



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105264376 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201480021950. 0

(22) 申请日 2014. 04. 16

(30) 优先权数据

1306882. 0 2013. 04. 16 GB

61/812, 402 2013. 04. 16 US

61/812, 396 2013. 04. 16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2014/051202 2014. 04. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/170681 EN 2014. 10. 23

(71) 申请人 环境、食品及农村国务部

地址 英国萨里郡

申请人 阿尔伯特大学董事会

(72) 发明人 约翰·麦克吉文 大卫·邦德

劳伦斯·豪厄尔斯 朱莉·吉亚尔

维吉雅·伽内什·那罗亚纳斯瓦密

(74) 专利代理机构 上海申新律师事务所 31272

代理人 董科

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

A61K 47/48(2006. 01)

权利要求书4页 说明书93页 附图21页

(54) 发明名称

低聚糖偶联物和使用方法

(57) 摘要

提供了一种检测样品中的抗 M 和 / 或抗 A 和 / 或抗 C/Y 抗体的存在的方法, 所述方法包括: 将样品与根据本发明所提供的诊断偶联物接触, 包括包含有至少两个单元的 4, 6- 二去氧 -4- 酰氨 - α - 吡喃糖并包含相邻的 4, 6- 二去氧 -4- 酰氨 - α - 吡喃糖单元之间的至少一个 - (1-3) - 连接的低聚糖, 其中, 吡喃糖的碳 5 位连接着 R 基团, R 独立地选自 -CH₂OH, -H 或具有至少一个 C 原子的烷基, 低聚糖共价连接到非糖分子或到表面。

1. 一种检测样品中的抗 M 和 / 或抗 A 和 / 或抗 C/Y 抗体的存在的方法, 所述方法包括: 将样品与一种诊断偶联物相接触; 所述诊断偶联物包含有至少两个单元的 4, 6- 二去氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖并包含相邻的 4, 6- 二去氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖单元之间的至少一个 -(1-3)- 连接的一种低聚糖, 其中的所述吡喃糖中的 5 位上的 C 连接着 R 基, 所述 R 基独立地选自 $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{H}$ 或具有至少一个 C 的烷基; 所述低聚糖被共价连接到非糖分子或成坚固实体。

2. 一种诊断偶联物, 包含有至少两个单元的 4, 6- 二去氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖并包含相邻的 4, 6- 二去氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖单元之间的至少一个 -(1-3)- 连接的一种低聚糖, 其中的所述吡喃糖中的 5 位上的 C 连接着 R 基, 所述 R 基独立地选自 $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{H}$ 或具有至少一个 C 的烷基; 所述低聚糖被共价连接到非糖分子或成坚固实体。

3. 一种根据权利要求 1 所述的方法, 或一种根据权利要求 2 所述的诊断偶联物, 其特征在于, 所述低聚糖仅仅包含一个 -(1-3)- 连接。

4. 一种根据权利要求 1 或 3 所述的方法, 所述方法仅用于检测一种抗 -M 抗体, 或者一种根据权利要求 2 或 3 所述的诊断偶联物, 其特征在于, 所述低聚糖包含 2 个、3 个或 4 个 4, 6- 二去氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖单元。

5. 一种根据权利要求 4 所述的诊断偶联物, 所述诊断偶联物是一种特异性 M- 抗原, 能够优选地连接至一种抗 -M 抗体。

6. 一种根据权利要求 1 或 3 或 4 所述的方法, 或一种根据权利要求 2-5 中任一项所述的诊断偶联物, 其特征在于, 所述低聚糖是式 I 所示的二糖: 4, 6- 二脱氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖基 -(1-3)-4, 6- 二脱氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖 (式 I)。

7. 一种根据权利要求 1 或 3 或 4 所述的方法, 或一种根据权利要求 2-5 中任一项所述的诊断偶联物, 其特征在于, 所述低聚糖包含式 III 或式 IV 所示的三糖:

4, 6- 二脱氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖基 -(1-3)-4, 6- 二脱氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖基 -(1-2)-4, 6- 二脱氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖 (式 III);

4, 6- 二脱氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖基 -(1-2)-4, 6- 二脱氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖基 -(1-3)-4, 6- 二脱氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖 (式 IV)。

8. 一种根据权利要求 1 或 3 或 4 所述的方法, 或一种根据权利要求 2-5 中任一项所述的诊断偶联物, 其特征在于, 所述低聚糖包含式 VII 所示的四糖:

4, 6- 二脱氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖基 -(1-2)-4, 6- 二脱氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖基 -(1-3)-4, 6- 二脱氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖基 -(1-2)-4, 6- 二脱氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖 (式 VII)。

9. 一种根据权利要求 1 或 3 所述的方法, 或者一种根据权利要求 2 或 3 所述的诊断偶联物, 其特征在于, 所述低聚糖包含至少 6 个 4, 6- 二去氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖单元。

10. 一种根据权利要求 9 所述的诊断偶联物, 所述诊断偶联物是一种通用抗原, 能够连接到一种抗 -M 抗体或一种抗 -A 抗体或一种抗 C/Y 抗体。

11. 一种根据权利要求 1 或 3 或 9 所述的方法, 或一种根据权利要求 2 或 3 或 9 或 10 所述的诊断偶联物, 其特征在于, 所述低聚糖包含式 XIII 或式 XIV 所示的六糖: 4, 6- 二脱氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖基 -(1-2)-4, 6- 二脱氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖基 -(1-2)-4, 6- 二脱氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖基 -(1-3)-4, 6- 二脱氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃

糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-去氧-4-酰氨基- α -吡喃糖 (式 XIII) ;

4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖基-(1-3)-4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖 (式 XIV)。

12. 一种根据权利要求 1 或 3 或 9 所述的方法,或一种根据权利要求 2 或 3 或 9 或 10 所述的诊断偶联物,其特征在于,所述低聚糖包含式 XV 所示的九糖:

4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖 (式 XV)。

13. 一种诊断偶联物,包含一种低聚糖,所述低聚糖具有至少 6 个 4,6-二去氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元并包含重叠的式 VII 所示的四糖,使得在一个四糖中的第三和第四个 4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元在下一个四糖中形成了第一和第二个 4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元,从而形成一种低聚糖,其中的所有位于连续的 4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元之间的连接都可替代地为-(1,2)-和-(1,3)-连接;其中的所述吡喃糖中的 5 位上的 C 连接着 R 基,所述 R 基独立地选自 $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{H}$ 或具有至少一个 C 的烷基;所述低聚糖被共价连接到非糖分子或成坚固实体。

14. 一种诊断偶联物,包含一种低聚糖,所述低聚糖具有至少 7 个 4,6-二去氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元并包含重叠的式 VII 所示的四糖,使得在一个四糖中的第四个 4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元在下一个四糖中形成了第一个 4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元;其中的所述吡喃糖中的 5 位上的 C 连接着 R 基,所述 R 基独立地选自 $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{H}$ 或具有至少一个 C 的烷基;所述低聚糖被共价连接到非糖分子或成坚固实体。

15. 根据上述任一项权利要求所述的一种方法或一种诊断偶联物,在所述低聚糖中的 R 基为甲基、乙基或丁基。

16. 根据上述任一项权利要求所述的一种方法或一种诊断偶联物,在所述低聚糖中的每个 4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元中的所述酰氨基独立地选自:甲酰氨基,乙酰氨基,丙酰氨基或丁酰氨基。

17. 根据上述任一项权利要求所述的一种方法或一种诊断偶联物,其特征在于,至少一个 4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖基单元是 4,6-二脱氧-4-甲酰氨基- α -D-吡喃甘露糖基。

18. 根据上述任一项权利要求所述的一种方法或一种诊断偶联物,其特征在于,所述非糖分子为一种蛋白质,例如牛血清白蛋白 (BSA),或为一种包括疏水部分或荧光基团的非蛋白质载体分子。

19. 根据权利要求 1-17 中任一项所述的一种方法或一种诊断偶联物,其特征在于,所述低聚糖通过一种例如为牛血清白蛋白 (BSA) 的蛋白质键合连接至一种坚固实体。

20. 根据权利要求 1-17 中任一项或权利要求 19 所述的一种方法或一种诊断偶联物,其

特征在于,所述坚固实体为一种 ELISA 检测板的表面。

21. 根据权利要求 1-17 中任一项所述的一种方法或一种诊断偶联物,其特征在于,所述低聚糖通过脘偶联被共价连接至一种坚固实体。

22. 根据权利要求 1-17 中任一项或权利要求 21 所述的一种方法或一种诊断偶联物,其特征在于,所述坚固实体为一种 Carbo-BIND™检测板的表面。

23. 一种根据权利要求 1, 2, 4, 6-9 或 11-22 中任一项所述的方法,其特征在于,所述样品是从动物获得的生物样品。

24. 一种根据权利要求 1, 2, 4, 6-9 或 11-23 中任一项所述的方法,其特征在于,不包括检测针对非布鲁氏杆菌有机体的抗体。

25. 一种根据权利要求 1, 2, 4, 6-9 或 11-24 中任一项所述的方法,其特征在于,所述动物为人类或牛,猪,绵羊或山羊。

26. 一种确定动物感染了或曾经感染了布鲁氏杆菌有机体的方法,所述方法包含将一种获得自动物的第一样品与权利要求 9-12 中任一项所述的诊断偶联物相接触,并且检测所述诊断偶联物与出现在该样品中的至少一种抗体的结合。

27. 一种根据权利要求 26 所述的方法,还包含一步骤:将一种获得自动物的第二样品与权利要求 4-8 中任一项所述的诊断偶联物相接触,并且检测所述诊断偶联物与出现在该样品中的至少一种抗体的结合。

28. 一种确定动物是否已经被接种疫苗偶联物的方法,所述方法包含:将一种获得自动物的第一样品与根据权利要求 9-12 中任一项所述的诊断偶联物相接触,并将其或一种获得自动物的第二样品与根据权利要求 4-8 中任一项所述的诊断偶联物相接触,其特征在于,所述动物被确认为已经因此接种疫苗,当根据权利要求 9-12 中任一项所述的诊断偶联物连接至一种样品内的抗体并且根据权利要求 4-8 中任一项所述的诊断偶联物未连接至一种样品内的抗体时;

其中,所述疫苗偶联物包含一种低聚糖,所述低聚糖具有至少 2 个单元的 4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖,并且在相邻的 4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元之间仅仅包含一个-(1-2)-连接,所述低聚糖被共价连接至一种疫苗的载体分子。

29. 一种根据权利要求 26-28 中任一项所述的方法,包含从动物中获得第一和/或第二样品的步骤。

30. 一种疫苗偶联物,包含一种低聚糖,所述低聚糖包含至少 2 个单元的 4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖并且在相邻的 4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元之间仅仅包含一个-(1-2)-连接,所述低聚糖被共价连接至一种疫苗的载体分子。

31. 一种根据权利要求 30 所述的疫苗偶联物,其特征在于,所述疫苗偶联物分子是破伤风类毒素。

32. 一种疫苗组合物,包含一种根据权利要求 30 或 31 所述的疫苗偶联物。

33. 根据权利要求 30-32 中任一项所述的一种疫苗偶联物或一种疫苗组合物,用于接种动物以避免感染布鲁氏杆菌的方法。

34. 一种接种动物以避免感染布鲁氏杆菌的方法,包含:将根据权利要求 30-32 中任一项所述的疫苗偶联物或疫苗组合物施用于动物。

35. 一种根据权利要求 34 所述的方法,包含:后续地从所述动物获得生物样品,并且将

所述样品与根据权利要求 9-12 中任一项所述的诊断偶联物相接触。

36. 一种试剂盒,包含根据权利要求 2-22 中任一项所述的诊断偶联物。

37. 一种根据权利要求 36 所述的试剂盒,在根据权利要求 1 所述的方法中的应用。

38. 一种根据权利要求 36 或 37 所述的试剂盒,还包括从动物获得和 / 或包含一种生物样品的方法。

39. 一种根据权利要求 36-38 中任一项所述的试剂盒,包含实验室试剂,用于进行抗体 - 抗原结合检测分析。

40. 一种根据权利要求 36-39 中任一项所述的试剂盒,还包含根据权利要求 30-32 中任一项所述的疫苗偶联物或疫苗组合物。

41. 一种根据权利要求 36-38 所述的试剂盒,在一种检测方法中的应用 ;所述检测方法用于检测一种动物被感染或曾经感染了布鲁氏杆菌,所述试剂盒包括根据权利要求 9-12 中任一项所述的诊断偶联物。

42. 根据权利要求 41 所述的试剂盒,还包括一种根据权利要求 4-8 中任一项所述的诊断偶联物。

43. 一种基本上如本文所述的方法,诊断偶联物,免疫偶联物,免疫组合物或试剂盒,具有参照附图中所示的特性。

低聚糖偶联物和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新型的包含低聚糖的诊断偶联物,其作为一种可靠的诊断可用于检测布鲁氏菌病。此外,这些检测能够提供一种 DIVA(从接种疫苗的动物中鉴别出被感染的)检测,用于本文另外公开的接种的新型疫苗偶联物。

背景技术

[0002] 布鲁氏菌病是一种严重的跨国界全球性人畜共患病,其通过牲畜和野生动物传播,并主要是由于感染羊种布鲁氏杆菌或猪种布鲁氏杆菌 3 型。虽然该疾病在人体中影响非常严重,人与人之间的传播是罕见的,并且几乎所有病例都是由于接触了受感染的动物或动物产品 (Franco et al. (2007) *The Lancet Infectious Diseases* 7, 775-786)。布鲁氏菌病(除了犬种布鲁氏杆菌以外)是由于感染了布鲁氏杆菌光滑菌株,这些菌株的 O-多糖 (OPS) 在其外膜上作为光滑的脂多糖 (sLPS) 的一部分 (Cardoso et al (2006) *Microbial Cell Factories* 5, 13)。

[0003] 所述 sLPS 是一种大分子,包括具有氨基葡萄糖主链的脂质 A,所述氨基葡萄糖主链连接于一组核心糖,在布鲁氏杆菌的光滑菌株的情况下,该核心糖连接至所述 OPS,其延伸到细胞外环境。所述 OPS 被认为并被确定为致病因子 (Porte et al. (2003) *Infection and Immunity* 71, 1481-1490),并且诱导宿主内很强的抗体应答,其为古典和现代血清学诊断检测所针对的 (Nielsen&Yu (2010) *Prilozi* 31, 65-89)。不幸的是,其它具有类似 OPS 结构的革兰氏阴性细菌的感染,可能是种系发生无关的,可能会产生抗体,其在古典和现代血清学诊断检测中发生交叉反应 (Corbel (1985) *Vet. Bull.* 55, 927-942)。这样的假阳性血清反应 (FPSRs) 变得特别有问题,在布鲁氏菌病零患病率的区域,其中血清检测的阳性预测值变得非常小。

[0004] 改进布鲁氏菌病血清诊断特异性的尝试,主要是围绕着识别和应用重组蛋白抗原而努力。尽管许多研究已经发表以推崇一种或另一种抗原对假阳性分辨率的优点,没有一种研究结果成功地实现了已经渐渐超越了实验室研究而进入常规和有效利用的检测。

[0005] 引发的抗体是由于感染小肠结肠炎耶尔森菌,显著的与源自布鲁氏杆菌的光滑菌株的 OPS 以 0:9 的交叉反应,由于它们的结构具有相当大的相似性 (McGiven et al. (2008) *Journal of Immunological Methods* 337, 7-15) 并在诊断测试中被认为会导致许多假阳性血清反应 (Gerbier et al (1997) *Vet Res* 28, 375-383)。类似地,引发的针对源自布鲁氏杆菌的光滑菌株的 OPS 的抗体,表现出对小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS 相当大的反应 (Jungersen et al. (2006) *Epidemiol Infect* 134, 347-357)。

[0006] 所述布鲁氏杆菌 OPS 是无支链的可变长度的均聚物,平均由 50-100 单元的 4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-D-吡喃甘露糖 (N-甲酰基佩鲁斯胺) 稀有糖构成 (Meikle et al (1989) *Infect Immun.* 57, 2820-2828)。所述 4,6-二脱氧-15-4-甲酰胺基-D-吡喃甘露糖单元自身只在自然界中发现了布鲁氏杆菌有机体和小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 的 OPS 结构。在几乎所有的布鲁氏杆菌有机体中,相邻的 4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-D-吡喃甘露糖单元

为可变地 -1, 2 或 -1, 3 键连接。结构数据表明, 只有区分布鲁氏杆菌和小肠结肠炎耶尔森菌 0 :9 OPS 的 -1, 3 键连接, 是因为后者是一种专属的 α -1, 2 连接的 4, 6- 二脱氧 -4- 甲酰胺基 -D- 吡喃甘露糖的均聚物 (Caroff et al. (1984) Eur. J. Biochem. 139, 195-200)。在布鲁氏杆菌菌株之间, α -1, 2 连接的比例在 2% -20% 之间 (Meikle et al. (1989) Infect. Immun. 57, 2820-2828)。

[0007] 即使是在具有 20% 的 -1, 3 连接的布鲁氏杆菌菌株中, 该 OPS 会包含许多相邻的 -1, 2 连接 (Bundle et al. (1987) Biochemistry 26, 8717-8726)。然而, 目前还不知道, 这些连接的序列是否是有序和整齐的。有三种主要的生物合成 OPS 的途径, Wzx/Wzy, ABC(Wzm/Wzt) 和合成酶系统 (Wang et al (2010) In “Endotoxins: structure, function & recognition”; Springer Netherlands, pp. 123-152)。布鲁氏杆菌利用 ABC 系统 (Gonzalez et al (2008) PLoS ONE 3, e2760), 由于其在具有均聚 OPS 的有机体中更常见 (包括小肠结肠炎耶尔森菌 0 :9)。在此途径中, 糖类被单独地添加到不断增长的 OPS 链, 而非被构造成重复单元然后再加入, 就如在 Wzx/Wzy 路径中的例子一样, 其中, OPS 经常由三到五个不同的单糖的重复块构成。像这样, 很可能的是, α -1, 3 连接的位置没有规律性, 并且它们随机地分布在延长的相邻 α -1, 2 连接的区域, 甚至是在具有相对高比例的 α -1, 3 连接的菌株中。合成 OPS 的酶的控制和保真度尚未确立。两种连接类型的比例影响 OPS 的形状, 并且不同的形状是单克隆抗体 (Douglas et al (1988) J Clin Microbiol 26, 1353-1356) 和多克隆抗体可识别的, 比如那些用于对布鲁氏杆菌进行血清分类为 A (α -1, 3 键连接相对低一些, 通常为 2%) 和 M (α -1, 3 键连接相对高一些, 通常为 20%) 优势菌株或血清型 (Alton et al (1994) Techniques for the Brucellosis Laboratory, pages 53-54; INRA Editions, ISBN-10: 2738000428)。

[0008] 猪种布鲁氏杆菌 2 型菌株 (Zaccheus et al. (2013) PLoS One 8, e53941) 和小囊耳 20 型菌株 (Wattam et al. (2012) mBio 3:00246-12) 似乎不包含任何 α -1, 3 连接。小囊耳 20 型菌株是一种极不寻常并且是所述布鲁氏杆菌属的远亲成员, 也是极为罕见的。虽然, 它是光滑菌株, 但是它缺乏所需要的合成 4, 6- 二脱氧 -4- 甲酰胺基 -D- 吡喃甘露糖 OPS 的大多数基因 (Wattam et al (2012) mBio, 3:5)。它的 OPS 结构是一种还没有被确定的不同的形式。

[0009] 在布鲁氏杆菌和小肠结肠炎耶尔森菌 0 :9 均聚的 OPS 中, α -1, 2 和 α -1, 3 连接的相对比例和分布创建不同, 但是, 不必全面描述, 抗体结合抗原决定簇。在布鲁氏杆菌中, 有三种不同的抗原抗原决定簇, 其可以在 OPS 中找到, 为此, 出现了坚固结构的证据 (Bundle et al. (1989) Infect. Immun. 57, 2829-2836), 见表 1 :

[0010] 表 1-OPS 抗原决定簇

[0011]

抗原决定簇名称	佩鲁斯胺数	特点	存在于哪个 OPS
C/Y	3-4	N-乙酰佩鲁斯胺专性地由 α 1,2 键连接	所有的布鲁氏杆菌光滑菌株和小肠结肠炎耶尔森菌 O: 9
A	5 或更多	N-乙酰佩鲁斯胺由 α 1,2 键连接	主要分布在所有 A-主导布鲁氏杆菌菌株以及小肠结肠炎耶尔森菌 O: 9 中
M	2-6	至少一个 α 1,3 键连接与至少一个相邻的 α 1,2 键连接; 在不确定的抗原决定簇中 α 1,3 键连接	主要分布在 M-主导 OPS 布鲁氏杆菌菌株中, 而且在较小程度上分布在 A-优势菌株中。未发现于小肠结肠炎耶尔森菌 O: 9 中。

