (d, 1H, J_{B,A} = 11.0 Hz, CHB, OBn), 4.08 (dd, 1H, J_{2,1} = 1.7 Hz, J_{2,3} = 3.3 Hz, H2), 3.83-3.73 (m, 1H, H5), 3.61 (dd, 1H, J_{3,2} = 3.4 Hz, J_{3,4} = 9.1 Hz, H3), 3.49 (s, 3H, OMe), 3.39 (dd, 1H, J_{4,3} = 9.4 Hz, J_{4,5} = 9.4 Hz, H4), 2.43 (d, 1H, J_{OH,3} = 2.0 Hz, OH), 1.31 (d, 3H, J_{6,5} = 6.3 Hz, H6). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 138.6, 137.3, 128.5 (x2), 128.5 (x2), 128.1 (x2), 128.1 (x2), 128.0, 127.8 (Bn), 98.3 (C1), 81.8 (C3), 80.0 (C4), 75.4, 69.2 (2 x CH₂(Bn)), 68.0 (C2), 67.4 (C5), 57.5 (OCH₃), 18.0 (C6) J_{C1, H1} = 174 Hz HRMS: m/z C₂₁H₂₆NaO₅ [M+Na]⁺の計算値, 381.1672; 実測値, 381.1668.

【0191】

3 - O - メチル - D - ラムノース (D - 単糖)

1 - O - ベンジル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (43.7 mg、162.9 μmol) を4 MのHCl及びMeCN (10 mL) の16:10 (V:V) 溶液に溶解し、溶液を80 °Cで16時間加熱した。次いで、溶液を蒸発させ、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して (溶出液: MeOH / CH₂Cl₂、1/5) 単糖を白色の固体として得た (18.9 mg、106.1 μmol、65%)。R_f = 0.30, (EtOAc), ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 5.18 (d, 0.7H, J_{1α,2α} = 1.6 Hz, H1α), 4.74 (d, 0.3H, J_{1β,2β} = 1.0 Hz, H1β), 4.07 (dd, 0.7H, J_{2β,1β} = 0.7 Hz, J_{2β,3β} = 2.9 Hz, H2β), 4.03 (dd, 0.7H, J_{2α,1α} = 0.9 Hz, J_{2α,3α} = 1.9 Hz, H2α), 3.89-3.83 (m, 0.7H, H5α), 3.50-3.48 (2 xs, 3H, OCH₃ α / β), 3.46 (dd, 0.7H, J_{4α,3α} = 3.0 Hz, J_{4α,5α} = 9.4 Hz, H4α), 3.43-3.39 (m, 1H, H3α及びH4β), 3.42-3.35 (m, 0.3H, H5β), 3.15 (dd, 1H, J_{3β,2β} = 3.0 Hz, J_{3β,4β} = 9.2 Hz, H3β), 1.34-1.25 (m, 3H, H6α / H6β). ¹³C NMR (151 MHz, CD₃OD): δ 95.7 (C1α), 95.4 (C1β), 84.5 (C3β), 81.8 (C3α), 73.0 (C4α), 72.4 (C4β), 71.1 (C5β), 69.2 (C5α), 69.0 (C2β), 68.8 (C2α), 57.3 (OCH₃ α), 57.2 (OCH₃ β), 18.1 (C6α), 18.1 (C6β). J_{C1, H1α} = 172 Hz, J_{C1, H1β} = 161 Hz, HRMS: m/z C₇H₁₄NaO₅ [M+Na]⁺の計算値, 201.0739; 実測値, 201.0734. NMRスペクトルは、図5Bに示す。

【0192】

3 - O - メチル - L - ラムノピラノース (L - 単糖)

1, 2 - ジ - O - アセチル - 3 - O - メチル - L - ラムノピラノシド S9 (100 mg、381 μmol) をMeOH / H₂O / Et₃N (7/2/1) の溶液10 mLに溶解し、反応物をRTで16時間攪拌した。次いで、溶液を減圧下で蒸発させ、Dowex (登録商標) Na⁺により濾過し、次いで、Sephadex (登録商標) G - 12カラムにより濾過した。生成物を含む画分を採取し、蒸発させてα / β混合物 (8/5) としての13を透明な油として得た (37.5 mg、210 μmol、55%)。 ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 5.06 (d, 0.8H, J_{1α,2α} = 1.7 Hz, H1α), 4.87 (d, 0.2H, J_{1β,2β} = 1.7 Hz, H1β), 4.05 (d, 0.2H, J_{2β,1β} = 0.9 Hz, J_{2β,3β} = 3.1 Hz, H2β), 4.01 (dd, 0.8H, J_{2α,1α} = 1.8 Hz, J_{2α,3α} = 2.9 Hz, H2α), 3.83 (m, 0.8H, H5α), 3.48 (s, 0.6H, OCH₃ β), 3.48 (s, 2.4H, OCH₃ α), 3.44 (dd, 0.8H, J_{4α,3α} = J_{4α,5α} = 9.6 Hz, H4α), 3.41-3.36 (m, 1H, H3α, H4β), 3.29 (m, 0.2H, H3β), 1.30 (d, 0.6H, J_{6β,5β} = 6.1 Hz), 1.25 (d, 2. 50

4H, $J_{6\alpha,5\alpha} = 6.1$ Hz, $H_{6\alpha}$). ^{13}C NMR (151 MHz, CD_3OD): δ 95.7 ($\text{C}_{1\alpha}$), 95.3 ($\text{C}_{1\beta}$), 84.5 ($\text{C}_{3\beta}$), 81.8 ($\text{C}_{3\alpha}$), 73.0 ($\text{C}_{4\alpha}$), 72.4 ($\text{C}_{4\beta}$), 73.3 ($\text{C}_{5\beta}$), 69.2 ($\text{C}_{5\alpha}$), 69.0 ($\text{C}_{2\beta}$), 68.8 ($\text{C}_{2\alpha}$), 57.3 ($\text{OCH}_3\alpha$), 57.2 ($\text{OCH}_3\beta$), 18.1 ($\text{C}_{6\alpha}$), 18.1 ($\text{C}_{6\beta}$). $J_{\text{C}1, \text{H}1\alpha} = 172$ Hz, $J_{\text{C}1, \text{H}1\beta} = 162$ Hz. HRMS: m/z $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{NaO}_5[\text{M}+\text{Na}]^+$ の計算値, 201.0733; 実測値, 201.0735. NMRスペクトルは、図5Aに示す。

【0193】

4 - O - ベンジル - 3 - O - メチル - D - ラムノピラノース (14)

化合物6 (1.54 g、4.30 mmol) を4MのHCl及びMeCN (219 mL) の16:10溶液に溶解し、溶液を80℃で3時間加熱した。TLC解析により、3時間後に反応が完了に達したことが示された。次いで、溶液を蒸発させ、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して(溶出液: MeOH/ CH_2Cl_2 、1/5) α/β 混合物(6/5)としての化合物14を透明な油として得た(0.75 g、2.80 mmol、65%)。Rf = 0.25 (EtOAc/ヘキサン, 1/1) ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.36-7.27 (m, 5H, Bn), 5.25 (s, 1H, $\text{H}_{1\alpha}$), 4.85 (d, 1H, $J_{\text{A},\text{B}} = 11.1$ Hz, CHA, OBn), 4.72 (s, 1H, $\text{H}_{1\beta}$), 4.63 (d, 1H, $J_{\text{B},\text{A}} = 10.9$ Hz, CHB, OBn), 4.10-4.08 (m, 2H, $\text{H}_{2\alpha}$, $\text{H}_{2\beta}$), 3.99-3.92 (m, 1H, $\text{H}_{5\alpha}$), 3.62 (dd, 1H, $J_{3\alpha,4\alpha} = 9.1$ Hz, 3.3 Hz, $\text{H}_{3\alpha}$), 3.52, 3.50 (2 x s, 3H, $\text{OCH}_3\alpha/\beta$), 3.38 (dd, 1H, $J_{4\alpha,3\alpha} = 9.4$ Hz, $J_{4\alpha,5\alpha} = 9.4$ Hz, $\text{H}_{4\alpha}$), 3.37-3.31 (m, 3H, $\text{H}_{3\beta}$, $\text{H}_{4\beta}$, $\text{H}_{5\beta}$), 2.56 (br. s, 1H, OH), 2.46 (br. s, 1H, OH), 1.33 (d, 3H, $J_{6\beta,5\beta} = 5.7$ Hz, $\text{H}_{6\beta}$), 1.29 (d, 3H, $J_{6\alpha,5\alpha} = 5.7$ Hz, $\text{H}_{6\alpha}$). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 128.5, 128.4, 128.3, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7 (Bn), 93.9 ($\text{C}_{1\alpha}$), 93.8 ($\text{C}_{1\beta}$), 83.8 ($\text{C}_{3\beta}$), 81.3 ($\text{C}_{3\alpha}$), 79.8 ($\text{C}_{4\alpha}$), 79.3 ($\text{C}_{4\beta}$), 75.2 (CH_2 , Bn), 71.1 ($\text{C}_{5\beta}$), 68.3 ($\text{C}_{2\alpha}$), 68.0 ($\text{C}_{2\beta}$), 67.3 ($\text{C}_{5\alpha}$), 57.5 ($\text{OCH}_3\alpha$), 57.4 ($\text{OCH}_3\beta$), 18.0 (CH_3 , $\text{C}_{6\alpha}$), 17.9 (CH_3 , $\text{C}_{6\beta}$). HRMS m/z $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NaO}_5[\text{M}+\text{Na}]^+$ の計算値, 291.1203; 実測値, 292.1205.

【0194】

p - トリル 2 - アセチル - 4 - O - ベンジル - 3 - O - メチル - 1 - チオ - D - ラムノピラノシド (16)

化合物15 (925 mg、2.63 mmol) を無水 CH_2Cl_2 (20 mL) に溶解し、溶液を0℃に窒素ガス下で冷却した。次いで、チオクレゾール (456 mg、3.67 mmol) の後、三フッ化ホウ素ジエチルエーテラート (452.9 μL 、3.67 mmol) を加えた。反応物を0℃で3時間、完了に達するまで攪拌した。次いで、溶液を CH_2Cl_2 (20 mL) で希釈し、水 (2 x 20 mL) 及び飽和 NaHCO_3 溶液 (1 x 20 mL) で洗浄した。次いで、混合有機層を Na_2SO_4 により乾燥させ、蒸発させてフラッシュクロマトグラフィーにより精製して(溶出液: EtOAc/ヘキサン) α/β 混合物(5/2)としての化合物16を茶色の油として得た(880 mg、2.11 mmol、80%)。Rf = 0.6 (EtOAc/ヘキサン, 3/7) $[\alpha]_{\text{D}}^{25} 23.1$ (c 2.1, CHCl_3) ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.43-7.28 (m, 7H, Bn/Stol), 7.20-7.10 (m, 2H, Stol), 5.71 (d, 0.5H, $J_{2\beta,3\beta} = 2.5$ Hz, $\text{H}_{2\beta}$), 5.56 (dd, 0.5H, $J_{2\alpha,3\alpha} = 1.6$ Hz, 3.2 Hz, $\text{H}_{2\alpha}$), 5.35 (d, 0.5H, $J_{1\alpha,2\alpha} = 1.3$ Hz, $\text{H}_{1\alpha}$), 4.92 (d, 0.5H, $J_{\text{A},\text{B}} = 11.0$ Hz, CHA α , OBn), 4.87 (d, 0.5H, $J_{\text{A},\text{B}} = 11.0$ Hz, CHA β , OBn), 4.75 (s, 0.5H, $\text{H}_{1\beta}$), 4.64 (d x 2, 1H, $J_{\text{B},\text{A}}\alpha$ 及び $J_{\text{B},\text{A}}\beta = 10.7$ Hz, CHB α 及びCHB β , OBn), 4.27-4.20 (m, 0.5H, $\text{H}_{5\alpha}$), 3.65 (dd, 1H, $J_{3\alpha,4\alpha} = 9.3$ Hz, $J_{3\alpha,2\alpha} = 3.3$ Hz, $\text{H}_{3\alpha}$), 3.47 (s, 1.5H, $\text{OCH}_3\alpha$), 3.45 (s, 1.5H, $\text{OCH}_3\beta$), 3.45-3.42 (m, 0.5H, $\text{H}_{4\alpha}$), 3.40-3.34 (m, 1.5H, $\text{H}_{3\beta}$, $\text{H}_{4\beta}$, $\text{H}_{5\beta}$), 2.34 (s, 1.5H, CH_3 , STol β), 2.33 (s, 1.5H, CH_3 , STol α), 2.23 (s, 1.5H, Ac β), 2.15 (s, 1.5H, Ac α), 1.40 (d, 1.5H, $J_{6\beta,5\beta} = 5.5$ Hz, $\text{H}_{6\beta}$), 1.35 (d, 1.5H, $J_{6\alpha,5\alpha} = 6.2$ Hz, $\text{H}_{6\alpha}$). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 170.5 (CO β), 170.3 (CO α), 138.6, 138.5, 138.1, 138.0, 132.3 (

x2), 132.3 (x2), 130.2, 130.2, 129.9 (x2), 129.9, 129.1, 128.5 (x2), 128.5, 128.3, 128.1, 128.0 (x2), 127.8, 127.8, 125.4 (Ar), 86.5 (C1 α), 85.8 (C1 β), 84.0 (C3 β), 80.5 (C3 α), 80.4 (C4 α), 79.3 (C4 β), 76.1 (C5 β), 75.4 (CH₂, Bn α , Bn β), 70.4 (C2 α), 70.0 (C2 β), 68.9 (C5 α), 57.8 (OCH₃ β), 57.7 (OCH₃ α), 21.2 (CH₃, StOI β), 21.2 (CH₃, StOI α), 21.1 (Ac α), 20.9 (Ac β), 18.3 (C6 β), 17.9 (C6 α). J_{C1, H1 α} = 169 Hz, J_{C1, H1 β} = 154 Hz, ESI-MS: m/z C₂₃H₂₈NaO₅S[M+Na]⁺の計算値, 439.1550; 実測値, 439.1545.

【0195】

1, 2 - ジアセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (17)

10

化合物15 (450 mg、1.28 mmol) を MeOH 10.0 mL に溶解し、溶液を炭素担持水酸化パラジウム (40 mg、0.28 mmol) により帯電させた。溶液を水素ガスのバルーンで5分間通気し、水素ガス雰囲気下で3時間、完了に達するまで攪拌した。次いで、溶液をセライトにより濾過し、蒸発させて純粋な17を透明な油として得た (323 mg、1.23 mmol、96%)。R_f = 0.25 (EtOAc/ヘキサン, 1/1) [α]_D²⁵ -21.2 (c 3.4, CHCl₃) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.96 (s, 1H, H1), 5.24 (d, 1H, J_{2,1} = 2.0 Hz, H2), 3.76-3.67 (m, 1H, H5), 3.48 (dd, 1H, J_{4,5} = 9.4 Hz, J_{4,3} = 9.4 Hz, H4), 3.43 (dd, 1H, J_{3,2} = 3.2 Hz, J_{3,4} = 9.5 Hz, H3), 3.37 (s, 3H, OCH₃), 2.96 (br. s, 1H, OH), 2.08, 2.07 (2x s, 6H, CH₃), 1.28 (d, 3H, J_{6,5} = 6.3, H6) ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 169.9, 168.5 (2x C=O), 91.2 (C1), 79.3 (C3), 71.1 (C4), 70.4 (C5), 66.4 (C2), 57.4 (OCH₃), 20.9, 20.7 (2x Ac), 17.7 (C6). J_{C1, H1} = 170 Hz, LRMS m/z C₁₁H₁₈NaO₇ [M+Na]⁺の計算値, 285.1; 実測値, 285.1.

20

【0196】

2 - O - アセチル - 4 - O - ベンジル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 1, 2 - O - ジアセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (18 di)

化合物16 (615 mg、1.48 mmol) 及び化合物17 (323 mg、1.23 mmol) をトルエンとともに同時蒸発させ (5 $\times$ 10 mL)、高真空下で一晩乾燥させた。無水CH₂Cl₂ (20 mL) を加えた後、0.6 g を活性化粉末3 分子篩にかけた。次いで、反応物を -78 に窒素ガス雰囲気下で冷却し、N - ヨードスクシンイミド (406 mg、1.80 mmol) の後、トリフルリン酸 (20 μ L、226 μ mol) を加えた。反応物を3時間、完了に達するまで攪拌した。次いで、反応物をプフナー漏斗により濾過し、CH₂Cl₂ 20 mL で希釈し、10%のNa₂S₂O₃ (2 $\times$ 20 mL) 及び飽和NaHCO₃ 溶液 (1 $\times$ 20 mL) で洗浄した。次いで、有機層をNa₂SO₄ により乾燥させ、濾過し、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して (溶出液: EtOAc/ヘキサン) 化合物18 di を透明な油として得た (363 mg、655 μ mol、53%)。R_f = 0.55 (EtOAc/ヘキサン, 1/1) [α]_D²⁵ 183 (c 18.7, CHCl₃) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.40-7.16 (m, 5H, Bn), 6.02 (d, 1H, J_{1,2} = 1.7 Hz, H1), 5.39 (dd, 1H, J_{2',3'} = 1.9 Hz, 3.0 Hz, H2'), 5.31 (dd, 1H, J_{2,1} = 1.7, 1.7 Hz, H2), 5.17 (d, 1H, J_{1',2'} = 1.7 Hz, H1'), 4.92 (d, 1H, J_{A,B} = 10.9 Hz, CHA, OBn), 4.65 (d, 1H, J_{B,A} = 10.9 Hz, CHB, OBn), 3.88-3.81 (m, 1H, H5), 3.79-3.72 (m, 1H, H5'), 3.64-3.59 (m, 3H, H3, H3', H4), 3.48, 3.45 (2x s, 6H, OCH₃), 3.40 (dd, 1H, J_{4',5'} = J_{4',3'} = 9.5 Hz, H4'), 2.17, 2.16, 2.15 (3 x s, 9H, Ac), 1.35 (d, 3H, J_{6',5'} = 6.2 Hz, H6'), 1.34 (d, 3H, J_{6,5} = 6.1 Hz, H6). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.2, 170.0, 168.6 (3 x C=O), 138.5, 128.5 (x2), 128.1 (x2), 127.8 (Bn), 99.5 (C1'), 91.1 (C1), 80.0 (C4, C3'), 79.9 (C4'), 77.9 (C3), 75.5 (CH₂, Bn), 69.3 (C5'), 68.7 (C5), 68.6 (C2'), 66.9 (C2), 57.6, 57.6 (2x OCH₃), 21.2, 21.0, 20.9 (3 x Ac), 18.3 (C6), 18.0 (C6'). J_{C1, H1} = 173 Hz, J_{C1', H1'} = 179 Hz LRMS m/

30

40

50

z $C_{27}H_{38}NaO_{12}$ $[M+Na]^+$ の計算値, 577.2; 実測値, 577.9.

【0197】

2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 1, 2 - O - ジアセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (19 di)

17 と同一の手順。化合物 18 di (363 mg、655 μ mol)、炭素担持水酸化パラジウム (40 mg、285 μ mol)、MeOH (10 mL)。化合物 19 di (273 mg、588 μ mol、92%) を透明な油として単離した。Rf = 0.2 (EtOAc/ヘキサン, 1/1) $[\alpha]_D^{25}$ 44 (c 4.3, CHCl₃) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.93 (d, 1H, J_{1,2} = 1.6 Hz, H1), 5.31 (dd, 1H, J_{2,1} = 1.9 Hz, J_{2,3} = 2.8 Hz, H2'), 5.22 (m, 1H, H2), 5.09 (d, 1H, J_{1',2'} = 1.7 Hz, H1'), 3.76-3.66 (m, 2H, H5, H5'), 3.54-3.51 (m, 2H, H3, H4), 3.44 (dd, 1H, J_{4',5'} = 9.4 Hz, J_{4',3'} = 9.4 Hz, H4'), 3.35, 3.34 (2 x s, 6H, OCH₃), 3.34-3.29 (m, 1H, H3'), 2.88 (br. s, 1H, OH), 2.08, 2.06, 2.05 (3 x s, 9H, Ac), 1.29-1.25 (m, 6H, H6', H6). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.1, 170.0, 168.5 (3 x C=O), 99.7 (C1'), 91.0 (C1), 79.9 (C4), 79.4 (C3'), 77.5 (C3), 71.4 (C4'), 69.2 (C5'), 69.0 (C5), 67.4 (C2), 66.8 (C2'), 57.5, 57.2 (OCH₃), 21.0, 20.9, 20.8 (3 x Ac), 18.2 (C6), 17.5 (C6'). J_{C1,H1} = 173 Hz, J_{C1',H1'} = 168 Hz LRMS m/z $C_{20}H_{32}NaO_{12}$ $[M+Na]^+$ の計算値, 487.2; 実測値, 486.9.

【0198】

2 - O - アセチル - 4 - O - ベンジル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 1, 2 - O - ジアセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (18 トリ)

化合物 16 (243 mg、584 μ mol) 及び化合物 19 di (226 mg、487 μ mol) をトルエン (5 x 10 mL) とともに同時蒸発させ、高真空下で一晩乾燥させた。無水 CH₂Cl₂ (10 mL) を加えた後、0.3 g を活性化粉末 3 分子篩にかけた。次いで、反応物を -78 に窒素ガス雰囲気下で冷却し、N - ヨードスクシンイミド (161 mg、715 μ mol) の後、トリフルリン酸 (10 μ L、115 μ mol) を加えた。反応物を 3 時間、完了に達するまで攪拌した。次いで、反応物をブフナー漏斗により濾過し、CH₂Cl₂ 20 mL で希釈し、10% の Na₂S₂O₃ (2 x 10 mL) 及び飽和重炭酸ナトリウム溶液 (1 x 10 mL) で洗浄した。次いで、有機層を Na₂SO₄ により乾燥させ、濾過し、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して (溶出液: EtOAc/ヘキサン) 化合物 18 トリを透明な油として得た (254 mg、336 μ mol、69%)。Rf = 0.55 (EtOAc/ヘキサン, 1/1), $[\alpha]_D^{25}$ 157 (c 15, CHCl₃) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.36-7.25 (m, 5H, Bn), 5.98 (d, 1H, J_{1,2} = 1.7 Hz, H1), 5.36-5.32 (m, 2H, H2', H2''), 5.28 (m, 1H, H2), 5.11 (m, 2H, H1', H1''), 4.87 (d, 1H, J_{A,B} = 10.9 Hz, CHA, OBn), 4.62 (d, 1H, J_{B,A} = 10.9 Hz, CHB, OBn), 3.85-3.78 (m, 1H, H5''), 3.78-3.70 (m, 2H, H5', H5), 3.60-3.54 (m, 3H, H3', H3'', H4), 3.54-3.47 (m, 2H, H3, H4'), 3.43 (s, 3H, OCH₃), 3.39 (s, 6H, OCH₃ x 2), 3.36 (dd, 1H, J_{4'',3''} = 9.6 Hz, H4''), 2.12 (s, 6H, Ac x 2), 2.11 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 3H, Ac), 1.31 (d, 3H, J_{6'',5''} = 6.2 Hz, H6''), 1.30 (d, 3H, J_{6,5} = 6.3 Hz, H6), 1.29 (d, 3H, J_{6',5'} = 6.3 Hz, H6'). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.1, 170.0, 169.9, 168.4 (C=O), 138.5, 128.4 (x2), 128.0 (x2), 127.7 (Bn), 99.4 (C1'), 99.3 (C1''), 91.0 (C1), 79.9 (C4''), 79.9 (C3), 79.8 (C3'), 79.8 (C3''), 78.2 (C4'), 78.0 (C4), 75.3 (CH₂, Bn), 69.1 (C5), 68.6 (C2'), 68.4 (C2''), 67.8 (C5'), 67.8 (C5''), 66.7 (C2), 57.5 (OCH₃), 57.2 (OCH₃), 21.1, 21.0, 20.9, 20.8 (Ac), 18.2 (C6''), 18.0 (C6'), 17.8 (C6) J_{C1,H1} = 179 Hz, J_{C1',H1'} = 179 Hz, J_{C1'',H1''} = 179 Hz HRMS m/z $C_{36}H_{52}NaO_{17}$ $[M+Na]^+$ の計算値, 779.3102; 実測値, 779.3079.

【0199】

2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 1, 2 - O - ジアセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (19トリ)

17と同一の手順。化合物18トリ(228mg、301 μ mol)、炭素担持水酸化パラジウム(40mg、285 μ mol)、MeOH(10mL)。化合物19トリ(195.5mg、293 μ mol、97%)を透明な油として単離した。Rf = 0.25 (EtOAc/ヘキサン, 1/1) $[\alpha]_D^{25}$ 118 (c 13.3, CHCl₃) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5.98 (d, 1H, J_{1,2} = 1.4 Hz, H1), 5.36-5.32 (m, 2H, H2', H2''), 5.2 (m, 1H, H2), 5.14 (d, 1H, J_{1',2'} = 0.9 Hz, H1'), 5.10 (d, 1H, J_{1'',2''} = 1.2 Hz, H1''), 3.82-3.72 (m, 3H, H5, H5', H5''), 3.58-3.52 (m, 3H, H3, H3', H4'), 3.52-3.47 (m, 2H, H3'', H4''), 3.40, 3.39, 3.38 (3x s, 3H, OCH₃), 3.41-3.36 (m, 1H, H4), 2.48 (br. s, 1H, OH), 2.13 (s, 3H, Ac), 2.11 (s, 3H, Ac), 2.09 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 3H, Ac), 1.35-1.29 (m, 9H, H6, H6', H6''). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.1, 170.1, 170.0, 168.5 (4x C=O), 99.6 (C1'), 99.5 (C1''), 91.1 (C1), 80.0 (C3''), 79.9 (C3), 79.4 (C3'), 78.1 (C4), 78.0 (C4'), 71.6 (C4''), 69.2 (C5), 68.9 (C5'), 67.9 (C5''), 67.8 (C2''), 67.4 (C2'), 66.8 (C2), 57.6, 57.3, 57.2 (3x OCH₃), 21.1(x2), 21.0, 20.9 (4x Ac), 18.3 (C6''), 18.1 (C6'), 17.6 (C6). J_{C1,H1} = 172 Hz, J_{C1',H1'} = 171 Hz, J_{C1'',H1''} = 171 Hz LRMS m/z C₂₉H₄₆NaO₁₇ [M+Na]⁺の計算値, 689.3; 実測値, 688.8.