[0012] 专性地 α -1, 2 连接的三糖和四糖序列, 被发现在 OPS 中含量丰富, 此 OPS 指源自流产羊种和猪种布鲁氏杆菌以及小肠结肠炎耶尔森菌 O:9。这种序列被称为“C/Y 抗原决定簇”, 因为在经济上重要的布鲁氏杆菌和小肠结肠炎耶尔森菌 O:9 的所有光滑菌株内, 它们是常见的。结合这些序列的单克隆抗体被称为抗 C/Y。

[0013] 被专性地 α -1, 2 连接的多于四个糖类的更长的序列更可能在 α -1, 3 连接比例较低的布鲁氏杆菌菌株中被发现。这也包括仅包含 α -1, 2 连接的小肠结肠炎耶尔森菌 O:9。这些序列被称为“A 抗原决定簇”, 并且当然, 包含 C/Y 决定簇在其中 (如上所述, 被 α -1, 2 连接的佩鲁斯胺的 C/Y 抗原决定簇连锁多达 4 糖类的长度)。结合该抗原决定簇的单克隆抗体被称为抗 -A 抗体。具有包含低比例的 α -1, 3 连接并因此包含更丰富和更长的不间断 α -1, 2 连接的序列的 OPS 的布鲁氏杆菌菌株, 被称为“主导”菌株 (包括大多数的流产布鲁氏杆菌), 即使所述 OPS 可能包含 α -1, 3 连接的比例至少为每隔 50 个残基就有一个 (Bundle et al. (1989) Infect. Immun. 57, 2829-2836)。源自优势菌株的 OPS 当然包含 C/Y 抗原决定簇, 以及 A 抗原决定簇。

[0014] 一个 C/Y 抗体将有望同时结合到一个 C/Y 抗原决定簇和一个 A- 抗原决定簇, 由于较短的 C/Y 抗原决定簇的结构形成了较长的 A- 抗原决定簇结构的一部分。

[0015] 含有具有有限的相邻的 α -1, 2 的连接和单个 α -1, 3 的连接糖类序列被称为“M 抗原决定簇”。结合于这些序列的单克隆抗体被称为抗 -M 抗体。具有高比例 α -1, 3 的连接布鲁氏杆菌菌株被称为 M 优势菌株。此类菌株含有 C/Y 抗原决定簇, 但很少有 A 抗原决定簇, 如果有的话, 则是因为更频繁的 α -1, 3 连接的存在, 所述 α -1, 2 键连接的序列才被“打散”。

[0016] 所述 M 抗原决定簇的结构尚未确定, 而在具体细节结构上, 会因抗体的不同而异。然而, 任何 M 抗原决定簇必须有足够的尺寸以实现针对抗原引发的单克隆抗体的结合, 所述抗原包含有 α -1, 3 键连接并被充分地限制于 α -1, 2 连接, 以便不能有效结合到针对完全由 α -1, 2 连接的抗原 (或抗原的某部分) 引发的抗体。从而, 所述 α -1, 3 键连接的存在是至关重要的, 由于其是对 α -1, 2 连接数目的一个限定。这些抗原的结构已被现有技术部分地记载 (Bundle et al (1989) Infect Immun 57, 2829-2836), 虽然布鲁氏杆菌的菌株被分配到 A 和 M 型 (以及 A 型和 M 型的混合) 大幅地先于此存在。这种分

配是布鲁氏杆菌菌株的传统生物分型的基本组成部分 (Nielsen et al. (2009) “Bovine brucellosis” In: Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals 2009; Office International Des Epizooties, Paris, pg 10-19). 最近的研究工作表明 M 主导的 OPS 包含重复结构的决定簇, 所述决定簇中每三个 α -1, 2 连接就具有一个 α -1, 3 连接 (Kubler-Kielb & Vinogradov (2013) Carbohydr. Res. 378, 144-147)。

[0017] 菌株的分型至 A 型, M 型或 A、M 混合型 (其中具有的 α -1, 2 连接的比例为 2-20% (Meikle et al (1989) Infect Immun 57, 2820-2828)) 是利用超免疫兔血清来执行的。对这些兔子进行接种, 使用 A 主导型或 M 主导型灭活的布鲁氏杆菌细胞进行反复给药, 直至已获得高抗体滴度。多克隆血清随后被异源性细胞类型吸收 (例如, 兔血清超免疫的优势菌株被 M 主导型细胞吸收) 以除去交叉反应的抗体。经过精心选择和实验测试, 该过程留下了多克隆 (现称为单特异性) 的抗体群, 其更加针对免疫化类型并且能够被用于凝集试验, 以确定一个无类型菌株的 A 型、M 型, 或 A、M 混合型的状态 (Alton et al (1994) Techniques for the Brucellosis Laboratory, pages 53-54; INRA Editions, ISBN-10: 2738000428)。

[0018] 布鲁氏菌病的推定诊断取决于抗体的检测至布鲁氏杆菌 A、C/Y 和 M 抗原, 并且其由有机体培养所确定 (Nielsen et al. (2009) “Bovine brucellosis” In: Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals 2009; Office International Des Epizooties, Paris, pg 3-7)。A、C/Y 和 M 抗原决定簇同步表达对布鲁氏杆菌光滑脂多糖 (sLPS) 的 O 型抗原多糖领域, 并且此 sLPS 用于检测存在于疑似感染的动物或人的血清中的抗体。不幸的是, 布鲁氏杆菌是一种有毒病原体, 其必须在 3 级生物防护装置内培养。这使得生产诊断性 O 型抗原成为一个艰巨的、专业的和昂贵的任务, 伴随着显著的健康风险。此外, 因为每个 A、C/Y 和 M 抗原决定簇可被表达在单个布鲁氏杆菌 sLPS 中, 并因为这种抗原耐受普通部分降解的方法, 事实证明很难分离出纯净的 A 或 M 抗原决定簇。

[0019] 总之, 所述布鲁氏杆菌 OPS 是高度免疫原性的, 并且许多抗体在受感染的动物体内被引发以作用于该抗原。此 OPS 包含若干重叠的抗体抗原决定簇, 其中的一些对于布鲁氏杆菌是独有的, 另一些则不是。存在于所述布鲁氏杆菌 OPS 中的非独有抗原决定簇包含其作为一个血清诊断抗原的用途, 还是在假阳性血清结果出现时的一个主要因素。在动物布鲁氏菌病案例中, 之前的一些工作人员 (Alonso-Urmeneta et al. (1998) Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 5, 749-754) 已经报道了对应普通 OPS 抗原决定簇的抗体支配体液免疫反应, 并报道了 sLPS 的表位结构, 无论是 A、M 主导型或是 A 与 M 主导混合型, 都与血清诊断不相关。

[0020] 然而, 考虑到存在的抗体交叉反应性问题, 所述抗体针对不同的布鲁氏杆菌菌株以及其它有机体而被引发, 有必要查明抗原和能够分辨出针对布鲁氏杆菌而被引发和针对其它有机体而被引发的方法。

发明内容

[0021] 根据本发明的第一方面, 提供了一种检测样品中的抗 M 和 / 或抗 A 和 / 或抗 C/Y 抗体的存在的方法, 例如抗-O-多糖抗体, 比如其为抗布鲁氏杆菌和 / 或抗小肠结肠炎耶尔森菌 O:9 抗体, 所述方法包括: 将样品与根据本发明所提供的诊断偶联物 (该偶联物为本发明的第二方面, 或第三或第四方面) 相接触。所述方法可包括检测该偶联物至存在于样品

中的至少一种抗体的结合。在一个实施例中,用于本发明的第一方面的所述诊断偶联物可以是一种“通用抗原”,用于抗-M和抗-C/Y和抗-A的抗体,如下所述。上述诊断偶联物包含有至少两个单元的4,6-二去氧-4-酰氨-A-吡喃糖并包含相邻的4,6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖单元之间的至少一个-(1-3)-连接的一种低聚糖,所述低聚糖共价连接到非糖类载体分子或坚固的实体。

[0022] 在一个实施例中,提供了一种检测样品中的抗M抗体的存在的方法,例如抗-M OPS抗体,所述方法包括:将样品与根据如下定义的本发明的第二方面所提供的诊断偶联物(本发明第三或第四方面)相接触,并且检测该偶联物至存在于该样品中的至少一种抗-M抗体的结合。用于本发明所述的此实施例的该诊断偶联物是一种“特异性的M-抗原”,如下所述,能够区分一种抗-A(和/或抗-C/Y)抗体和一种抗-M抗体。即所述特异性的M-抗原诊断偶联物优选地(即具有更大的特异性)连接到抗-M抗体,相比于抗-A(和/或抗-C/Y)抗体。因此,所述方法的这个实施方案可提供一个方法用于检测样品中的抗-布鲁氏杆菌抗体的存在,同时避免检测到对应于非布鲁氏杆菌有机体的抗体。本发明人发现了在多克隆抗体应答中的意想不到特异性,感染动物的布鲁氏杆菌中的绝大多数具有 α -1,3键连接,它的存在从结构上区分了布鲁氏杆菌与小肠结肠炎耶尔森菌0:9 OPS的大多数菌株。考虑到在大多数布鲁氏杆菌的OPS中具有极少数量的 α -1,3键连接,完全令人惊讶的是,本发明所述的方法能够有效地检测到由布鲁氏杆菌菌株引发的几乎所有抗体的存在。

[0023] 所述诊断偶联物与一个抗体的结合的检测,如本文所述,可以通过任何已知的技术实施,例如:ELISA测定,荧光偏振测定(FPA),TR-FRET测定,侧流测定或基于微珠的凝集测定,如下更详细的描述。本发明并不局限于任何这些测定方法,并且本领域技术人员能够很容易地想到可以使用的替代方法。

[0024] 一种抗-M抗体是一种能够结合源自布鲁氏杆菌OPS的M抗原决定簇或结合一种M-优势抗原的抗体。一种抗-A抗体是一种能够结合含有A-抗原决定簇的抗原或结合一种A-优势抗原的抗体,如发现于所述布鲁氏杆菌OPS或所述小肠结肠炎耶尔森菌0:9 OPS中。一种抗-C/Y抗体是一种能够结合含有C/Y-抗原决定簇的抗原的抗体,如发现于所述布鲁氏杆菌OPS或所述小肠结肠炎耶尔森菌0:9 OPS中。在某些情况下,此抗原决定簇可能被发现于一种A-或M-优势抗原中。一个抗-M抗体可优先结合到包含有M-抗原决定簇的一个抗原,相对于结合此抗体到包含有A或C/Y抗原决定簇的一个抗原(即它会以更大的特异性结合到一个包含M-抗原决定簇的抗原)。此类抗原、抗体和抗原决定簇的例子属于如上所述的公知常识。抗-M抗体的例子包括:BM40(Greiser et al. (1987) Am. Inst. Pasteur Microbiol. 138, 549-560), BM28或BM10(Bundle et al (1989) Infect. Immun. 57, 2829-2836)。抗-A抗体的例子包括:YsT9.1和YsT9.2(Bundle et al. (1989) 20 Infect. Immun. 57, 2829-2836)。

[0025] 根据本发明的第二方面,提供了一种诊断偶联物,其包含至少两个4,6-二去氧-4-酰氨-A-吡喃糖单元并包含相邻的4,6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖单元之间的至少一个-(1-3)-连接的一种低聚糖,所述低聚糖共价连接到非糖类载体分子或坚固的实体,如表面或微珠(例如,包含任何非液体结构,如凝胶或乳胶微珠或表面)。

[0026] 此处所述的诊断偶联物可证明在对应于所述A, C/Y和M抗原决定簇的抗体的检测中是有用的,在一些实施例里,用于区分对应于A或C/Y和M抗原决定簇的抗体。因此,所

述诊断偶联物被称作“诊断抗原”。

[0027] 所述低聚糖可包含 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 或 15 个 4, 6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖单元。

[0028] 如整个说明书中所述的一个“特异性的 M-抗原”可被提供,其中,本发明所述的诊断偶联物包含低聚糖,所述低聚糖包含 2, 3, 4 或 5 个 4, 6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖单元。如整个说明书中所述的一个对应于抗-M 和抗-A 抗体的“通用抗原”可被提供,其中,本发明所述的诊断偶联物低聚糖,所述低聚糖包含 6 个或 6 个以上的 4, 6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖单元。所述诊断偶联物的这些特定实施例,在本文的其它地方进行了进一步说明。

[0029] 使用于本说明书的术语“(1-3)-连接”是指低聚糖里的相邻的 4, 6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖单元之间的一种 α -1, 3(键)连接(也被称为 α -1 \rightarrow 3 连接)。类似地,使用于本说明书的术语“(1-2)-连接”是指低聚糖里的相邻的 4, 6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖单元之间的一种 α -1, 2(键)连接(亦称为 α -1 \rightarrow 2 连接)。

[0030] 至少一个 (1-3)-连接可按如下定义被居中设置。如下所定义,其中存在 4 个或更多的 4, 6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖单元,所述至少一个 (1-3)-连接可被内置,并可选地居中设置。

[0031] 术语“内置的 (1-3)-连接”是指,在分子的任一端所述 (1-3)-连接都不是最终的键连接,也就是说,其被置于 4, 6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖单元之间,这两个 4, 6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖单元都未形成所述低聚糖的一个终端单元。

[0032] 本文所述的术语一种具有偶数个 4, 6-二去氧-4-酰氨-A-吡喃糖单元的低聚糖的“居中设置的 (1-3)-连接”是指,所述 (1-3)-连接位于该分子的中心位置,并具有相等数量的 4, 6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖单元在两侧。在一种低聚糖具有奇数个 4, 6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖单元的情况下,所述术语“居中设置的 (1-3)-连接”是指所述 (1-3)-连接紧靠在所述 4, 6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖单元的一侧,而此 4, 6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖单元位于该分子的中间,即:所述单元的两侧具有相等数目的其它单元。例如在三糖中,该中央单元是第二单元,而所述居中设置的 (1-3)-连接为第一键连接(第一单元和第二单元之间)或第二键连接(第二单元和第三单元之间);又如在五糖中,该中央单元是第三单元,而所述居中设置的 (1-3)-连接为第二键连接(第二单元和第三单元之间)或第三键连接(第三单元和第四单元之间)。

[0033] 在一个实施例中,成为诊断偶联物的一部分的所述低聚糖具有不多于一个 (1-3)-连接,即,所述低聚糖里存在单个 (1-3)-连接,而在 4, 6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖单元之间具有所有其它非 (1-3)-连接的键连接,例如可以是 α -1, 2 键连接。

[0034] 整个说明书中所述的术语“吡喃糖”表示一种具有吡喃环的糖(例如,戊糖或己糖)。在本发明的任何方面或任何实施例中,每个 4, 6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖单元中的 C5(吡喃糖中的 5 位上的 C)连接着 R 基,其中的 R 基独立地选自 $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{H}$ 或具有至少一个 C 的烷基。所述 R 基的“独立的选择”指的是在低聚糖所含的每个 4, 6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖单元中,各个 R 基可以不同。在一些实施例里,所述烷基可为具有 1-5 个碳原子的烃,例如,1, 2, 3, 4 或 5 个碳原子。

[0035] 在本发明的任何方面或任何实施例中,所述烷基可以是有支链或无支链的饱和烃。所述烷基可以是,例如:甲基,乙基,丙基,丁基或戊基。在一个实施例中,R为甲基。

[0036] 在本发明的任何方面或任何实施例中,每个4,6-二去氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元中的酰胺基可各自独立地选自:甲酰氨基,乙酰氨基,丙酰氨基或丁酰氨基,即存在于整个分子中每个酰氨基可以是甲酰氨基,乙酰氨基,丙酰氨基或丁酰氨基中的任何基团,以致于在所述低聚糖中可能存在有这些基团的混合。在任何实施例中,4,6-二去氧-4-酰氨基- α -吡喃糖可以是4,6-二去氧-4-甲酰胺基-D-吡喃甘露糖。

[0037] 此处所述的低聚糖的任一个实施例中,在本发明的任何方面,所述低聚糖的还原端可由一个 $-OCH_3$ 基封端,其由 $-OH$ 部分上的 $-H$ 被 $-CH_3$ 替换而形成,其键合在所述吡喃糖环的C1上(位于1位的碳)。所述还原端可替换地被一个 $-1-O-(CH_2)_n-COO-CH_3$ 基团所“封端”,其中的 $n=3-9$,其可促使连接到蛋白质和/或非蛋白质分子和/或连接到坚固实体。在一个进一步的替代中,非佩鲁斯胺糖可以连接在任何合适的位置,至本文所定义的低聚糖,任选地为了实现键合连接到其它分子的目标。其它的连接系统如下所述。

[0038] 共价连接以形成所述诊断偶联物的一部分的低聚糖,可以是具有式I所示的二糖:

[0039] 4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖基-(1-3)-4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖(式I)。

[0040] 在一个实施例中,所述二糖包含如式II所示的物质:

[0041] 4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-甘露吡喃糖基-(1-3)-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖(式II)。

[0042] 所述低聚糖可以是三糖,其具有如式III或IV所示的物质:

[0043] 4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖基-(1-3)-4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖(式III);

[0044] 4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖基-(1-3)-4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖(式IV)。

[0045] 所述低聚糖可以是四糖,其具有如式V、VI或VII所示的物质:

[0046] 4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖基-(1-3)-4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖(式V);

[0047] 4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖基-(1-3)-4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖(式VI);

[0048] 4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖基-(1-3)-4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖(式VII)。

[0049] 在一个式实施例中,所述四糖包含如式VIII所示的物质:

[0050] 4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-甘露吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-甘露吡喃糖基-(1-3)-4,6-二去氧-4-甲酰胺基- α -D-甘露吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖(式VIII)。

式,在总所周知的合适的活化剂的存在下,键合连接或蛋白质载体的一个羧基和蛋白质载体或键合连接的伯胺或仲胺之间的反应导致了酰胺键的形成;键合连接或蛋白质载体的胺基和蛋白质载体或键合连接的磺酰卤基之间的反应导致了磺酰胺键的共价形成;而键合连接或蛋白质载体的醇羟基或酚基和蛋白质载体或键合连接的烷基或芳基卤化物之间的反应导致了连接所述载体至所述键合连接的醚键的共价形成;类似地,这些补充性反应可发生在所述键合连接和所述低聚糖之间,以形成所述低聚糖和所述键合连接之间的键合。

[0070] 下表 2 展示了多种补充性反应基团与它们之间的反应所形成的化学键。

[0071] 表 2 :补充性反应基团与导致的键合

[0072]

第一反应基	第二反应基	导致的键
羧酸	胺基	酰胺类键
酰基叠氮基	胺基	酰胺键
羧基	胺基	酰胺键
酮基	氮氧基	肟键
硫醇	溴或碘代乙酰基	硫醚键
碳酸酯	胺基	氨基甲酸酯键
环氧化物	巯基	P-羟基硫醚键
马来酰亚胺	巯基	硫醚键
羟基	烷基/芳基卤化物	醚键
胺基	环氧化物	P-羟基胺键
胺基	酮基	亚胺键
胺基	酮基	仲胺键
磺酰卤基	胺基	磺酰胺键
环氧化物	醇羟基	P-羟基醚键
羟基	异氰酸酯	尿烷

[0073] 术语“偶联剂”是指一种试剂,其被用于将其它两个分子或物质藕联在一起。从而,偶联剂包括异源交叉偶联剂和同源交叉偶联剂。在一个实施例中,所述偶联剂包含一种选自表 2 中的“第一反应基”的基团。在另一个实施例中,所述偶联剂包含一种选自表 2 中的“第二反应基”的基团。例如,一个偶联剂可包含一种选自表 2 中的“第一反应基”的基团,而一个吡喃甘露糖衍生物可包含一种选自表 2 中的“第二反应基”的基团,或反之亦然。

[0074] 术语“异源交叉偶联剂”是指一种试剂,其通过将具有的至少两个不同的官能团内置于一个试剂,用于将两种分子或物质藕联在一起。这种交叉偶联剂是本领域所熟知的,并包括,例如: $X-Q-X'$, 其中的每个 X 和 X' 独立地优选交叉偶联基团,例如选自: $-OH$, $-CO_2H$, 环氧基, $-SH$, $-N=C=S$ 及其类似基团。优选地, Q 为共价偶联 X 和 X' 的基团,具有约 1-20 个原子,或可选地具有约 1-15 个 C 原子。异源交叉偶联剂的合适的例子包括: $N-\epsilon$ -马来酰亚胺己酸, 3-马来酰亚胺基苯甲酸 N -羟基琥珀酰亚胺酯, 3-(2-二硫吡啶基)丙酸酰肼, N -羟基琥珀酰亚胺碘代乙酸酯, NHS-PEG-顺丁烯二酰亚胺以及 3-(2-二硫吡啶基)丙

酸 N- 羟基琥珀酰亚胺酯。所述异源交叉偶联剂也可为脂质或类脂质的,其中,碳水化合物半抗原可以共价连接到脂质或者将所述脂质共施用作为免疫助剂。

[0075] 术语“同源双功能交叉偶联剂”是指一种试剂,其通过将具有的至少两个相同的官能团置于一个试剂,用于将两种分子或物质藕联在一起。这种交叉偶联剂是本领域所熟知的,并包括,例如 :X-Q-X, 其中的每个 X 和 Q 如上所定义。合适的同源双功能交叉偶联剂的例子包括 :方酸衍生物,和衍生自琥珀酸酐、马来酸酐、聚氧化烯、己二酸 (CO₂H-C₆-CO₂H) 以及壬二酸 (CO₂H-C₉-CO₂H) 的实体。1, 2- 乙二胺, 二酰氯和方酸二乙酯都是所述同源双功能交叉偶联剂的特定实施例。同源双功能交叉偶联剂也可以源自脂质和脂质类似物。

[0076] 一个优选实施例采用了所述异源双功能 5- 甲氧基羰基戊醇作为键合连接。所述低聚糖通过借助于一个 α 键连接一个或多个糖单元至所述 α 键的羟基而被合成。所述键这样选择,其第二官能团在低聚糖链延伸的整个过程中维持不变。与该键类型相近的变种为带有末端醇和含 4-10 个碳原子的末端酯基的烷烃,或者是带有末端醇和末端酯基的二甘醇或三甘醇。

[0077] 从所述糖残基除去保护基团并引进关键的甲酰胺基官能团之后,所述键合连接酯被转化为酰胺,该酰胺偶联于蛋白质或具有伯氨基并使用同源双功能交叉偶联剂二烷基方酸而获得的聚合物。

[0078] 其他的方法是本领域从业人员所已知的。如 Lemieux 所教导的,例如该键合酯可被转化为酰肼,并通过与亚硝酸或四氧化二氮的反应,获得了一种高反应性酰基叠氮物质。如果没有分离,其将迅速与蛋白质或聚合物的伯氨基团藕联。其中不太有用的方法为下面的键合连接酯进行反应以获得一种醛,所述醛可通过还原胺化反应藕联。这种类型的方法不太有效,由于转化该酯基至合适的官能团的化学反应可能与存在于所述低聚糖中的官能团不兼容。

[0079] 通过非限制性示例的方式,如在本文中所列举的操作,所述低聚糖可以通过与 5- 甲氧基羰基戊醇键合分子进行合成而结合于牛血清白蛋白 (BSA) 或共聚乙烯吡咯酮,所述低聚糖的另一端与二烷基方酸偶联剂反应,以提供一种方酸半酯,其形成酰胺键连接到存在于所述 BSA 蛋白中的氨基 (或共聚乙烯吡咯酮)。

[0080] 在本发明所述的偶联物中,如上所述的低聚糖共价连接至一个载体,例如,一个非低聚糖实体,比如为蛋白质,例如 :牛血清白蛋白 (BSA), 到包含疏水单元的非蛋白质载体分子,或到荧光基团,该荧光基团能够在例如一个 TR-FRET 或 FPA 系统中进行检测。通过非限制性示例的方式,所述低聚糖可共价连接到载体,该载体为一个坚固的实体,如表面和 / 或膜和 / 或微珠。一个“坚固的”微珠包含非液态结构,如凝胶珠或乳胶珠。因此,所述诊断偶联物可能以一个具有至少一种如本发明所述的低聚糖的表面的形式连接到其上,经由键合系统,所述键合系统包括一个共价连接至所述低聚糖。所述连接例如可以通过一个蛋白质载体被动吸收介导的,或者一个非蛋白载体分子,其包含疏水单元,共价连接于所述低聚糖。例如,所述被动吸收是由于疏水性和与表面的离子相互作用,该表面例如为 :聚苯乙烯,聚氯乙烯,胶乳,玻璃,硝化纤维素,聚偏氟乙烯。所述蛋白质载体例如可为 BSA。所述连接也可以是通过脲偶联形成,其包括 :通过高碘酸盐氧化提供醛基至低聚糖上。其中,脲偶联的情况下,该表面可以是 Carbo-BIND™ ELISA 试剂板。可用于该坚固实体表面的其它官能团也可被利用,例如马来酰亚胺 (键合至巯基)、胺基 (如表 2 所示,通过连接的使用而

提供多种键合方式)、醛基(键合至胺基)或羧基(键合至胺基)。

[0081] 本发明书所述的诊断偶联物可为合成的偶联物,例如,低聚糖和由下述方法被合成的偶联物。

[0082] 在根据本发明所述的方法中,所述样品可以是从小动物获得的生物样品,例如一只被布鲁氏杆菌感染的动物,或曾经被布鲁氏杆菌感染的动物,或疑似被布鲁氏杆菌感染的动物,或疑似曾经被布鲁氏杆菌感染的动物。所述动物可以是反刍动物,骆驼科动物或猪科动物,比如为类似或猪的动物,例如,牛、猪、绵羊或山羊,或者可以是一个人类。所述生物样品可以是血液,血浆,血清,组织,唾液或奶样。特别是,所述生物样品不是只包括抗体和/或低聚糖(加上实验室试剂)的实验室样品,而是复杂样品,也包含许多成分,包括其他抗体,用于实施的无关的方法等。在来自于动物的样品中存在的抗-M 抗体指示该动物被感染或曾经被感染了布鲁氏杆菌光滑菌株,从而引发免疫应答并产生了抗体。布鲁氏杆菌可以是光滑菌株(那些在其表面上存在的 OPS),其不是猪链球菌 2 型或小囊耳 B02 型。

[0083] 所述方法可以 ELISA 检测的方式进行,例如间接 ELISA 或竞争性 ELISA,其设计属于本领域技术人员的惯用技术手段。例如在间接 ELISA 中,所述低聚糖被固定在 ELISA 板上,以形成本发明所述的诊断偶联物,例如通过脲结合至所述 Carbo-BIND™检测板上,或通过偶联载体分子的使用结合至非官能化的 ELISA 板;其中所述偶联载体分子,例如为 BSA,能被动吸收到该检测板。待检测的生物样品随后被加入板中,并培养一段时间,之后将板洗干净。一种检测偶联物(如 HRP 偶联蛋白 G)被加入,并且所述板通过合适的方法被培养,洗涤,随后被开发,以检测所使用的偶联物(在使用 HRP 的情况下,如下所述,ABTS 可能是合适的)。这允许确定结合的水平,如果有任何生物样品中到低聚糖的抗体存在于所述检测板上。具体实施例如下所述。

[0084] 在竞争性 ELISA 中,寡糖可在 ELISA 板上固定化,以形成根据本发明所述的诊断偶联物,例如,通过脲结合至一个所述 Carbo-BIND™检测板上,或通过偶联载体分子的使用结合至非官能化的 ELISA 板;其中所述偶联载体分子,例如为 BSA,能被动吸收到该检测板。待检测的生物样品随后被加入到板,与抗 M 单克隆抗体(如 BM40 抗体)相结合,并培养一段时间,之后将板洗。抗 M 的单克隆抗体的结合之后通过加入到合适的酶偶联物检测板进行检测,所述偶联物为特异性结合的抗 M 的单克隆抗体,之后进一步培养,再洗涤所述检测板。(如果所述抗 M 抗体已经被酶标记,例如被 HRP 所标记,那么就不需要附加偶联物和培养步骤了)所述板随后通过一种适于所使用的偶联物的方法进行研发(在使用 HRP 的情况下,ABTS 为合适的,如下所述)。这就允许所述抗 M 单克隆抗体的结合水平的确定的。该样品中的任何抗 M 抗体将与单克隆抗 M 抗体竞争性地争夺结合至所述固定抗原,造成了检测信号的减少。这作为生物样品中的抗 M 抗体的存在的程度使用。

[0085] 其他的 ELISA 变体,例如,模块化 ELISA(Rhodes et al. (1989) J. Vet. Diagn. Invest. 1, 324-328) 为本领域技术人员所熟知,并且无需创造性即可被使用。

[0086] 根据本发明所述的方法,可包含 R-FRET 方法的使用,比如在 W02009/118570 和 W02011/030168 中所述的方法。在本文中,所述低聚糖可被直接或间接偶联至 TR-FRET 标记,例如镧系元素螯合物(供体荧光基团)或荧光素(受体荧光基团),如在上述专利中所述。

[0087] 如上所述,低聚糖也可被直接或间接偶联至荧光基团,其将使得由荧光偏振结合

的抗原-抗体的检测成为可能 (Nasir and Jolley (1999) Comb. Chem. High Throughput Screen., 2, 177-190), 例如如美国专利 US 5976820 中所记载的。这就形成了本文别处所述的荧光偏振测定法 (FPA) 的基础。

[0088] 通过非限制性示例的方式, 可用于本发明的其他测定形式包括侧流测定, 其中的抗原沿其血清 (含有血清抗体) 被吸收到膜, 可能引起流动。所述血清可以与抗物质的抗体相混合, 被胶态金或乳胶珠标记 (Abdoel et al. (2008) Vet. Microbiol. 130, 312-319)。一个进一步的替代性选择是基于微珠的凝集测试, 例如其中, 一种抗原-BSA 偶联物被动地涂布到乳胶珠。所述微珠随后被加入血清样品, 而凝集的出现或不出现将被观察到 (表明抗体结合到了微珠上的抗原)。(Abdoel&Smiths (2007) Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 57, 123-128)

[0089] 该方法可以是判定一个动物被感染布鲁氏杆菌有机体或曾经被感染布鲁氏杆菌有机体的诊断方法, 所述方法包含: 根据本发明所述的第二方面 (和 / 或第三方面, 和 / 或第四方面, 如下所述), 将一个预先从动物获得生物样品与一种诊断偶联物相接触。所述动物可能是人类, 或者是牛、猪、绵羊或山羊。所述生物样品可为: 血液, 血浆, 血清, 组织, 唾液或奶样。

[0090] 根据本发明的第二方面, 还提供了所述诊断偶联物, 用于诊断方法, 以判定如上所述的一个动物是否被感染了或曾经感染了布鲁氏杆菌有机体。

[0091] 此处所述的方法使用了本发明所述的诊断偶联物, 并第一次提供了它, 采用所述方法用于检测抗-A 和 / 或抗 C/Y 和 / 或抗-M 抗体, 例如抗-OPS 抗体, 如抗布鲁氏杆菌抗体, 使用了合成抗原。如上所述, 既然布鲁氏杆菌必须在 3 级生物容器中生长, 那么诊断 O- 抗原的生产则是一个苛刻的专业的和昂贵的任务。因此, 提供一种合成抗原是一个显著的优势。此处所示的数据表明, 化学合成已经成功地提供了一种通用抗原, 以检测到布鲁氏杆菌抗体, 所述抗体是在被可产生 sLPS (以及具有“A”抗原决定簇特性的抗原的其他细菌) 的所有布鲁氏杆菌感染的期间产生的。这就提供了一种极有价值的和方便用于假定诊断的抗原, 并且其可被部署于几乎任何检测方法中, 包括那些不需要复杂设备的方法, 在偏远地区不可用的方法等 (Martinez et al. (2007) Proc. Natl. Acad. 10Sci. 105, 19606-19611)。

[0092] 而且, 在本发明所述的某些实施例中, 特定的能够优选结合于抗-M 抗体的 M- 抗原的提供, 被第一次提供用于一种方法, 使得检测到针对布鲁氏杆菌的抗体而能避免检测到针对非布鲁氏杆菌有机体的抗体 (比如, 拥有高度类似于布鲁氏杆菌结构的 OPS 的格兰氏阴性有机体, 例如为小肠结肠炎耶尔森菌 0:9)。因此, 在本发明所述的方法中, 这样的检测到被非布鲁氏杆菌感染的假阳性结果的比例显著地减少, 相对于那些不是根据本发明所述的血清诊断分析方法, 例如 Nielsen 等人所记载的 (“Bovine brucellosis” In: Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals 2009; Office International Des Epizooties, Paris, pg 10-19)。本文中, 所述布鲁氏杆菌可为流产羊种和猪种 (除猪 2 型菌株以外) 细菌。针对猪 2 型菌株或小囊耳 B02 型菌株的抗体的出现, 采用如上所述的方法的实施例也许不会被检测到。此处所披露的诊断偶联物的使用, 其为一种具体的 M- 抗原, 用于检测几乎所有的布鲁氏杆菌光滑菌株, 包括 A- 优势菌株和 M- 优势菌株, 完全是一个意外的结果, 由于在 A- 优势菌株中存在很少的 M- 抗原决定簇。

[0093] 在任何情况下, 使用在诊断的离散的分离的 M 抗原决定簇 (即, 如这里所述的具体

的 M- 抗原) 的应用, 以前未曾提出过。这是因为所述抗原决定簇以前没有明确地界定, 已经被报道为无诊断价值, 并且可变地出现于 OPS 以区别于显著的布鲁氏杆菌菌株。这是由于其依赖于 α -1, 3 键的频率, α -1, 3 键的频率在大部分 A 优势菌株中低至 2% (除了在猪 2 型菌株中以外)。一种诊断分析法, 它仅能检测源自被 M 优势菌株感染的血清, 其为有限的应用, 由于感染 A 优势菌株也是可能的。如上所述, 完全意想不到的, 此处所述的 M- 抗原可用于检测 A- 优势菌株, 以及 M- 优势菌株。

[0094] 本发明所述的方法可为一种用于检测是否有动物已经暴露于和 / 或已经被感染了布鲁氏杆菌, 所述方法包含第一步: 将从动物中获得的第一样品与一种为通用抗原的诊断偶联物相接触, 并检测存在于该样品中的所述偶联物与至少一种抗体的结合; 所述方法可选地包含第二步: 与获得自具有为特定 M- 抗原的诊断偶联物的动物的一个第二样品相接触, 再检测存在于该样品中的所述偶联物与至少一种抗 M 抗体的结合。所述第一和第二样品也可以是相同的样品。只有当所述第一步给出了阳性信号即表明抗 -A 和 / 或抗 -C/Y 和 / 或抗 -M 抗体 (例如, 抗 -OPS 抗体, 如抗布鲁氏杆菌抗体) 存在于样品中的时候, 才实施第二步。这是因为, 至此第一接触步骤的阴性结果可被认为表明该动物曾经未被或未被感染或暴露于布鲁氏杆菌。所述方法可包括一个起始步骤, 即从动物体上获得样品。

[0095] 检测所述诊断偶联物与一个抗体的结合, 可以通过任何已知的技术方法实施, 例如: ELISA 测定, 荧光偏振测定 (FPA), TR-FRET 测定, 侧流测定或基于微珠的凝集测定, 如下更详细的描述。

[0096] 所述通用抗原可包含选自式 XIII-XV 的低聚糖。所述特定 M- 抗原可包括选自式 I- XII 的低聚糖。因此, 此处所述的方法可提供一种用于减少假阳性血清反应的出现的方法 (FPSRs), 当实施该方法用于检测一个动物是否感染或已经暴露于布鲁氏杆菌。“降低发生”可表明通过本发明所述的方法得到的较低的被确定为阳性 FPSRs 的比例 (如使用常规的现有技术中的血清方法测定), 而真阳性有效测定被保持着。可选地或附加地, “降低发生”也可表明本发明所述的方法测定为感染了布鲁氏杆菌的大多数动物事实上都已被感染, 相较于使用现有技术的方法测定的被感染的动物的比例。被布鲁氏杆菌感染的确认能够被确定了, 例如, 通过微生物培养 (Nielsen et al. (“Bovine brucellosis” In: Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals 2009; 100 office International Des Epizooties, Paris, pg 3-7)。

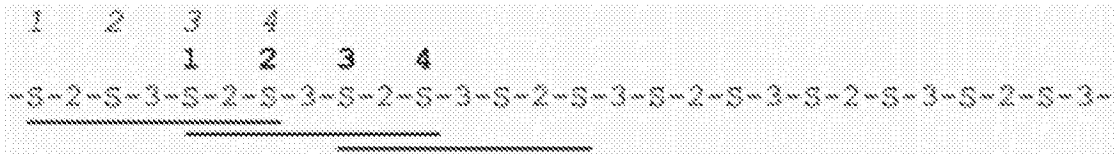
[0097] 根据本发明所述的方法, 可为用于区分感染了布鲁氏杆菌的动物与接种了一种疫苗偶联物的动物的方法, 根据本发明所述的第六方面, 如下所述。这种疫苗偶联物包含一种低聚糖, 所述低聚糖具有至少两个 4, 6- 二脱氧 -4- 乙酰氨基 - α - 吡喃糖单元, 每个单元由一个 α -(1-2)- 连接被连接到一个相邻的单元, 所述低聚糖被共价连接到疫苗的载体分子。所述方法的应用, 包括本发明所述诊断偶联物的应用, 促使针对布鲁氏杆菌的有用的合成疫苗的发展, 由于所述方法提供了一种 DIVA (从免疫动物中区别出被感染的动物) 测试, 以从接种了包含独占的 - (1-2) - 连接的 4, 6- 二脱氧 -4- 乙酰氨基 - α - 吡喃糖单元的疫苗的动物中区分被感染的动物。

[0098] 本发明的第三方面为提供了一种诊断偶联物, 包含一种低聚糖, 其具有至少 6 个 4, 6- 二脱氧 -4- 乙酰氨基 - α - 吡喃糖单元并且包含重叠的如式 VII 所示的四糖, 使得在一个四糖中的所述第三和第四个 4, 6- 二脱氧 -4- 乙酰氨基 - α - 吡喃糖单元在下一个四糖

中形成了第一和第二个 4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖单元,从而形成一种低聚糖,其中的所有位于多个 4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖单元之间的连接都可替代地为-(1,2)-和-(1,3)-键,所述低聚糖被共价连接至一种非多糖分子或连接至一种坚固实体。

[0099] 所述低聚糖可为 6-100 个 4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖单元长度,例如长度为 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 或 96。无论总长度如何,4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖单元和键合连接的形式都如下所示,其中的“S”表示一个单独的 4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖单元,其中的“2”表示 α -(1,2)-连接而“3”则表示 α -(1,3)-连接:

[0100]



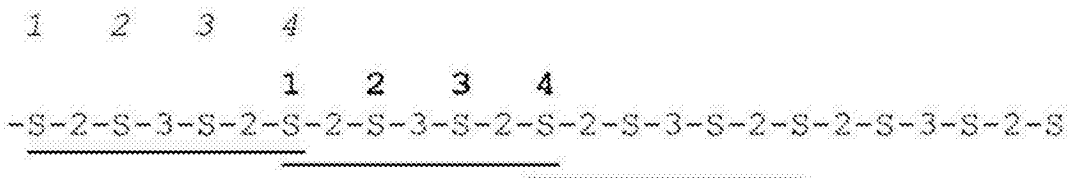
[0101] 这表明,具有从未连续的键合连接,其为相同的类型。重叠的四糖为上面所示的有下划线的序列。链中的用于第一个四糖的 4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖单元数目如以上斜体字所示,链中具有用于第二个四糖的单元数目如以上粗体字所示。这便显示了所述四糖时如何重叠的,以致在一个四糖中的第三和第四单元形成下一个四糖中的所述第一和第二单元。

[0102] 因此,所述低聚糖包含至少一个“S-2-S-3-S-2-S-3-S-2-S”子单元,其中,每个子单元通过 α -1,3 键线性地连接到另一个子单元。

[0103] 根据本发明的第四方面,提供了一种诊断偶联物,包含有一种低聚糖,其包括至少 7 个 4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖单元并包含重叠的如式 VII 所示的四糖,以致在一个四糖中的所述第四个 4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖单元形成了下一个四糖中的第一个 4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖单元,所述低聚糖被共价偶联到一种非多糖分子或一种坚固实体。

[0104] 所述低聚糖可以具有 7-100 个 4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖单元的长度,例如 7, 10, 13, 16, 19, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 99 或 105 个单元长度。无论总长度如何,4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖单元和键合连接的形式都如下所示,其中的“S”表示一个单独的 4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖单元,其中的“2”表示 α -(1,2)-连接而“3”则表示 α -(1,3)-连接:

[0105]



[0106] 这表明,最多只有两个连续的 α -1,2 键合连接。重叠的四糖为上面所示的有下划线的序列。链中的用于第一个四糖的 4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃糖单元数目如以上斜体字所示,链中具有用于第二个四糖的单元数目如以上粗体字所示。这便显示了所述四糖时如何重叠的,以致在一个四糖中的第四单元形成下一个四糖中的所述第一单元。