10

20

【0200】

2 - O - アセチル - 4 - O - ベンジル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 1, 2 - O - ジアセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (18テトラ)

化合物16(146mg、351 μ mol)及び化合物19トリ(195mg、293 μ mol)をトルエン(5 $\times$ 10mL)とともに同時蒸発させ、高真空下で一晩乾燥させた。無水CH₂Cl₂(10mL)を加えた後、0.2gを活性化粉末3分子篩にかけた。次いで、反応物を-78に窒素ガス雰囲気下で冷却し、N-ヨードスクシンイミド(96.5mg、429 μ mol)の後、トリフルリン酸(5 μ L、57.5 μ mol)を加えた。反応物を3時間、完了に達するまで攪拌した。次いで、反応物をブフナー漏斗により濾過し、CH₂Cl₂ 10mLで希釈し、10%のNa₂S₂O₃(2 $\times$ 5mL)及び飽和NaHCO₃溶液(1 $\times$ 5mL)で洗浄した。次いで、有機層をNa₂SO₄により乾燥させ、濾過し、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して(溶出液: EtOAc/ヘキサン)化合物18テトラを透明な油として得た(149.7mg、156 μ mol、53%)。Rf = 0.55 (EtOAc/ヘキサン, 1/1) $[\alpha]_D^{25}$ 54.7 (c 5.0, CHCl₃) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.37-7.26 (m, 5H, Bn), 5.99 (d, 1H, J_{1,2} = 1.7 Hz, H1), 5.37-5.32 (m, 3H, H2', H2'', H2'''), 5.28 (m, 1H, H2), 5.11 (s, 3H, H1', H1'', H1'''), 4.86 (d, 1H, J_{A,B} = 10.9 Hz, CHA, OBn), 4.62 (d, 1H, J_{B,A} = 10.9 Hz, CHB, OBn), 3.85-3.71 (m, 4H, H5, H5', H5'', H5'''), 3.61-3.53 (m, 4H, H3, H4, H4', H4''), 3.53-3.49 (m, 3H, H3', H3'', H3'''), 3.44, 3.40, 3.39, 3.38 (4x s, 12H, OCH₃), 3.37-3.31 (m, 1H, H4'''), 2.13, 2.12 (2x s, 6H, Ac), 2.11, 2.08, 2.07 (3x s, 9H, Ac), 1.34 (d, 3H, J_{6,5} = 6.2 Hz, H6), 1.31 (d, 3H, J_{6',5'} = 6.3 Hz, H6'), 1.30 (d, 3H, J_{6'',5''} = 6.3 Hz, H6''), 1.28 (d, 3H, J_{6''',5'''} = 6.3 Hz, H6'''). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.1, 170.0, 170.0, 169.9, 168.5 (C=O), 138.5, 128.4(x2), 128.0(x2), 127.8, (Bn), 99.5 (C1'''), 99.4 (C1''), 99.3 (C1'), 91.0 (C1), 80.0 (C3), 80.0 (C3'), 79.8 (C3'', C3'''及びC4'''), 78.3 (C4), 78.1 (C4'及びC4''), 75.4 (CH₂, Bn), 69.1 (C5), 68.6 (C2'''), 68.4 (C5'''), 67.9 (C2''), 67.8 (C2'), 67.7 (C5'), 67.7 (C5''), 66.8 (C2), 57.5, 57.5, 57.3, 57.2 (4x

30

40

50

OCH₃), 21.1, 21.0, 21.0, 21.0, 20.9 (5x Ac), 18.3 (C6), 18.1 (C6'), 18.1 (C6''), 18.0 (C6'''). J_{C1,H1} = 185 Hz, J_{C1',H1'} = 179 Hz, J_{C1'',H1''} = 179 Hz, J_{C1''',H1'''} = 179 Hz, HRMS m/z C₄₅H₆₆NaO₂₂[M+Na]⁺の計算値, 981.3943; 実測値, 981.3910.

【0201】

2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 1, 2 - O - ジアセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (19 テトラ)

17 と同一の手順。化合物 18 テトラ (110 mg、114.7 μmol)、炭素担持水酸化パラジウム (20.0 mg、143 μmol)、MeOH (10 mL)。化合物 19 テトラ (95.6 mg、110.0 μmol、96%) を白色の固体として単離した。R_f = 0.40 (EtOAc/ヘキサン, 1/1) [α]_D²⁵ 52.40 (c 4.78, CHCl₃) ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 5.96 (d, 1H, J_{1,2} = 1.6 Hz, H1), 5.41 (dd, 1H, J_{2',1'} = 3.0 Hz, J_{2',3'} = 5.6 Hz, H2'), 5.40 (dd, 1H, J_{2'',1''} = 3.0 Hz, J_{2'',3''} = 5.1 Hz, H2''), 5.37 (s, 1H, H2'''), 5.33 (dd, J_{2,1} = 3 Hz, J_{2,3} = 5.8 Hz, H2), 5.08 (m, 2H, H1', H1''), 5.07 (m, 1H, H1'''), 3.88-3.80 (m, 3H, H5, H5', H5''), 3.80-3.73 (m, 1H, H5'''), 3.69 (dd, 1H, J_{3,2} = 3.9 Hz, J_{3,4} = 11.2 Hz, H3), 3.61-3.55 (m, 2H, H3', H3''), 3.55-3.45 (m, 3H, H4, H4', H4''), 3.42-3.32 (m, 2H, H3''', H4'''), 3.41 (2 x s, 3H, OCH₃), 3.40 (2 x s, 3H, OCH₃), 2.15, 2.13, 2.11, 2.11, 2.09 (5 x s, 15H, Ac), 1.34-1.26 (m, 12H, H6, H6', H6'', H6'''). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD/CDCl₃, 1/1): δ 171.0, 170.9, 170.9, 170.7, 169.3 (C=O), 99.9 (C1'''), 99.8 (C1''), 99.8 (C1'), 91.4 (C1), 80.4 (C3'''), 80.3 (C3''), 80.2 (C3'), 79.4 (C3'''), 78.9 (C4), 78.8 (C4'), 78.5 (C4''), 71.8 (C4'''), 69.8 (C5'''), 69.5 (C5), 68.6 (C2'''), 68.5 (C2'), 68.4 (C2''), 68.2 (C5', C5''), 67.3 (C2), 57.7 (x2), 57.5 (x2) (4 x OCH₃), 21.0, 21.0, 21.0, 20.9, 20.9 (5 x Ac), 18.5 (C6'), 18.3 (C6''), 18.2 (C6'''), 17.6 (C6) J_{C1,H1} = 179 Hz, J_{C1',H1'} = 177 Hz, J_{C1'',H1''} = 177 Hz, J_{C1''',H1'''} = 176 Hz HRMS m/z C₃₈H₆₀NaO₂₂ [M+Na]⁺の計算値, 891.3474; 実測値, 891.3429.

【0202】

2 - O - アセチル - 4 - O - ベンジル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 1, 2 - O - ジアセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (18 ペンタ)

化合物 16 (37.4 mg、89.9 μmol) 及び化合物 19 テトラ (48.8 mg、56.2 μmol) をトルエン (5 x 10 mL) とともに同時蒸発させ、高真空下で一晩乾燥させた。無水 CH₂Cl₂ (5 mL) を加えた後、50 mg を活性化粉末 3 分子篩にかけた。次いで、反応物を 78 に窒素ガス雰囲気下で冷却し、N - ヨードスクシンイミド (24.7 mg、109.8 μmol) の後、トリフルリン酸 (10 μL、113 μmol) を加えた。反応物を 3 時間、完了に達するまで攪拌した。次いで、反応物をブフナー漏斗により濾過し、CH₂Cl₂ 10 mL で希釈し、10% の Na₂S₂O₃ (2 x 5 mL) 及び飽和 NaHCO₃ 溶液 (1 x 5 mL) で洗浄した。次いで、有機層を Na₂SO₄ により乾燥させ、濾過し、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して (溶出液: EtOAc/ヘキサン) 化合物 18 ペンタを透明な油として得た (35.6 mg、30.7 μmol、55%)。R_f = 0.70 (EtOAc/ヘキサン, 7/3) [α]_D²⁵ 22.26 (c 1.75, CHCl₃) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.36-7.26 (m, 5H, Bn), 5.98 (d, 1H, J_{1,2} = 1.5 Hz, H1), 5.35-5.31 (m, 4H, H2', H2'', H2''', H2'''), 5.27 (s, 1H, H2), 5.10 (s, 4H, H1', H1'', H1''', H1'''), 4.86 (d, 1H, J_{A,B} =

10.9 Hz, CHA, OBn), 4.61 (d, 1H, $J_{B,A} = 10.9$ Hz, CHB, OBn), 3.84-3.70 (m, 5H, H5, H5', H5'', H5''', H5'''), 3.60-3.51 (m, 5H, H3, H4, H4', H4'', H3'''), 3.51-3.46 (m, 4H, H3', H3'', H3''', H4'''), 3.43, 3.39 (2 x s, 3H, OCH₃), 3.38 (s, 6H, OCH₃ x2), 3.37 (s, 3H, OCH₃), 3.37-3.31 (m, 1H, H4'''), 2.12, 2.12, 2.11, 2.08 (4 x s, 12H, Ac), 2.07 (s, 6H, Ac x2), 1.36-1.26 (m, 15H, H6, H6', H6'', H6''', H6'''). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.2, 170.1, 170.1, 170.0, 169.9, 168.5 (C=O), 138.5, 128.4 (x2), 128.0 (x2), 127.8 (Bn), 99.5 (C1'''), 99.4 (C1''), 99.4 (C1'), 99.3 (C1'''), 91.0 (C1), 80.0 (C3'''), 80.0 (C3), 79.9 (C3'), 79.9 (C3'', C3''', C4'''), 78.3 (C4), 78.3 (C4'), 78.2 (C4''), 78.1 (C4'''), 75.4 (CH₂, Bn), 69.1 (C5), 68.7 (C2'''), 68.4 (C5'''), 67.9 (C2''), 67.9 (C2'''), 67.8 (C2'), 67.8 (C5'), 67.7 (C5'', C5'''), 66.8 (C2), 57.5, 57.5, 57.3, 57.3, 57.2 (5 x OCH₃), 21.1, 21.1, 21.0, 21.0, 21.0, 20.9 (6x Ac), 18.3 (C6), 18.1 (C6'), 18.1 (C6''), 18.1 (C6'''), 17.9 (C6''') J_{C1,H1} = 174 Hz, J_{C1',H1'} = 177 Hz, J_{C1'',H1''} = 177 Hz, J_{C1''',H1'''} = 177 Hz, J_{C1''',H1'''} = 177 Hz HRMS m/z C₅₄H₈₀NaO₂₇[M+Na]⁺の計算値, 1183.4785; 実測値, 1180.4753.

10

20

30

40

50

【0203】

2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 1, 2 - O - ジアセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (19ペンタ)

17と同一の手順。化合物18ペンタ(35.0mg、30.1μmol)、炭素担持水酸化パラジウム(15.0mg、105.0μmol)、MeOH(5mL)。化合物19ペンタ(32.2mg、30.1μmol、100%)を白色の固体として単離した。R_f = 0.45 (EtOAc/ヘキサン, 7/3) [α]_D²⁵ 19.6 (c 1.66, CD₃OD) ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 5.97 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.4$ Hz, H1), 5.34-5.29 (m, 4H, H2', H2'', H2''', H2'''), 5.26 (s, 1H, H2), 5.12 (s, 1H, H1'''), 5.09 (s, 3H, H1', H1'', H1'''), 3.81-3.72 (m, 5H, H5, H5', H5'', H5''', H5'''), 3.57-3.35 (m, 4H, H3, H4', H4'', H4'''), 3.51-3.44 (m, 5H, H4, H4''', H3', H3'', H3'''), 3.38 (2 xs, 3H, OCH₃), 3.37 (s, 6H, OCH₃), 3.36 (s, 3H, OCH₃ x2), 3.37-3.31 (m, 1H, H3'''), 2.12, 2.12, 2.10, 2.08, 2.07 (4 x s, 12H, Ac), 2.06 (s, 6H, Ac x2), 1.35-1.25 (m, 15H, H6, H6', H6'', H6''', H6'''). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 170.1 (x2), 170.1, 170.1, 170.0, 168.5 (C=O), 99.6 (C1'''), 99.6 (C1''), 99.5 (C1'), 99.4 (C1'''), 91.1 (C1), 80.1 (C3''), 80.0 (C3'), 80.0 (C3), 79.9 (C3'''), 79.4 (C3'''), 78.3 (C4'), 78.3 (C4''), 78.2 (C4'''), 78.1 (C4), 71.6 (C4'''), 69.2 (C5), 68.9 (C5'''), 68.0 (C2'''), 68.0 (C2''), 67.9 (C2'''), 67.8 (C2'), 67.8 (C5'), 67.7 (C5''), 67.5 (C5'''), 66.8 (C2), 57.6, 57.3, 57.3, 57.3, 57.2 (5 x OCH₃), 21.1 (x2), 21.1, 21.0 (x2), 20.9 (6x Ac), 18.3 (C6), 18.2 (C6', C6'', C6'''), 18.1 (C6''') LRMS m/z C₄₇H₇₄NaO₂₇[M+Na]⁺の計算値, 1093.4; 実測値, 1093.8.

【0204】

3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 3 - O - メチル - D - ラムノピラノース (二糖)

化合物18di(18mg、38.7μmol)をMeOH(5mL)に溶解し、ナトリウム金属(1mg)を反応混合物に加えた。16時間後、レキシン(rexin)-H⁺をpH5が得られるまで混合物に加えた。次いで、混合物を濾過し、蒸発させて、更なる精製は行わずに二糖化合物を得た(13.1mg、38.7μmol、収率100%)。R_f = 0.5 (MeOH/CH₂Cl₂, 1/5) ¹H NMR(600 MHz, CD₃OD): δ 5.08 (d, 1H, $J_{1',2} = 1.8$ Hz, H1'), 4.99 (d, 0.8H, $J_{1\alpha,2} = 1.7$ Hz, H1 α), 4.65 (d, 0.

2H, $J_{1\beta,2} = 0.9$ Hz, H1 β), 4.04 (dd, 1H, $J_{2',1'} = 1.9$ Hz, $J_{2',3'} = 3.1$ Hz, H2'), 3.99 (dd, 0.2H, $J_{2\beta,1\beta} = 1.1$ Hz, $J_{2\beta,3\beta} = 3.9$ Hz, H2 β), 3.96 (dd, 0.8H, $J_{2\alpha,1\alpha} = 1.9$ Hz, $J_{2\alpha,3\alpha} = 2.9$ Hz, H2 α), 3.82 (m, 0.8H, H5 α), 3.68 (m, 1H, H5'), 3.51 (dd, 0.8H, $J_{4\alpha,5\alpha} = 3.0$ Hz, $J_{4\alpha,3\alpha} = 9.3$ Hz, H4 α), 3.48 (m, 0.2H, H4 β) 3.46 (dd, 0.8H, $J_{3\alpha,2\alpha} = 3.0$ Hz, $J_{3\alpha,4\alpha} = 9.3$ Hz, H3 α), 3.42-3.40 (m, 4H, H4'及びOCH₃'), 3.38 (s, 3H, OCH₃), 3.31 (m, 0.2H, H5 β), 3.24 (dd, 1H, $J_{3',2'} = 3.2$ Hz, $J_{3',4'} = 9.4$ Hz, H3'), 3.23 (m, 0.2H, H3 β), 1.34 (d, 0.6H, $J_{6\beta,5\beta} = 6.0$ Hz, H6 β) 1.24 (d, 2.4H, $J_{6\alpha,5\alpha} = 6.3$ Hz, H6 α), 1.20 (d, 3H, $J_{6',5'} = 6.4$ Hz, H6'). ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 103.2 (C1'), 95.5 (C1 α), 95.4 (C1 β), 85.5 (C3 β), 83.0 (C3 α), 82.0 (C3'), 79.8 (C4 α), 79.2 (C4 β), 72.6 (C4'), 72.0 (C5 β), 70.5 (C5'), 68.5 (C2 α), 68.4 (C2 β 及びC2'), 67.8 (C5 α), 57.3 (OCH₃'), 56.7 (OCH₃ α), 56.5 (OCH₃ β), 18.8 (C6 α 及びC6 β), 17.9 (C6'). $J_{C1',H1'\alpha} = 173$ Hz, $J_{C1,H1\alpha} = 172$ Hz, $J_{C1,H1\beta} = 165$ Hz. NMRスペクトルは、図17に示す。

10

【0205】

3-O-メチル- α -D-ラムノピラノシド-(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-メチル- α -D-ラムノピラノシド-(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-メチル- α -D-ラムノピラノース(三糖)

化合物19トリ(25 mg、37.5 μ mol)を無水MeOH 10 mLに溶解し、溶液を窒素ガス雰囲気下で攪拌した。次いで、ナトリウム金属(10.0 mg、0.44 mmol)を加え、反応物を攪拌した後、完了に達したことをTLCにより確認した。次いで、溶液をレキシンにより中和し、セライトにより濾過し、蒸発させて三糖化合物を透明な固体として得た(18.1 mg、36.3 μ mol、97%)。Rf = 0.45 (MeOH/CH₂Cl₂, 1/4) [α]_D²⁵ 16.754 (c 1.4, MeOH) ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 5.16 (m, 2H, H1'及びH1''), 5.07 (d, 0.8H, $J_{1\alpha,2} = 1.6$ Hz, H1 α), 4.65 (d, 0.2H, $J_{1\beta,2} = 0.6$ Hz, H1 β), 4.12 (dd, 1H, $J_{2',1'} = 2.2$ Hz, $J_{2',3'} = 2.6$ Hz, H2'), 4.11 (dd, 1H, $J_{2'',1''} = 1.9$ Hz, $J_{2'',3''} = 3.0$ Hz, H2''), 4.07 (dd, 0.2H, $J_{2\beta,1\beta} = 0.9$ Hz, $J_{2\beta,3\beta} = 2.9$ Hz, H2 β), 4.04 (dd, 1H, $J_{2\alpha,1\alpha} = 2.0$ Hz, $J_{2\alpha,3\alpha} = 2.8$ Hz, H2 α), 3.90 (m, 0.8H, H5 α), 3.80 (m, 1H, H5') 3.74 (m, 1H, H5''), 3.62 (dd, 1H, $J_{4\alpha,5\alpha} = J_{4\alpha,3\alpha} = 9.2$ Hz, H4'), 3.58 (dd, 0.8H, $J_{4\alpha,5\alpha} = J_{4\alpha,3\alpha} = 9.3$ Hz, H4 α), 3.56-3.49 (m, 1H, H3 α 及びH4 β), 3.45 (m, 1H, H3'), 3.49-3.48 (m, 4H, OCH₃'', H4''), 3.46 (s, 3H, OCH₃'), 3.45 (s, 3H, OCH₃), 3.39 (m, 0.2H, H5 β), 3.33-3.29 (dd, 1.2H, $J_{3'',4''} = 3.0$ Hz, $J_{3'',4''} = 9.5$ Hz, H3''及びH3 β), 1.35 (d, 0.6H, $J_{6\beta,5\beta} = 6.0$ Hz, H6 β), 1.32 (d, 3H, $J_{6',5'} = 6.4$ Hz, H6'), 1.29 (d, 2.4H, $J_{6\alpha,5\alpha} = 6.3$ Hz, H6 α), 1.28 (d, 3H, $J_{6'',5''} = 6.2$ Hz, H6''). ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 103.2 (C1''), 103.2 (C1'), 95.5 (C1 α), 95.4 (C1 β), 85.4 (C3 β), 83.1 (C3'), 82.9 (C3 α), 82.0 (C3''), 80.0 (C4 α), 79.4 (C4 β), 79.3 (C4'), 72.6 (C4''), 71.9 (C5 β), 70.5 (C5''), 69.0 (C5'), 68.6 (C2 β), 68.5 (C2 α), 68.3 (C2''), 68.0 (C2'), 67.7 (C5 α), 57.3 (OCH₃''), 56.7 (OCH₃ α), 57.6 (OCH₃'), 56.5 (OCH₃ β), 18.8 (C6'及びC6 β), 18.6 (C6 α), 17.9 (C6''). $J_{C1',H1'\alpha} = J_{C1'',H1''} = 173$ Hz, $J_{C1\alpha,H1\alpha} = 172$ Hz, $J_{C1\beta,H1\beta} = 163$ Hz $J_{C1',H1'\alpha} = 170$ Hz LRMS m/z C₂₁H₃₈NaO₁₃[M+Na]⁺の計算値, 521.2; 実測値, 521.2. NMRスペクトルは、図18に示す。

20

30

40

【0206】

3-O-メチル- α -D-ラムノピラノシド-(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-メチル- α -D-ラムノピラノシド-(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-メチル- α -D-ラムノピラノシド-(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-メチル- α -D-ラムノピラノース(四糖)

化合物19テトラ(22.6 mg、26.0 μ mol)を無水MeOH 10 mLに溶解し、溶液を窒素ガス雰囲気下で攪拌した。次いで、ナトリウム金属(10 mg、0.44 mmol)を加え、反応物を攪拌した後、完了に達したことをTLCにより確認した。

50

次いで、溶液をレキシン - H^+ 樹脂により中和し、セライトにより濾過し、蒸発させて四糖化合物を透明な固体として得た (15.9 mg、24.1 μmol 、93%)。Rf = 0.45 (MeOH/CH₂Cl₂, 1/4) [α]_D²⁵ 7.7 (c 0.63, MeOH) ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 5.08 (m, 3H, H1', H1'', H1'''), 5.00 (d, 0.8H, J_{1 α ,2} = 1.8 Hz, H1 α), 4.66 (d, 0.2H, J_{1 β ,2} = 0.8 Hz, H1 β), 4.05 (m, 2H, J_{2',1'} = 2.2 Hz, J_{2',3'} = 2.6 Hz, H2' 及び H2''), 4.04 (dd, 1H, J_{2'',1''} = 1.9 Hz, J_{2'',3''} = 3.0 Hz, H2'''), 4.01 (dd, 0.2H, J_{2 β ,1 β} = 0.8 Hz, J_{2 β ,3 β} = 3.0 Hz, H2 β), 3.96 (dd, 1H, J_{2 α ,1 α} = 1.9 Hz, J_{2 α ,3 α} = 2.8 Hz, H2 α), 3.83 (m, 0.8H, H5 α), 3.76-3.69 (m, 2H, H5' 及び H5''), 3.67 (m, 1H, H5'''), 3.56-3.53 (m, 2H, H4' 及び H4''), 3.51 (dd, 0.8H, J_{4 α ,5 α} = J_{4 α ,3 α} = 9.3 Hz, H4 α), 3.52-3.49 (m, 1H, H3 α 及び H4 β), 3.46 (dd, J_{3',2'} = 3.0 Hz, J_{3',4'} = 9.3 Hz, 1H, H3'), 3.42-3.40 (m, 4H, OCH₃''', H4'''), 3.40-3.35 (s, 11H, OCH₃', OCH₃'', OCH₃, H3'' 及び H3'), 3.33 (m, 0.2H, H5 β), 3.25-3.22 (m, 1.2H, H3''' 及び H3 β), 1.28-1.21 (m, 9H, H6 β , H6', H6 α 及び H6''), 1.20 (d, 3H, J_{6''',5'''} = 6.2 Hz, H6'''). ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 103.2 (C1'''), 103.0 (C1''), 103.0 (C1') 95.5 (C1 α), 95.4 (C1 β), 85.4 (C3 β), 83.0 (C3'), 83.0 (C3'') 82.9 (C3 α), 82.0 (C3'''), 80.0 (C4 α), 79.7 (C4 β), 79.4 (C4'), 79.2 (C4''), 72.6 (C4'''), 71.9 (C5 β), 70.5 (C5'''), 69.0 (C5'), 68.9 (C5''), 68.6 (C2 β), 68.2 (C2 α), 68.3 (C2'''), 68.0 (C2' 及び C2''), 67.7 (C5 α), 57.3 (OCH₃'''), 56.7 (OCH₃ α), 56.7 (OCH₃'), 56.6 (OCH₃''), 56.5 (OCH₃ β), 18.8 (C6 α), 18.7 (C6 β), 18.5 (C6' 及び C6''), 17.9 (C6'''). J_{C1', H1'} = J_{C1'', H1''} = J_{C1''', H1'''} = 173 Hz, J_{C1 α , H1 α} = 174 Hz, J_{C1 β , H1 β} = 162 Hz, LRMS m/z C₂₈H₅₀N aO₁₇[M+Na]⁺の計算値, 681.3; 実測値, 680.9. NMR スペクトルは、図 19 に示す。

【0207】

3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノース (五糖)

化合物 19 ペンタ (33.1 mg、30.9 μmol) を無水 MeOH 10.0 mL に溶解し、溶液を窒素ガス雰囲気下で攪拌した。次いで、ナトリウム金属 (10.0 mg、0.44 mmol) を加え、反応物を攪拌した後、完了に達したことを TLC により確認した。次いで、溶液をレキシンにより中和し、セライトにより濾過し、蒸発させて五糖化合物を透明な固体として得た (25.3 mg、30.9 μmol 、100%)。Rf = 0.45 (MeOH/CH₂Cl₂, 1/4) [α]_D²⁵ 12.6 (c 1.0, MeOH) ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 5.12 (m, 4H, H1', H1'', H1''', H1'''), 5.03 (d, 0.8H, J_{1 α ,2} = 1.8 Hz, H1 α), 4.71 (s, 0.2H, H1 β), 4.09 (m, 3H, H2' 及び H2''), 4.04 (dd, 1H, J_{2''',1'''} = 1.9 Hz, J_{2''',3'''} = 2.8 Hz, H2'''), 4.05 (dd, 0.2H, J_{2 β ,1 β} = 0.8 Hz, J_{2 β ,3 β} = 2.8 Hz, H2 β), 4.00 (dd, 1H, J_{2 α ,1 α} = 2.0 Hz, J_{2 α ,3 α} = 2.6 Hz, H2 α), 3.87 (m, 0.8H, H5 α), 3.80-3.73 (m, 3H, H5', H5'' 及び H5'''), 3.71 (dd, 1H, J_{5''',4'''} = 9.1 Hz, J_{5''',6'''} = 6.3 Hz, H5'''), 3.60-3.56 (m, 3H, H4', H4'', H4'''), 3.55 (dd, 0.8H, J_{4 α ,5 α} = J_{4 α ,3 α} = 9.3 Hz, H4 α), 3.52-3.47 (m, 0.8H, H3 α 及び H4 β), 3.46-3.39 (m, 19.2H, OCH₃ × 5, H4''', H3', H3'' 及び H3''', H5 β), 3.29 (m, 1.2H, H3 β 及び H3'''), 1.23-1.22 (m, 12H, H6 β , H6', H6 α , H6'', H6'''), 1.24 (d, 3H, J_{6''',5'''} = 6.1 Hz, H6'''). ¹³C NMR (151 MHz, CD₃OD): δ 103.2 (C1'''), 103.1 (C1'''), 103.0 (C1'' 及び C1'), 95.5 (C1 α), 95.3 (C1 β), 85.3 (C3 β), 83.0 (C3'), 83.0 (C3''), 83.0 (C3'''), 82.9 (C3 α), 82.0 (C3'''), 80.0 (C4 α), 79.5 (C4 β 及び C4'), 79.4 (C4''), 79.2 (C4'''), 72.6 (C4''') 71.9 (C5 β), 70.5 (C5'''), 69.0 (C5'), 69.0 (C5''), 68.9 (C5'''), 68.6 (C2 β), 68.4 (C2 α), 68.3 (C2'''), 68.0 (C2', C2'' 及び C2'''), 67.7 (C5 α), 57.3 (OCH₃'''), 56.7 (OCH₃

α , OCH_3' , OCH_3'' , OCH_3'''), 56.6 ($\text{OCH}_3\beta$), 18.8 ($\text{C6}\alpha$), 18.6 ($\text{C6}\beta$, $\text{C6}'$, $\text{C6}''$ 及び $\text{C6}'''$), 17.9 ($\text{C6}''''$). $J_{\text{C1}',\text{H1}'} = J_{\text{C1}'',\text{H1}''} = J_{\text{C1}',',\text{H1}'''} = J_{\text{C1}',',,\text{H1}''''} = 173 \text{ Hz}$, $J_{\text{C1}\alpha,\text{H1}\alpha} = 170 \text{ Hz}$, $J_{\text{C1}\beta,\text{H1}\beta} = 160 \text{ Hz}$, LRMS m/z $\text{C}_{35}\text{H}_{62}\text{NaO}_{21}[\text{M}+\text{Na}]^+$ の計算値, 841.4; 実測値, 841.3. NMRスペクトルは、図20に示す。

【0208】

2 - [N - (tert - ブトキシカルボニル) アミノ] エチル 2 - O - アセチル - 4 - O - ベンジル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (21)

化合物16 (46.4 mg、111 μmol) 及び N - boc - エタノールアミン (19 μL 、123 μmol) をトルエン (5 $\times$ 10 mL) とともに同時蒸発させ、高真空中で一晩乾燥させた。無水 CH_2Cl_2 (5 mL) を加えた後、0.1 g を活性化粉末 3 分子篩にかけた。次いで、反応物を - 78 に窒素ガス雰囲気下で冷却し、N - ヨードスクシンイミド (33.7 mg、150 μmol) の後、トリフリン酸 (10 μL 、115 μmol) を加えた。反応物を3時間、完了に達するまで攪拌した。次いで、反応物をブフナー漏斗により濾過し、塩化メチレン 10.0 mL で希釈し、10%の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (2 $\times$ 10 mL) 及び飽和重炭酸ナトリウム溶液 (1 $\times$ 10 mL) で洗浄した。次いで、有機層を Na_2SO_4 により乾燥させ、濾過し、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して (溶出液: EtOAc / ヘキサン) 化合物21を透明な油として得た (42.0 mg、88 μmol 、80%)。Rf = 0.30 (EtOAc / ヘキサン, 3/7) $[\alpha]_{\text{D}}^{25} 108.8$ (c 22.5, CHCl_3) $^1\text{H NMR}$ α , (500 MHz, CDCl_3): δ 7.37-7.32 (m, 4H, Bn), 7.31-7.28 (m, 1H, Bn), 5.29 (dd, 1H, $J_{2,1} = 1.3 \text{ Hz}$, $J_{2,3} = 3.1 \text{ Hz}$, H2), 4.88 (d, 1H, $J_{\text{A,B}} = 10.9 \text{ Hz}$, CHA, OBn), 4.85 (br. s, 1H, NH), 4.71 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.3 \text{ Hz}$, H1), 4.60 (d, 1H, $J_{\text{B,A}} = 10.9 \text{ Hz}$, CHB, OBn), 3.73-3.66 (m, 2H, H5及びCHA, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 3.63 (dd, 1H, $J_{3,2} = 3.4 \text{ Hz}$, $J_{3,4} = 9.4 \text{ Hz}$, H3), 3.50-3.44 (m, 1H, CHB, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 3.44 (s, 3H, CH_3O), 3.39-3.32 (m, 2H, H4及びCHA, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 3.30-3.22 (m, 1H, CHB, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 2.15 (s, 3H, Ac), 1.45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, Boc), 1.32 (d, 3H, $J_{6,5} = 6.3 \text{ Hz}$, H6). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ = 170.5, 155.9 (C=O), 138.6, 128.5 (x2), 128.0 (x2), 127.8 (Bn), 97.8 (C1), 80.1 (C4), 79.9 (C3), 79.5 ($\text{CC}(\text{CH}_3)_3$), 75.4 (CH_2 , Bn), 68.6 (C2), 67.8 (C5), 67.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 57.6 (OCH_3), 40.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 28.5 ($(\text{CH}_3)_3\text{BOC}$), 21.1 (Ac), 18.0 (C6). HRMS m/z $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{NNaO}_8[\text{M}+\text{Na}]^+$ の計算値, 476.2255; 実測値, 476.2249.

【0209】

2 - [N - (tert - ブトキシカルボニル) アミノ] エチル 2 - O - アセチル - 4 - O - ベンジル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (22)

化合物21 (46 mg、101.5 μmol) を MeOH (5 mL) に溶解し、炭素上のパラジウム (40 mg、0.38 mmol) により帯電させた。次いで、溶液を水素ガスのバルーンで5分間通気し、水素ガス雰囲気下の室温で連続的に攪拌した。4時間後、反応は完了に達したため、セライトにより濾過し、蒸発させて純粋な22を透明な油として得た (21.0 mg、57.8 μmol 、62%)。Rf = 0.35 (EtOAc / ヘキサン, 1/1), $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 5.30 (dd, 1H, $J_{2,1} = 1.8 \text{ Hz}$, $J_{2,3} = 3.1 \text{ Hz}$, H2), 4.78 (br. s, 1H, NH), 4.74 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.6 \text{ Hz}$, H1), 3.76-3.65 (m, 2H, H5及びCHA, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 3.53-3.43 (m, 3H, H3, H4及びCHB, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 3.41 (s, 3H, CH_3O), 3.39-3.26 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 2.34 (br. s, OH), 2.12 (s, 3H, Ac), 1.46 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, Boc), 1.34 (d, 3H, $J_{6,5} = 6.2 \text{ Hz}$, H6). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ = 170.3, 155.9 (C=O), 98.0 (C1), 79.4 (C4), 71.6 (C3), 68.3 (C2), 67.5 (C5), 67.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 57.3 (OCH_3), 40.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 28.4 ($(\text{CH}_3)_3\text{BOC}$), 20.9 (Ac), 17.7 (C6). HRMS m/z $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NNaO}_8[\text{M}+\text{Na}]^+$ の計算値, 386.1791; 実測値, 386.1784.

【0210】

2 - [N - (t e r t - ブトキシカルボニル) アミノ] エチル 2 - O - アセチル - 4 - O - ベンジル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (2 3)

化合物 2 2 (2 1 . 0 m g 、 5 7 . 8 μ m o l) 及び化合物 1 6 (2 8 . 9 m g 、 6 9 . 4 μ m o l) をトルエン (5 $\times$ 1 0 m L) とともに同時蒸発させ、高真空下で一晩乾燥させた。無水 C H ₂ C l ₂ (5 m L) を加えた後、0 . 1 g を活性化粉末 3 分子篩にかけた。次いで、反応物を - 7 8 に窒素ガス雰囲気下で冷却し、N - ヨードスクシンイミド (1 9 . 1 m g 、 8 4 . 9 μ m o l) の後、トリフルリン酸 (5 . 0 μ L 、 5 7 . 5 μ m o l) を加えた。反応物を 3 時間、完了に達するまで攪拌した。次いで、反応物をブフナー漏斗により濾過し、C H ₂ C l ₂ (1 0 m L) で希釈し、1 0 % の N a ₂ S ₂ O ₃ (2 $\times$ 1 0 m L) 及び飽和 N a H C O ₃ 溶液 (1 $\times$ 1 0 m L) で洗浄した。次いで、有機層を N a ₂ S O ₄ により乾燥させ、濾過し、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して (溶出液 : E t O A c / ヘキサン) 化合物 2 3 を透明な油として得た (1 8 m g 、 2 6 . 5 μ m o l 、 4 7 %) 。 (R _f = 0.65 EtOAc/ヘキサン 3/7). ¹H NMR α , (500 MHz, C D C l ₃): δ 7.38-7.32 (m, 4 H, B n), 7.31-7.27 (m, 1 H, B n), 5.35 (m, 1 H, H 2'), 5.28 (m, 1 H, H 2), 5.12 (s, 1 H, H 1'), 4.88 (d, 1 H, J _{A,B} = 10.8 Hz, C H A, O B n), 4.83 (b r . s, 1 H, O H), 4.69 (s, 1 H, H 1), 4.62 (d, 1 H, J _{B,A} = 10.9 Hz, C H B, O B n), 3.85-3.77 (m, 1 H, H 5'), 3.75-3.68 (m, 1 H, C H A, C H ₂ C H ₂ N H B o c), 3.66-3.61 (m, 1 H, H 5), 3.61-3.56 (m, 1 H, H 3'), 3.56-3.51 (m, 4 H, H 3 及び H 4), 3.51-3.42 (m, 4 H, C H B, C H ₂ C H ₂ N H B o c 及び C H ₃ O), 3.41-3.34 (m, 4 H, H 4' 及び C H ₃ O), 3.33-3.24 (m, 2 H, C H ₂ C H ₂ N H B o c), 3.30 (b s, 1 H, N H) 2 . 13, 2.10 (2 $\times$ s, 6 H, A c $\times$ 2), 1.46 (s, 9 H, C (C H ₃) ₃, B o c), 1.33-1.27 (m, 6 H, H 6 及び H 6'). ¹³C NMR (125 MHz, C D C l ₃): δ = 170.4, 170.2 155.9 (C = O), 138.6, 128.4 ($\times$ 2), 128.0 ($\times$ 2), 127.8 (B n), 99.4 (C 1'), 97.8 (C 1), 80.0 (C 4'), 80.0 (C 4), 79.9 (C 3'), 79.6 (C (C H ₃) ₃), 78.3 (C 3), 75.4 (C H ₂, B n), 68.7 (C 2'), (C 5'), 67.9 (C 2), 67.3 (C H ₂ C H ₂ N H B o c), 67.1 (C 5), 57.6 及び 57.4 (O C H ₃), 40.3 (C H ₂ C H ₂ N H B o c), 28.5 ((C H ₃) ₃, B O C), 21.2 及び 21.1 (A c), 18.2 及び 17.9 (C 6 及び C 6'). J _{C 1', H 1'} α = 171 Hz, J _{C 1, H 1} α = 168 Hz HRMS: m/z C ₃₂ H ₄₉ N N a O ₁₃ [M + N a] ⁺ の計算値, 678.3102; 実測値, 678.3092. NMR スペクトルは、図 2 1 に示す。

10

20

30

【 0 2 1 1 】

2 - アミノエチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノース (リンカー二糖)

化合物 2 3 (1 8 m g 、 2 7 μ m o l) を M e O H (2 m L) に溶解し、P D / C (1 0 m g 、 9 3 μ m o l) を加え、混合物をバルーン圧により水素雰囲気下で 1 6 時間攪拌した。次いで、化合物を M e O H (1 0 m L) で希釈し、セライトにより濾過し、濃縮した。次いで、濃縮物を M e O H (2 m L) に溶解し、固体ナトリウム (1 0 m g 、 4 3 5 μ m o l) を加えた。反応物を窒素雰囲気下で 1 6 時間攪拌し、レキシン - H ⁺ 樹脂を p H 5 に達するまで加えた。混合物を濾過し、濾液を濃縮した。次いで、化合物を D C M (2 m L) で溶解し、T F A (1 6 0 μ L) を 0 で加えた。0 で 3 0 分後、D C M 及び T F A 混合物を蒸発させてリンカー二糖を黄色の油として得た (1 0 . 3 m g 、 2 7 μ m o l 、 収率 1 0 0 %) 。 (R _f = 0.12, DCM/MeOH/水/NH₄OH, 60/35/6/1) ¹H NMR (600 MHz, D ₂ O): δ 5.16 (d, 1 H, J _{1,2} = 1.6 Hz, H 1'), 4.87 (d, 1 H, J _{1,2} = 1.7 Hz, H 1), 4.23 (m, 2 H, H 2' 及び H 2) 3.97 (m, 1 H, C H A C H ₂ N H ₂), 3.80 (m, 2 H, H 5' 及び H 5), 3.70 (m, 1 H, C H B C H ₂ N H ₂), 3.64 (d d, 1 H, J _{3,2} = 3.3 Hz, J _{3,4} = 9.2 Hz, H 3), 3.58 (d d, 1 H, J _{4,3} = J _{4,5} = 9.2 Hz, H 4), 3.50 (d d, 1 H, J _{4',3'} = J _{4',5'} = 9.6 Hz, H 4'), 3.44 (s, 3 H, O C H ₃), 3.44 (s, 3 H, O C H ₃), 3.41 (d d, 1 H, J _{3',2'} = 3.3 Hz, J _{3',4'} = 9.7 Hz, H 3'), 3.27 (m, 2 H, C H ₂ N H ₂), 1.33 (d, 3 H, J _{6,5} = 5.9 Hz, H 6), 1.29 (d, 3 H, J _{6',5'} = 6.4 Hz, H 6'). ¹³C NMR (150 MHz, D ₂ O): δ 101.4 (C 1'), 99.7 (C 1), 80.5 (C 3), 79.4 (C 3')

40

50

, 78.1 (C4), 70.6 (C4'), 69.5 (C5'), 67.2 (C5), 66.0 (C2'), 65.8 (C2), 63.4 (CH₂CH₂NH₂), 56.1 (2 x OCH₃), 39.0 (CH₂NH₂), 17.3 (C6), 16.5 (C6'). J_{C1',H1'α} = 174 Hz, J_{C1, H1α} = 173 Hz ESI-MS: m/z C₁₆H₃₂NO₉[M+H]⁺の計算値, 382.2072; 実測値, 382.2071.

【0212】

実施例3A：結果及び考察

3-O-メチルD-ラムノースの合成：D-ラムノースを、Zunk et al. and others [28-31]により記載の方法をわずかに改変して、最初に合成した（スキーム1、図22に示す）。D-マンノースのアセチル化の後、アノマーベンジル化により、1-O-ベンジル誘導体1が49%の収率で、2つのステップにより生成された。1の粗精製及びナトリウムメトキシドによる処理の後、C6におけるヨウ素化により、ヨウ化物2が優れた収率で生じた。水酸化パラジウム及び水素ガスによる2の還元により、D-ラムノース誘導体3が100%の収率で生成された。¹H NMRスペクトルの1.28 ppmにおける二重線により、C6におけるデヒドロキシ化が確認された。D-ラムノース誘導体3の2, 3-O-アセトニド保護の後、O-4ベンジル化により、4が90%の収率で2つのステップにより得られた。アセトニド脱保護の後にジオール5を得た。その後、ジブチルスズオキシド処理による3-Oの選択的メチル化、並びにフッ化セシウム及びヨウ化メチルによる反応によって、6が優れた収率で（91%）2つのステップにより得られた[32]。O-メチル-重線とC3との間のロングレンジHMB Cカップリングにより、メチルの導入が位置選択的に確認された。中間体6の包括的脱保護によって、3-O-メチルD-ラムノース7が59%の収率で2つのステップにより得られた。（HRMS m/z C₇H₁₄NaO₅[M+Na]⁺の計算値, 201.0739; 実測値, 201.0734).

【0213】

3-O-メチルL-ラムノースの合成：天然に豊富で安価なL-ラムノースを、アセチル化及びチオクレゾールとの反応後に、チオグリコシドドナー8に優れた収率で変換した[31-36]。Zemplén条件下での脱アセチル化及びアセトニド保護後に中間体9が得られた。ベンジル化及びアセトニド脱保護により、ジオール10が優れた収率で得られた。ジブチルスズオキシドを使用する3-Oの選択的メチル化の後、フッ化セシウム及びヨウ化メチルによる処理によって、メチル化誘導体11が55%の収率で2つのステップにより生成された。中間体6についてこれまでに記載のように、O-メチル-重線とC3との間の強力なロングレンジシグナルにより、反応が位置選択的に確認された。アセトン及び水中のN-ブロモスクシンイミドにより、ヘミアセタール12が71%の収率で得られた。アセチル化の後のベンジル還元及びその後の脱アセチル化により、3-O-メチルL-ラムノース13が24%の収率で3つのステップにより得られた。（HRMS m/z C₇H₁₄NaO₅[M+Na]⁺の計算値, 201.0733; 実測値, 201.0735）（スキーム2、図23に示す）

【0214】

3-O-メチルD-ラムノースオリゴ糖の合成：得られた純粋なD-鏡像異性体中間体6を用いた、HCl、アセトニトリル混合物による6のアノマー脱保護によって、ヘミアセタール14を65%の収率で生成した。次いで、14をアセチル化し、チオクレゾール及びBF₃OEt₂で処理してドナー16を良好な収率で生成した。次いで、ベンジル化中間体15の水素化の後、アクセプター17を優れた収率で（96%）生成した。その後、N-ヨードスクシンイミド及びトリフリン酸により活性化した16と17との間のグリコシル化反応により、二糖18 di が53%の収率で生じた（αのみ）。加えて、H1'とC4との間のロングレンジHMB Cシグナルにより、カップリングが確認された。生じた更なる隣接C1', H1'カップリング定数（ $^3J_{1',H1} = 17.9 \text{ Hz}$ ）は、α配置を示し、これまでの文献のデータと一致した[34]。¹H NMRスペクトルベンジル領域におけるシグナルの非存在によって示されるように、ベンジル脱保護の後、二糖アクセプター19 di が形成された。反復グリコシル化の繰返し及び水素化反応後、五糖18ペンタが最終的に得られた。各反復的グリコシル化により、スキーム3に示すように、わず

かに少量のそれぞれのオリゴ糖が得られた（図 2 4 に示す）。オリゴ糖の長さにもかかわらず、ベンジル除去により、一貫して高い収率を維持した（90～100%）。19 ペンタの Z e m p l e n 条件下における最終的脱保護により、標的五糖 1 が 100% の収率で得られ、D - マンノースから 1.0% の全収率が得られた。また、標的 19 d i、標的 19 トリ、及び標的 19 テトラを Z e m p l e n 条件下で脱保護して、化合物 20 d i、化合物 20 トリ、及び化合物 20 テトラが優れた収率で得られた。

【0215】

2 - アミノエチルハンドルグリコシル化：オリゴ糖をタンパク質にコンジュゲートしてコンジュゲートワクチンを生成するための一般的手法は、ハンドルを有するオリゴ糖の還元末端をグリコシル化することである [3 7 , 3 8]。N - b o c エタノールアミンによる中間体 1 6 のグリコシル化により、中間体 2 1 が良好な収率で得られた（スキーム 4、図 2 5 に示す）。加えて、H 1 と隣接するリンカー C H₂ との間のロングレンジ H M B C シグナルにより、カップリングが確認された。生じた隣接 C 1 , H 1 カップリング定数は、α 配置と一致した [3 4]。P d / C によるベンジル脱保護によって、化合物 2 2 が 62% の収率で得られ、その後、1 6 による化合物 2 2 のグリコシル化によって、2 3 が 53% の収率で生成された。2 3 の包括的脱保護により、最終的標的 2 4 が 100% の収率で生成された。

【0216】

実施例 4：H S A との緑膿菌メチル化ラムナン合成五糖コンジュゲーション（ハンドル又はリンカーなし）

水中 H S A 1.25 mg を、20% のメタノール 300 μ l 中の実施例 3 に従って生成したメチル化ラムナン合成五糖（ハンドル又はリンカーなし）に加えた。次いで、これを室温で 1 時間放置し、凍結乾燥させた。凍結乾燥物質を、0.5 M の硫酸ナトリウム及び 15 mg / m l のシアノ水素化ホウ素ナトリウムを含む 0.2 M のホウ酸ナトリウム 300 μ l に直ちに溶解し、72 時間 55 ° で放置した。M i l l i p o r e 社のウルトラ - 15 30 K M W C O スピнкаラムを使用して、試料を水に変換した（水による回転 3 ×）。一定分量を M A L D I 及び S D S - P A G E により確認し、残りを凍結乾燥させ（1.1 mg）、マウスの免疫に使用するまで - 20 ° で保存した。B a l b / C マウス 6 匹を、複合糖質とアジュバントとのプライム 1 回ブースト 2 回の計画により免疫した。第 2 のブースト後の血清を、E L I S A により、緑膿菌由来の L P S 及び全細胞に対する交差反応性について調べた。

【0217】

S D S - P A G E では、H S A 分子対コンジュゲートの泳動の変化により、コンジュゲーションが例示された（図 2 6 A 及び図 2 6 B）。M A L D I 解析では、各五糖単位が 872 a m u である場合の約 5 k D a の質量増加により、約 6 つの五糖が H S A にコンジュゲートしたことが示された（図 2 7）。E L I S A 解析では、得られた血清が、緑膿菌由来の L P S（図 2 8 A ~ 2 8 F）及び殺菌全細胞（図 2 9）を認識することが示され、全細胞について詳述するように、合成五糖の複合糖質の、標的緑膿菌エピトープを認識するのに必要とされる応答を達成する能力が強調された。

【0218】

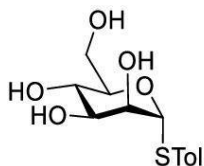
実施例 5：ハンドル及び任意選択でリンカーを有する 3 - O - メチルトリラムノースオリゴ糖、3 - O - メチルテトララムノースオリゴ糖、及び 3 - O - メチルペンタ - ラムノースオリゴ糖の合成

図 3 0 を参照する。B o c で保護したアミノエチルハンドルをチオトルエン中間体 S 8（上の 1 6 と同一）に 84% の収率で結合させた。次いで、水素化条件下でのベンジル保護基の除去により、ドナー S 1 0（上の 2 2 と同一）が優れた収率で得られた。チオトルエンによる反復的 1, 4 グリコシル化により、S 8（上の 1 6 と同一）を保護した後、4 - O - ベンジル脱保護により、S 1 1（上の 2 3 と同一）、S 1 3、S 1 5、及び S 1 7 が生成された。S 1 3、S 1 5、及び S 1 7 の定量的 4 - O - ベンジル脱保護の後、ナトリウムメトキシドを使用する脱アセチル化及び T F A による B o c 脱保護によって、S 1

9 (上の24と同一)、S20、及びS21が得られた。更なる精製は行わずに、このような化合物を、セミ分取逆相精製後に活性化N-ヒドロキシスクシンイミド及びアルデヒド保護ヘミアセタールを含む二価リンカーとコンジュゲートさせた(スキーム5、図30を参照)。

【0219】

【化12】



10

p-トリル1-チオ-α-D-マンノピラノシド(S1)

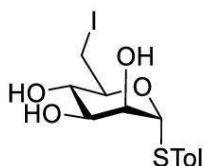
2000 mLの丸底フラスコ内で、アセチル化マンノース(142.5 g、365.1 mmol)を無水CH₂Cl₂ 800 mLに溶解し、溶液を0 にN₂雰囲気下で冷却した。次いで、チオクレゾール(63.5 g、511.0 mmol)の後、三フッ化ホウ素ジエチルエーテラート(63.1 mL、511.0 mmol)を加え、溶液をRTで48時間、TLCが完了を示す時点まで攪拌した。次いで、反応物を水(2×200 mL)及びNaHCO₃(2×200 mL)で洗浄した。有機層を単離し、Na₂SO₄により乾燥させ、濾過し、減圧下で蒸発させた。次いで、粗生成物を無水MeOH 1000 mLに溶解し、0 に冷却した。次いで、ナトリウム金属(0.873 g、36.4 mmol)を加え、反応物をRTで30時間、完了に達するまで攪拌した。溶液をDowex H⁺で中和、濾過、及び蒸発させた。次いで、粗生成物を水(500 mL)に溶解し、CH₂Cl₂(3×150 mL)で抽出した。次いで、水性層を蒸発させてS1を淡緑色の粉末として得た(96.86 g、245 mmol、67%、2つのステップにより)。R_f = 0.65 (MeOH/CH₂Cl₂, 15/85, V/V) [α]_D²⁵ 2.5 (c 0.16, MeOH) ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.39 (d, 2H), 7.11 (d, 2H), 5.33 (s, 1H), 4.08-3.98 (m, 2H), 3.83-3.62 (m, 3H), 3.29 (s, 1H), 2.29 (s, 3H) ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 138.9, 133.5 (2C), 132.1, 130.8 (2C), 90.8, 75.5, 73.7, 73.1, 68.7, 62.6, 21.1 ESI-MS: m/z C₁₃H₁₈O₅NaS [M+Na]⁺の計算値, 309.0767; 実測値, 309.0769.

20

30

【0220】

【化13】



p-トリル6-ヨード-1-チオ-α-D-マンノピラノシド(S2)

化合物S1(96.86 g、338.2 mmol)を無水THF(600 mL)に溶解し、溶液を60 のN₂下で還流させた。次いで、トリフェニルホスフィン(133.05 g、507.3 mmol)、イミダゾール(46.04 g、676.4 mmol)、及びI₂(128.76 g、507.3 mmol)を緩徐に加えた。10分後にヨウ素の紫色が持続すると、反応は完了となった。次いで、溶液をRTに冷却し、減圧下で濃縮した。粗混合物を酢酸エチル(600 mL)に溶解し、10%のNa₂S₂O₃(2×150 mL)及び水(2×150 mL)で洗浄した。次いで、有機層をNa₂SO₄により乾燥させ、濾過し、蒸発させ、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して(溶出液: MeOH/CH₂Cl₂, 1/5, V/V)化合物S2を白色の固体として得た(87.37 g、220.5 mmol、65%)。R_f = 0.65 (MeOH/CH₂Cl₂, 1/9, V/V) [α]_D²⁵ -2.1 (c 0.041, MeOH) ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD): δ 7.47 (d, 2H), 7.14 (d, 2H), 5.34 (s, 1H), 3.93 (dd, 1H), 3.67-3.52 (m, 3H), 3.31 (s, 1H), 2.3

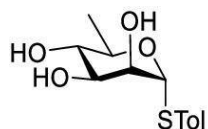
40

50

2 (s, 3H) ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 138.9, 133.4 (2C), 132.2, 130.7 (2C), 91.0, 74.9, 73.8, 72.7, 72.6, 21.1, 6.0 ESI-MS: m/z $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{INaS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ の計算値, 418.9784; 実測値, 418.9786.