[0107] 因此,所示低聚糖包含至少一个“S-2-S-3-S-2-S-2-S-3-S”子单元,其中,每个子单元通过 α -1,2 键线性地连接到另一个子单元。

[0108] 根据本发明的第三或第四方面所述的诊断偶联物每个都提供了一种特异性的 M- 抗原,其能够优选地连接至一种抗 -M 抗体,相较于连接至一种抗 -C/Y 或抗 -A 抗体的水平。

[0109] 本发明的第五方面,提供了一种试剂盒,用于实施本发明所述的方法,包含有一种根据本发明的第二和 / 或第三和 / 或第四方面所述的诊断偶联物。所述试剂盒也包含用于获得和 / 或含有来自动物的生物样品的方法。这种试剂盒可包含有,例如,实验室试剂,用于进行抗体 - 抗原结合检测分析,比如为 ELISA。所述试剂盒可以包括包装材料和 / 或提供了使用该试剂盒的说明书的材料。

[0110] 包含于该试剂盒中的所述诊断偶联物可为一种坚固实体的形式,其具有连接其上的至少一种低聚糖,包括至少两个 4,6- 二脱氧 -4- 乙酰氨基 - α - 吡喃糖单元并包括位于相邻的 4,6- 二脱氧 -4- 乙酰氨基 - α - 吡喃糖单元之间的至少一个 -(1-3)- 键合连接。所述坚固实体可具有连接其上的低聚糖,该低聚糖如式 XIII-XV 所示,从而提供了一种通用抗原,该低聚糖如式 I-XII 所示,从而提供了一种特定抗原。所述坚固实体例如可以是一种如 ELISA 检测板的表面。所述试剂盒包含一种为通用抗原的诊断偶联物,或者包含一种为特定 M- 抗原的诊断偶联物,和 / 或可既包含为通用抗原的诊断偶联物又包含为特定 M- 抗原的诊断偶联物。包含两种类型的诊断偶联物的试剂盒有利的是,可用于初始检测被表达 OPS 的有机体(例如,布鲁氏杆菌)感染或暴露于表达 OPS 的有机体的动物,接着用于确认该动物是否感染了或已被暴露于布鲁氏杆菌,而不是感染了或暴露于类似小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 的有机体。

[0111] 更加本发明的第六方面,提供了一种疫苗偶联物,其包含一种低聚糖,该低聚糖具有至少两个 4,6- 二脱氧 -4- 乙酰氨基 - α - 吡喃糖单元并包括位于相邻的 4,6- 二脱氧 -4- 乙酰氨基 - α - 吡喃糖单元之间的一个 -(1-2)- 键合连接。在所述疫苗偶联物中的低聚糖只包含一个 -(1-2)- 键合连接。连接到所述载体分子的键,按照上述的这些方法实现,相对于本发明所述的诊断偶联物。一种疫苗载体分子,例如可以是本领域所熟知的蛋白质或多肽,可作为实用的对抗原分子的偶联物,以形成一种疫苗。例如,所述疫苗载体分子可为破伤风类毒素 (Verez-Bencomo et al, 20(2004)Science 305, 522-525), CRIM 197 (Mawas et al. (2002) Infect. Immun. 70, 5107-5114) 或者其它的高度免疫原性蛋白 (Svenson&Lindberg(1981) Infect. Immun. 32, 490-496)。所述疫苗载体分子也可以是免疫原性颗粒,比如为脂质体或无活性的病毒颗粒,其中所述低聚糖被接合于所述颗粒的表面。

[0112] 本发明的第七方面提供了一种疫苗组合物,包含有根据本发明的第六方面所述的疫苗偶联物。所述疫苗组合物还可包括适于此方法的赋形剂和 / 或稀释剂,通过此方法,该组合物将向对象给药,当需要接种疫苗以抵抗布鲁氏杆菌感染时。合适的组合物的选择是本领域技术人员通过惯用技术手段就能够完成的,而无需投入创造性劳动。

[0113] 例如,本发明所述的疫苗组合物可通过药学上可接受的赋形剂或稀释剂的使用而被方便地配制出来,例如,水溶剂,非水溶剂,无毒赋形剂,比如例如盐、防腐剂、缓冲液等。非水溶剂的例子为:丙二醇,聚乙二醇,植物油和可注射的有机酯,比如油酸乙酯。水溶剂包括:水,醇 / 水溶液,盐水溶液,注射药物用介质,比如氯化钠,林格氏葡萄糖等。防腐剂包括

抗微生物剂,抗氧化剂,螯合剂和惰性气体。所述疫苗组合物的各种成分的 pH 值和准确浓度可根据本领域公知常识进行调节。

[0114] 在某些情况下,配制包含助剂的疫苗组合物以增强免疫应答也是比较理想的。这些助剂包括所有可接受的免疫刺激性化合物,例如,细胞因子,毒素或合成成分。常用的助剂包括氢氧化铝,磷酸铝,磷酸钙,弗氏助剂和奎尔 -A 皂苷。除了助剂以外,生物应答调节剂 (BRM) 与所述疫苗偶联物共施用以下调抑制素 T 细胞的活性,这也是理想的。

[0115] 用于疫苗组合物施用的可能的介质包括脂质体。脂质体是微观囊泡,其包含一个或多个脂质双层围绕着亲水内衬。脂质体在组成上与细胞膜类似,因而脂质体通常可以安全地给药并且是可生物降解的。用于制备脂质体以及各种分子的脂质体制剂(例如,封装)的技术都是众所周知的。

[0116] 基于制备方法,脂质体可以是单层或多层并且其直径尺寸可为 0.02 μm 至大于 10 微米。脂质体还可吸附到几乎任何类型的细胞并随后释放出封装剂。可选择地,所述脂质体与靶细胞相融合,这是通过脂质体的内容物注入到靶细胞而实现的。可选地,一个脂质体可通过吞噬性细胞内吞噬而被吸收。内吞作用之后接着为脂质体脂质的溶酶体内降解,并释放出封装剂。在本说明书中,根据本发明所述的组合物中的所述疫苗偶联物可在脂质体的表面上本地化,以促进抗原呈递,而没有脂质体的破裂或内吞作用。然而无论什么样的机制或呈递,结果都是相关的疫苗偶联物在细胞内的处置。

[0117] 脂质体载体可以是阴离子或阳离子。阴离子脂质体载体包括 pH5 敏感脂质体,其紧接着内吞作用和内体酸化进行扰乱或融合内吞体膜。

[0118] 使用在该组合物中的其它合适的脂质体和本发明所述的方法包括:多层囊泡 (MLV),低聚物层状囊泡 (OLV),单层囊泡 (UV),小型单层囊泡 (SUV),中型单层囊泡 (MIN),大型单层囊泡 (LUV),巨型单层囊泡 (GUV),多囊囊泡 (MW),由反相蒸发法 (REV) 制得的单或低聚糖层状囊泡,由反相蒸发法 (MLV-REV) 制得的多层囊泡,稳定的多片层囊泡 (SPLV),冷冻和融化的 MLV (FATMLV),由挤出法制备的囊泡 (VET),由弗氏压碎法制备的囊泡 (FPV),由融合法制备的囊泡 (FUV),由脱水-复水法制备的囊泡 (DRV),以及泡状囊泡 (BSV)。制备这些脂质体的技术都是公知的。

[0119] 递送颗粒的其它形式,例如为微珠及其类似物,也被考虑用于递送所述疫苗偶联物。

[0120] 在一个实施例中,所述疫苗组合物可包括于动物饲料(即适于被动物食用的食品)中,包含有本发明所述的一种组合物和/或一种疫苗偶联物。在非限制性实施例中,这可能以颗粒、屑状或糊状物的形式存在,所述糊状物,仅仅作为例子,可进一步包括:谷物,草料和/或蛋白质成分。该组合物也可以被包括在饮用液体和/或通过喷雾施用到该动物周围的大气中,因此可由动物所吸入。

[0121] 根据本发明上述的各方面的方法和诊断偶联物,使这些有用的疫苗结合物和组合物被制得以用于接种疫苗的动物防止被布鲁氏杆菌感染,基于合成的,独占的-(1-2)-键合的 4,6-二脱氧-4-乙酰氨基- α -吡喃低聚糖。这是因为根据本发明所述的方法提供了一种 DIVA 测试以从感染了布鲁氏杆菌的动物中区分出接种这种疫苗的动物。

[0122] 因此,根据本发明所述的疫苗偶联物和/或疫苗组合物,可被用于给动物接种防止感染布鲁氏杆菌的方法中,所述方法包括施用所述疫苗偶联物和/或疫苗组合物到动

物。因此,本发明的第八方面提供了一种给动物接种防止感染布鲁氏杆菌的方法,该方法包含施用所述疫苗偶联物和 / 或疫苗组合物到动物。所述方法还包括后续地通过本发明的第一方面所述的方法确认抗 -A 和 / 或抗 -C/Y 抗体在源自动物的生物样品中的存在,以预防感染布鲁氏杆菌。例如,此方法可通过将所述样品和诊断偶联物接触而实现,所述诊断偶联物为此处所定义的通用抗原。

[0123] 本发明的说明书和权利要求书中的词语“包含”和“含有”及其类似词语,例如“包括”和“具有”等等,意思是“包括但不限于”,并且不排除其它的部分,添加剂,组分,整体或步骤。

[0124] 本发明的其它技术特征可以从以下实施例中明确地得到说明。一般来说,被本发明的发明书所披露的技术特征(包括所附权利要求书和附图)将延伸至其紧密相关的新技术特征或新技术特征的结合。从而,结合本发明的特定方面、实施方式或实施例中描述的特征、整数、特性、化合物或化学部分都应当被理解为适用于其它的方面、实施方式或实施例,除非与其不相容。

[0125] 此外,除非另有说明,出于同样或类似的目的,本发明所记载的技术特征可以被本领域技术人员替换为其它替代性的技术特征。

附图说明

[0126] 本发明的具体实施方式将在此部分通过说明附图 1-27 的内容而进行仅为示例性地描述:

[0127] 图 1 显示了,目标五糖 (1) 展示出了优选地结合到 M-5 特异性抗体,和九糖 (2) 被设计用于键合至 A- 和 M- 特异性抗体;

[0128] 图 2 中的 X 轴显示了来自羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISA 的结果,表示为一个共同的阳性对照的百分比;而 Y 轴显示了来自小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS iELISA 的结果,也表示为一个共同的阳性对照的百分比;图中的实心菱形表示源自牛血清的确认感染了布鲁氏杆菌流产生化 1 型的结果 ($n = 45$);而叉形则表示源自感染了非布鲁氏杆菌的牛的血清的结果 ($n = 68$),所述牛为在一种或多种常规血清诊断测试中结果呈阳性的牛;

[0129] 图 3A 的 X 轴显示了来自羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISA 的结果,表示为一个共同的阳性对照的百分比;而 Y 轴显示了来自小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS iELISA 的结果,也表示为一个共同的阳性对照的百分比;图中的实心菱形表示源自猪血清的确认感染了布鲁氏杆菌流产生化 1 型的结果 ($n = 41$);而叉形则表示源自感染了非布鲁氏杆菌的猪的血清的结果 ($n = 52$),所述猪来自一个或多个猪群,且在一种或多种常规血清诊断测试中结果呈阳性;

[0130] 图 3B 的 X 轴显示了来自布鲁氏杆菌 S99 OPS iELISA 流产菌株的结果 ($n = 52$),表示为一个共同的阳性对照的百分比;而 Y 轴显示了来自小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS iELISA 的结果,也表示为一个共同的阳性对照的百分比;图中的实心菱形表示源自猪血清的确认感染了布鲁氏杆菌流产生化 1 型的结果 ($n = 41$);而叉形则表示源自感染了非布鲁氏杆菌的猪的血清的结果 ($n = 52$),所述猪来自一个或多个猪群,且在一种或多种常规血清诊断测试中结果呈阳性;

[0131] 图 4 显示了四糖 ($m/z = 711.3$) 的选择离子的计数:(A) 选自羊种布鲁氏杆菌

16M 核心 OPS(3 个显著峰显示在 8:05, 8.50&11:10mins:secs) ;(B) 选自布鲁氏杆菌 S99 核心 OPS 流产菌株 (5 个显著峰显示在 8:05, 8:50, 9:20, 10:05 和 10:40mins:secs) ;(C) 选自小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 核心 OPS(6 个显著峰显示在 8:05, 9:20, 9:55, 10:10, 10:40 和 11:30mins:secs) ;(D) 选自洗脱自结合有抗 - 布鲁氏杆菌 mAb BM40 的亲和色谱柱的布鲁氏杆菌 S99 核心 OPS 流产菌株 (3 个显著峰显示在 8:50, 10:30 和 11:15mins:secs) ;通过体积排阻色谱水解和纯化的所有核心 OPS, 在石墨化碳 HPLC 柱与 ESI- 三重四极质谱仪联用中进行在线分析 ;

[0132] 图 5 表示, 通过不同浓度的竞争性液相抗原 (X 轴) 将 BM40 单克隆抗体抑制素连接到固相的羊种布鲁氏杆菌 16M OPS 抗原 (Y 轴), 同时进行三种类型的竞争性 OPS 抗原的评估 (见图例), 除了在根据本发明所述的 TSM 抗原中以外 ;

[0133] 图 6 显示了连接至固相羊种布鲁氏杆菌 16M 核心 OPS(Y 轴) (图 7A) 的兔抗 M 的单特异性抗血清的抑制作用, 或者连接至固相布鲁氏杆菌 S99 核心 OPS 流产菌株抗原 (Y 轴) (图 7B) 的兔抗 A 的单特异性抗血清的抑制作用, 通过不同浓度的竞争性液相抗原 (X 轴), 同时进行三种类型的竞争性 OPS 抗原的评估 (见图例), 除了在根据本发明所述的 TSM(四糖) 抗原中以外 ;

[0134] 图 7 的 X 轴显示了来自羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISA 的结果, 表示为一个共同的阳性对照的百分比 ; 而 Y 轴显示了来自 TSM 抗原 iELISA 的结果, 也表示为一个共同的阳性对照的百分比 ; 图中的实心菱形表示源自牛血清的确认感染了布鲁氏杆菌流产生化 1 型的结果 (n = 45) ; 而叉形则表示源自感染了非布鲁氏杆菌的牛的血清的结果 (n = 68), 所述牛在一种或多种常规血清诊断测试中结果呈阳性 ;

[0135] 图 8 显示了布鲁氏杆菌 A- 和 M- 特异性 mAbs, YsT9-1 和 Bm10 的 ELISA 滴定曲线 ; 五糖偶联物 42(右图) 和九糖偶联物 43(左图) ;

[0136] 图 9 的 X 轴显示了来自 BSA- 九糖偶联物 iELISA 的结果, 表示为一个共同的阳性对照的百分比 ; 而 Y 轴显示了来自 BSA- 五糖偶联物 iELISA 的结果, 也表示为一个共同的阳性对照的百分比 ; 图中的实心菱形表示源自牛血清的确认感染了布鲁氏杆菌流产生化 1 型的结果 (n = 45) ; 而叉形则表示源自感染了非布鲁氏杆菌的牛的血清的结果 (n = 68), 所述牛在一种或多种常规血清诊断测试中结果呈阳性 ;

[0137] 图 10 的 X 轴显示了来自 BSA- 四糖偶联物 iELISA 的结果, 表示为一个共同的阳性对照的百分比 ; 而 Y 轴显示了来自 BSA- 二糖偶联物 iELISA 的结果, 也表示为一个共同的阳性对照的百分比 ; 图中的实心菱形表示源自牛血清的确认感染了布鲁氏杆菌流产生化 1 型的结果 (n = 45) ; 而叉形则表示源自感染了非布鲁氏杆菌的牛的血清的结果 (n = 68), 所述牛在一种或多种常规血清诊断测试中结果呈阳性 ;

[0138] 图 11 的 X 轴显示了来自 BSA- 三糖偶联物 (具有终端的 α -1, 3 键) iELISA 的结果, 表示为一个共同的阳性对照的百分比 ; 而 Y 轴显示了来自 BSA- 三糖偶联物 (具有终端的 α -1, 2 键) iELISA 的结果, 也表示为一个共同的阳性对照的百分比 ; 图中的实心菱形表示源自牛血清的确认感染了布鲁氏杆菌流产生化 1 型的结果 (n = 45) ; 而叉形则表示源自感染了非布鲁氏杆菌的牛的血清的结果 (n = 68), 所述牛在一种或多种常规血清诊断测试中结果呈阳性 ;

[0139] 图 12 显示了从以下结果中产生的 ROC 曲线 : 所述小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS,

羊种布鲁氏杆菌 16M OPS, BSA- 五糖、BSA- 四糖和 BSA - 二糖偶联物 iELISAs 被应用于确认感染了布鲁氏杆菌流产生化 1 型的牛的血清的结果 (n = 45), 以及被应用于感染了非布鲁氏杆菌的牛的血清的结果 (n = 68), 所述牛在一种或多种常规血清诊断测试中结果呈阳性;

[0140] 图 13 显示了羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISA 应用于源自四种实验中感染了布鲁氏杆菌流产 544 (布鲁氏杆菌 #1 至 #4, 实线) 菌株牛的血清和四种实验中感染了小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 (Ye0:9#1 至 #4, 虚线) 的结果; 样品取自于感染后第 3, 7, 16, 24 周;

[0141] 图 14 显示了所述 BSA- 九糖偶联物 iELISA 被应用于源自四种实验中感染了布鲁氏杆菌流产 544 (布鲁氏杆菌 #1 至 #4, 实线) 菌株牛的血清和四种实验中感染了小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 (Ye0:9#1 至 #4, 虚线) 的结果; 样品取自于感染后第 3, 7, 16, 24 周;

[0142] 图 15 显示了所述 BSA- 五糖偶联物 iELISA 被应用于源自四种实验中感染了布鲁氏杆菌流产 544 (布鲁氏杆菌 #1 至 #4, 实线) 菌株牛的血清和四种实验中感染了小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 (Ye0:9#1 至 #4, 虚线) 的结果; 样品取自于感染后第 3, 7, 16, 24 周;

[0143] 图 16 的 X 轴显示的源自羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISA 和 Y 轴显示的来自 BSA- 五糖偶联物 (具有终端的 α -1, 2 键) iELISA 被应用于源自四种实验中感染了布鲁氏杆菌流产 544 (实心菱形) 菌株牛的血清 (n = 16) 和四种实验中感染了小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 (叉形) 的血清的结果。样品取自于感染后第 3, 7, 16, 24 周; 散点图只区分了源自不同感染类型的样品, 并不能区分感染后的动物和时间;

[0144] 图 17 显示了所述 BSA- 四糖偶联物 iELISA 被应用于源自四种实验中感染了布鲁氏杆菌流产 544 (布鲁氏杆菌 #1 至 #4, 实线) 菌株牛的血清和四种实验中感染了小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 (Ye0:9#1 至 #4, 虚线) 的结果; 样品取自于感染后第 3, 7, 16, 24 周;

[0145] 图 18 显示了所述 BSA- 二糖偶联物 iELISA 被应用于源自四种实验中感染了布鲁氏杆菌流产 544 (布鲁氏杆菌 #1 至 #4, 实线) 菌株牛的血清和四种实验中感染了小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 (Ye0:9#1 至 #4, 虚线) 的结果; 样品取自于感染后第 3, 7, 16, 24 周;

[0146] 图 19 的 X 轴显示的源自 BSA- 四糖偶联物 iELISA 和 Y 轴显示的源自 BSA- 二糖偶联物 iELISA 被应用于源自四种实验中感染了布鲁氏杆菌流产 544 (实心菱形) 菌株牛的血清 (n = 16) 和四种实验中感染了小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 (叉形) 的血清 (n = 16) 的结果。样品取自于感染后第 3, 7, 16, 24 周; 散点图只区分了源自不同感染类型的样品, 并不能区分感染后的动物和时间;

[0147] 图 20 的 X 轴显示了来自 BSA- 九糖偶联物 iELISA 的结果, 表示为一个共同的阳性对照的百分比; 而 Y 轴显示了来自 BSA- 五糖偶联物 iELISA 的结果, 也表示为一个共同的阳性对照的百分比; 图中的实心菱形表示源自牛血清的确认感染了布鲁氏杆菌流产生化 1 型的结果 (n = 45); 而叉形则表示源自随机取样所得的布鲁氏菌病的游离牛血清的结果 (n = 125);