【0221】

【化14】



p - トリル 1 - チオ - α - D - ラムノピラノシド (S3)

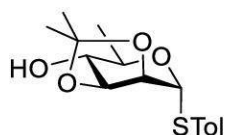
10

化合物 S2 (1.76 g、4.44 mmol) を MeOH (30 mL) に溶解し、溶液を $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (0.39 g、2.76 mmol) により帯電させ、溶液を H_2 で通気した。次いで、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (1.8 mL、10.3 mmol) を加え、溶液を H_2 雰囲気下で 6 時間、完了に達するまで攪拌した。次いで、溶液をセライトのパッドにより濾過し、蒸発させ、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して (溶出液: MeOH/ CH_2Cl_2 , 1/5, V/V) 化合物 S3 を透明な油として得た (0.65 g、2.40 mmol、54%)。Rf = 0.50 (MeOH/ CH_2Cl_2 , 1/9, V/V) $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 0.91 (c 0.043, MeOH) ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.35 (d, 2H), 7.14 (d, 2H), 5.29 (s, 1H), 4.10-4.00 (m, 2H), 3.64 (dd, 1H), 3.45 (dd, 1H), 3.31 (s, 1H), 2.31 (s, 3H), 1.26 (d, 3H) ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 138.8, 133.3 (2C), 132.2, 130.8 (2C), 90.6, 74.2, 73.8, 72.9, 72.6, 21.1, 17.8 ESI-MS: m/z $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{NaS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ の計算値, 293.0818; 実測値, 293.0818.

20

【0222】

【化15】



30

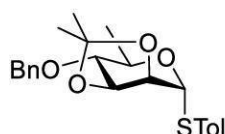
p - トリル 2, 3 - O - イソプロピリデン - 1 - チオ - α - D - ラムノピラノシド (S4)

化合物 S3 (10.16 g、37.6 mmol) を無水アセトン 250 mL に溶解した。この溶液に、2,2-ジメトキシプロパン (8.29 mL、67.6 mmol) 及び p-トルエンスルホン酸一水和物 (0.71 g、0.376 mmol) を加え、反応物を RT で 3 時間、完了に達するまで攪拌した。溶液を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル (300 mL) に溶解し、飽和 NaHCO_3 (2 × 100 mL) で洗浄した。混合有機層を Na_2SO_4 により乾燥させ、濾過し、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して (溶出液: EtOAc/ヘキサン, V/V) 化合物 S4 を白色の固体として得た (10.68 g、34.4 mmol、92%)。スペクトルデータは、文献の値と一致した。¹

40

【0223】

【化16】



p - トリル 4 - O - ベンジル - 2, 3 - O - イソプロピリデン - 1 - チオ - α - D - ラムノピラノシド (S5)

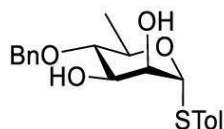
化合物 S4 (10.68 g、34.4 mmol) を無水 DMF (150 mL) に溶解し

50

、溶液を 0 に冷却した。次いで、NaH (2.06 g、51.6 mmol) を小分けして加え、溶液を 30 分間攪拌した。臭化ベンジル (4.91 mL、41.3 mmol) を滴下して加え、溶液を RT で 2 時間、完了に達するまで攪拌した。反応を Et₃N (10 mL) の追加によりクエンチし、次いで、飽和した NH₄Cl の冷却溶液 (400 mL) 中に注いだ。溶液を 0 で 1 時間攪拌し、次いで、濾過した。固体を採取し、高真空下で乾燥させて S5 をベージュ色の固体として得た (13.43 g、33.5 mmol、98%)。スペクトルデータは、文献の値と一致した。²

【0224】

【化17】



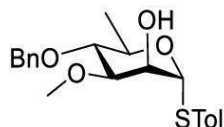
10

p - トリル 4 - O - ベンジル - 1 - チオ - α - D - ラムノピラノシド (S6)

化合物 S5 (1.09 g、2.72 mmol) を AcOH (10 mL) の 80% (v/v) 溶液に溶解し、一晚 RT で攪拌した。次いで、溶液を 55 まで油浴中で 3 時間加熱して反応を完了に至らせた。次いで、溶液を減圧下で蒸発させ、トルエン (4 × 30 mL) と同時蒸発させて S6 を透明な油として得た (909 mg、2.52 mmol、92%)。スペクトルデータは、文献の値と一致した。²

【0225】

【化18】



20

p - トリル 4 - O - ベンジル - 3 - O - メチル - 1 - チオ - α - D - ラムノピラノシド (S7)

化合物 S6 (14.3 g、39.7 mmol) をトルエン (3 × 100 mL) と同時蒸発させ、高真空下で一晩乾燥させた。次いで、S6 を無水トルエン (400 mL) に溶解し、N₂ ガスでパージし、ジブチルスズ (IV) オキシド (11.85 g、47.6 mmol) により帯電させた。次いで、反応混合物を還流により 16 時間攪拌し、RT に冷却し、減圧下で蒸発させた。粗製スズアセタールを高真空下で 5 時間放置し、無水 DMF (793 mL) に溶解し、N₂ でパージした。フッ化セシウム (9.00 g、59.6 mmol) 及びヨードメタン (28.15 mL、396.6 mmol) を加え、反応物を 40 で 16 時間、N₂ 下で攪拌した。混合物を RT に冷却し、EtOAc (350 mL) で希釈し、水 (5 × 150 mL)、飽和 NaHCO₃ (150 mL)、及び鹼水 (150 mL) で洗浄した。次いで、混合有機層を Na₂SO₄ により乾燥させ、蒸発させ、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して (溶出液: EtOAc / ヘキサン、V/V) S7 を透明な油として得た (10.87 g、29.0 mmol、73%)。R_f = 0.40 (EtOAc / ヘキサン, 3/7, V/V) [α]_D²⁵ 8.2 (c 0.38, CHCl₃) ¹H NMR (400 MHz, CD₃Cl): δ 7.40-7.27 (m, 8H), 7.11 (d, 2H), 5.47 (d, 1H), 4.86 (d, 1H), 4.64 (d, 1H), 4.30 (dd, 1H), 4.20 (dq, 1H), 3.58 (dd, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.44 (dd, 1H), 2.32 (s, 3H), 2.28 (br.s, 1H), 1.30 (d, 3H) ¹³C NMR (100 MHz, CD₃Cl): δ 138.6, 137.8, 132.2 (2C), 130.4, 130.0 (2C), 128.6 (2C), 128.1 (2C), 127.9, 87.6, 82.1, 80.2, 75.4, 69.5, 68.6, 57.6, 21.2, 17.9 ESI-MS: m/z C₂₁H₂₆O₄NaS[M+Na]⁺ の計算値, 397.1444; 実測値, 397.1444.

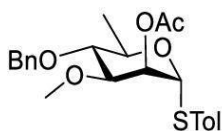
30

40

【0226】

50

【化 19】



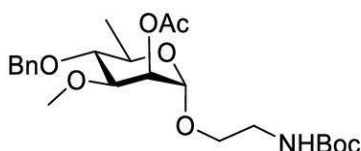
p - トリル 2 - O - アセチル - 4 - O - ベンジル - 3 - O - メチル - 1 - チオ - α - D - ラムノピラノシド (S8 (上の 16 と同一))

化合物 S7 (10.85 g、29.0 mmol) を無水酢酸 (20 mL) 及びピリジン (20 mL) に溶解し、溶液を RT で 16 時間攪拌した。次いで、溶液を減圧下で蒸発させ、トルエン (5 × 30 mL) と同時蒸発させた。次いで、粗製油をフラッシュクロマトグラフィーにより精製して (溶出液: EtOAc / ヘキサン、V / V) 化合物 S8 を透明な油として得た (10.77 g、25.9 mmol、89%)。スペクトルデータは、文献の値と一致した。³

10

【0227】

【化 20】



20

2 - (tert - ブチルオキシカルボニルアミド) エチル 2 - O - アセチル - 4 - O - ベンジル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (S9 (上の 21 と同一))

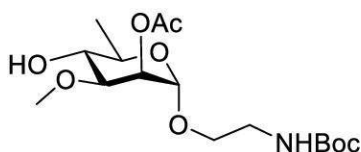
化合物 S8 (46.4 mg、0.11 mmol) 及び N - boc - エタノールアミンをトルエン (5 × 10 mL) とともに同時蒸発させ、高真空下で一晩乾燥させた。無水 CH₂Cl₂ (5 mL) を加えた後、0.1 g を活性化粉末 3 分子篩にかけ、反応物を -78 に N₂ ガス雰囲気下で冷却した。次いで、N - ヨードスクシンイミド (33.7 mg、0.12 mmol) の後、トリフルリン酸 (10.0 μL、0.12 mmol) を加え、反応物を 3 時間、完了に達するまで攪拌した。混合物をプフナー漏斗により濾過し、CH₂Cl₂ (10 mL) で希釈し、10% の Na₂S₂O₃ (2 × 10 mL) 及び飽和 NaHCO₃ (10 mL) で洗浄した。次いで、有機層を Na₂SO₄ により乾燥させ、濾過し、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して (溶出液: EtOAc / ヘキサン、V / V) 化合物 S9 を透明な油として得た (42.0 mg、0.093 mmol、84%)。R_f = 0.55 (EtOAc / ヘキサン, 1/1, V/V) [α]_D²⁵ 108.8 (c 2.3, CHCl₃) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.45-7.36 (m, 5H), 4.89 (d, 1H), 4.84 (br. s, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.61 (d, 1H), 3.72-3.65 (m, 2H), 3.63 (dd, 1H), 3.49-3.44 (m, 1H), 3.42 (s, 3H), 3.36-3.30 (m, 1H), 3.35 (dd, 1H), 3.30-3.21 (m, 1H), 2.14 (s, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.31 (d, 3H) ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 170.5, 155.9, 138.6, 128.5 (2C), 128.0 (2C), 127.8, 97.8, 80.1, 79.9, 75.4, 68.6, 67.8, 67.3, 57.6, 40.3, 28.5, 21.1, 18.0 ESI-MS: m/z C₂₃H₃₅NO₈H[M+H]⁺ の計算値, 454.2435; 実測値, 454.2435.

30

40

【0228】

【化 21】



2 - (tert - ブチルオキシカルボニルアミド) エチル 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (S10 (上の 22 と同一))

炭素担持水酸化パラジウム (1.00 g、7.00 mmol) を MeOH (20 mL)

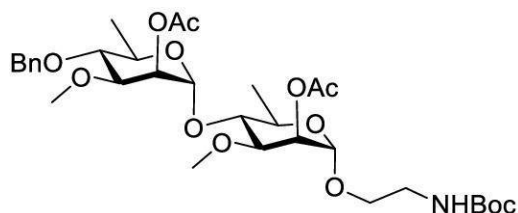
50

に加え、溶液を H_2 で30分間通気した。次いで、化合物S9(1.37g、3.02mmol)を加え、溶液を H_2 の連続流により3時間、RTで攪拌した。次いで、反応物をセライトのパッドにより濾過し、蒸発させてS10を透明な油として得た(1.07g、2.94mmol、98%)。Rf = 0.35 (EtOAc/ヘキサン, 1/1, V/V) $[\alpha]_D^{25}$ 9.6 (c 0.28, $CHCl_3$) 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$ / CD_3OD): δ 5.29 (s, 1H), 4.78 (br. s, 1H), 4.74 (s, 1H), 3.76-3.65 (m, 2H), 3.54-3.47 (m, 2H), 3.46 (dd, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.38-3.36 (m, 2H), 2.34 (br. s, 1H), 2.11 (s, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.33 (d, 3H) 1H NMR (125 MHz, $CDCl_3$ / CD_3OD): δ 170.4, 155.9, 98.0, 79.5, 71.6, 68.3, 67.5, 67.2, 57.3, 40.3, 28.4, 20.9, 17.7 ESI-MS: m/z $C_{16}H_{29}NO_8H[M+H]^+$ の計算値, 364.1966; 実測値, 364.1963.

10

【0229】

【化22】



2-O-アセチル-4-O-ベンジル-3-O-メチル- α -D-ラムノピラノシド-(1 $\rightarrow$ 4)-2-(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]エチル2-O-アセチル-3-O-メチル- α -D-ラムノピラノシド(S11(上の23と同一))

20

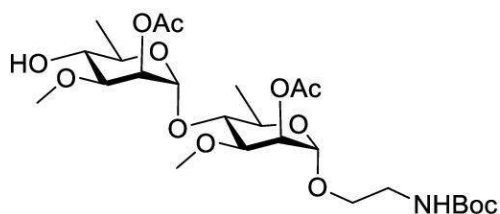
化合物S10(1.07g、2.93mmol)及び化合物S8(1.47g、3.53mmol)をトルエン(5 $\times$ 20mL)とともに同時蒸発させ、高真空で一晩乾燥させた。無水塩化メチレン(50mL)を加えた後、0.500gを活性化粉末3分子篩にかけた。次いで、反応物を-78に N_2 雰囲気下で冷却し、N-ヨードスクシンイミド(1.13g、4.11mmol)の後、トリフルリン酸(0.50mL、5.66mmol)を加えた。反応物を3時間、完了に達するまで攪拌した。次いで、反応物をプフナー漏斗により濾過し、 CH_2Cl_2 (100mL)で希釈し、10%の $Na_2S_2O_3$ (2 $\times$ 100mL)及び飽和 $NaHCO_3$ (100mL)で洗浄した。次いで、有機層を Na_2SO_4 により乾燥させ、濾過し、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して(溶出液: EtOAc/ヘキサン、V/V)化合物S11を透明な油として得た(1.56g、2.38mmol、81%)。Rf = 0.65 (EtOAc/ヘキサン, 1/1, V/V) $[\alpha]_D^{25}$ 66.8 (c 1.0, $CHCl_3$) 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.38-7.27 (m, 5H), 5.35 (dd, 1H), 5.28 (s, 1H), 5.12 (d, 1H), 4.89 (d, 1H), 4.82 (br. s, 1H), 4.69 (d, 1H), 4.61 (d, 1H), 3.86-3.77 (m, 1H), 3.75-3.66 (m, 1H), 3.66-3.55 (m, 1H), 3.55-3.45 (m, 3H), 3.44 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.39-3.33 (m, 2H), 3.33-3.23 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.34-1.28 (m, 6H) ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 170.4, 170.2, 155.9, 138.6, 128.4 (2C), 128.0 (2C), 127.8, 99.4, 97.8, 80.1, 80.0, 79.9, 78.3, 75.4, 68.7, 68.5, 67.9, 67.3, 67.1, 57.6, 57.4, 40.3, 28.5, 21.2, 21.0, 18.2, 17.9 ESI-MS: m/z $C_{32}H_{49}NNaO_{13}[M+Na]^+$ の計算値, 678.3096; 実測値, 678.3092.

30

40

【0230】

【化23】



50

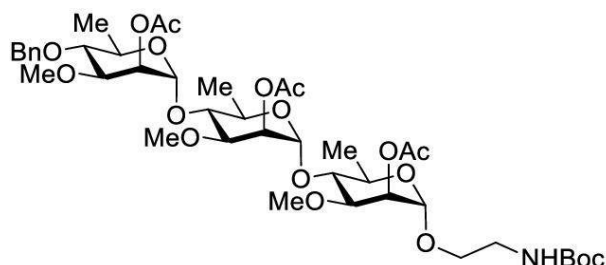
2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - (t e r t - ブトキシカルボニル) アミノ] エチル 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (S 1 2)

炭素担持水酸化パラジウム (1 . 2 0 g 、 8 . 5 5 m m o l) を M e O H (5 0 m L) に加え、溶液を H_2 で 3 0 分間通気した。次いで、化合物 S 1 1 (1 . 7 1 g 、 2 . 6 1 m m o l) を加え、溶液を H_2 の連続流により 3 時間 R T で攪拌した。次いで、反応物をセライトのパッドにより濾過し、蒸発させて S 1 2 を透明な油として得た (1 . 4 7 g 、 2 . 5 9 m m o l 、 9 9 %) 。 $R_f = 0.20$ (EtOAc / ヘキサン , 1 / 1 , V / V) $[\alpha]_D^{25} 1.07$ (c 0.33 , $CHCl_3$) 1H NMR (400 MHz , $CDCl_3$) : δ 5.36 (dd , 1H) , 5.31-5.26 (m , 1H) , 5.14 (s , 1H) , 4.82 (br. s , 1H) , 4.70 (s , 1H) , 3.84-3.75 (m , 1H) , 3.75-3.62 (m , 1H) , 3.58-3.44 (m , 4H) , 3.43-3.34 (m , 8H) , 3.34-3.21 (m , 1H) , 2.38 (br. s , 1H) , 2.12-2.08 (m , 6H) , 1.46 (s , 9H) , 1.35-1.29 (m , 6H) ^{13}C NMR (100 MHz , $CDCl_3$) : δ 170.5 , 170.2 , 155.9 , 99.8 , 97.9 , 80.1 , 79.7 , 79.5 , 78.4 , 77.4 , 71.7 , 69.0 , 67.9 , 67.5 , 67.4 , 67.2 , 57.5 , 57.3 , 40.4 , 28.6 , 21.2 , 21.1 , 18.3 , 17.7 ESI-MS : m/z $C_{32}H_{43}O_{13}NH[M+H]^+$ の計算値 , 566.2807 ; 実測値 , 566.2788 .

10

【 0 2 3 1 】

【 化 2 4 】



20

2 - O - アセチル - 4 - O - ベンジル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - (t e r t - ブトキシカルボニル) アミノ] エチル 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (S 1 3)

30

化合物 S 1 2 (1 . 4 6 g 、 2 . 5 7 m m o l) 及び化合物 S 8 (1 . 2 9 g 、 3 . 1 0 m m o l) をトルエン (5 $\times$ 2 0 m L) とともに同時蒸発させ、高真空下で一晩乾燥させた。無水塩化メチレン (5 0 m L) を加えた後、0 . 4 0 0 g を活性化粉末 3 分子篩にかけた。次いで、反応物を - 7 8 に N_2 雰囲気下で冷却し、N - ヨードスクシンイミド (9 9 0 . 0 m g 、 3 . 6 0 m m o l) の後、トリフルリン酸 (0 . 4 0 m L 、 4 . 5 2 m m o l) を加えた。反応物を 3 時間完了に達するまで攪拌した。次いで、反応物をブフナー漏斗により濾過し、 CH_2Cl_2 (1 0 0 m L) で希釈し、1 0 % の $Na_2S_2O_3$ (2 $\times$ 1 0 0 m L) 及び飽和 $NaHCO_3$ (1 0 0 m L) で洗浄した。次いで、有機層を Na_2SO_4 により乾燥させ、濾過し、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して (溶出液 : E t O A c / ヘキサン , V / V) 化合物 S 1 3 を透明な油として得た (1 . 6 5 g 、 1 . 9 2 m m o l 、 7 5 %) 。 $R_f = 0.45$ (EtOAc / ヘキサン , 1 / 1 , V / V) $[\alpha]_D^{25} 2.0$ (c 0.46 , $CHCl_3$) 1H NMR (600 MHz , $CDCl_3$) : δ 7.37-7.26 (m , 5H) , 5.35 (s , 1H) , 5.33 (s , 1H) , 5.27 (s , 1H) , 5.10 (s , 1H) , 5.09 (s , 1H) , 4.88 (d , 1H) , 4.83 (br. s , 1H) , 4.61 (d , 1H) , 3.85-3.71 (m , 1H) , 3.77-3.65 (m , 3H) , 3.59 (dd , 1H) , 3.56-3.45 (m , 5H) , 3.44 (s , 3H) , 3.40 (s , 3H) , 3.38 (s , 3H) , 3.38-3.33 (m , 2H) , 3.32-3.26 (m , 1H) , 2.13 (s , 3H) , 2.10 (s , 3H) , 2.08 (s , 3H) , 1.46 (s , 9H) , 1.33-1.30 (m , 6H) , 1.28 (d , 3H) ^{13}C NMR (150 MHz , $CDCl_3$) : δ 170.4 , 170.2 , 170.1 , 155.9 , 138.6 , 128.5 (2C) , 128.1 (2C) , 127.8 , 99.5 , 97.9 , 80.1 , 80.0 , 80.0 , 78.7 , 78.4 , 75.5 , 68.7 , 68.5 , 68.0 , 67.9 , 67.8 , 67.3 , 67.1 , 57.6 , 57.5 , 57.3 , 40.4 , 28.5 , 21.2 , 21.1 , 18.3 , 18

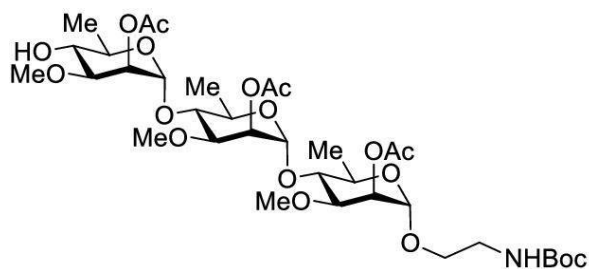
40

50

.1,17.9 ESI-MS: m/z $C_{41}H_{63}O_{18}NNa$ $[M+Na]^+$ の計算値, 880.3937; 実測値, 880.3943.

【 0 2 3 2 】

【 化 2 5 】



10

2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - (tert - ブトキシカルボニル) アミノ] エチル 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (S 1 4)

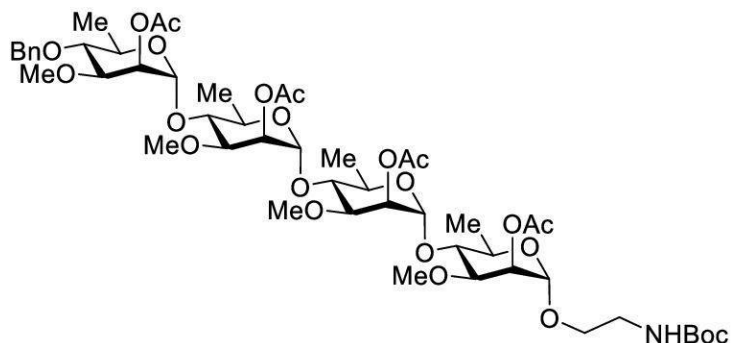
炭素担持水酸化パラジウム (8 0 7 . 0 m g 、 5 . 6 7 m m o l) を MeOH (5 0 m L) に加え、溶液を H_2 で 3 0 分間通気した。次いで、化合物 S 1 3 (1 . 6 5 g 、 1 . 9 2 m m o l) を加え、溶液を H_2 の連続流により 3 時間 RT で攪拌した。次いで、反応物をセライトのパッドにより濾過し、蒸発させて S 1 3 を透明な油として得た (1 . 5 7 g 、 1 . 8 9 m m o l 、 9 8 %) 。 $R_f = 0.20$ (EtOAc / ヘキサン , 1 / 1 , V / V) $[\alpha]_D^{25} 2.3$ (c 0.51 , $CHCl_3$) 1H NMR (600 MHz , CD_3OD) : δ 5.40 (dd , 1H) , 5.36 (s , 1H) , 5.32 (s , 1H) , 5.10 (d , 1H) , 5.06 (d , 1H) , 4.75 (s , 1H) , 3.88-3.82 (m , 1H) , 3.81-3.75 (m , 2H) , 3.75-3.71 (m , 1H) , 3.69 (dd , 1H) , 3.57 (dd , 1H) , 3.53-3.45 (m , 3H) , 3.43 (s , 3H) , 3.40 (s , 3H) , 3.39 (s , 3H) , 3.35-3.32 (m , 4H) , 3.32-3.24 (m , 2H) , 2.13-2.11 (m , 6H) , 2.10 (s , 3H) , 1.50 (s , 9H) , 1.33-1.30 (m , 6H) , 1.29 (d , 3H) ^{13}C NMR (150 MHz , CD_3OD) : δ 171.7 (2C) , 171.6 , 158.5 , 101.0 , 100.8 , 98.7 , 81.5 , 81.3 , 80.8 , 80.4 , 79.6 , 72.9 , 72.9 , 70.8 , 69.6 , 69.3 , 69.2 , 69.0 , 68.0 , 67.5 , 58.0 , 57.7 , 41.1 , 28.9 , 20.7 , 18.6 , 18.5 , 17.9 ESI-MS: m/z $C_{34}H_{57}O_{18}NNa$ $[M+Na]^+$ の計算値, 790.3468; 実測値, 790.3462.

20

30

【 0 2 3 3 】

【 化 2 6 】



40

2 - O - アセチル - 4 - O - ベンジル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - (tert - ブトキシカルボニル) アミノ] エチル 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (S 1 5)

化合物 S 1 4 (1 . 4 5 g 、 1 . 8 9 m m o l) 及び化合物 S 8 (9 4 3 . 9 m g 、 2 . 2 7 m m o l) をトルエン (5 $\times$ 2 0 m L) とともに同時蒸発させ、高真空下で一晩乾

50

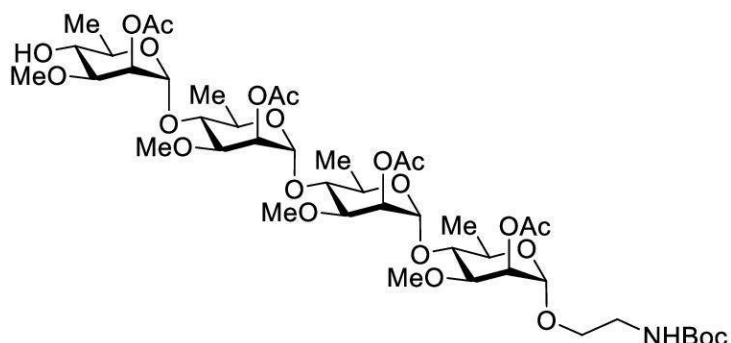
燥させた。無水塩化メチレン (50 mL) を加えた後、0.400 g を活性化粉末 3 分子篩にかけた。次いで、反応物を -78 に N₂ 雰囲気下で冷却し、N-ヨードスクシンイミド (727.0 mg、2.64 mmol) の後、トリフルリン酸 (0.35 mL、3.96 mmol) を加えた。反応物を 3 時間完了に達するまで攪拌した。次いで、反応物をブフナー漏斗により濾過し、CH₂Cl₂ (100 mL) で希釈し、10% の Na₂S₂O₃ (2 × 100 mL) 及び飽和 NaHCO₃ (100 mL) で洗浄した。次いで、有機層を Na₂SO₄ により乾燥させ、濾過し、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して (溶出液: EtOAc / ヘキサン、V/V) 化合物 S15 を透明な油として得た (1.49 g、1.41 mmol、74%)。R_f = 0.40 (EtOAc/ヘキサン, 1/1, V/V) [α]_D²⁵ 1.7 (c 0.31, CHCl₃) ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.37-7.26 (m, 5H), 5.35 (s, 3H), 5.28 (s, 1H), 5.13-5.06 (m, 3H), 4.89 (d, 1H), 4.83 (br. s, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.61 (d, 1H), 3.87-3.63 (m, 5H), 3.63-3.57 (m, 1H), 3.57-3.46 (m, 7H), 3.44 (s, 3H), 3.41-3.24 (m, 13H), 2.15-2.04 (m, 12H), 1.46 (s, 9H), 1.35-1.26 (m, 12H) ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 170.1, 170.3, 170.2, 170.1, 155.9, 138.6, 128.5 (2C), 128.1 (2C), 127.9, 99.6, 99.5, 97.9, 80.1, 80.0, 79.9, 79.7, 78.9, 78.4, 77.4, 75.5, 68.7, 68.5, 68.1, 68.0, 67.9, 67.8, 67.7, 67.3, 67.1, 40.4, 28.6, 21.3, 21.2, 18.4, 18.2, 18.1, 18.0 ESI-MS: m/z C₅₀H₇₇NO₂₃H [M+H]⁺ の計算値, 1060.4959; 実測値, 1060.4977.