[0148] 图 21 的 X 轴显示了来自 BSA- 四糖偶联物 iELISA 的结果, 表示为一个共同的阳性对照的百分比; 而 Y 轴显示了来自 BSA- 二糖偶联物 iELISA 的结果, 也表示为一个共同的阳性对照的百分比; 图中的实心菱形表示源自牛血清的确认感染了布鲁氏杆菌流产生化 1 型的结果 (n = 45); 而叉形则表示源自随机取样所得的布鲁氏菌病的游离牛血清的结果 (n = 125);

[0149] 图 22 的 X 轴显示了羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISA 的结果,表示为一个共同的阳性对照的百分比;而 Y 轴显示了 TSM 抗原 ELISAs;图中的实心菱形表示源自绵羊和山羊血清的确认感染了布鲁氏杆菌羊种生化 1 型的结果 ($n = 61$);而空心三角形则表示源自感染了非布鲁氏杆菌的绵羊和山羊血清的结果,所述绵羊和山羊随机取样于英国 ($n = 94$);

[0150] 图 23 的 X 轴显示了来自 BSA-五糖偶联物 iELISA 的结果,表示为一个共同的阳性对照的百分比;而 Y 轴显示了来自 BSA-九糖偶联物 ELISAs 的结果,也表示为一个共同的阳性对照的百分比;图中的实心菱形表示源自山羊和绵羊血清的确认感染了布鲁氏杆菌羊种生化 3 型的结果 ($n = 61$);而空心三角形则表示源自感染了非布鲁氏杆菌的绵羊和山羊血清的结果,所述绵羊和山羊随机取样于英国 ($n = 94$);

[0151] 图 24 显示了 (#2) 人血清的滴定法测定,所述人血清源自由抗共聚维酮-共轭糖偶联物 99a 和 99b 的细菌培养诊断呈猪种布鲁氏杆菌阳性的人类患者;

[0152] 图 25 显示了单克隆抗体和抗 ELISA 检测板的人血清 #2 的滴定法测定,其中的所述 ELISA 检测板涂覆有低负荷“布鲁氏杆菌 A 型”六糖偶联物 100b;

[0153] 图 26 显示了单克隆抗体和抗 ELISA 检测板的人血清 #2 的滴定法测定,其中的所述 ELISA 检测板涂覆有通用抗原“布鲁氏杆菌 A 和 M 型”六糖偶联物 98;以及

[0154] 图 27 显示了 HRP 偶联 BM40 抗 M mAb 的结合,表达为针对 3 种 BSA-低聚糖偶联物的 iELISA 光密度 (OD),在 Y 轴上显示为三条分离的线:二糖,三糖和四糖。

具体实施方式

[0155] 低聚糖和偶联物的合成

[0156] 下面的部分提供了通用的方法,标题为“通用合成方法”。

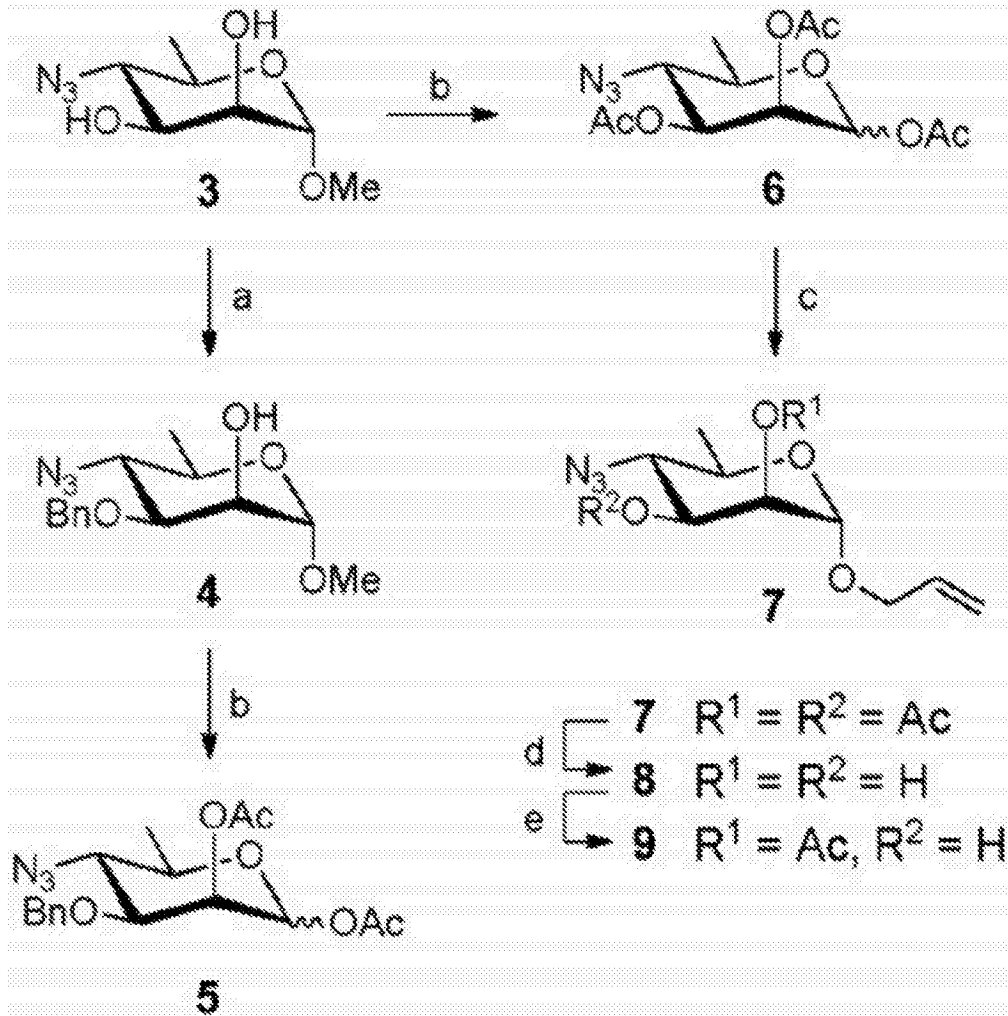
[0157] 五糖 1(图 1;例如式 XI) 被选为最大尺寸的抗原,其可表现出选择性的 M 型特性,与 A-特异性抗体发生有限的交叉反应。九糖 2(上式 XV) 被认为是一种抗原,其可包含两种 A-型抗原决定簇和一种 M-型抗原决定簇,可作为一种通用抗原用于检测被布鲁氏杆菌流产菌株,羊种布鲁氏杆菌和猪种布鲁氏杆菌感染了动物或人体内的抗体。

[0158] 目标低聚糖 1 和 2 的大尺寸,内部的 1,3 键的并入,以及对于抗原合成的约束以前未尝试过 (Peters&Bundle (1989) Can. J. Chem. 67, 497-502) 并且使得改进的合成方法的研发成为必需。连接剂 5-甲基氧羰基戊醇 (Lemieux et al. 15(1975) J. Am. Chem. Soc. 97, 4076-4083; Ogawa et al. (1996) Carbohydr. Res. 293, 173-94) 被选择由于其与所采用的方法相兼容以脱保护组成低聚糖,并由于其为随后的偶联至蛋白质的反应提供多种途径的灵活性,以创造糖复合物抗原 (Kamath et al. (1996) Glycoconjugate 13, 315-319)。两种不同的方法被应用于首先合成五糖和九糖,具有第二修改的方法以合成二,三,四和六糖。所述第二种方法采用了相关的但略作修改的保护方案用于单糖和双糖的合成子的构建。

[0159] 合成方法 1

[0160] 行之有效的方法被用于合成化合物 3-6,如下所述 (Bundle et al. (1998) Carbohydr. Res. 174, 239-251)。路易斯酸催化 6 所提供的烯丙基苷 7 的糖苷化反应,其酯交换至 8 一个 2,3-原酸酯衍生物的形成,所述 2,3-原酸酯衍生物经过区域选择性开环获得了选择性保护的结构块 9(合成路线 1)。

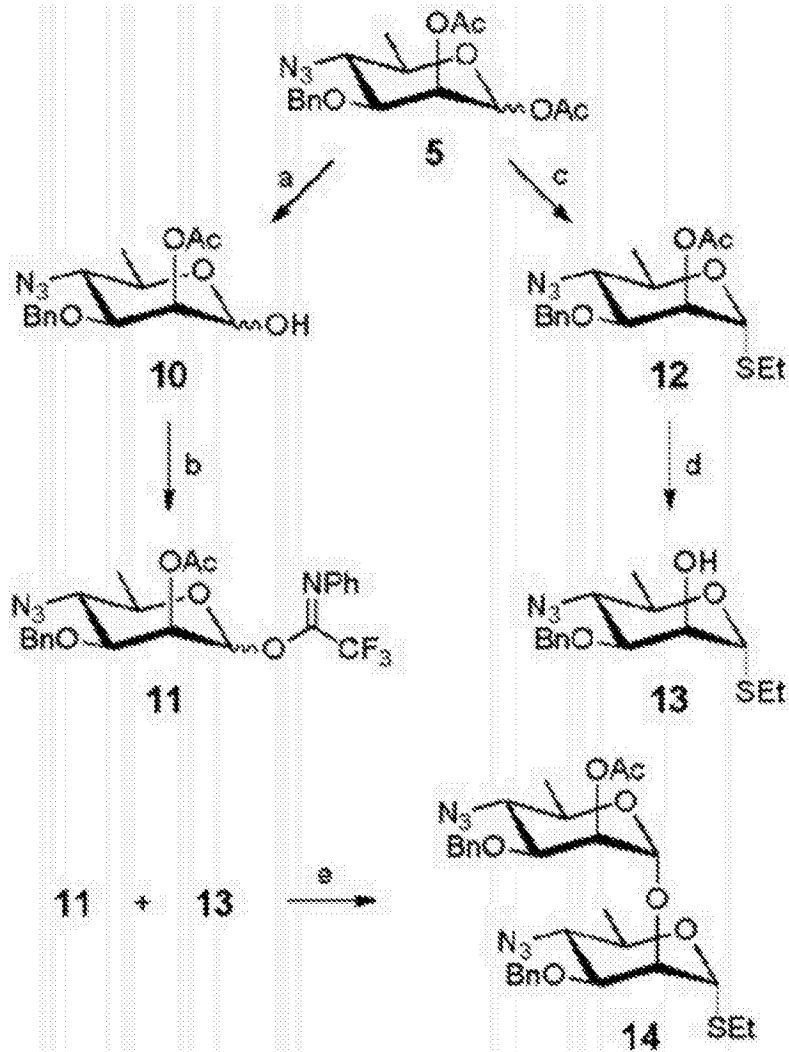
[0161]



[0162] 合成路线 1 :a) Bu_2SnO , BnBr , PhMe , $110\text{ }^\circ\text{C}$;b) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ 50:20:0.5 ;c) AlI OH , $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 ;d) NaOCH_3 , CH_3OH ;e) i. $\text{CH}_3(\text{OEt})_3$, 对-甲苯磺酸, DMF ;ii. AcOH .

[0163] 我们使用 N-苯基三氟乙酰亚胺酯用于糖基化反应,因为这种供体已经展现出比相应的三氯乙酰亚胺酯衍生物更高效,对于包括了 6-脱氧糖供体的糖基化反应 (Hanashima et al. (2007) *Org. Lett.* 9, 1777-1779)。5 给予 10 的选择性脱乙酰反应,接着在碳酸铯的存在下与 N-苯基三氟乙酰亚胺酰基氯化物反应作为碱给予糖基 N-苯基三氟乙酰基亚氨酸酯供体 11 (Hanashima et al. (2007) *Org. Lett.* 9, 1777-1779)。单糖 5 也转化为硫代糖苷供体 12 和进行酯交换反应得到受体 13 (Peters&Bundle (1989) *Can. J. Chem.* 67, 491-496)。通过 11 的 13 的糖基化反应在三氟甲磺酸三甲基硅酯的存在下进行,以给出二糖 14,产率 94%,具有完整的立体控制并无需 B-端基差向异构体检测量 (合成路线 2)。

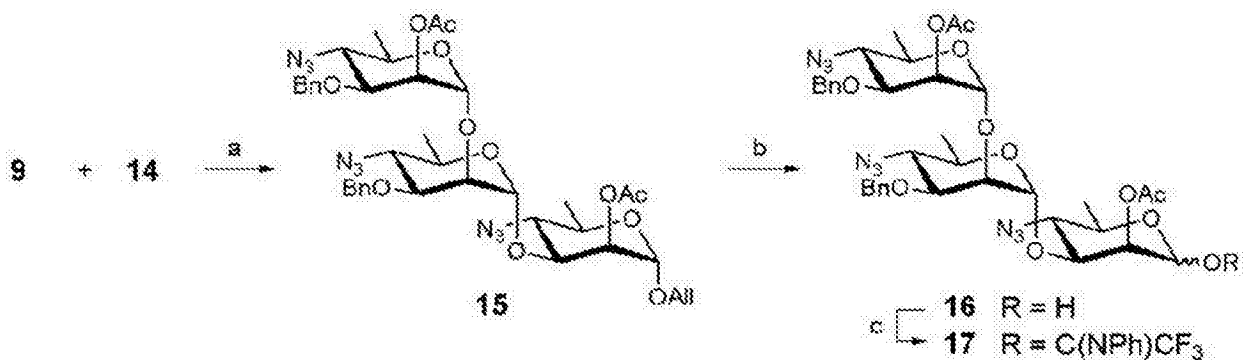
[0164]



[0165] 合成路线 2 :a) 2M $\text{Me}_2\text{NH}/\text{THF}$, CH_2Cl_2 ; b) $\text{CF}_3\text{C}(\text{NPh})\text{Cl}$, Cs_2CO_3 , CH_2Cl_2 ; c) EtSH , $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 ; d) NaOCH_3 , CH_3OH ; e) TMSOTf , CH_2Cl_2 。

[0166] 所述 1,3- 键连接的三糖构造块 15 由于其烯丙基糖苷而被合成,这是因为此端基差向异构的保护基的选择性去除允许简便接入到半缩醛且随后的亚胺酯离去基团 (Du et al. (2001) *Tetrahedron* 57, 1757-1763)。尝试着与烯丙基进行糖基化反应,作为离去基团但所有的都试图这样做失败 (Wang et al. (2007) *J. Org. Chem.* 72, 5870-2873)。因此,15 利用在乙酸中的氯化钯被选择性地脱去 (Du et al. (2001) *Tetrahedron* 57, 1757-1763),以给予半缩醛 16,其被反过来转化成该 N- 苯基三氟乙酰基亚氨酸酯供体 17 (合成路线 3)。

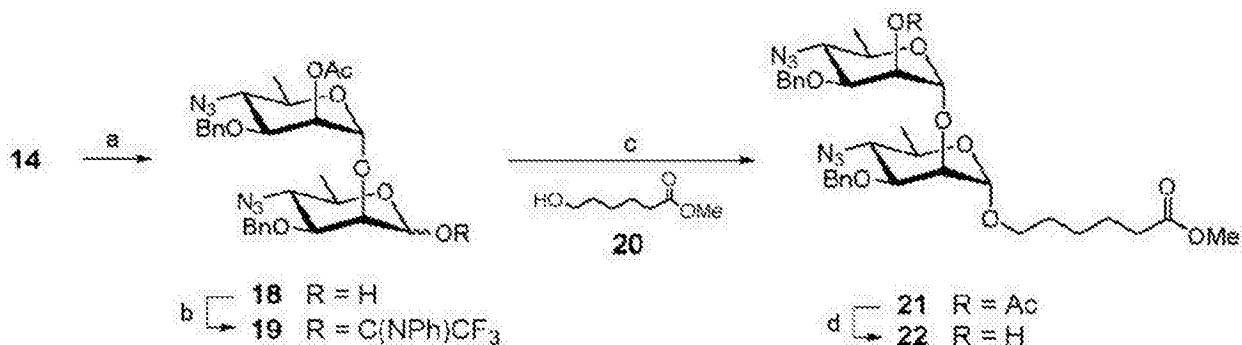
[0167]



[0168] 合成路线 3 :a) NIS, TfOH, CH_2Cl_2 , -30°C ;b) PdCl_2 , AcONa, AcOH, H_2O ;c) $\text{CF}_3\text{C}(\text{NPh})\text{Cl}$, Cs_2CO_3 , CH_2Cl_2 。

[0169] 由硫苷 14 进行的 5- 甲氧基羰基戊醇的糖基化获得了中等至不佳的收率, 由于这种类型的受体的反应性低 (Lemieux et al. (1975) J Am. Chem. Soc. 97, 4076-4083)。该硫代糖苷 14 水解得到半缩醛 18, 其将它转换为亚胺酯 19。该六碳连接剂 20 (El Fangour et al. (2004) J. Org. Chem. 69, 2498-1503) 由 19 进行糖基化反应以获得所述保护的双糖糖苷 21 (Hou&Kovac (2010) Carbohydr. Res. 345, 999-1007)。21 的酯交换反应得到了系绳糖苷受体 22 (合成路线 4)。

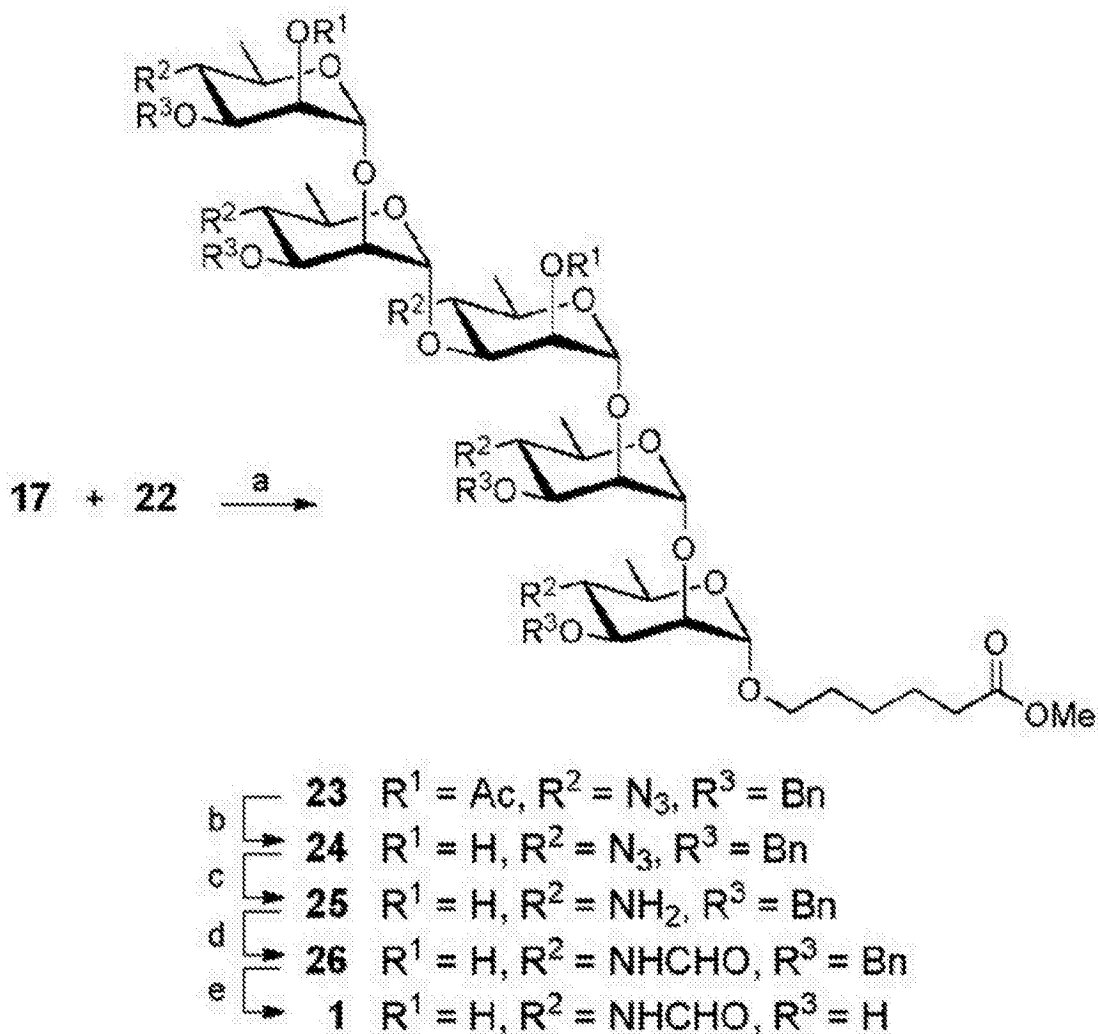
[0170]



[0171] 合成路线 4 :a) NIS, H_2O , 丙酮 ;b) $\text{CF}_3\text{C}(\text{NPh})\text{Cl}$, Cs_2CO_3 , CH_2Cl_2 , c) TMSOTf, PhMe, 10°C ;d) NaOCH_3 , CH_3OH 。