10

20

【0234】

【化27】



30

2-O-アセチル-3-O-メチル- α -D-ラムノピラノシド-(1 $\rightarrow$ 4)-2-O-アセチル-3-O-メチル- α -D-ラムノピラノシド-(1 $\rightarrow$ 4)-2-O-アセチル-3-O-メチル- α -D-ラムノピラノシド-(1 $\rightarrow$ 4)-2-(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]エチル 2-O-アセチル-3-O-メチル- α -D-ラムノピラノシド (S16)

炭素担持水酸化パラジウム (720.0 mg、5.13 mmol) を MeOH (50 mL) に加え、溶液を H₂ で 30 分間通気した。次いで、化合物 S15 (1.42 g、1.34 mmol) を加え、溶液を H₂ の連続流により 3 時間 RT で攪拌した。次いで、反応物をセライトのパッドにより濾過し、蒸発させて S16 を透明な油として得た (1.30 g、1.34 mmol、100%)。R_f = 0.15 (EtOAc/ヘキサン, 3/2, V/V) [α]_D²⁵ 3.4 (c 0.67, CHCl₃) ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 5.42 (dd, 1H), 5.40 (dd, 1H), 5.38 (dd, 1H), 5.33 (dd, 1H), 5.10 (d, 1H), 5.08 (d, 1H), 5.06 (d, 1H), 4.75 (d, 1H), 3.90-3.82 (m, 2H), 3.82-3.76 (m, 2H), 3.76-3.72 (m, 1H), 3.72-3.66 (dd, 1H), 3.62-3.55 (m, 2H), 3.55-3.46 (m, 4H), 3.46-3.43 (s, 3H), 3.43-3.36 (m, 11H), 3.33-3.22 (m, 2H), 2.14-2.11 (m, 9H), 2.11 (s, 3H), 1.51 (s, 9H), 1.36-1.31 (m, 9H), 1.30 (d, 3H) ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 171.7 (2C), 171.6 (2C), 158.5, 101.0, 100.9, 100.8, 98.7, 81.4, 81.3, 81.2, 80.9, 80.3, 80.2, 80.0, 79.6, 72.9, 70.7, 69.6, 69.3, 69.2, 69.1, 69.0, 68.9, 68.0, 67.6, 58.0, 57.6, 41.1, 29.0, 20.7, 18.6,

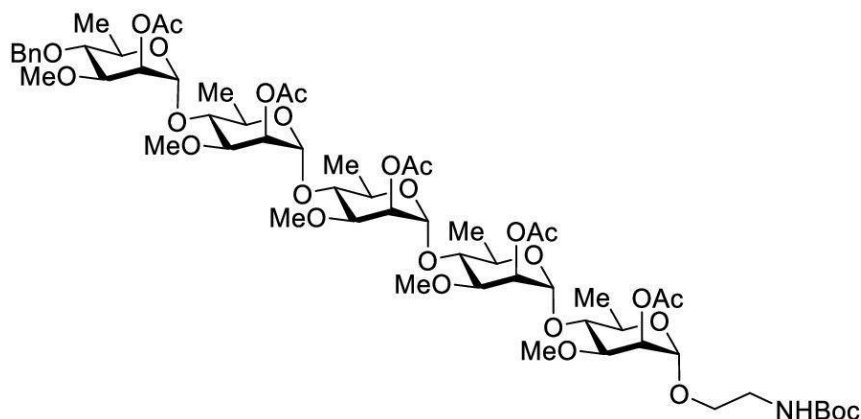
40

50

18.5, 18.4, 17.9 ESI-MS: m/z $C_{43}H_{71}O_{23}NNa$ $[M+Na]^+$ の計算値, 992.4309; 実測値, 992.4313.

【0235】

【化28】



10

2-O-アセチル-4-O-ベンジル-3-O-メチル-α-D-ラムノピラノシド-(1→4)-2-O-アセチル-3-O-メチル-α-D-ラムノピラノシド-(1→4)-2-O-アセチル-3-O-メチル-α-D-ラムノピラノシド-(1→4)-2-O-アセチル-3-O-メチル-α-D-ラムノピラノシド-(1→4)-2-(tert-butoxycarbonylamino)アミノ]エチル2-O-アセチル-3-O-メチル-α-D-ラムノピラノシド(S17)

20

化合物S16(878.9mg、0.91mmol)及び化合物S8(452.9mg、1.09mmol)をトルエン(5×20mL)とともに同時蒸発させ、高真空下で一晩乾燥させた。無水塩化メチレン(50mL)を加えた後、0.200gを活性化粉末3

分子篩にかけた。次いで、反応物を-78にN₂雰囲気下で冷却し、N-ヨードスクシンイミド(348.8mg、1.27mmol)の後、トリフルリン酸(0.15mL、1.70mmol)を加えた。反応物を3時間、完了に達するまで攪拌した。次いで、反応物をブフナー漏斗により濾過し、CH₂Cl₂(50mL)で希釈し、10%のNa₂S₂O₃(2×50mL)及び飽和NaHCO₃(50mL)で洗浄した。次いで、有機

30

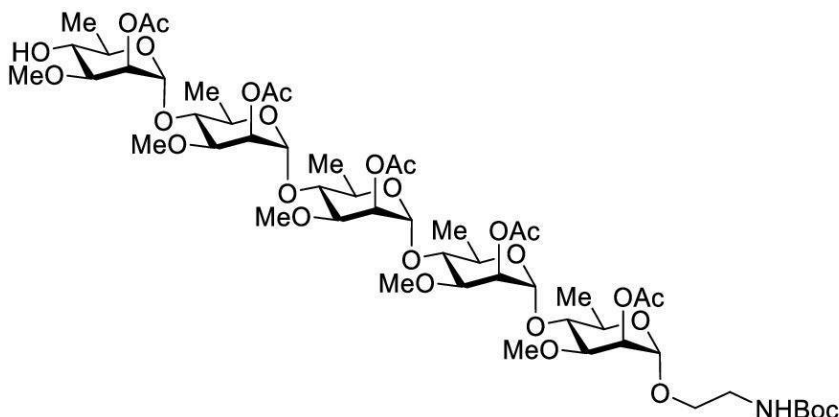
層をNa₂SO₄により乾燥させ、濾過し、フラッシュクロマトグラフィーにより精製して(溶出液: EtOAc/ヘキサン、V/V)化合物S17を透明な油として得た(693.0mg、0.55mmol、64%)。R_f = 0.50 (EtOAc/ヘキサン, 3/2, V/V)

$[\alpha]_D^{25}$ 1.5 (c 0.27, CHCl₃) ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.39-7.27 (m, 5H), 5.33 (s, 4H), 5.28 (s, 1H), 5.10 (s, 4H), 4.88 (d, 1H), 4.83 (br. s, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.61 (d, 1H), 3.86-3.54 (m, 6H), 3.62-3.46 (m, 10H), 3.44 (s, 3H), 3.41-3.34 (m, 13H), 3.34-3.23 (m, 2H), 2.13 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.08 (s, 9H), 1.46 (s, 9H), 1.36-1.22 (m, 15H) ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 170.4, 170.3, 170.2, 170.1, 170.0, 155.9, 138.6, 128.5 (2C), 128.1 (2C), 127.9, 99.7, 99.6, 99.5, 99.4, 97.9, 80.1, 80.0, 79.9, 79.7, 78.8, 78.5, 78.3, 78.3, 77.4, 75.5, 68.7, 68.5, 68.0, 67.9, 67.8, 67.7, 67.3, 67.0, 57.6, 57.5, 57.4 (2C), 57.3, 40.4, 28.5, 21.2, 21.1, 18.4, 18.3, 18.2, 18.1, 17.9 ESI-MS: m/z $C_{59}H_{91}O_{28}NH$ $[M+H]^+$ の計算値, 1262.5800; 実測値, 1262.5806.

40

【0236】

【化 2 9】



10

2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - (tert - ブトキシカルボニル) アミノ] エチル 2 - O - アセチル - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (S 1 8)

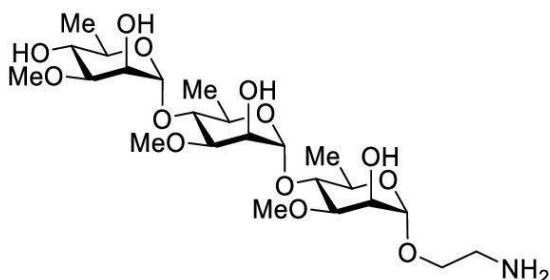
[00333]炭素担持水酸化パラジウム (300.0 mg、2.14 mmol) を MeOH (30 mL) に加え、溶液を H_2 で 30 分間通気した。次いで、化合物 S 1 7 (623.3 mg、0.49 mmol) を加え、溶液を H_2 の連続流により 3 時間 RT で攪拌した。次いで、反応物をセライトのパッドにより濾過し、蒸発させて S 1 8 を透明な油として得た (537.0 mg、0.46 mmol、93%)。Rf = 0.25 (EtOAc/ヘキサン, 3/2, V/V) $[\alpha]_D^{25}$ 0.12 (c 0.033, $CHCl_3$) 1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 5.44-5.41 (m, 3H), 5.39 (s, 1H), 5.34 (dd, 1H), 5.11 (s, 1H), 5.09 (s, 2H), 5.07 (s, 1H), 4.76 (s, 1H), 3.92-3.83 (m, 3H), 3.83-3.77 (m, 2H), 3.77-3.73 (m, 1H), 3.70 (dd, 1H), 3.62-3.56 (m, 3H), 3.56-3.46 (m, 6H), 3.45 (3H), 3.45-3.38 (m, 15H), 3.34-3.24 (m, 2H), 2.14-2.12 (m, 12H), 2.11 (s, 3H), 1.52 (s, 9H), 1.36-1.32 (m, 12H), 1.31 (d, 3H) ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ 171.7 (2C), 171.6 (3C), 158.4, 101.0, 100.8, 98.6, 81.4, 81.3, 81.2, 80.9, 80.3, 80.2, 81.1, 80.0, 79.6, 72.9, 70.7, 69.6, 69.3, 69.2, 69.1, 69.0, 68.9, 68.0, 67.5, 58.0, 57.6, 41.1, 29.0, 20.7, 18.6, 18.5 (3C), 17.9 ESI-MS: m/z $C_{52}H_{85}O_{28}NNa$ $[M+Na]^+$ の計算値, 1194.5150; 実測値, 1194.5153.

20

30

【0237】

【化 3 0】



40

3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - (tert - ブトキシカルボニル) アミノ] エチル 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (S 1 9)

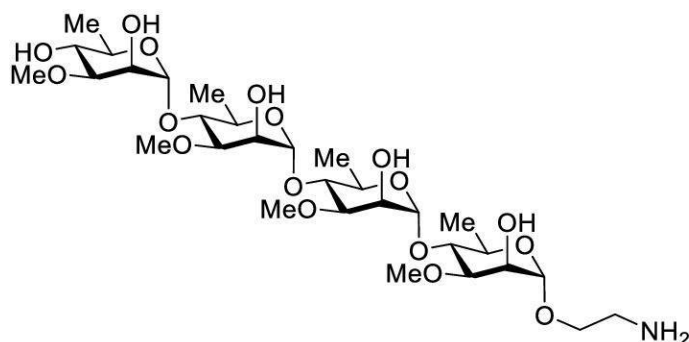
化合物 S 1 4 (755.0 mg、0.98 mmol) を MeOH (30.0 mL) に溶解し、ナトリウム金属 (15.0 mg、0.65 mmol) を加えた。反応物を RT で 1

50

6 時間攪拌し、Dowex H⁺ で中和、濾過、及び蒸発させた。次いで、粗生成物を CH₂Cl₂ (100 mL) 及びトリフルオロ酢酸 (5.8 mL) に溶解し、RT で 10 分間攪拌した後、減圧下で蒸発させて S 19 をベージュ色の粉末として生成した (532.4 mg、0.98 mmol、100%)。[α]_D²⁵ 1.5 (c 0.52, CH₃OH)¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 5.13 (s, 2H), 4.80 (s, 1H), 4.12 (s, 1H), 4.09 (s, 1H), 4.07 (s, 1H), 3.96-3.90 (m, 1H), 3.80-3.74 (m, 2H), 3.67-3.51 (m, 4H), 3.52-3.45 (m, 1H), 3.46 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 3.42 (s, 3H), 3.41-3.35 (m, 1H), 3.29-3.24 (m, 1H), 3.25-3.15 (m, 2H), 1.32 (d, 3H), 1.30 (d, 3H), 1.26 (d, 3H) ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 103.2, 103.1, 101.7, 83.1, 82.8, 82.0, 79.5, 79.3, 72.6, 70.5, 69.1, 68.7, 68.3, 68.0, 67.5, 64.6, 57.3, 56.7, 56.6, 40.5, 18.7, 18.6, 17.9 ESI-MS: m/z C₂₃H₄₃O₁₃NH [M+H]⁺ の計算値, 542.2807; 実測値, 542.2804.

【0238】

【化31】



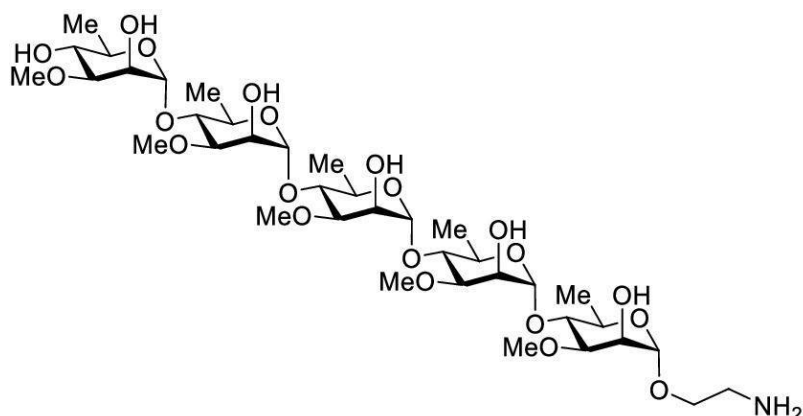
20

3-O-メチル-α-D-ラムノピラノシド-(1→4)-3-O-メチル-α-D-ラムノピラノシド-(1→4)-3-O-メチル-α-D-ラムノピラノシド-(1→4)-2-(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]エチル 3-O-メチル-α-D-ラムノピラノシド (S 20)

化合物 S 16 (390 mg、0.40 mmol) を MeOH (30.0 mL) に溶解し、ナトリウム金属 (10 mg、0.44 mmol) を加えた。反応物を RT で 16 時間攪拌し、Dowex H⁺ で中和、濾過、及び蒸発させた。次いで、粗生成物を CH₂Cl₂ (50 mL) 及びトリフルオロ酢酸 (2.4 mL) に溶解し、RT で 10 分間攪拌した後、減圧下で蒸発させて S 20 をベージュ色の粉末として生成した (282.1 mg、0.40 mmol、100%)。[α]_D²⁵ 1.1 (c 0.13, CH₃OH)¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 5.14 (m, 3H), 4.81 (s, 1H), 4.13 (s, 1H), 4.09 (s, 3H), 3.96-3.91 (m, 1H), 3.82-3.75 (m, 2H), 3.75-3.67 (m, 2H), 3.67-3.57 (m, 4H), 3.57-3.52 (m, 1H), 3.51-3.42 (m, 12H), 3.42-3.36 (m, 3H), 3.31-3.26 (m, 1H), 3.25-3.15 (m, 2H), 1.34 (d, 3H), 1.32-1.28 (m, 6H), 1.27 (d, 3H) ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 103.2, 103.1, 103.0, 101.7, 83.1, 83.0, 82.8, 79.4, 79.3, 79.2, 72.6, 70.5, 69.1, 68.7, 68.4, 68.4, 68.0, 67.5, 64.6, 57.3, 56.7, 56.6, 40.4, 18.7, 18.5 (2C), 17.9 ESI-MS: m/z C₃₀H₅₅O₁₇NH [M+H]⁺ の計算値, 702.3543; 実測値, 702.3532.

【0239】

【化 3 2】



10

3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 2 - (tert - ブトキシカルボニル) アミノ] エチル 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (S 2 1)

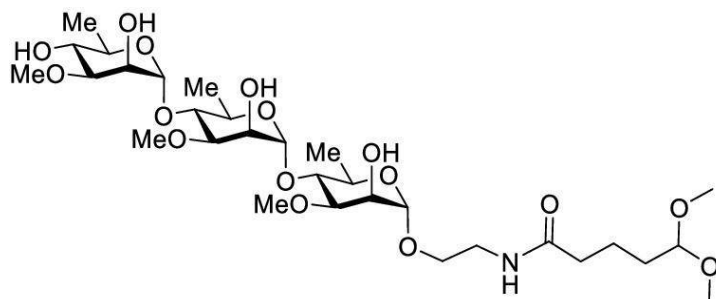
化合物 S 1 8 (5 0 0 m g 、 0 . 4 7 m m o l) を MeOH (3 0 . 0 m L) に溶解し、ナトリウム金属 (1 0 m g 、 0 . 4 4 m m o l) を加えた。反応物を RT で 1 6 時間攪拌し、Dowex H⁺ で中和、濾過、及び蒸発させた。次いで、粗生成物を CH₂Cl₂ (5 0 m L) 及びトリフルオロ酢酸 (2 . 7 m L) に溶解し、RT で 1 0 分間攪拌した後、減圧下で蒸発させて S 2 1 をベージュ色の粉末として生成した (4 0 2 m g 、 0 . 4 7 m m o l 、 1 0 0 %) 。 [α]_D²⁵ 1.0 (c 0.26, CH₃OH) ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) : δ 5.15 (s, 4H), 4.80 (s, 1H), 4.14-4.12 (m, 1H), 4.12-4.08 (m, 4H), 3.96-3.91 (m, 1H), 3.81-3.74 (m, 3H), 3.75-3.67 (m, 2H), 3.67-3.58 (5H), 3.57-3.52 (dd, 1H), 3.50-3.38 (m, 19H), 3.31-3.28 (dd, 1H), 3.26-3.15 (m, 2H), 1.34 (d, 3H), 1.32-1.28 (m, 9H), 1.27 (d, 3H) ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) : δ 103.2, 103.1, 103.0 (2C), 101.7, 83.1 (3C), 82.8, 82.0, 79.4, 79.3, 79.2 (2C), 72.6, 70.5, 69.1 (2C), 68.7, 68.4, 67.4 (2C), 67.5, 64.6, 57.3, 56.7, 56.6 (2C), 40.4, 18.7, 18.6 (3C), 17.9 ESI-MS: m/z C₃₇H₆₇O₂₁NH[M + H]⁺ の計算値, 862.4278; 実測値, 862.4265.

20

30

【 0 2 4 0 】

【化 3 3】



40

3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 → 4) - 2 - (2 , 2 - ジメトキシブチルカルボニル) アミノ] エチル 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (S 2 2)

2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 5 , 5 - ジメトキシペンタン酸 (2 3 9 m g 、 0 . 9 2 m m o l) を無水 DMF (9 . 2 m L) に溶解し、化合物 S 1 9 (5 0 m g 、 9 2 μ m o l) をこの溶液に加えた。反応物を 1 6 時間 RT で攪拌し、1 滴の Et₃N を追加することにより完了を促進させた。試料を減圧下で蒸発させ、トルエン (5 × 1 0 m L) と同時蒸発させた。次いで、粗製試料を H₂O (2 m L) 中に懸濁させ、CHCl₃ (

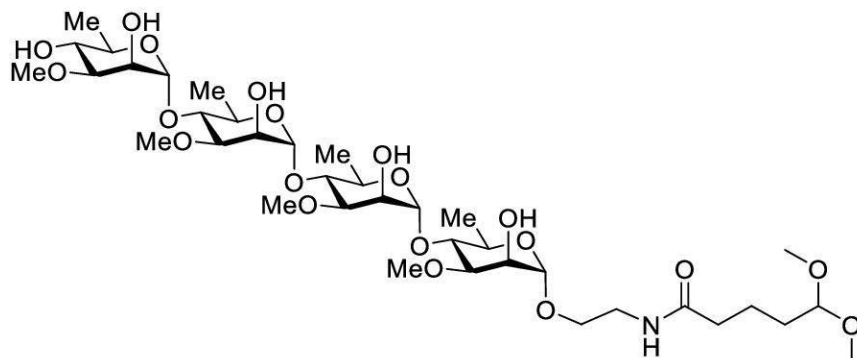
50

5 × 1 mL) で抽出した。水性層を採取し、蒸発させ、HPLC (C-18、H₂O / MeOH) により精製してS22を白色の粉末として生成した (7.4 mg、10.8 μmol、12%)。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 5.16-5.13 (m, 2H), 4.75 (d, 1H), 4.41 (t, 0.73H), 4.13-4.08 (m, 2H), 4.08-4.06 (m, 1H), 3.84-3.71 (m, 3.5H), 3.71-3.65 (m, 1H), 3.64-3.55 (m, 3H), 3.55-3.37 (m, 17H), 3.36-3.32 (m, 4H), 3.29 (dd, 1H), 2.26 (t, 1.6H), 1.73-1.60 (m, 3.3H), 1.33-1.25 (m, 9H) ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 176.2, 105.8, 103.2, 103.1, 101.3, 83.2, 83.1, 83.0, 82.0, 79.7, 79.2, 72.6, 70.5, 69.0, 68.3, 68.0, 67.6, 67.0, 57.3, 56.7, 53.5, 53.4, 40.2, 36.6, 33.1, 22.0, 18.7, 18.6, 17.8.

【0241】

10

【化34】



20

3-O-メチル-α-D-ラムノピラノシド-(1→4)-3-O-メチル-α-D-ラムノピラノシド-(1→4)-3-O-メチル-α-D-ラムノピラノシド-(1→4)-2-(2,2-ジメトキシブチルカルボニル)アミノ]エチル3-O-メチル-α-D-ラムノピラノシド(S23)

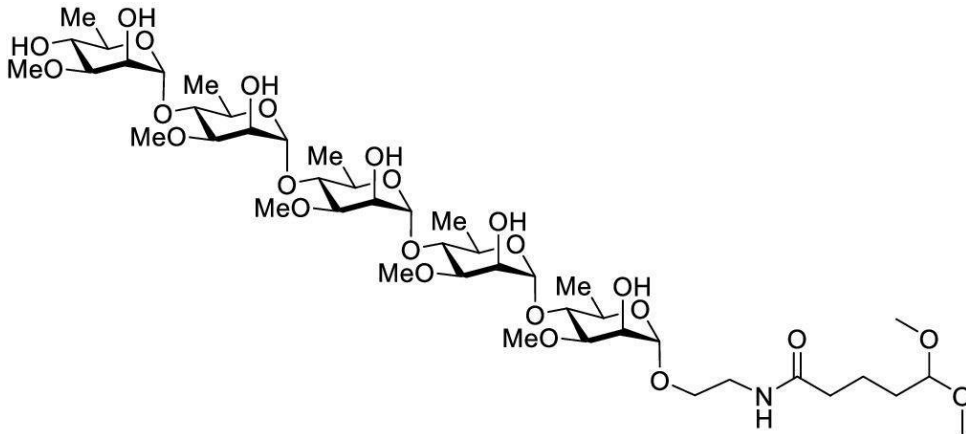
2,5-ジオキソピロリジン-1-イル5,5-ジメトキシペンタン酸(185 mg、0.71 mmol)を無水DMF(7.1 mL)に溶解し、化合物S20(50.0 mg、71.2 μmol)をこの溶液に加えた。反応物を16時間RTで攪拌し、1滴のEt₃Nを追加することにより完了を促進させた。試料を減圧下で蒸発させ、トルエン(5 × 10 mL)と同時蒸発させた。次いで、粗製試料をH₂O(2 mL)中に懸濁させ、CHCl₃(5 × 1 mL)で抽出した。水性層を採取し、蒸発させ、HPLC (C-18、溶出液: H₂O / MeOH、V/V) により精製してS23を白色の粉末として生成した (11.0 mg、13.0 μmol、18%)。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 5.16-5.13 (m, 3H), 4.75 (d, 1H), 4.41 (t, 1H), 4.13-4.09 (m, 3H), 4.07 (dd, 1H), 3.82-3.71 (m, 4H), 3.71-3.65 (m, 1H), 3.64-3.56 (m, 3H), 3.54-3.47 (m, 6H), 3.47-3.36 (m, 14H), 3.35-3.32 (m, 6H), 3.31 (dd, 1H), 2.26 (t, 2H), 1.72-1.61 (m, 4H), 1.34-1.25 (m, 12H) ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 176.0, 105.8, 103.2, 103.1, 103.0, 101.3, 83.1, 83.0, 82.9, 82.0, 79.8, 79.4, 79.2, 72.6, 70.5, 69.1, 69.0, 68.4, 68.3, 68.0, 67.7, 67.0, 57.3, 56.7, 53.5, 53.4, 40.2, 36.6, 33.1, 22.0, 18.7, 18.6 (2C), 17.9.

30

40

【0242】

【化 3 5】



10

3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド - (1 $\rightarrow$ 4) - 2 - (2, 2 - ジメトキシブチルカルボニル) アミノ] エチル 3 - O - メチル - α - D - ラムノピラノシド (S 2 4)

2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 5, 5 - ジメトキシペンタン酸 (150 mg、0.58 mmol) を無水 DMF (5.8 mL) に溶解し、化合物 S 2 1 (50 mg、58.0 μ mol) をこの溶液に加えた。反応物を 16 時間 RT で攪拌し、1 滴の Et₃N を追加することにより完了を促進させた。試料を減圧下で蒸発させ、トルエン (5 $\times$ 10 mL) と同時蒸発させた。次いで、粗製試料を H₂O (2 mL) 中に懸濁させ、CHCl₃ (5 $\times$ 1 mL) で抽出した。水性層を採取し、蒸発させ、HPLC (C - 18、溶出液 : H₂O / MeOH) により精製して S 2 4 を白色の粉末として生成した (20.3 mg、20.2 μ mol、35%)。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 5.17-5.13 (m, 4H), 4.75 (d, 1H), 4.41 (t, 1H), 4.13-4.10 (m, 4H), 4.07 (dd, 1H), 3.82-3.71 (m, 5H), 3.71-3.65 (m, 1H), 3.65-3.56 (m, 4H), 3.52-3.38 (m, 22H), 3.36-3.33 (m, 7H), 3.31 (dd, 1H), 2.26 (t, 1H), 1.73-1.61 (m, 4H), 1.34-1.25 (m, 15H) ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 176.0, 105.8, 103.2, 103.1, 101.3, 83.1, 83.0, 82.0, 79.8, 79.4, 79.2, 72.7, 70.5, 69.0 (2C), 68.3, 68.0 (2C), 67.6, 67.1, 57.3, 56.7, 53.5, 53.4, 40.2, 36.6, 33.1, 22.0, 18.7, 18.6 (3C), 17.9.