[0172] 五糖 23 获得自构造块三糖 17 和二糖糖苷 22, 并使用 TMSOTf 作为活化剂, 获得的收率为 68% (合成路线 5)。逐步去保护按照以下顺序: 为定量收率脱乙酰化以得到 24, 用硫化氢进行叠氨基还原反应以获得 25。化合物 25 由 20 通过混合酸酐 (乙酸酐 / 甲酸 2:1) 直接甲酰化得到 26 (Bundle et al. (1988) Carbohydr. Res. 174, 239-251)。接着引入 N- 甲酰胺基, NMR 分析所有后续的化合物是困难的, 这是由于对于每个甲酰基而言的 E/Z 旋转异构体的存在导致了潜在的同分异构体 32 的混合。它们的标识通过一组有限的特征核磁共振表征和高分辨质谱测定而被确认。五糖 1 由苄醚氢解而获得。

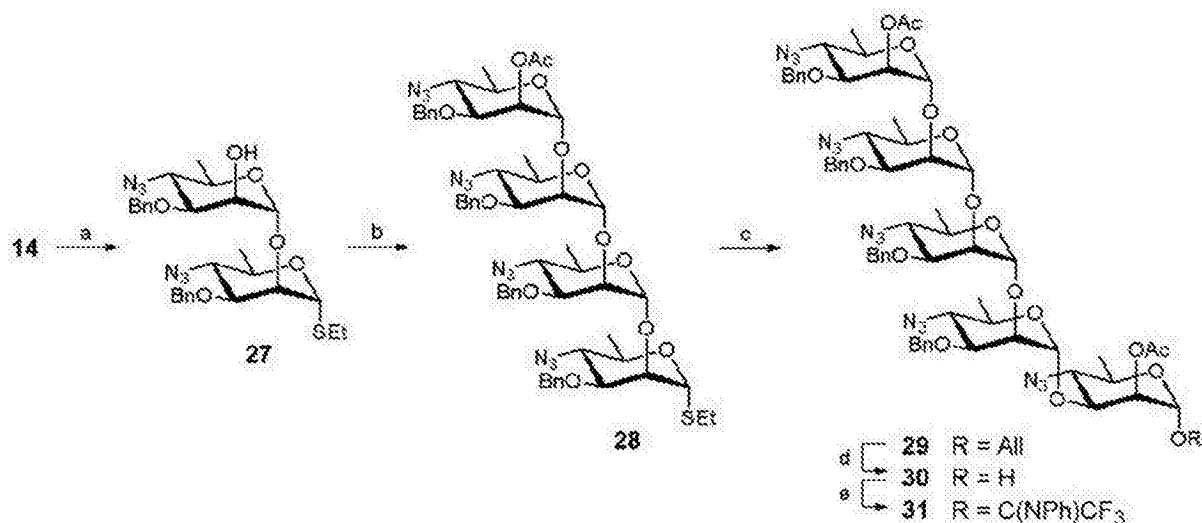
[0173]



[0174] 合成路线 5 :a) TMSOTf, CH_2Cl_2 ; b) NaOCH_3 , CH_3OH ; c) H_2S , Py . / NEt_3 1:1; d) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{HCOOH}$ 2:1, CH_3OH ; e) H_2 , Pd/C, AcOH。

[0175] 九糖 2 的合成被设想为创建一个末端具有 α -1,3 键的五糖供体, 该 α -1,3 键随后将允许五糖供体在 C-2 上具有连接基团以引导立体选择性的独占 1,2-连接的四糖的 α 糖基化反应。为了实现五糖供体的合成, 化合物 14 被脱保护, 以得到相应的受体 27, 其通过亚胺酯供体 19 完成糖基化。在 100°C 的甲苯中, 四糖 28 被转化为所述 21 (Hou&Kovac (2010) *Carbohydr. Res.* 345, 999-1007)。四糖硫苷 28 被直接用作供体 15, 用于单糖糖苷的糖基化反应, 以获得所述 α 1,3-糖苷键。五糖 29 的烯丙基随后被移除 (Du et al. (2001) *Tetrahedron* 57, 1757-1763), 以得到 30, 并且所述亚胺酯供体 31 与 N-苯基三氟乙酰氯进行下面的反应 (合成路线 6)。

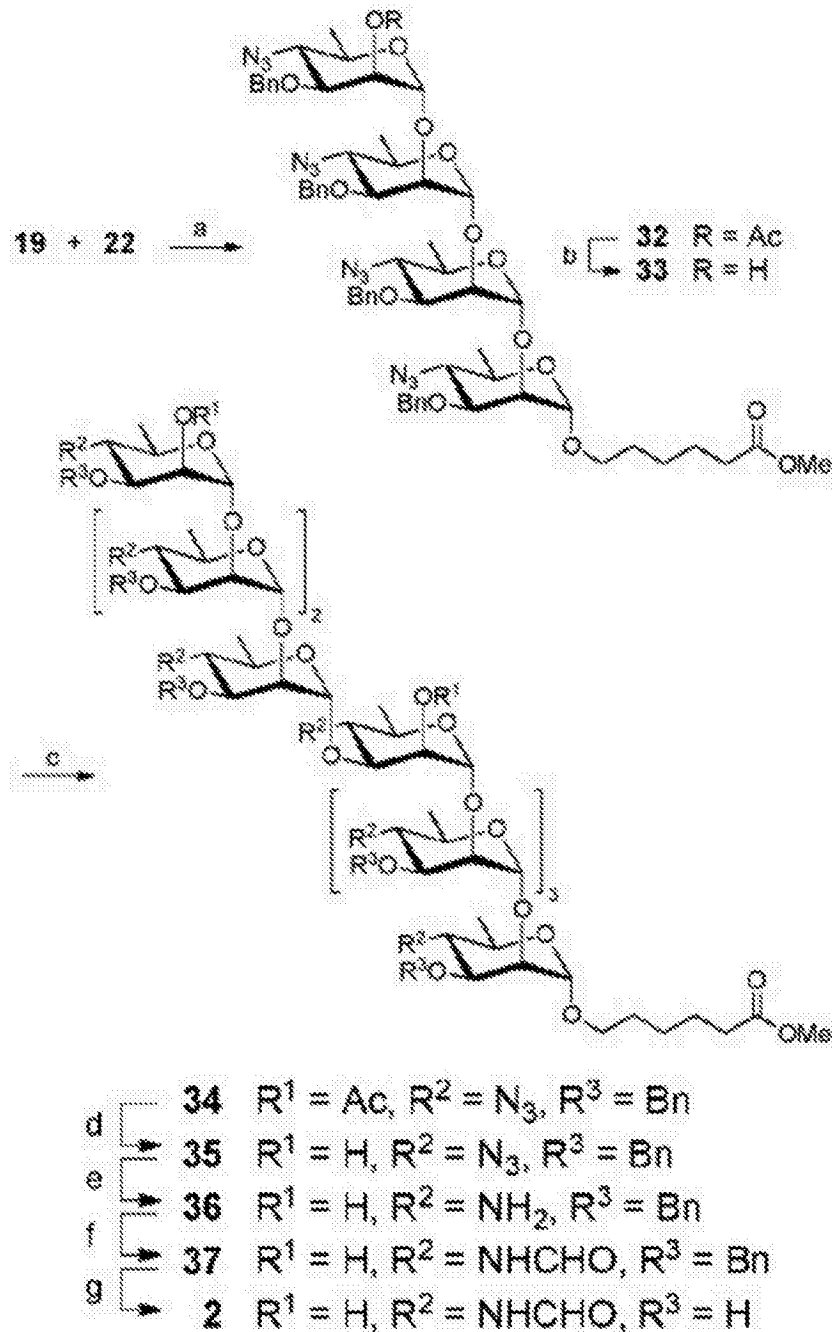
[0176]



[0177] 合成路线 6 :a) NaOCH₃, CH₃OH ;b) 19, TMSOTf, PhMe, 100 °C ;c) 9, NIS, TfOH, CH₂Cl₂;d) PdCl₂, AcONa, AcOH, H₂O ;e) CF₃C(NPh)Cl, Cs₂CO₃, CH₂Cl₂。

[0178] 四糖系绳糖苷 32 通过 2+2 的二糖受体 22 的糖基化反应而得到, 通过采用相同的条件的所述二糖供体 19, 被用于制备 28, 32 酯交换反应得到了所述四糖受体 33, 其由五糖供体 31 糖基化而得到九糖 34, 收率 30%。脱保护步骤的顺序 (脱乙酰化至 35, 还原叠氮化物 10 变为 36, N-甲酰化反应得到 37 以及氢化反应) 以得到 2, 依照以下顺序以获得五糖 1 (合成路线 7)。

[0179]

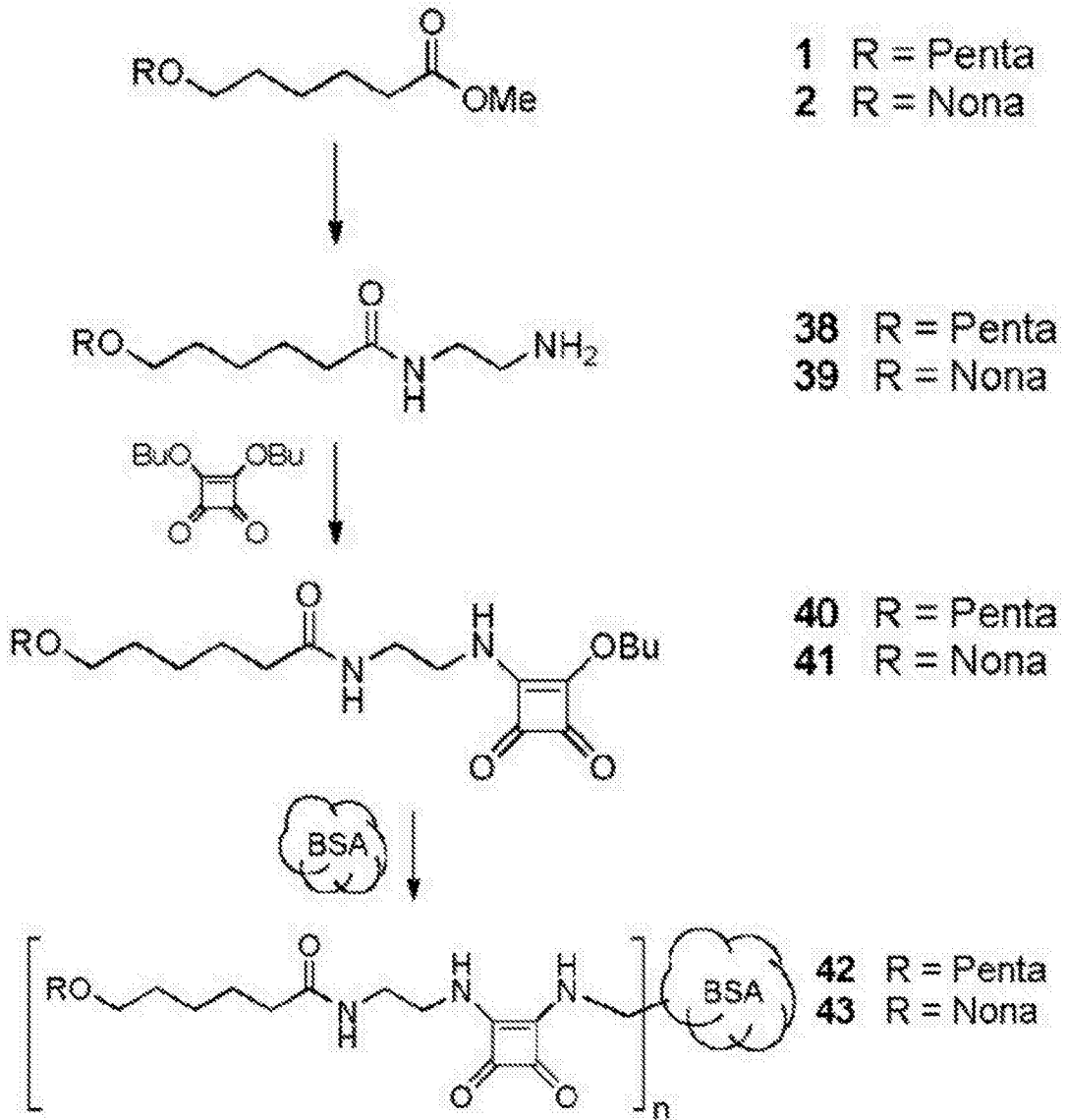


[0180] 合成路线 7 :a) TMSOTf, PhMe, 100 °C ;b) NaOCH₃, CH₃OH ;c) 31, TMSOTf, CH₂Cl₂;d) NaOCH₃, CH₃OH ;e) H₂S, py. /NEt₃1:1 ;f) Ac₂O/HCOOH 2:1, CH₃OH g) H₂, Pd/C, AcOH。

[0181] 最终的化合物 1 和 2 通过反相 HPLC 纯化。全面的 NMR 检测在在叠氮五糖衍生物 24 和九糖衍生物 35 中进行。选择的特征核磁共振表征和高分辨质谱表征了衍生物 26 和 37 以及目标低聚糖 1 和 2 的特性。

[0182] 为了结合到蛋白质,五糖苷 1 和九糖苷 2 被首先转化成相应的酰胺 38 和 39,通过与乙二胺的反应(合成路线 8)。38 和 39 与方酸二正丁酯的反应得到了方酸半酯 40 和 41,它们通过反相 HPLC 被分离。相应的五糖和九糖牛血清白蛋白(BSA)糖复合物 42 和 43 通过 20-1 摩尔比的 40 和 41 与 BSA 在硼酸盐缓冲液中反应 3 天而制得。MALDI-TOE 质谱表明,每个偶联物都包含大约 16 个备份的低聚糖在 BSA 的每个分子中。

[0183]

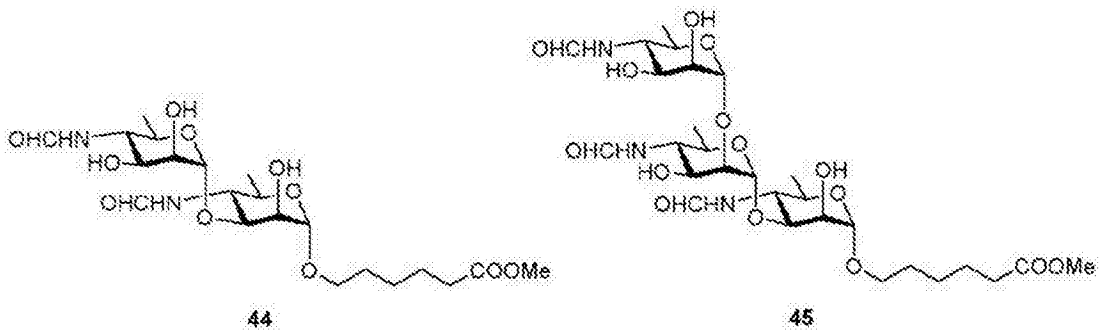


[0184] 合成路线 8 :五糖 1 和九糖 2 的活化反应和偶联反应至 BSA 以获得糖偶联物 42 和 43。

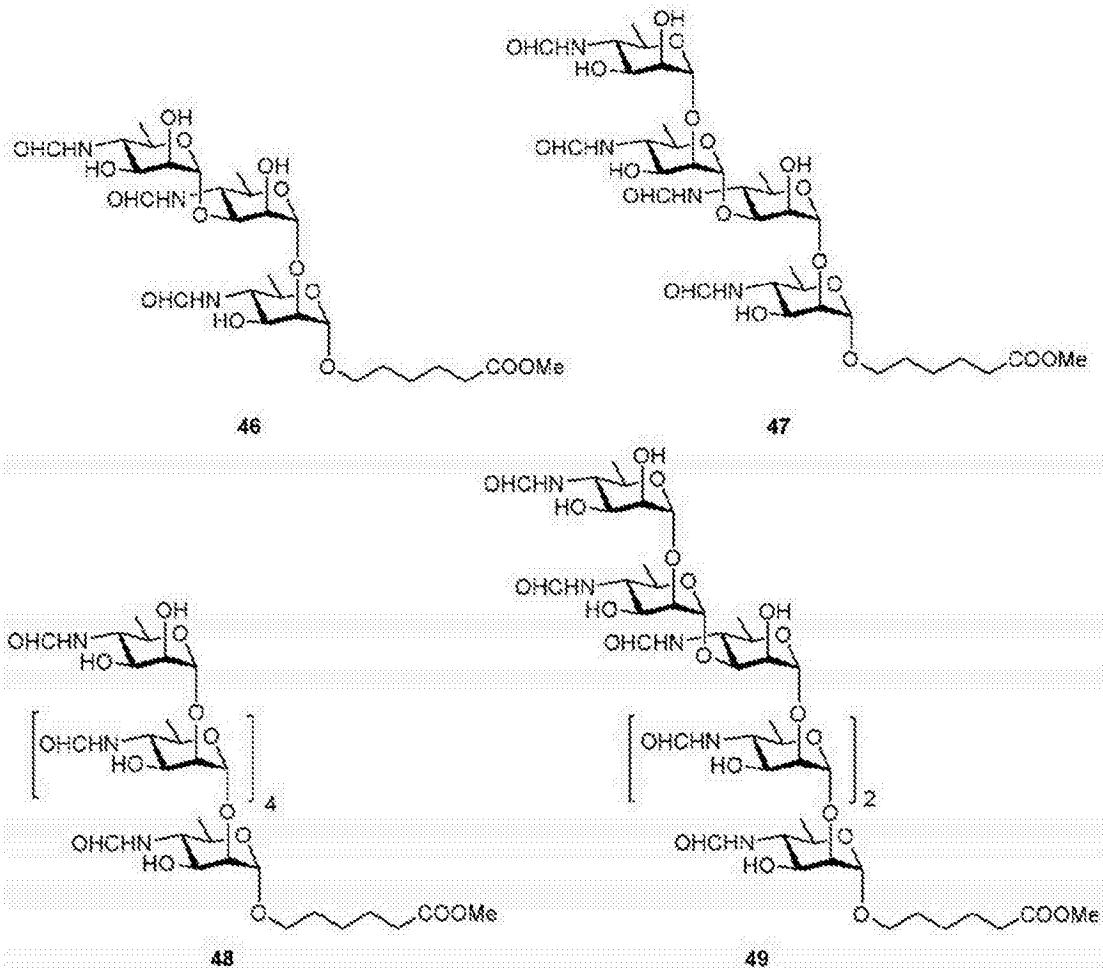
[0185] 合成方法 2 :

[0186] 此方法着重于涉及较短的低聚糖 44-47, 其将提供 M- 特异性抗原并获得上述辨别水平。

[0187]

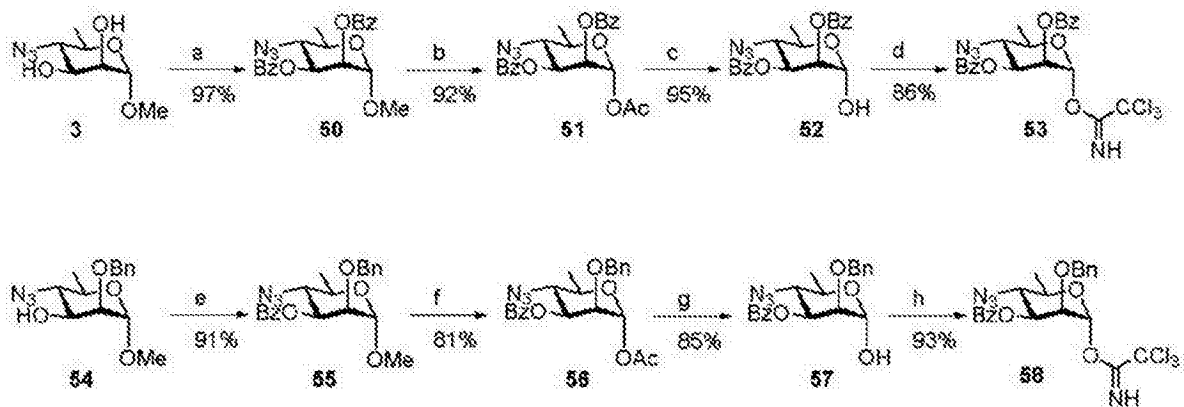


[0188]



[0189] 所述另外的化合物被合成了；六糖 48 以提供一种纯净的 A 抗原决定簇和化合物 49，其提供了一种小尺寸的低聚糖，环绕着 A 和 M 抗原决定簇。沿着所述九糖 2 的低聚糖 49，是一种通用布鲁氏杆菌抗原。它对应着布鲁氏杆菌 O- 抗原的终端六糖，所述布鲁氏杆菌 O- 抗原是由 Kubler-Kielb 和 Vinogradov 所披露的 (Carbohydr. Res. (2013) 378, 144-147)。

[0190]

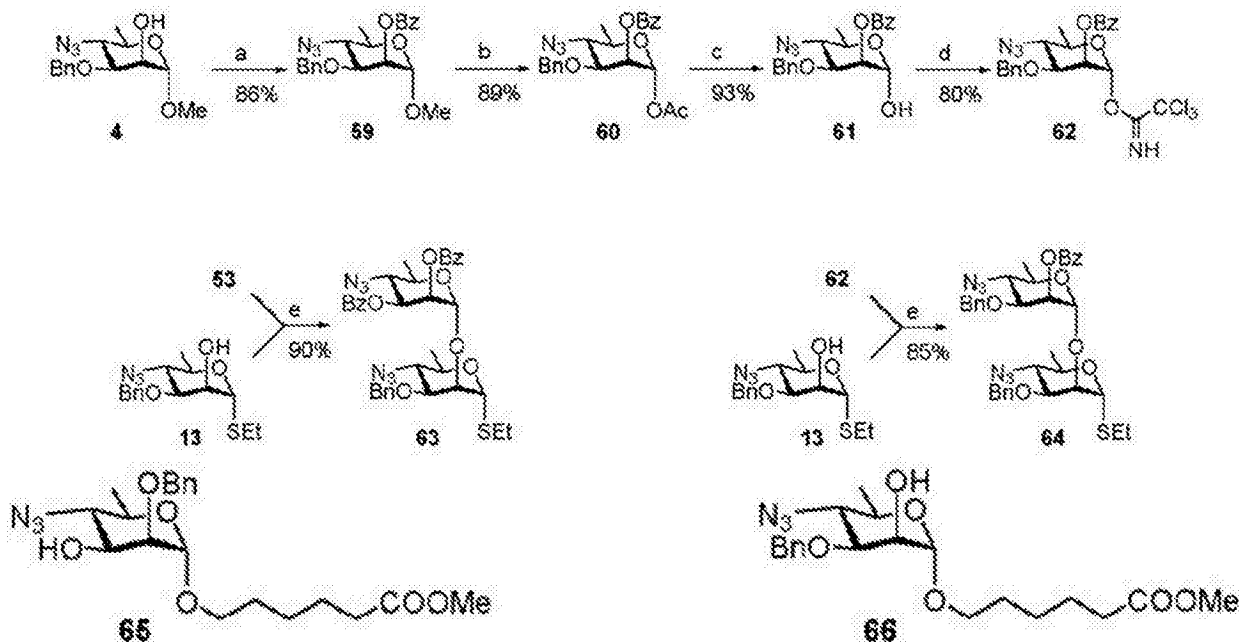


[0191] 合成路线 9 :a) BzCl, Py, rt, 10h ; b) Ac₂O, AcOH, H₂SO₄, rt, 6h ; c) NH₂NH₂. AcOH, DMF, 60 °C, 0.5h ; d) CCl₃CN, DBU, CH₂Cl₂, rt, 10min. ; e) BzCl, Py, rt, 3h ; f) Ac₂O, AcOH, H₂SO₄, rt, 3h ; g) NH₂NH₂. AcOH, DMF, 60 °C, 0.5h ; h) CCl₃CN, DBU, CH₂Cl₂, rt, 10min.

[0192] 与 1 和 2 的合成相比，其中，乙酸酯和苄醚被使用了，低聚糖 44-49 的合成使用了

苯甲酸酯和苄基醚保护基以允许 1, 2 和 1, 3 键合连接的构建。在保护基策略中的这种明显的区别从早期的合成 1 和 2 允许三氯乙酰亚胺酯供体的使用, 而非更难以制备的 N- 苄基三氯乙酰基亚氨酸酯 11, 19 和 31。用于制备 15 低聚糖 44-49 的合成子为化合物 50-66。单糖亚胺酯 53, 58 和 62 如合成路线 9 和 10 所示的方法而被合成。二糖硫代糖苷 63 和 64 由 13 的糖基化制得, 通过亚胺酯 53 和 62 (合成路线 10)。这两个 5- 甲氧羰基戊醇糖苷 65 和 66 由文献记载的方法制备 (Saksena et al. (2008) Carbohydr. Res. 343, 1693-201706 ; Saksena et al. (2005) Tetrahedron:Asymmetry 16, 187-197)。亚胺酯 62 被用于 48 和 49 的合成中。

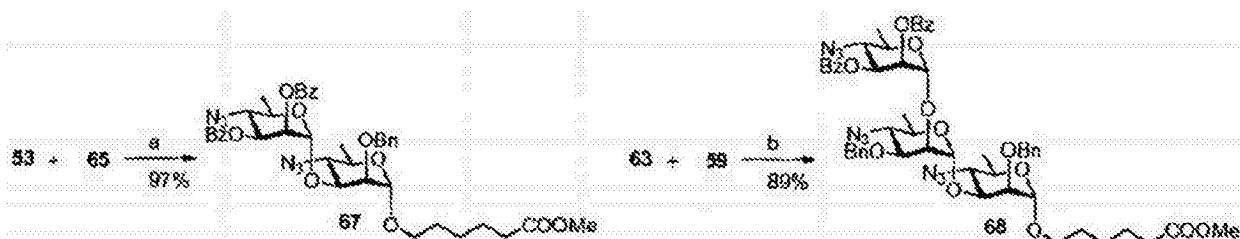
[0193]



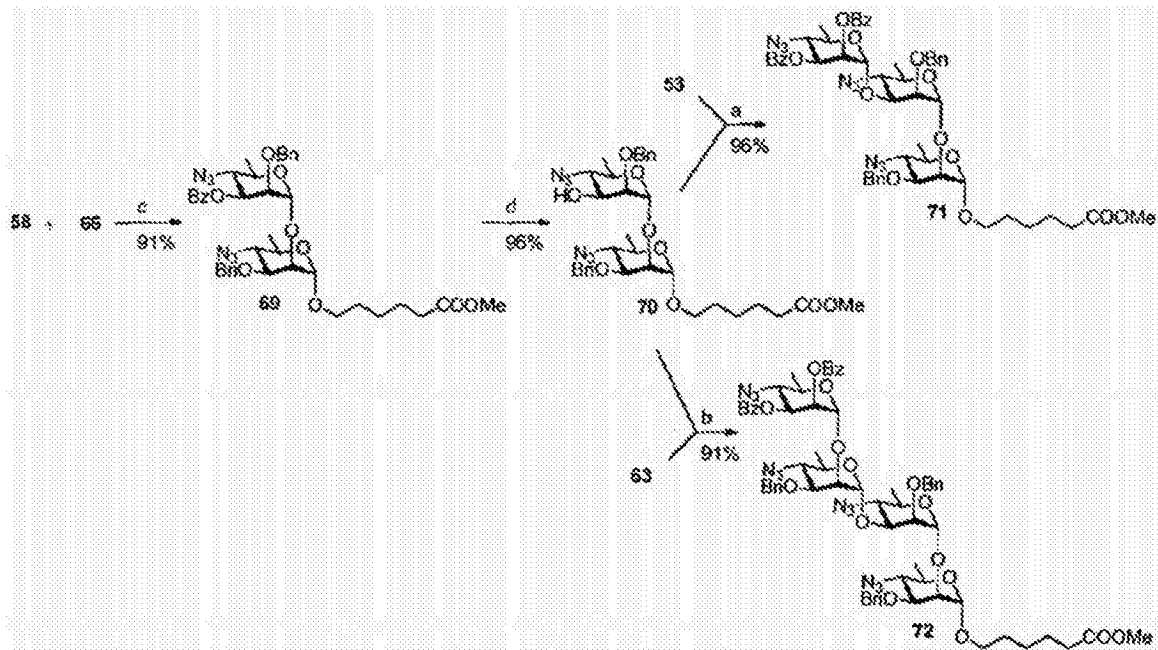
[0194] 合成路线 10 :a) BzCl, Py, rt, 3h ;b) Ac₂O, AcOH, H₂SO₄, rt, 3h ;c) NH₂NH₂. AcOH, DMF, 60°C , 0.5h ;d) CCl₃CN, DBU, CH₂Cl₂, rt, 10min. , e) TMSOTf, 3 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 1h.

[0195] 所述 1, 3 连接的二糖 67 由亚胺酯 53 与受体 65 的反应而获得。三糖 68 由二糖硫代糖苷 63 与单糖糖苷 65 反应而获得。单糖亚胺酯 58 和 66 的反应得到了 1, 2 键合连接的二糖 69。当 69 为脱 -O- 苯甲酰化时, 所导致的二糖 70 会被单糖亚胺酯 53 糖基化, 以得到具有末端 1, 3 连接的所述三糖 71。二糖 70 也提供获得四糖 72 的方法, 当其与二糖硫代糖苷 63 反应时 (合成路线 11)。

[0196]



[0197]

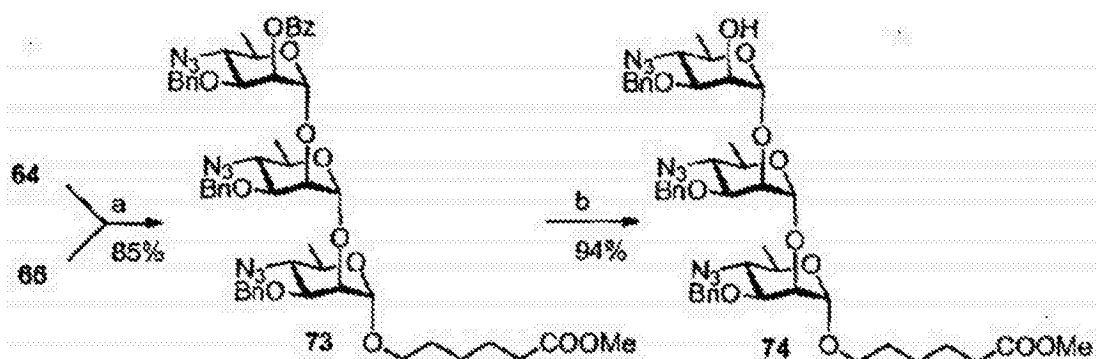


[0198] 合成路线 11 : a) TMSOTf, 3 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 1h ; b) MeOTf, 3 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 48h ; c) TMSOTf, 3 Å MS, PhMe, 95°C , 1h ; d) NaOCH₃, CH₃OH, rt, 4h。

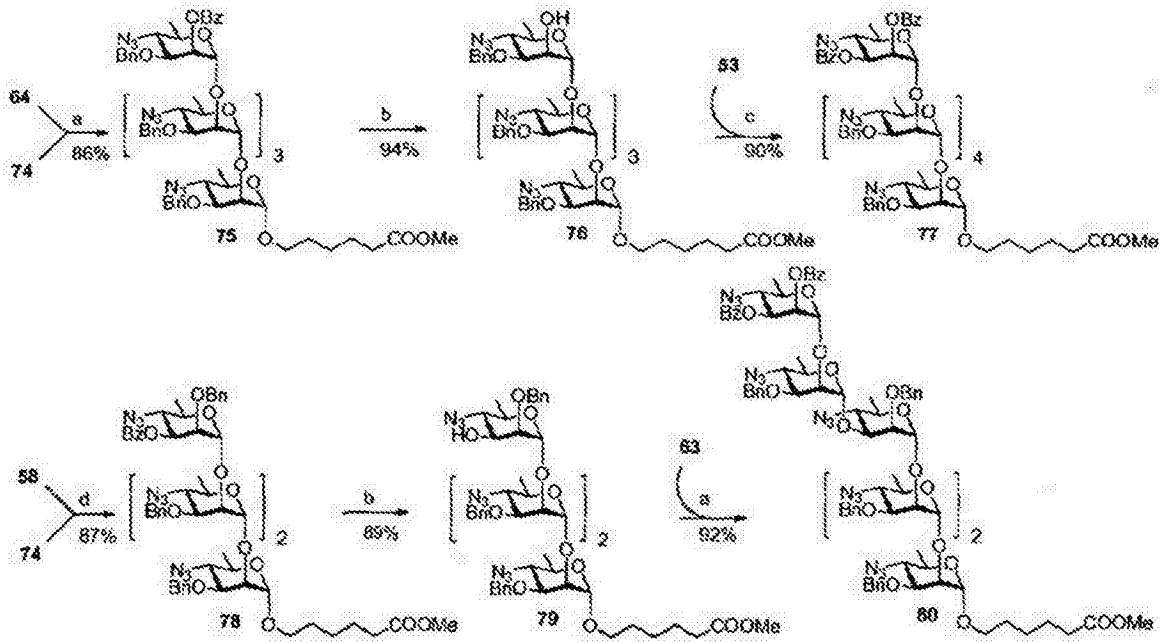
[0199] 六糖 48 和 49 分别详细阐述了单糖糖苷 66 与所述二糖硫苷 64 进行的糖基化反应,以得到所述三糖 73,其在酯交换反应后提供乙醇受体 74,所述乙醇受体 74 作为通用的三糖中间体获得两种六糖 (合成路线 12)。所述独占的 1,2-键合连接的六糖 48 由 74 的与 10 二糖硫苷 64 糖基化反应制得,以得到五糖 75。末端苯甲酸酯基团的酯交换得到了五糖醇 76,其通过与亚胺酯 53 糖基化后得到了六糖 77。由亚胺酯 58 进行的三糖醇 74 的糖基化得到了四糖 78。78 的酯转移反应之后,四糖醇 79 被设置用于引入 α 1,3 键连接。与二糖硫苷 63 的反应得到了被保护的六糖 80。

[0200] 纠正表 (依据第 91 条)

[0201]



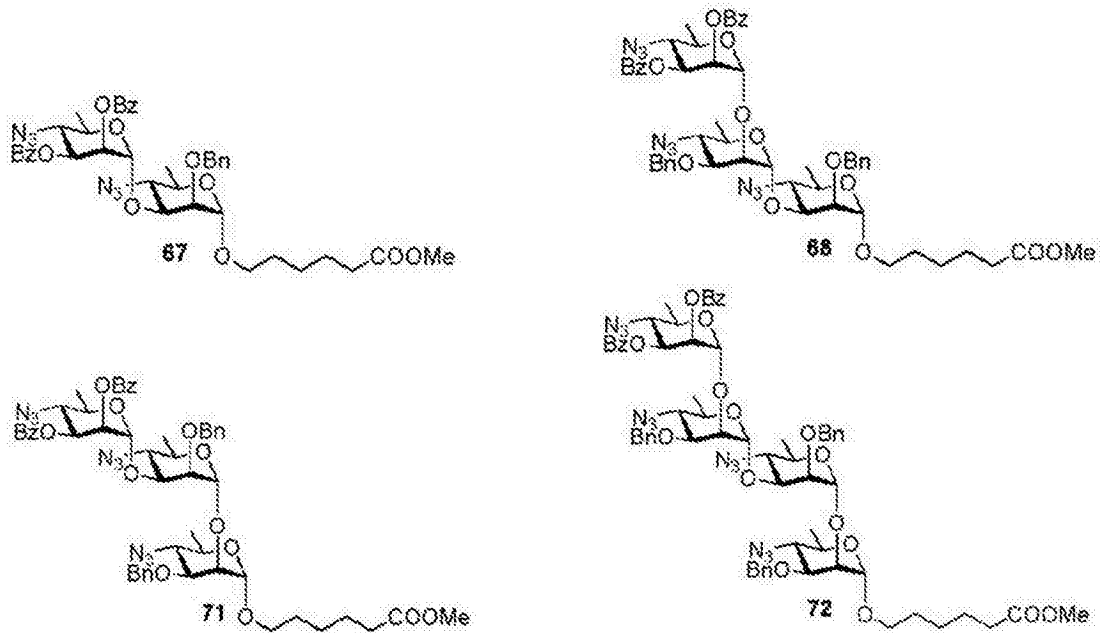
[0202]



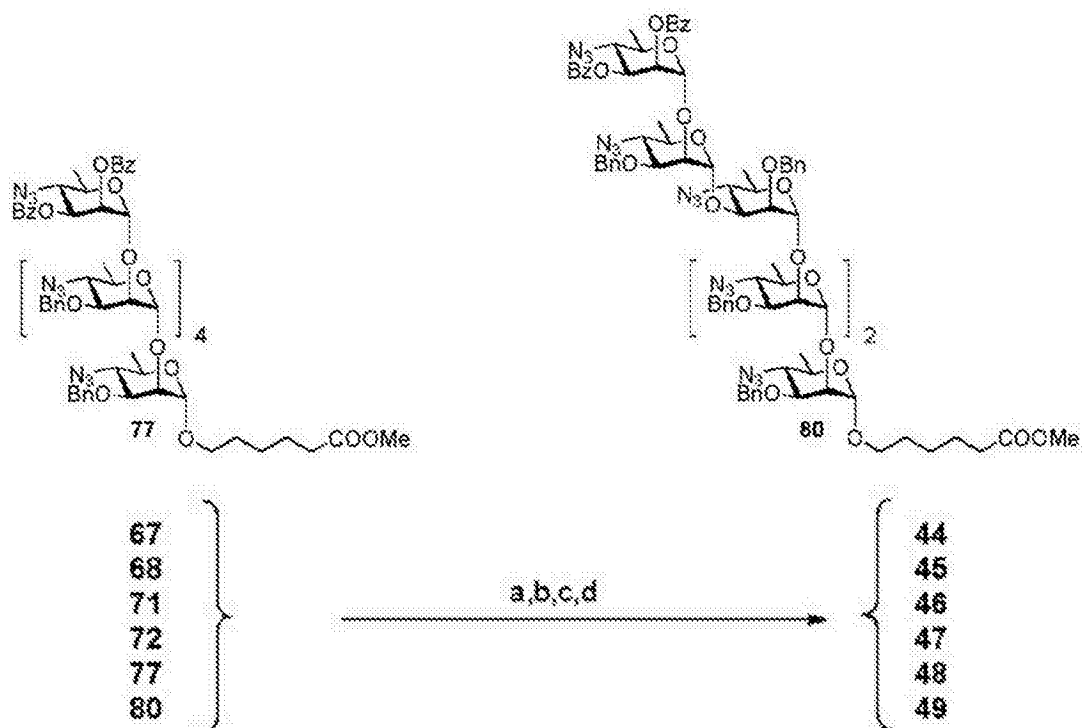
[0203] 合成路线 12 :a) MeOTf, 3 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 48h ;b) NaOCH₃, CH₃OH, rt, 4h ;c) TMSOTf, 3 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 1h ;d) TMSOTf, 3 Å MS, PhMe, 95 °C , 1h.