20

30

【0 2 4 3】

実施例 6 : 阻害 ELISA による新たなオリゴ糖リンカーの mAb 1 B 1 に対するスクリーニング

リンカーが結合したオリゴ糖 (実施例 5) は、メチルラムナンチップエピトープを効率的に模倣することが示される。メチルラムナンチップに対して特異的であるものとこれまでに同定されている、PBS - Tween 中の定濃度 10 μ g / mL の 1 B 1 mAb を、緑膿菌 (Pa) PAO1 BAA - 47 (wt) リポ多糖 (LPS) (阻害に対する陽性対照) 及び髄膜炎菌 (Nm) galE / lpt3 LPS (阻害に対する陰性対照) 並びにリンカーを有する合成オリゴ糖 (S 19 - 21) の希釈により 1 : 1 の比でインキュベートした。mAb 1 B 1 の最終濃度は 5 μ g / mL であった。Pa LPS 及び Nm LPS 並びに合成オリゴ糖を、濃度 3 mg / mL から開始して滴定し (最終濃度 1.5 mg / mL)、PBS - Tween により 2 倍希釈を 12 回行った。この混合物をともに 1 時間室温でインキュベートした後、Pa wt LPS コーティング ELISA プレートに 1 時間室温で加えた。

40

【0 2 4 4】

阻害ステップにおいて利用可能な 1 B 1 全てに結合するのに十分な LPS / オリゴ糖が存在する場合、ELISA プレート上の LPS に結合する遊離の 1 B 1 は存在せず、この

50

ため E L I S A による呈色反応も存在しない。しかし、L P S / オリゴ糖のいずれも抗体に結合しないか、又は 1 B 1 の結合を遮断するのに十分な L P S / オリゴ糖が存在しない場合、E L I S A により生成される色の強度は、P B S 単独とのインキュベーションの場合と類似する。

【 0 2 4 5 】

図 3 3 に示すように、P a w t L P S は、L P S をおよそ 1 0 0 μ g / m l に希釈するまで E L I S A により色が生成されないため、1 B 1 に結合及び遮断する。無関係な N m L P S は、1 B 1 の結合を遮断せず、P B S も、1 B 1 の結合を遮断しない。

【 0 2 4 6 】

オリゴ糖は、1 B 1 と四糖及び五糖との結合を遮断し、同様に挙動して、およそ 5 μ g / m l の力価がわずかに測定され、一方、三糖も結合を遮断するが、およそ 1 0 0 μ g / m l の力価がより早期に測定される。

【 0 2 4 7 】

したがって、このような結果は、先に調製したオリゴ糖（リンカーなし）のデータを裏付ける。このようなオリゴ糖におけるリンカーの付加によって、オリゴ糖の立体構造も変更されず、オリゴ糖の m A b 1 B 1 への結合及び遮断も影響されない。したがって、リンカーを有する合成オリゴ糖は、P a 上の m A b 1 B 1 により認識されるエピトープを効率的に模倣する。

【 0 2 4 8 】

実施例 7：複合糖質の調製のためのオリゴ糖リンカーと活性化 C R M（免疫化用）及び活性化 B S A（スクリーニング用）のコンジュゲーション

C R M 及び B S A のアミノオキシ活性化：最初に、タンパク質（C R M 又は B S A）の溶解素を 1 0 m g / m l で 2 0 0 m M のリン酸ナトリウム緩衝液 p H 7 . 4 に溶解し、4 に冷却することにより活性化した。次いで、D M S O 中に 3 m g / m l で溶解した、およそ 8 5 $\times$ モル過剰量のプロモ酢酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステルを加え、1 8 時間 4 で放置した。次いで、臭素活性化タンパク質を、a m i c o n u l t r a - 1 0 3 0 K M W C O スピнкаラムを使用して水に対して（3 回）およそ 5 0 0 μ l の容量まで脱塩した。これに 2 0 0 m M のリン酸ナトリウム緩衝液 p H 7 . 4 を 5 0 0 μ l に加え、4 に冷却した。2 0 0 m M のリン酸ナトリウム緩衝液 p H 7 . 4 1 0 0 μ l に溶解した、およそ 7 5 $\times$ モル過剰量の 3 - （アミノオキシ）- 1 - プロパンチオール塩酸塩を加え、室温で 2 時間放置した。次いで、生じたアミノオキシ活性化タンパク質を、a m i c o n u l t r a - 1 0 3 0 K M W C O スピнкаラムを使用して水に対して（3 回）脱塩した。活性化レベルは、M A L D I M S により決定した（表 6）。

【 0 2 4 9 】

アルデヒド官能基生成のためのリンカーの活性化：S 2 2、S 2 3、及び S 2 4 上のリンカーを活性アルデヒド官能基に変換するために、オリゴ糖（S 2 2 ~ 2 4）を 3 m g / m l で 5 0 % の酢酸に溶解し、3 7 で 7 時間放置した。冷却されると、反応混合物を凍結乾燥させた。

【 0 2 5 0 】

コンジュゲーション及びコンジュゲートの特性決定：2 0 0 m M のリン酸ナトリウム緩衝液 p H 6 5 0 μ l に溶解した活性化オリゴ糖（トリ - 、テトラ - 又はペンタ - ）1 m g を、0 時間、3 時間、及び 6 時間に、活性化タンパク質に加えた。使用する活性化タンパク質の量は、それぞれの場合で調整して、タンパク質の 1 アミノオキシ基当たりおよそ 8 $\times$ モル過剰量のオリゴ糖を維持した。反応物は、1 8 時間室温で放置した。次いで、a m i c o n u l t r a - 1 0 3 0 K M W C O スピнкаラムを使用して P B S に対して（3 回）生成物を単離し、4 で保存した。

活性化 C R M（トリ - / テトラ - / ペンタ - はそれぞれ 2 . 1 m g / 1 . 7 m g / 1 . 5 m g C R M - o x y）上の 1 アミノオキシ基当たりおよそ 8 $\times$ モル比となる活性化オリゴ糖（トリ - 、テトラ - 、及びペンタ - ）各 3 m g をコンジュゲートした。コンジュゲーションの程度は、M A L D I M S により決定した（表 6）。

【 0 2 5 1 】

【 表 6 】

表 6. CRM & BSA コンジュゲートの活性化及びオリゴ糖負荷の要約

コンジュゲート	アミノオキシ活性化 (アミノオキシ数/タン パク質)	コンジュゲーション (オリゴ数/タンパク 質)
CRM-tri	15	10
CRM-tetra-	15	9
CRM-penta	15	8
BSA-tri	20	6
BSA-tetra-	20	5
BSA-penta-	20	6

10

【 0 2 5 2 】

実施例 8 : コンジュゲートによるマウス及びウサギの免疫化

6 ~ 8 週齢の雌の B A L B / c マウスを 3 回腹腔内に免疫した。各時点で、各マウスに同一量のオリゴ糖コンジュゲート並びに S I G M A アジュバント及び P B S 緩衝液を投与した。マウスは、0 日目にプライムして 2 1 日目及び 4 2 日目にブースターを投与し、0 日目、3 5 日目、及び 5 6 日目に血液試料を採取した。

20

【 0 2 5 3 】

M R h a 3 V 群の各マウスに、C R M 2 8 μ g が生じる三糖コンジュゲート 3 μ g を、5 0 % v / v の S I G M A アジュバントとともに投与し、P B S 緩衝液を総量 1 0 0 μ l で腹腔内に投与した。M R h a 4 V 群の各マウスに、C R M 2 5 . 5 μ g が生じる四糖コンジュゲート 3 μ g を 5 0 % v / v の S I G M A アジュバントとともに投与し、P B S 緩衝液を総量 1 0 0 μ l で腹腔内に投与した。最終的には、M R h a 5 V 群の各マウスに、C R M 2 3 μ g が生じる五糖 3 μ g を 5 0 % v / v の S I G M A アジュバントとともに投与し、P B S 緩衝液を総量 1 0 0 μ l で腹腔内に投与した。血液試料は、顎下静脈採取方法により得られ、血液分離後に血清およそ 1 0 0 μ l を得た。

【 0 2 5 4 】

実施例 9 : B S A - コンジュゲート及び L P S に対する生成したマウス血清のスクリーニング

プライム 1 回ブースト 2 回の免疫化計画を行ったマウス由来の個々の血清を、B S A - オリゴ糖コンジュゲート及び P a w t L P S を認識する能力について、E L I S A によりスクリーニングした。

全てのマウスにおいて、コンジュゲートに対する良好な I g M 応答が生じ、これは、免疫前血清 (図 3 4 A) と比較した E L I S A による B S A - オリゴ糖コンジュゲートの認識 (図 3 5 A ~ C) 及び免疫前血清 (図 3 4 B) と比較した L P S に対する中等度の応答 (図 3 5 D) に例示された。全てのマウスにおいて、コンジュゲートに対する中等度の I g G 応答が生じ、これは、免疫前血清 (図 3 6 A) と比較した E L I S A による B S A - オリゴ糖コンジュゲートの認識 (図 3 7 A) により例示された。同様に、四糖コンジュゲート及び五糖コンジュゲートを投与した全てのマウスでは、コンジュゲートに対する中等度の I g G 応答が生じ、これは、免疫前血清 (図 3 6 B) と比較した E L I S A による L P S の認識 (図 3 7 B) により例示された。C R M - 四糖コンジュゲート及び C R M - 五糖コンジュゲートにより免疫化したマウスが、三糖コンジュゲートを投与したマウスと比較して E L I S A による P a w t L P S に対する I g G 応答の向上を示したため (図 3 7 B) 、マウスデータから、天然抗原の効率的模倣に必要とされる最小長のオリゴ糖は、四糖であることが示唆され得る。表 7 に詳述する殺菌全細胞を、E L I S A により、生成血清による認識についてスクリーニングした。

30

40

【 0 2 5 5 】

50

実施例 10 : B S A - コンジュゲート及び L P S に対する生成したウサギ血清のスクリーニング

全てのウサギにおいて、コンジュゲートに対する良好な免疫応答が生じ、これは、免疫前血清と比較した E L I S A による B S A - オリゴ糖コンジュゲートの認識により例示された (図 3 8 A)。同様に、全てのウサギにおいて、コンジュゲートに対する良好な免疫応答が生じ、これは、免疫前血清と比較した E L I S A による L P S の認識により例示された (図 3 8 B)。全てのウサギにおいて強力な応答 (1 : 1 0 , 0 0 0 の範囲におけるエンドポイント力価) が生じ、これにより、いくつかの異なる L P S 分子を認識することが可能となった。

【 0 2 5 6 】

実施例 11 : 殺菌全細胞に対する生成したマウス血清及びウサギ血清のスクリーニング

野生型株、A バンドメチルラムナンと関連すると考えられる遺伝子に変異を有する株、及び臨床環境において最も一般的に遭遇する血清型株を含む様々な緑膿菌殺菌細胞 (表 7) に対して、全細胞 E L I S A を実施した。

【 0 2 5 7 】

【表 7】

表 7 全細胞 ELISA によりスクリーニングした細胞のリスト

種	株	NRCC #	血清型	詳細	ソース
緑膿菌	PAO1 BAA-47	6678	5	野生型	ATCC
	PAO1	6667	-	PAO1 (wzy ::Gm)	Lam lab
	PAO1	6668	-	PAO1 (wzy ::Gm)(Δpa5457)	Lam lab
	PAO1	6669	-	PAO1 (wzy ::Gm)(Δpa5458)	Lam lab
	PAO1	6670	-	PAO1 (wzy ::Gm)(Δpa5459)	Lam lab
	5933	6954	1	33348	ATCC
	5934	6955	2	33349	ATCC
	5939	6956	6	33354	ATCC
	5943	6957	10	33357	ATCC
	5944	6958	11	33358	ATCC
	170003	6959	16	33363	ATCC
	5937	6960	5	33352	ATCC
	001S4-1	6944	-	臨床単離株	Sad lab
	003S-20	6945	-	臨床単離株	Sad lab
	003E-9	6946	-	臨床単離株	Sad lab
カタル球菌	004S-3	6947	-	臨床単離株	Sad lab
	004E-8	6948	-	臨床単離株	Sad lab
	006S3-1	6949	-	臨床単離株	Sad lab
	006S4-1	6950	-	臨床単離株	Sad lab
	009S-7	6951	-	臨床単離株	Sad lab
	014S-1	6952	-	臨床単離株	Sad lab
	014E-31	6953	-	臨床単離株	Sad lab
	lgt2/lgt4	6541	-	陰性対照	Cox lab
	8047 lpt3	6263	-	陰性対照	Cox lab

【 0 2 5 8 】

投与したオリゴ糖ワクチンにより貯蔵された免疫後マウス血清は、図 3 9 A に示すように細胞を認識した。再び、三糖コンジュゲートによる免疫後血清が、四糖コンジュゲート及び五糖コンジュゲートにより誘発された明快な応答と比較して弱い応答を誘発し、これによって、メチルラムナンチップエピトープが、全細胞との関連において可視となること、及びオリゴ糖コンジュゲートが、このエピトープを認識可能な免疫応答をもたらすことが可能であることが例示された。

【 0 2 5 9 】

免疫後の個々のウサギ血清は、図 3 9 B に示すように細胞を認識し、これによって、メチルラムナンチップエピトープが、全細胞との関連において可視となり、オリゴ糖コンジュゲート（トリ - 、テトラ - 、及びペンタ - ）が、このエピトープを認識可能な免疫応答をもたらすことが可能であることが例示された。その上、発明者らのコレクションの様々な臨床単離株（表 7 ）に対してウサギ血清をスクリーニングすると（図 3 9 C ）、再び、殆どの株に対しても良好な交差反応性が観察され、これによって、このエピトープの保存、及びオリゴ糖に基づくコンジュゲートの、必要とされる免疫応答をもたらすことが可能な能力が更に例示された。

10

【 0 2 6 0 】

L P S 及び B S A コンジュゲートによる先のデータと一致して、全細胞 E L I S A により、適切な応答の促進に必要な最小長のオリゴ糖として四糖に必要とされる、マウスにおける要件が裏付けられた。しかし、ウサギ由来の血清では、全てのコンジュゲートが類似の交差反応的応答を誘発可能であったため、同一のこの最小長の要件が示されなかった。

20

【 0 2 6 1 】

まとめると、このような結果により、メチルラムナン A バンドチップエピトープを代表する、少なくとも合成四糖及び五糖の C R M コンジュゲートが、P a w t L P S 及び臨床環境において最も一般的に遭遇する血清型を代表する全細胞を認識する特定の免疫応答を誘発可能であることが示され、これによって、ワクチン免疫原としての単離抗原に代わる実行可能な選択肢として、これらの可能性が例示される。

【 0 2 6 2 】

本明細書に記載する特定の実施形態は、単なる例とすることを意図する。変更形態、修正形態、及び変形形態は、特定の実施形態に対して当業者により行われ得る。特許請求の範囲は、本明細書に記載する特定の実施形態により制限されるべきではないが、全体として本明細書と一致するように解釈すべきである。

30

【 0 2 6 3 】

本明細書において言及する全ての公表文献、特許、及び特許出願は、本発明が属する分野の当業者の技術レベルを示し、個々の各公表文献、特許又は特許出願が参照により組み込まれるものと詳細かつ個別に示すと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

[00371] このように本発明は記載され、本明細書が多くの方法により変形され得ることは明らかである。このような変形形態は、本発明の趣旨及び範囲からの逸脱であるとはみなされず、このような修正形態は全て、当業者に明らかであるように、次の特許請求の範囲内に含まれることを意図する。

【 0 2 6 4 】

40

参考文献

次の各参考文献の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

1. Plackett, B., No money for new drugs, Nature 586 (2020) S50-S52.
2. Jansen, K.U., Anderson, A.S., The role of vaccines in fighting antimicrobial resistance, Hum. Vaccines Immunother. 14(2018) 2142-2149.
3. Grimwood et al., Vaccination against respiratory Pseudomonas aeruginosa infection, Hum. Vaccines Immunother. 11(2015) 14-20.
4. Adlbrecht et al., Efficacy, immunogenicity, and safety of IC43 recombinant Pseudomonas aeruginosa vaccine in mechanically ventilated intensive care patients-a randomized clinical trial, Crit. Care, 24 (2020) 74.

50

5. Merakou, C., Schaefer, M.M., Priebe, G.P., Progress toward the elusive *Pseudomonas aeruginosa* vaccine, *Surg. Infect.* 8 (2018) 757-768.
6. V. L. Campodonico et al., Efficacy of a conjugate vaccine containing poly mannuronic acid and flagellin against experimental *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice, *Infect. Immun.* 79(2011) 3455-3464.
7. Hegerie et al., Development of a broad spectrum glycoconjugate vaccine to prevent wound and disseminated infections with *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, *PLOS ONE* (2018) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203143>.
8. DiGiandomenico et al., Identification of broadly protective human antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl by phenotypic screening. *J Exp Med* 209 (2012) 1273-1287 10
9. DiGiandomenico et al., A multifunctional bispecific antibody protects against *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Transl Med* 6(2014) 262ra155
10. Horn et al., Preclinical in vitro and in vivo characterization of the fully human monoclonal IgM antibody KBPA101 specific for *Pseudomonas aeruginosa* serotype IATs-O11. (2010) *Antimicrob. Ag. Chemother.* 54:2338-2344.
11. Loos et al., Pre-clinical and phase I safety data for anti-*Pseudomonas aeruginosa* human monoclonal antibody AR-105. (2019) *Open Forum Infect. Dis.* 6: S307-S308. 20
12. AstraZeneca. 2019. AstraZeneca pipeline update. April 2020. https://www.astrazeneca.com/content/dam/az/PDF/2020/q12020/Q1_2020_results_clinical_trials_appendix.pdf
13. Patel et al., An engineered bispecific DNA encoded IgG antibody protects against *Pseudomonas aeruginosa* in a pneumonia challenge model. (2017) *Nat. Commun.* 8: 637-648.
14. Dasgupta et al., Characterization of lipopolysaccharide-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* derived from serotypes O3, O5, and O6. *Infect. Immun* (1994) 62:809-817 30
15. Byrd et al., Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol. Microbiol.* (2009) 73:622-638
16. Sadovskaya et al., High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: the *ndvB* gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated β -(1-3)-glucans, which bind aminoglycosides. *Glycobiology* 20 (2010) 895-904.
17. Knirel, Y. A. and Kocharova, N.A., Structure and properties of the common polysaccharide antigen of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry (Moscow)* 60 (1995) 1499-1507. 40
18. Yokota et al., Characterization of a polysaccharide component of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* IID1008 (ATCC 27584) as D-rhamnan. *Eur. J. Biochem.* 167 (1987) 203-209.
19. Vinogradov et al., Structures of lipopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae*. Elucidation of the structure of the linkage region between core and polysaccharide O chain and identification of the residues at the non-reducing termini of the O chains. *J Biol Chem.* (2002) 277:25070-25081.
20. Wang et al., Biosynthesis of the Common Polysaccharide Antigen of 50

- Pseudomonas aeruginosa* PAO1: Characterization and Role of GDP-D-Rhamnose: GlcNAc/GalNAc-Diphosphate-Lipid α 1,3-D-Rhamnosyltransferase WbpZ. *J. Bacteriol.* (2015) 197: 2012-2019.
21. Arsenault et al., Structural studies on the polysaccharide portion of "A-band" lipopolysaccharide from a mutant (AK1401) of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *Can. J. Chem.* 69 (1991) 1273-1280
22. Cox et al., Investigating the candidacy of a capsular polysaccharide-based glycoconjugate as a vaccine to combat *Haemophilus influenzae* type a disease: a vaccine solution for an unmet public health need. *Vaccine* (2017) 35:6129-36. 10
23. St. Michael et al., Investigating the candidacy of the serotype specific rhamnan polysaccharide based glycoconjugate to prevent disease caused by the dental pathogen *Streptococcus mutans*. *Glycoconj. J.* (2018) 35:53-64.
24. Cairns et al., Development and characterisation of mouse monoclonal antibodies specific for *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* lipoteichoic acid, utilising synthetic molecules to define a minimal epitope. *ACS Chem. Biol.* (2020) 15:1050-1058.
25. Makarenko et al., Immunological studies of an artificial antigen with specificity of a common polysaccharide antigen of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Imm. Med. Microbiol.* (1993) 7:251-256. 20
26. Lam et al., Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. (1989) *J. Clin. Microbiol.* 27:962-967.
27. Richard et al., Antibody binding to the O-specific antigen of *Pseudomonas aeruginosa* O6 inhibits cell growth. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2020) 64: e02168-19
28. Zunk, M. and Kiefel, M. J., An efficient synthesis of selectively functionalized d-rhamnose derivatives, *Tetrahedron Lett.*, 52 (2011) 1296-1299. 30
29. Faure et al., Practical synthesis of valuable d-rhamnoside building blocks for oligosaccharide synthesis, *Tetrahedron Lett.* 48 (2007) 2385-2388.
30. Seepersaud et al., Ceric ammonium nitrate/acetic anhydride: A tunable system for the O-acetylation and mononitration of diversely protected carbohydrates, *Synth. Commun.* 47 (2017) 853-871.
31. Blattner et al., Syntheses of oligomannosides in solution and on a soluble polymer support: a comparison, *Carbohydr. Res.* 341 (2006) 299-321.
32. Nagashima, N. and Ohno, M., An efficient O-monoalkylation of dimethyl l-tartrate via O-stannylene acetal with alkyl halides in the presence of cesium fluoride, *Chem. Lett.*, 16 (1987) 141-144. 40
33. Leontein, K. and Lonhgren, J., Determination of the absolute configuration of sugars by gas-liquid chromatography of their acetylated 2-octyl glycosides, in : J. N. BeMiller, R.L. Whistler, D. H. Shaw (Eds.), *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Stockholm, John Wiley & Sons, Inc., 1993, pp.87-89.
34. Wang, L. and Lowary, T. L., Synthesis of rhamnolipid derivatives containing ester isomers, *Org. Lett.* 22 (2020) 9633-9637.
35. Domon, B. and Costello, C. E., A systematic nomenclature for carbohydrate fragments in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates, *Glycoconj* 50

ate J, 5 (1988) 397-409.

36. Dass, C., Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry, Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 2007, pp.17-26.

37. Crawford, C. J. and Oscarson, S., Convergent total synthesis of *Cryptococcus neoformans* serotype B capsule repeating motif, Carbohydr. Res. 497 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.carres.>

38. Qin et al., Chemical synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* O11 O-antigen trisaccharide based on neighboring electron-donating effect, J. Carbohydr. Chem. 39 (2020) 374-397.

39. X. Zhang, D. Wang, G. Jin, L. Wang, Z. Guo, G. Gu, Synthesis of a tetrasaccharide repeating unit of the exopolysaccharide from *Burkholderia multivorans*, J. Carb. Chem. 36 (2017) 189-204. 10

40. D. Wang, W. Zhuge, Z. Guo, G. Gu, Synthesis of a disaccharide repeating unit of the O-antigen from *Burkholderia ambifaria* and its oligomers, Carb. Res. 442 (2017) 41-51.

41. M. P. Jamshidi, C. Cairns, S. Chong, F. St. Micheal, E. V. Vinogradov, A. D. Cox, J. Sauvageau, Synthesis and Immunogenicity of a Methyl Rhamnan Pentasaccharide Conjugate from *Pseudomonas aeruginosa* A-Band Polysaccharide, ACS Infect. Dis. 8 (2022) 1347-1355.

42. Munneke S, Dangerfield EM, Stocker BL, Timmer MSM. The versatility of N-alkyl-methoxyamine bi-functional linkers for the preparation of glycoconjugates. Glycoconj J. 2017 Oct;34(5):633-642. doi:10.1007/s10719-017-9785-4. Epub 2017 Jul 19. PMID: 28725972. 20

43. Bethell et al., 1979, J. Biol. Chem. 254:2572-4; Hearn et al., 1981, J. Chromatogr. 218:509-18.

【図面】

【図 1】

【図 2】

30

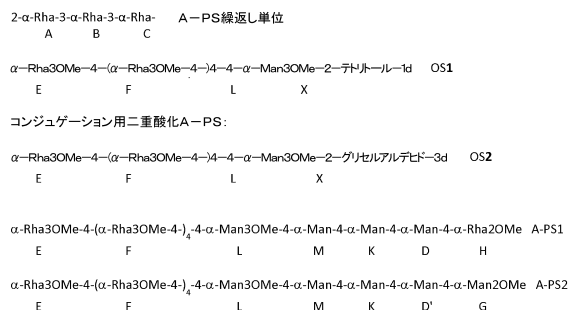


FIG. 1

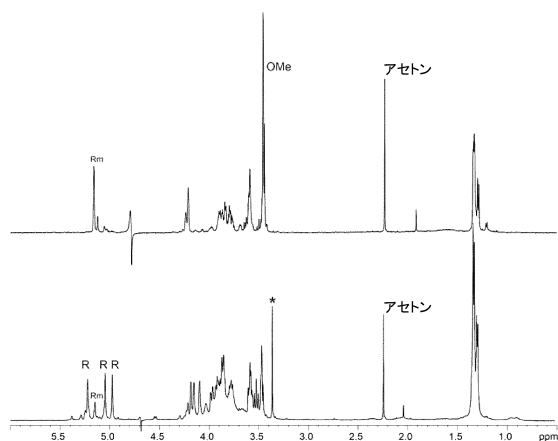


FIG. 2

40

50

【 図 3 】

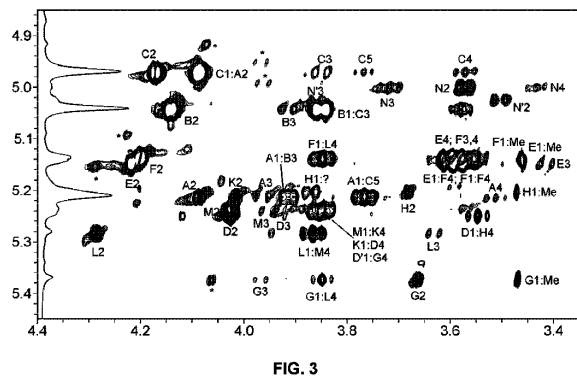


FIG. 3

【 図 4 】

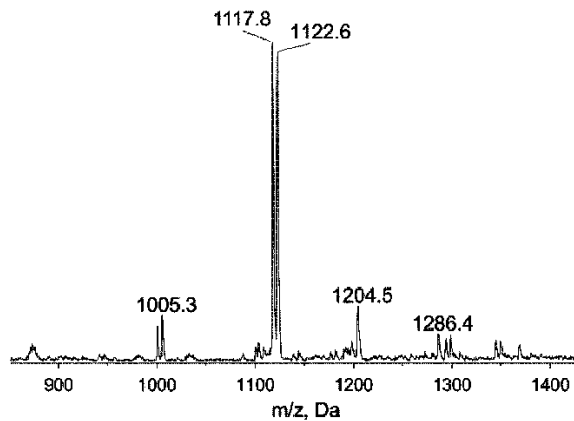


Fig. 4

【 図 5 A 】

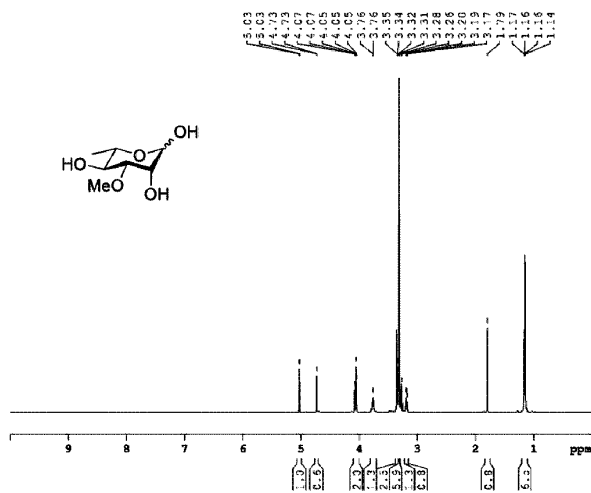


FIG. 5A

【 図 5 B 】

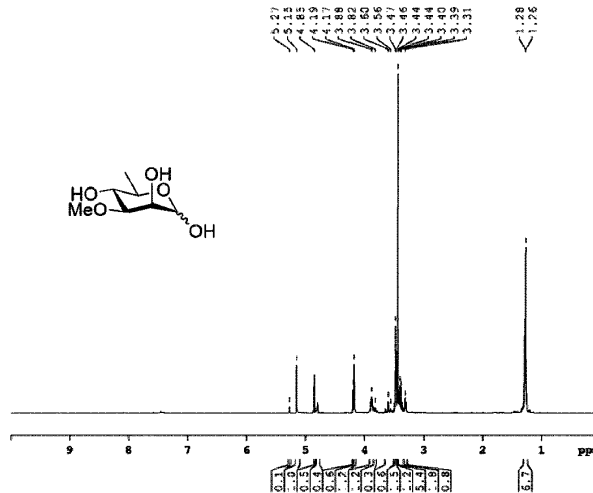


FIG. 5B

10

20

30

40

50

【 図 6 】

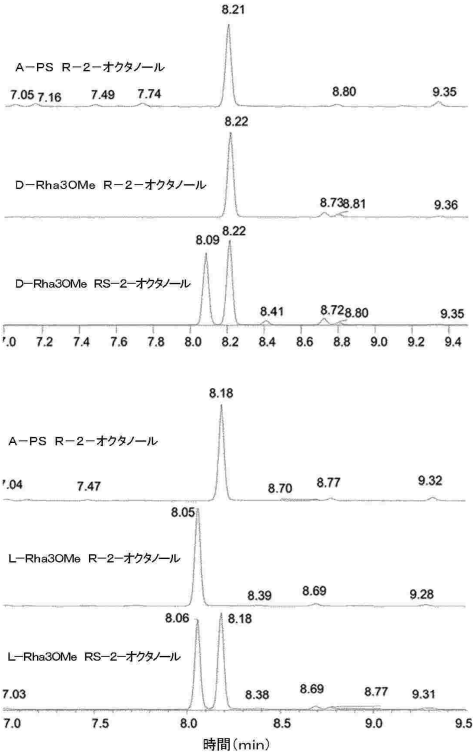


FIG. 6

【 図 7 】

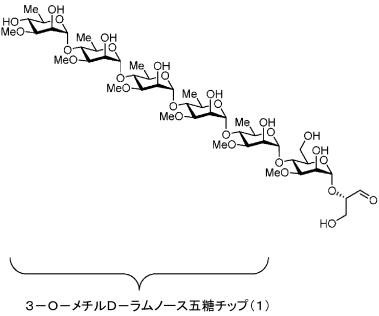


FIG. 7

【 図 8 A 】

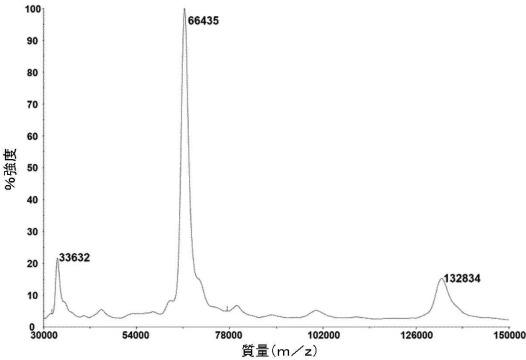


Fig. 8A

【 図 8 B 】

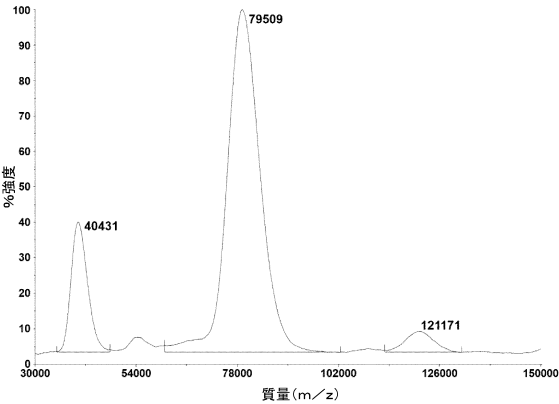


FIG. 8B

10

20

30

40

50

【 図 8 C 】

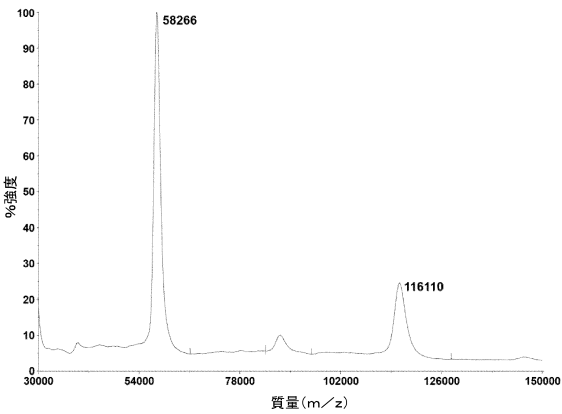


FIG. 8C

【 図 8 D 】

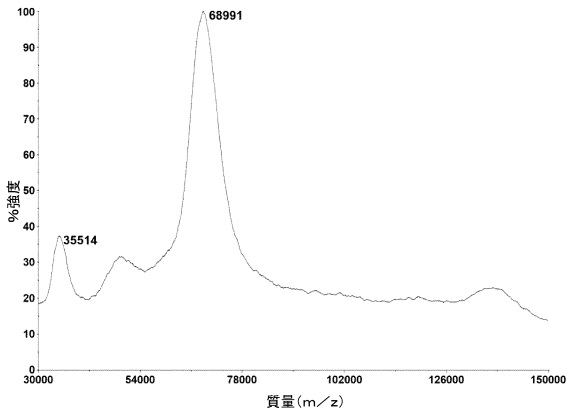


FIG. 8D

【 図 9 A 】

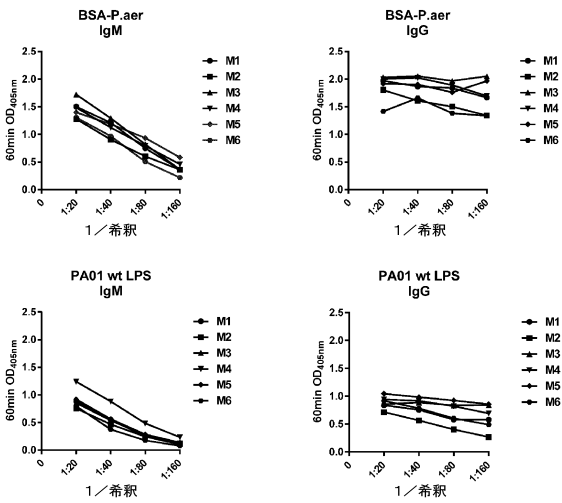


FIG. 9A

【 図 9 B 】

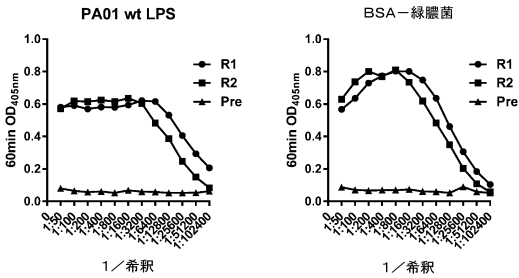


FIG. 9B

10

20

30

40

50

【 図 1 0 】

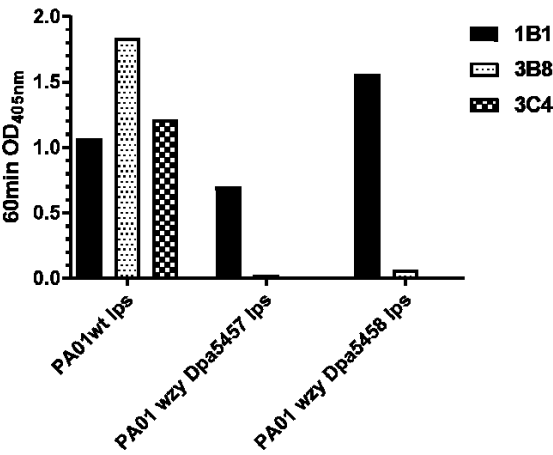


FIG. 10

【 図 1 1 A 】

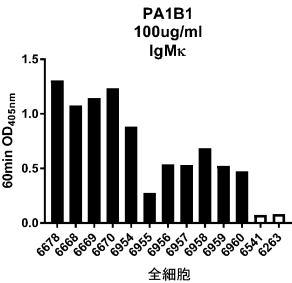


FIG. 11A

10

20

【 図 1 1 B 】

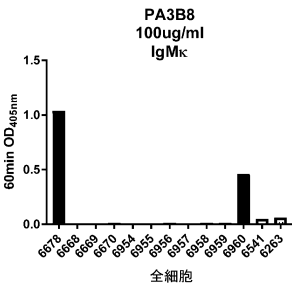


FIG. 11B

【 図 1 1 C 】

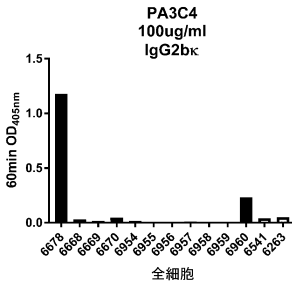


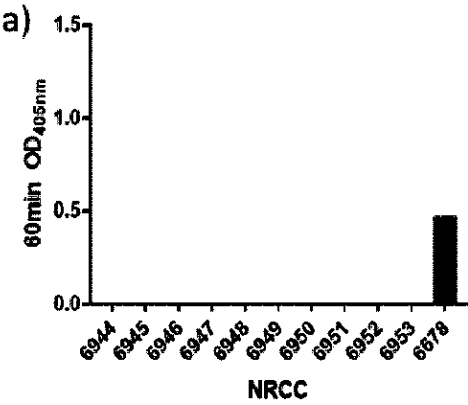
FIG. 11C

30

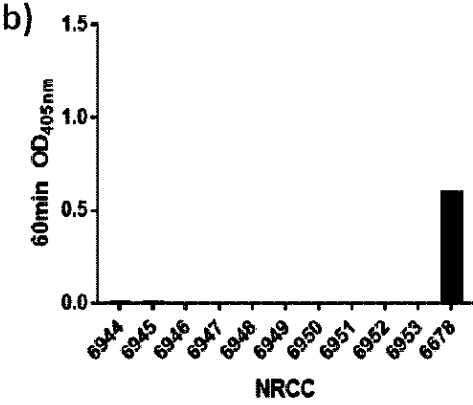
40

50

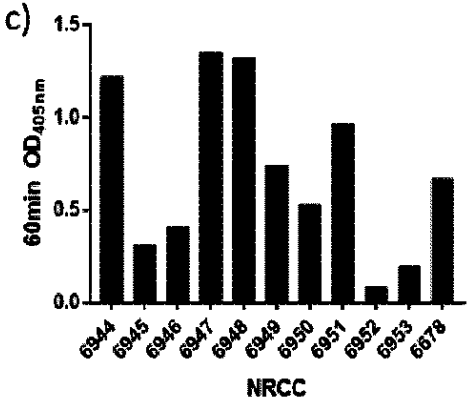
【 図 1 2 a) 】



【 図 1 2 b) 】



【 図 1 2 c) 】



【 図 1 3 A 】

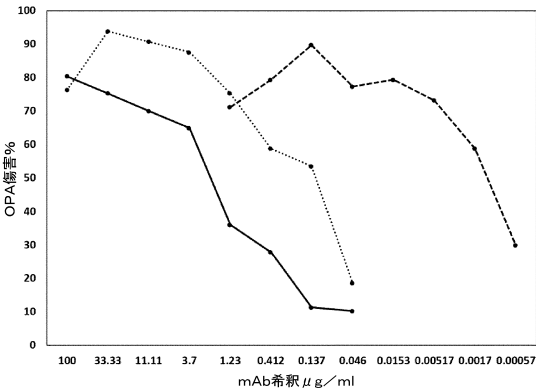


FIG. 13A

【 図 1 3 B 】

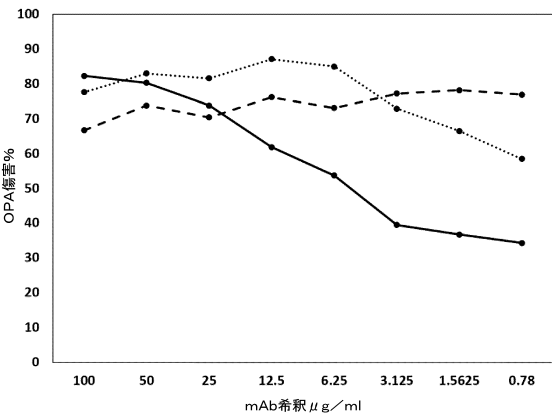


FIG. 13B

【 図 1 4 A 】

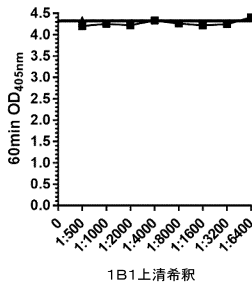


FIG. 14A

【 図 1 4 B 】

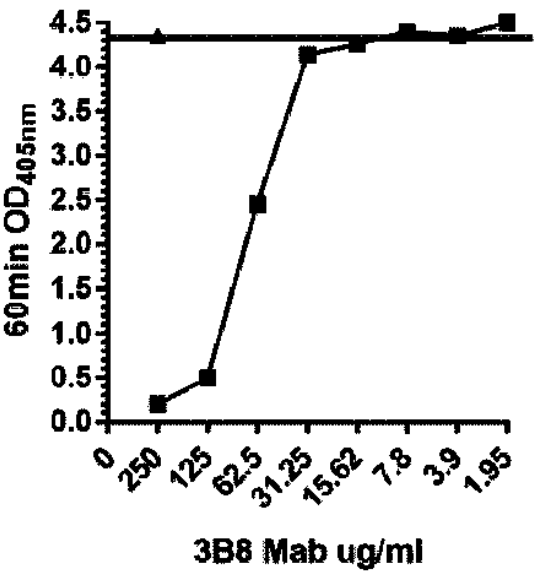


FIG. 14B

【 図 1 5 A 】

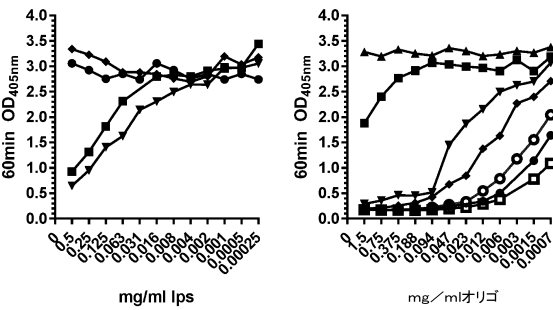


FIG. 15A

10

20

30

40

50

【 図 1 5 B 】

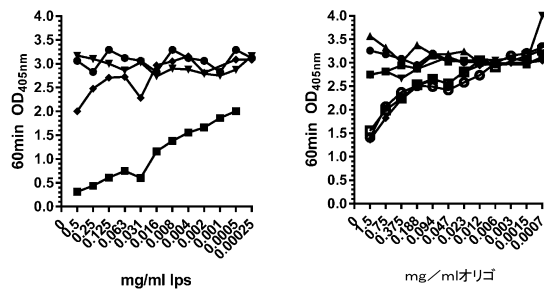


FIG. 15B

【 図 1 5 C 】

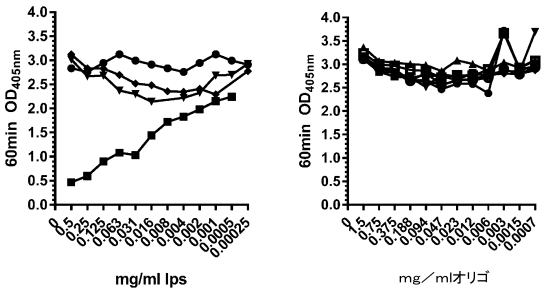


FIG. 15C

【 図 1 5 D 】

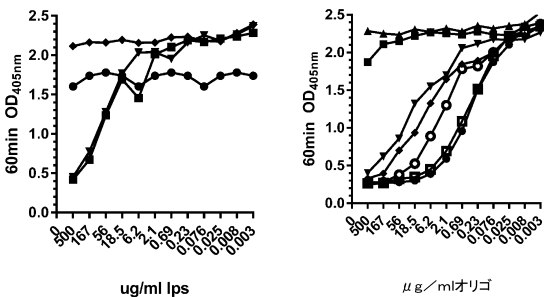


FIG. 15D

【 図 1 5 E 】

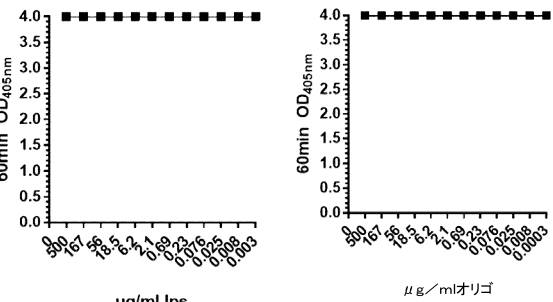


FIG. 15E

10

20

30

40

50

【 図 1 5 F 】

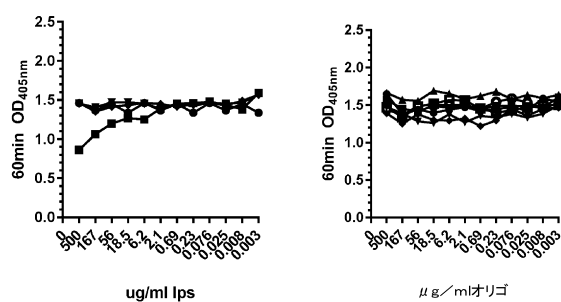


FIG. 15F

【 図 1 6 】

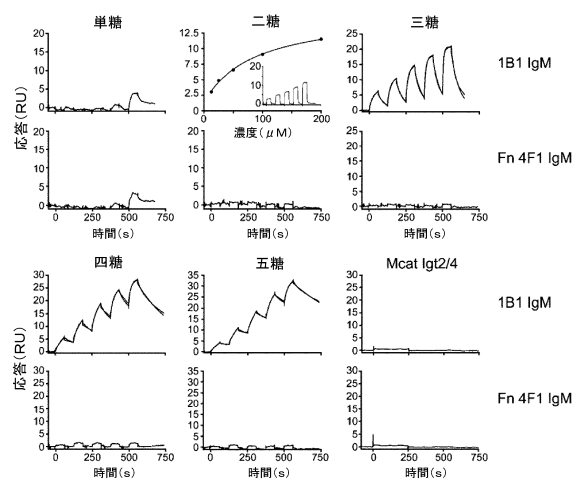


FIG. 16

【 圖 1 7 】

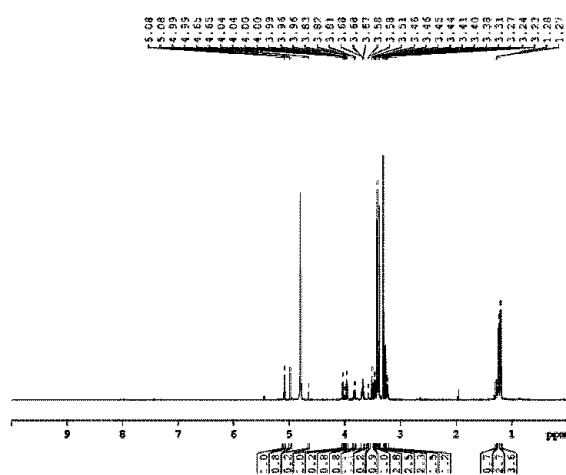


FIG. 17

【 図 1 8 】

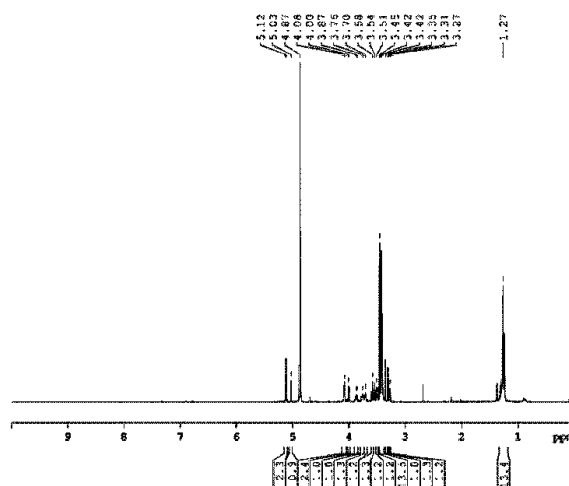


FIG. 18

【 図 1 9 】

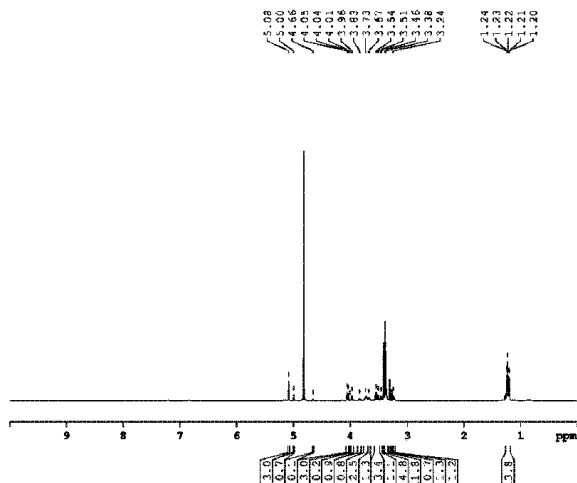


FIG. 19

【 図 2 0 】

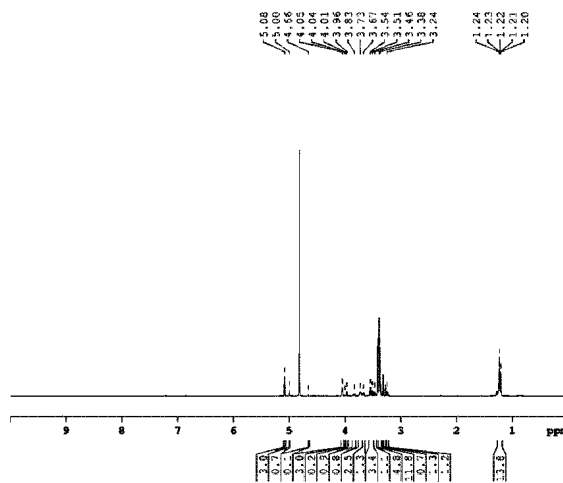


FIG. 20

10

【 図 2 1 】

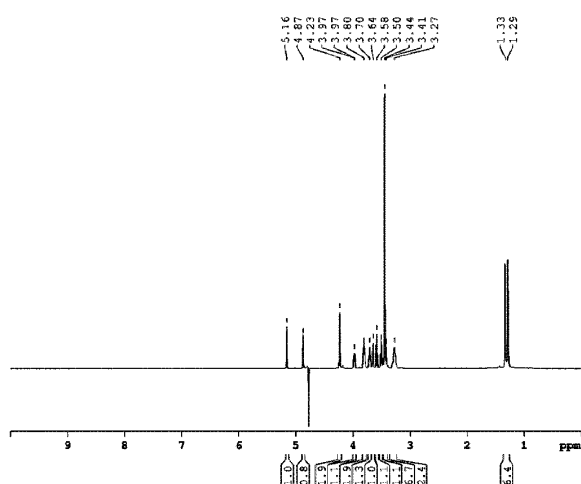
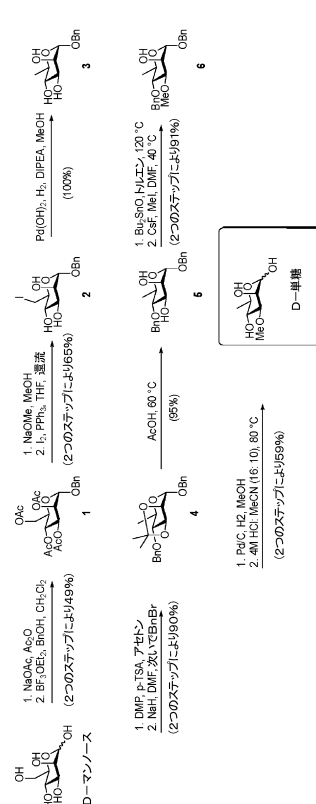


FIG. 21

【 図 2 2 】



スキーム1

FIG. 22

20

30

40

【 図 2 6 B 】

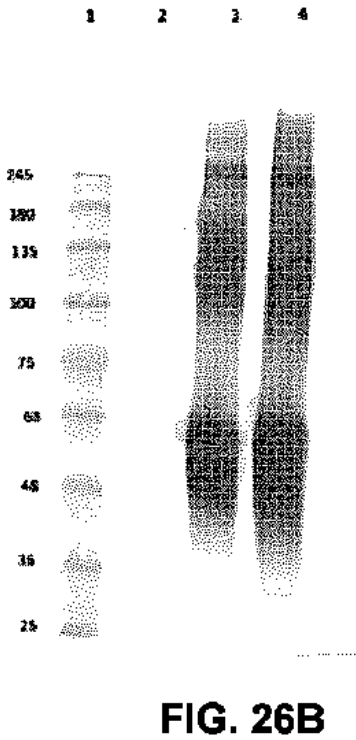


FIG. 26B

【 図 2 7 A 】

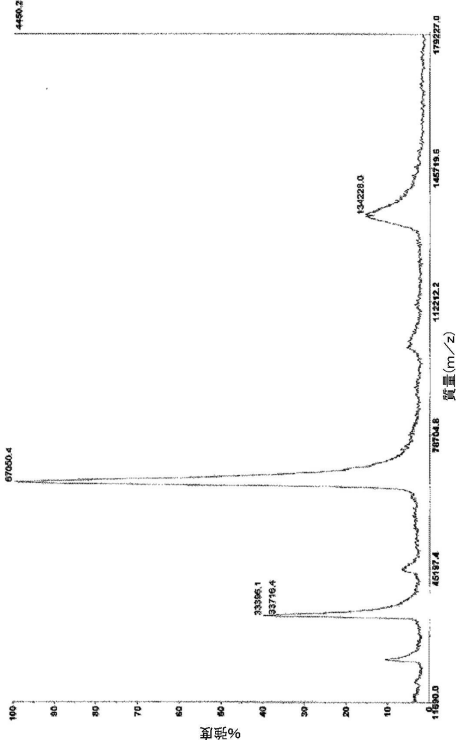


FIG. 27A

【 図 2 7 B 】

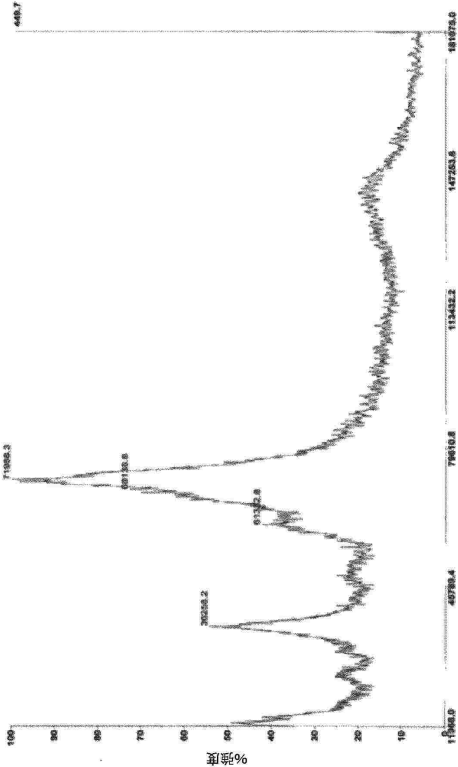


FIG. 27B

【 図 2 8 A - C 】

PAO1 wtLPSに対するPre, D35, 及びD42の滴定
MPa21-06 1-G線調剤ラムベンター-HSA
05.08.21

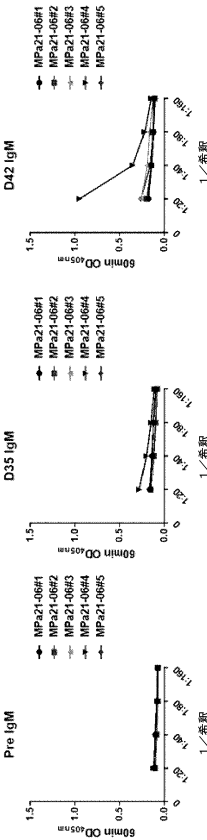


Fig. 28A

Fig. 28B

Fig. 28C

10

20

30

40

50

【 図 2 8 D - F 】

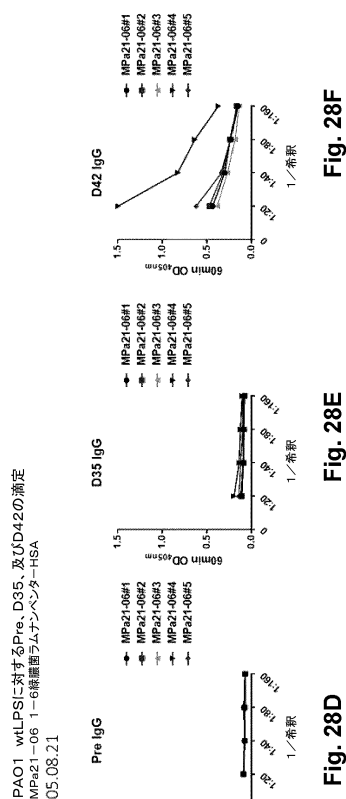


Fig. 28F

Fig. 28E

Fig. 28D

PAO1 wtLPSに対するPre、D35、及びD42の滴定
MPa21-06 1-6緑膿菌ラムナンペンターHSA
05.08.21

【 図 2 8 G - H 】

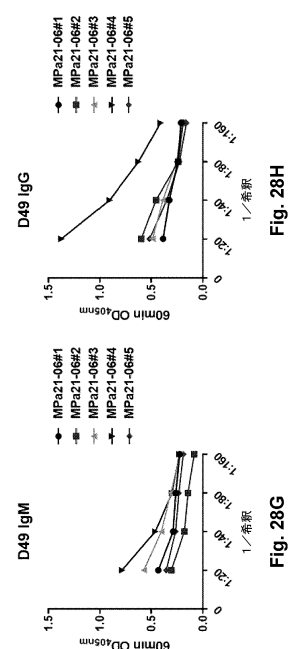


Fig. 28H

Fig. 28G

PAO1 wtLPSに対するD49滴定
MPa21-06 1-6株膿菌ラムナンペンターHSA
17.08.21

【 図 2 9 】

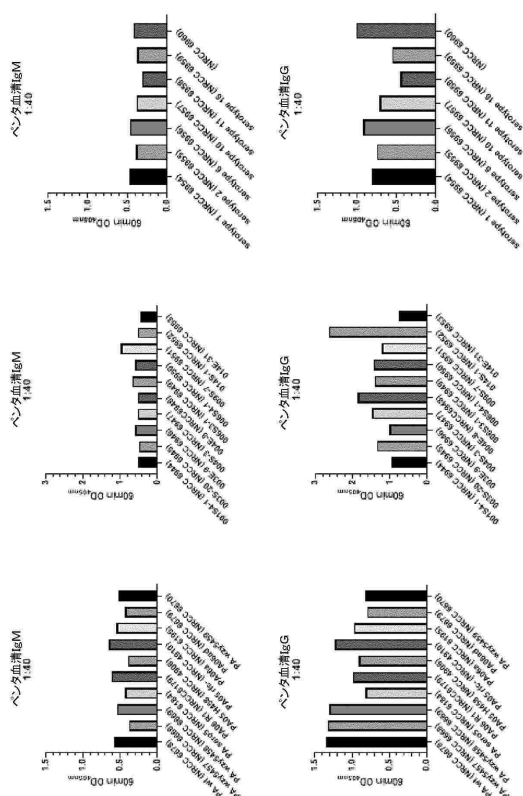


FIG. 29

【 図 3 0 】

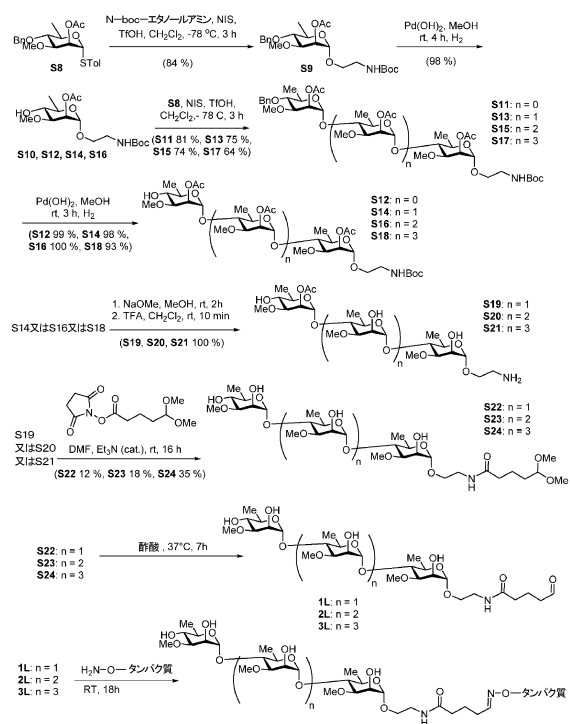


FIG. 30

【 図 3 1 A 】

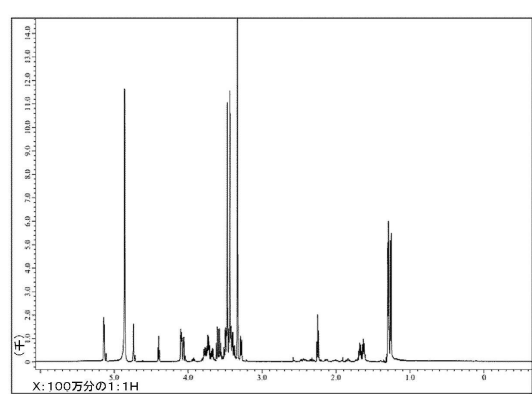


FIG. 31A

【 図 3 1 B 】

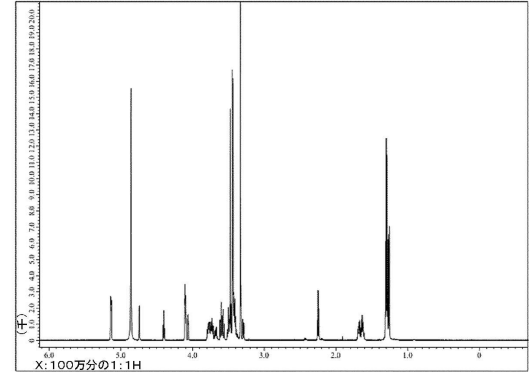


FIG. 31B

【 図 3 2 】

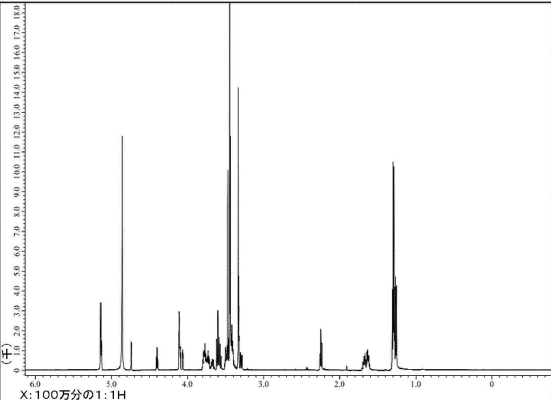


FIG. 32

【 図 3 3 】

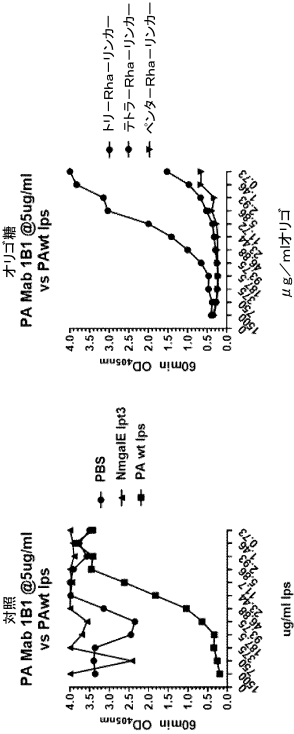


FIG. 33

【図 3 4 A】

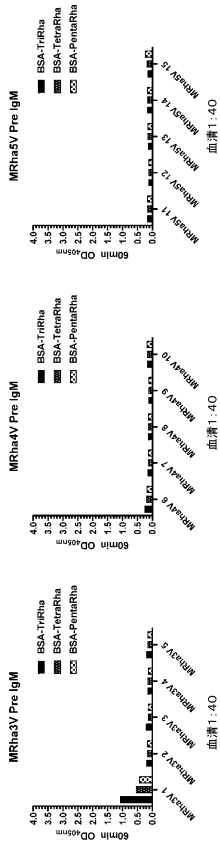


FIG. 34A

【図 3 4 B】

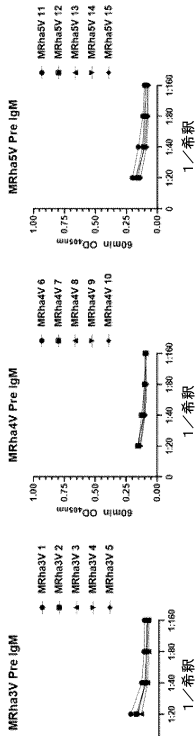


FIG. 34B

【図 3 5 A】

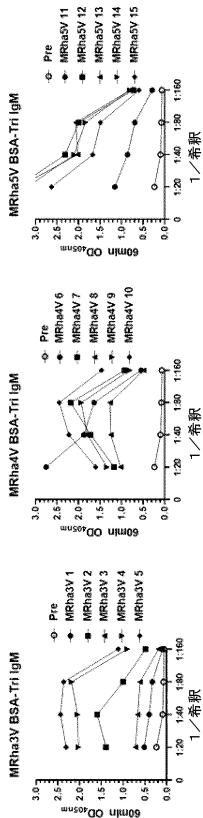


FIG. 35A

【図 3 5 B】

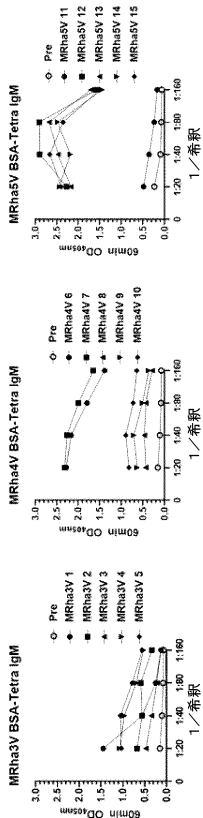


FIG. 35B

10

20

30

40

50

【図 3 5 C】

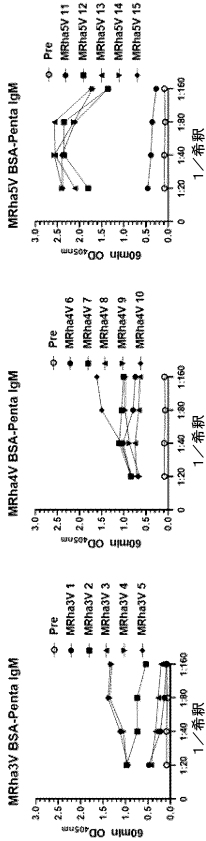


FIG. 35C

【図 3 5 D】

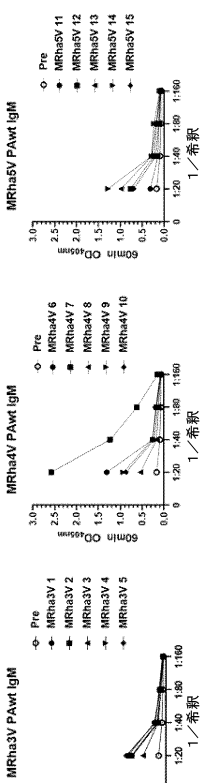


FIG. 35D

【図 3 6 A】

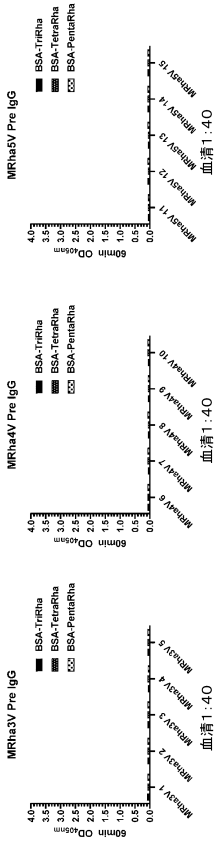


FIG. 36A

【図 3 6 B】

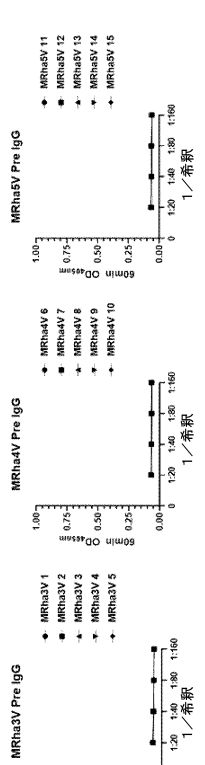


FIG. 36B

10

20

30

40

50

【 図 3 7 A 】

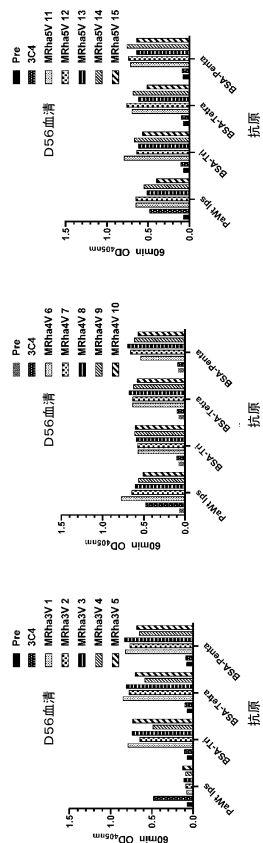


FIG. 37A

【 図 3 7 B 】

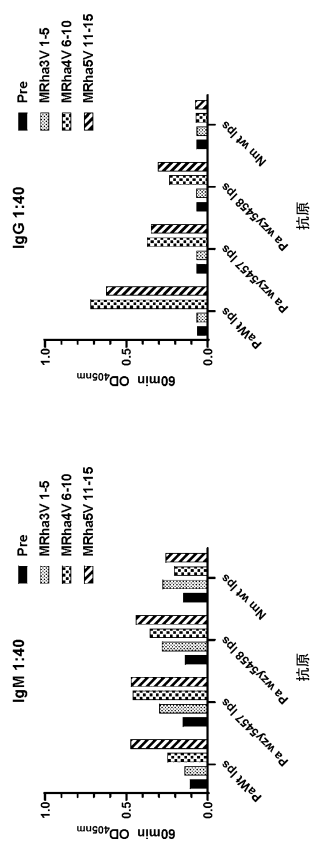


FIG. 37B

【 図 3 8 A 】

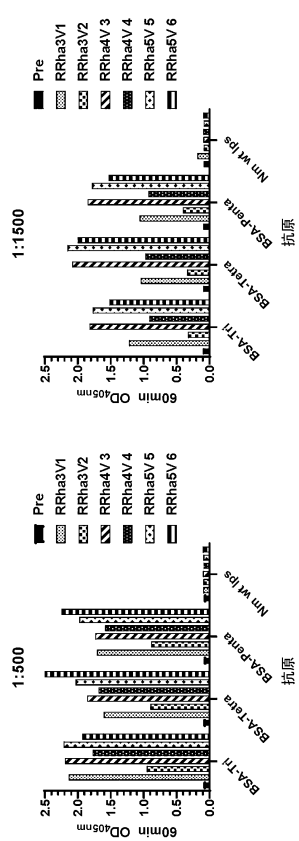


FIG. 38A

【 図 3 8 B 】

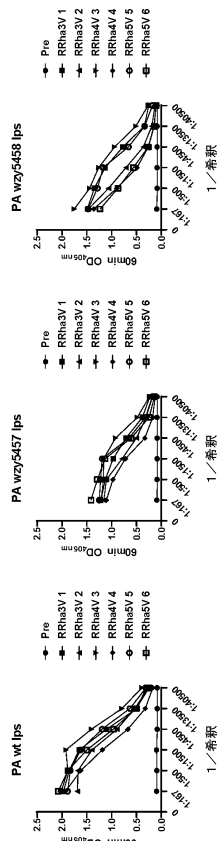


FIG. 38B

【図 39 A】

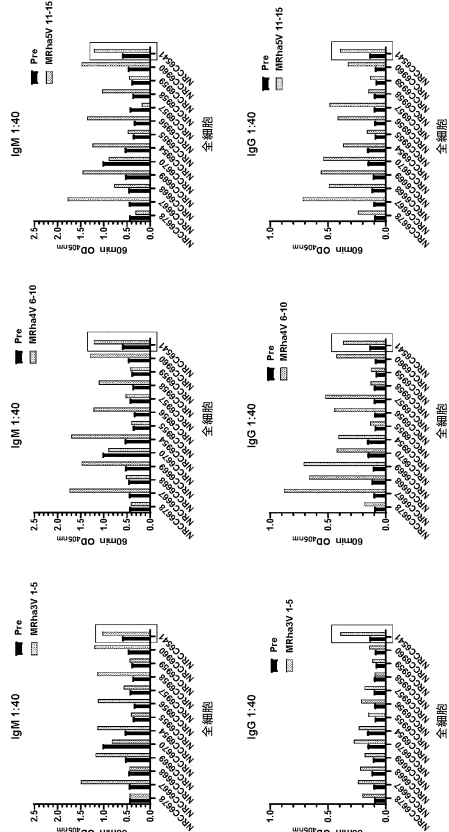


FIG. 39A

【図 39 B】

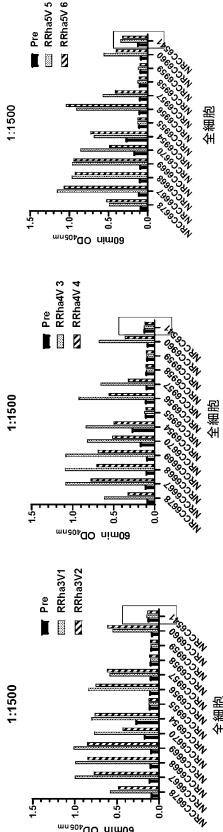
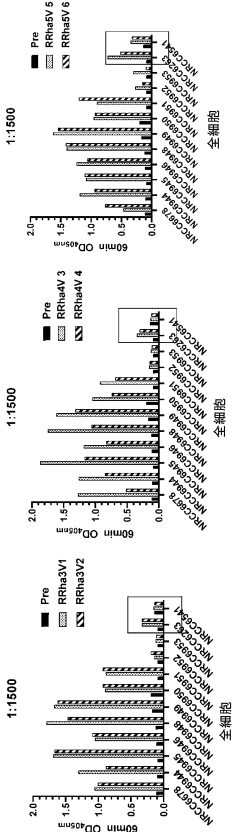


FIG. 39B

【図 39 C】



【配列表】
2025509292000001.xml

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2023/050297
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C07K 16/12</i> (2006.01), <i>A61K 39/104</i> (2006.01), <i>A61K 39/385</i> (2006.01), <i>A61P 31/04</i> (2006.01), <i>A61P 37/04</i> (2006.01), <i>C07H 15/04</i> (2006.01) (more IPCs on the last page) CPC: , <i>A61K 39/104</i> (2020.01), <i>A61K 39/385</i> (2020.01), <i>A61P 31/04</i> (2020.01), <i>A61P 37/04</i> (2020.01), <i>C07H 15/04</i> (2020.01) (more CPCs on the last page) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Keywords searched across the entire IPC		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Databases: Questel Orbit (FAMPAT), STN, GenomeQuest, Scopus Keywords: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> or <i>P. aeruginosa</i> , vaccine, glycoconjugate, conjugate, rhamnan, antibod+, anti-LPS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STANISLAVSKY, E.S. and LAM, J.S., " <i>Pseudomonas aeruginosa</i> antigens as potential vaccines". FEMS Microbiology Reviews, 1 November 1997 (01-11-1997), Vol. 21, pp. 243-277, ISSN 1574-6976. *abstract; page 245, paragraph 2 (right); page 260, last paragraph (left); Page 261, paragraph 2 (left), section 4.4, and Tables 3 and 8*	13, 15, 16, 20-23
X	MAKARENKO, T.A. et al., " <i>Immunological studies of an artificial antigen with specificity of a common polysaccharide antigen of Pseudomonas aeruginosa</i> ". FEMS Immunology and Medical Microbiology, 1 October 1993 (01-10-1993), Vol. 7, pp. 251-256, ISSN 1574-695X. *Introduction and Discussion sections; pages 254-255, overlapping paragraph*	13, 15, 21, 23
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* "A" "D" "E" "L" "O" "P"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance document cited by the applicant in the international application earlier application or patent but published on or after the international filing date document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 27 April 2023 (27-04-2023)		Date of mailing of the international search report 06 June 2023 (06-06-2023)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476		Authorized officer Chantal Binda (873) 455-0955

10

20

30

40

50

International application No.
PCT/CA2023/050297

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)), ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.	☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3.	Additional comments:

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2023/050297

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ARSENAULT, T.L. et al., "Structural studies on the polysaccharide portion of "A-band" lipopolysaccharide from a mutant (AK1401) of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain PAO1". Canadian Journal of Chemistry, August 1991 (08-1991), Vol. 69, pp. 1273-1280, ISSN 1480-3291. *abstract; page 1274, paragraphs 1 and 2 (left)*	1-25
A	MELAMED, J. et al., "Biosynthesis of the <i>Pseudomonas aeruginosa</i> common polysaccharide antigen by D-Rhamnosyltransferases WbpX and WbpY". Glycoconjugate Journal, 15 February 2022 (15-02-2022), Vol. 39, pp. 393-411, ISSN 1573-4986. *page 394, paragraphs 1 and 2 (left)*	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2023/050297

IPC:

C07K 14/21 (2006.01), **C07K 14/34** (2006.01), **C07K 14/195** (2006.01), **C07K 14/245** (2006.01),
G01N 33/569 (2006.01)

10

CPC:

C07K 14/21 (2020.01), **C07K 14/34** (2020.01), **C07K 14/195** (2020.01), **C07K 14/245** (2020.01),
C07K 16/1214 (2020.01), **C07K 19/00** (2020.01), **G01N 33/56911** (2020.01), **G01N 2469/10** (2020.01)

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
C 0 7 K	14/195 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	R
C 0 7 K	14/765 (2006.01)	C 0 7 K	14/195	
C 0 7 K	16/12 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	
		C 0 7 K	14/765	
		C 0 7 K	16/12	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

2 1 6 0

(72)発明者 ヴィノグラドフ , エヴゲーニ

カナダ , ケー 2 ビー 5 ジェー 9 オンタリオ , オタワ , ウェントワース アベニュー 4 6 1

(72)発明者 ソヴァジョー , ジャネル

カナダ , ケー 1 エム 0 ズィー 2 オンタリオ , オタワ , リドー テラス 1 1 0 , ユニット 7

F ターム (参考) 4C057 AA05 AA11 AA13 AA17 AA18 AA30 BB01 DD01 JJ05 JJ06

4C085 AA03 AA13 AA14 AA38 BA19 BB24 BB31 CC07 CC22 CC23

CC33 DD34 DD35 DD57 EE01 EE06 GG02 GG03 GG04 GG05 GG08

GG10

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA70 DA75 DA76 EA20

EA31 FA74 GA21