[0204] 纠正表 (依据第 91 条)

[0205]



[0206]

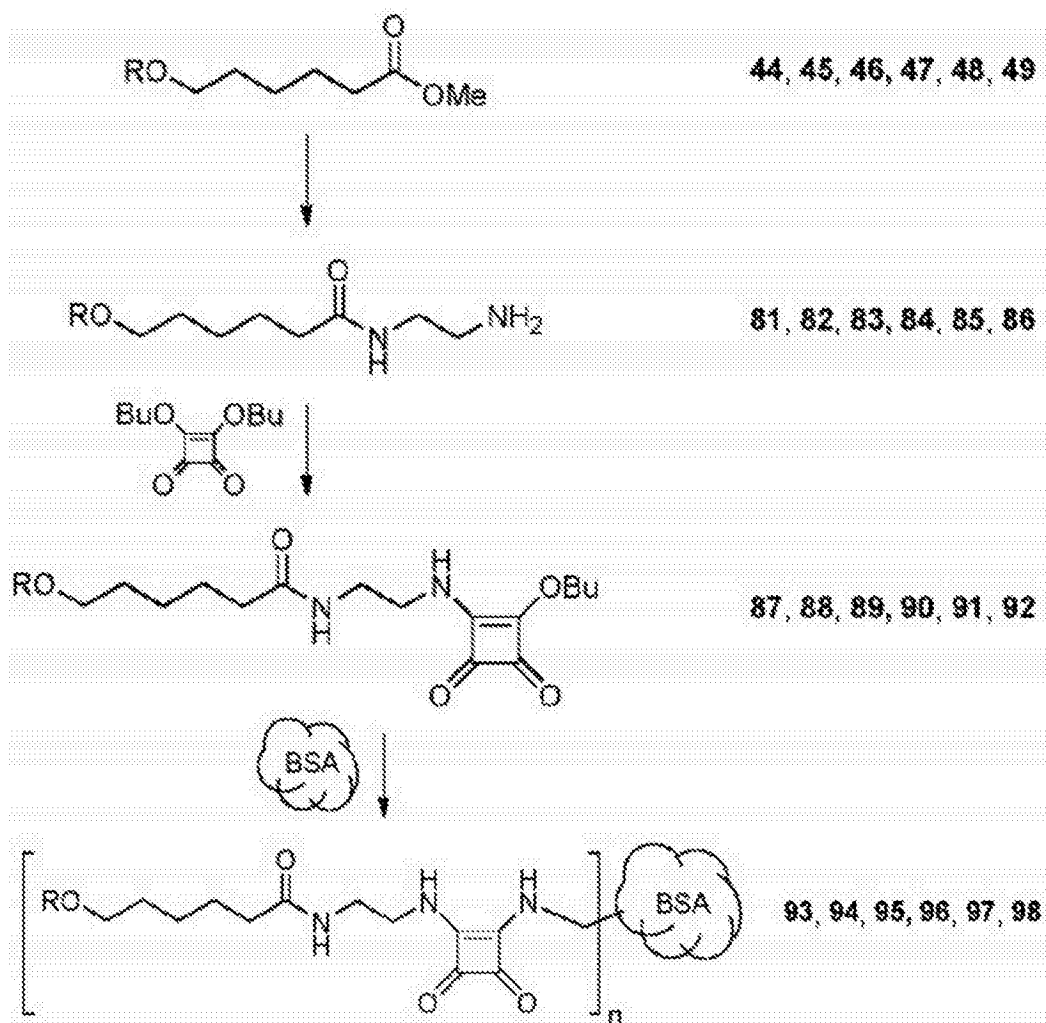


[0207] 合成路线 13 :a) NaOCH₃, CH₃OH, rt, 4h ;b) H₂S, Py/H₂O, 40°C , 16h ;c) 甲酸酐 , CH₃OH, -20°C , 3h ;d) H₂, Pd(OH)₂, CH₃OH/H₂O, rt, 16h。

[0208] 六种低聚糖 67, 68, 71, 72, 77 和 80 的脱保护采用了相同的反应条件 (合成路线 13)。这包括去除苯甲酸酯的酯交换反应, 叠氨基还原为胺基的还原反应, 由甲酸酐进行的胺的酰化反应以获得甲酰胺, 以及最后的催化加氢反应, 以获得目标低聚糖, 如 5 种甲氧羰基戊醇糖苷 44-49。

[0209] 5 种甲氧羰基戊醇糖苷 44-49 转化为抗原, 为了诊断或疫苗应用, 也出现了类似的协议, 如所述的用于五糖和九糖 (合成路线 14)。

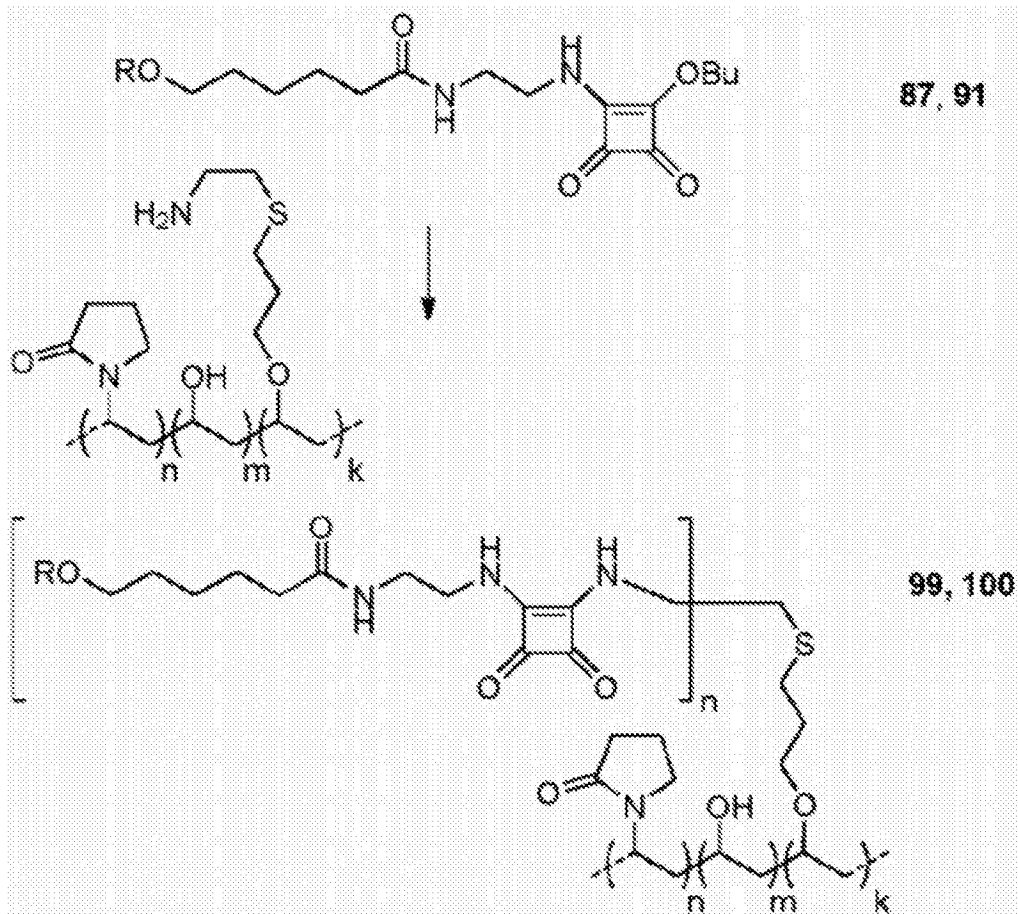
[0210]



[0211] 合成路线 14 :低聚糖 44-49 至 BSA 的活化和偶联反应,以获得糖苷偶联物 93-98。

[0212] 非蛋白聚合物胺化共聚聚维酮也被用来作为一种替代的和潜在的优异抗原用于免疫检测。代表性的偶联物是为说明二糖 44 和六糖 48(合成路线 15)。

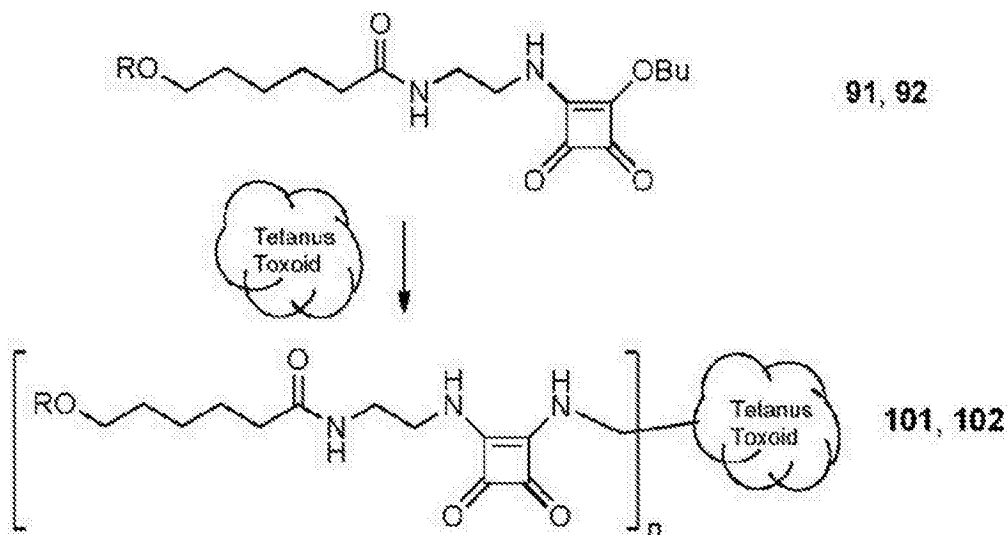
[0213]



[0214] 合成路线 15: 单糖 87 和 91 的偶联到共聚聚维酮以获得糖复合物 99 和 100。

[0215] 潜在的疫苗候选物通过偶联两种六糖 48 和 49 至单体的破伤风类毒素被合成。该方酸根半酯 91 和 92 分别偶联至破伤风类毒素, 以提供抗原 101 和 102(合成路线 16)。

[0216]



[0217] 合成路线 16: 低聚糖 91 和 92 偶联至破伤风类毒素以获得糖复合物 101 和 102。

[0218] 通用合成方法

[0219] TLC 分析在硅胶 60-F254 上进行 (Merck, Darmstadt) 并通过荧光猝灭和 / 或通过用 5% 硫酸乙醇溶液炭化进行检测。所有商购试剂作为供给。柱色谱法在硅胶 230-400 目,

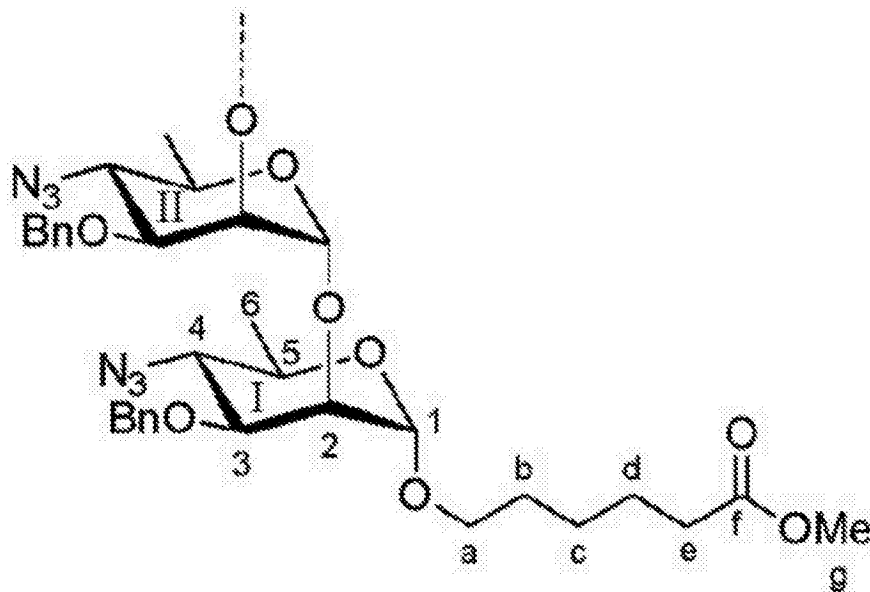
60 Å (Silicycle, Ontario) 上进行, 并使用 HPLC 品质的溶剂。分子筛被粉碎并存储在 150°C 的烘箱中, 并在使用前在真空条件下干燥火烧。有机溶液在浓缩之前用无水硫酸镁真空干燥, 在小于 40°C 下进行 (浴)。所有最终化合物通过反相色谱法纯化, 在沃特世 600 高效液相色谱系统上进行, 使用贝克曼半制备型 C-18 柱 (10x 250mm, 5 μ), 用乙腈和水作为组合洗脱剂。产品用沃特世 2487 紫外检测器被检测。

[0220] 旋光度由 Perkin-Elmer 241 旋光计测定, 其样品置于 10cm 的容器皿中, 在 $21 \pm 2^\circ\text{C}$ 测得。[α]_D 值的单位为 $10^{-1} \text{deg cm}^2 \text{g}^{-1}$, 具有 [α]_{D20} 表示温度为 20°C 而 [α]_{D21} 表示温度为 21°C。

[0221] NMR 氢谱在 500, 600 或 700MHz 的光谱仪下记录。第一级质子的化学位移 δ H 参照的是任一残留 CHCl₃ (δ H 7. 27, CDCl₃), 或 CD₂HOD (δ H 3. 30, CD₃OD) 或者是内部丙酮 (δ H 2. 225, D₂O)。NMR 碳谱在 125MHz 下记录, 而化学位移参照的是内部 CDCl₃ (δ 77. 23) 或外部丙酮 (δ 31. 07)。对于所有化合物共振的分配是由二维同核和异核的化学位移相关实验完成的。质谱分析是通过正模式电喷雾电离进行的, 在混合部门 TOF 质谱仪上, 并通过 MALDI 质谱分析用于蛋白的糖复合物, 采用芥子酸为基质。

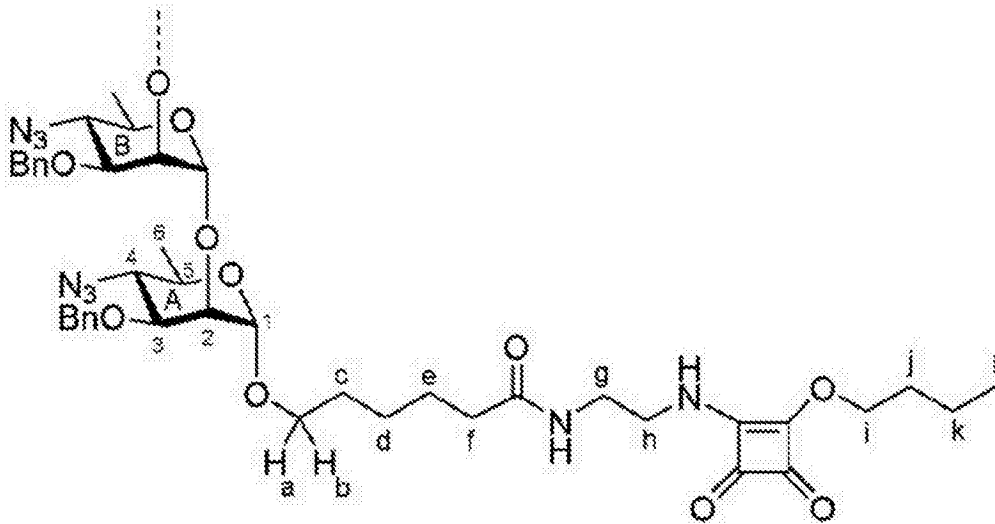
[0222] 用于化合物 4-41 的编号如下:

[0223]



[0224] 以及化合物 42-92:

[0225]



[0226] 甲基 4-叠氨基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷 (5)

[0227] 将 3 的溶液 (Bundle et al. (1988) Carbohydr. Res. 174, 239-251) (1.09g, 5.36mmol) 和 BU_2SnO (1.5g, 6mmol) 溶于甲苯 (50mL), 在 140°C 搅拌 2h。然后, 在降温之后, 溴苄 (0.7mL, 5.9mmol) 和 Bu_4NBr (1.9g, 5.9mmol) 被加入, 并将此混合物在 65°C 搅拌过夜。蒸发溶剂后, 在硅胶柱中进行纯化 (己烷 / 乙酸乙酯 8:1) 而获得纯化物 4 (1.38g, 87%)。该核磁共振参数都与文献中记载的相一致 (Boschioli et al. (2001) Curr. Op. Microbiol. 4, 58-64), ^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ 7.5-7.3 (m, 5H; H-Ar), 4.72 (d, $^3J_{1,2} = 1.7\text{Hz}$, 1H; H-1), 3.98 (dt, $^3J_{2,3} = 3.3\text{Hz}$, $^3J_{2,\text{OH}} = 1.6\text{Hz}$, 1H; H-2), 3.72 (dd, $^3J_{3,4} = 9.6\text{Hz}$, 1H; H-3), 3.36 (s, 3H; OCH₃), 2.39 (d, 1H; OH), 1.44ppm (d, 3H; H-6); ^{13}C NMR (126MHz, CDCl_3): δ 137.2, 128-129, 100.0, 78.3, 72., 67.2, 66.4, 63.9, 55.0, 18.4ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{NaO}_4[\text{M}+\text{Na}]^+$: 316.12678; 实际值: 316.12705。

[0228] 1,2-二-O-乙酰基-4-叠氨基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷 (5)

[0229] 4 的溶液 (1.03g, 5.07mmol) 在乙酸酐 / 乙酸 / 硫酸中 (50:20:0.5, 35mL) 在室温下被搅拌 1.5h, 然后倒入到冰冷的 1M 碳酸钾溶液中。将产物用二氯甲烷萃取, 并将萃取液经硫酸镁干燥。将溶剂蒸发并与甲苯共同蒸发。过硅胶色谱柱 (己烷 / 乙酸乙酯 10:1), 得到 5 作为一种端基差向异构体混合物 (1.4g, 82%, α/β 93:7)。核磁共振参数与文献记载的一致的 (Boschioli et al. (2001) Curr. Op. Microbiol. 4, 58-64): NMR (500MHz, CDCl_3): δ (α) 7.4-7.3 (m, 5H; H-Ar), 6.02 (d, $^3J_{1,2} = 2\text{Hz}$, 1H; H-1), 5.34 (dd, $^3J_{2,3} = 3.3\text{Hz}$, 1H; H-2), 2.15, 2.11 (2s, 6H; OAc), 1.34ppm (d, 3H; H-6); ^{13}C NMR (126MHz, CDCl_3): δ 169.8, 168.3, 137.0, 128-129, 91.0, 75.8, 71.8, 69.3, 63.6, 20.9, 20.8, 18.5ppm; 元素分析计算值 (%) 为 $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_6$: C 56.2, H 5.8, N 11.7; 实际值: C 56.2, H 5.7, N 11.3。

[0230] 1,2,3-三-O-乙酰基-4-叠氨基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷 (6)

[0231] 化合物 3 (1.03g, 5.07mmol) 被乙酰化具有相同的协议用于获得化合物 5。化合物 6 (1.31g, 82%) 被获得于 α/β 95:5 混合物中。该分离仅用于分析: 核磁共振参数和物理常数都与文献一致 (Bundle et al. (1988) Carbohydr. Res. 174, 239-251): $[\alpha]_{\text{D}20}(\text{a}) = +122$ ($c = 1.2$ 在 CHCl_3 中); ^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ (α) 5.98 (d, $^3J_{1,2} = 1.6\text{Hz}$, 1H; H-1), 2.15, 2.13, 2.07 (3s, 9H; OAc), 1.36ppm (d, 3H; H-6); ^{13}C NMR (126MHz, CDCl_3): δ 169.7, 169.6, 168.3, 90.6, 70.1, 69.3, 67.8, 62.1, 20.9, 20.7, 20.7, 18.4ppm;

HRMS(ESI): m/z 计算值为 $C_{12}H_{17}N_3NaO_7[M+Na]^+$: 20 338.09587; 实际值: 338.09559; 元素分析计算值(%) $C_{12}H_{17}N_3O_7$: C 45.7, H 5.4, N 13.3; 实际值: C 45.35, H 5.45, N 13.2。

[0232] 烯丙基 2,3-二-O-乙酰基-4-叠氮基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(7)

[0233] 将 6 置于二氯甲烷(4mL)溶剂中(900mg, 2.85mmol)得到溶液, 被加入 $BF_3 \cdot Et_2O$ (0.4mL, 3.24mmol)。在加入烯丙醇(0.3mL, 4.41mmol)前, 将该混合物在室温下搅拌 1h, 并随后再搅拌 2 天。一旦该反应完成, 所述混合物被饱和盐水冷却至 0°C。NaHCO₃ 溶液被加入, 该混合物被搅拌 30 分钟。产物用乙酸乙酯萃取, 将萃取液干燥(硫酸镁), 过滤, 浓缩。用柱色谱法纯化(己烷/乙酸乙酯 10:1), 得到烯丙基糖苷 7(625mg, 70%): $[\alpha]_{D20} = +103$ ($c = 1.5$ 在 $CHCl_3$ 中); 1H NMR(500MHz, $CDCl_3$): δ 5.25(dd, $^3J_{2,3} = 3.6$ Hz, $^3J_{3,4} = 10$ Hz, 1H; H-3), 5.23(dd, $^3J_{1,2} = 1.7$ Hz, 1H; H-2), 4.76(d, $^3J_{1,2} = 1.7$ Hz, 1H; H-1), 2.15, 2.08(2s, 6H; OAc), 1.37ppm(d, 3H; H-6); ^{13}C NMR(126MHz, $CDCl_3$): δ 169.9, 169.6, 133.1, 118.1, 96.5, 70.4, 69.2, 68.4, 67.0, 62.7, 20.9, 20.8, 18.3ppm; 元素分析计算值(%) $C_{13}H_{19}N_3O_6$: C 49.8, H 6.1, N 13.4, 实际值: C 49.9, H 6.3, N 13.5。

[0234] 烯丙基 4-叠氮基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(8)

[0235] 烯丙基糖苷 7(625mg, 2mmol) 溶于甲醇(20mL)中, 用 0.1M 甲醇钠溶液处理(0.3mL)。1h 后, 反应完成, 并用氢离子交换树脂中和。过滤并在真空下除去溶剂, 得到纯二醇 8(447mg, 98%): $[\alpha]_{D20} = +117$ ($c = 1.1$ 在 $CHCl_3$ 中); 1H NMR(600MHz, $CDCl_3$): δ 4.84(d, $^3J_{1,2} = 1.7$ Hz, 1H; H-1), 3.93(dd, $^3J_{2,3} = 3.4$ Hz, 1H; H-2), 1.34ppm(d, 3H; H-6); ^{13}C NMR(126MHz, $CDCl_3$): δ 133.4, 117.7, 98.5, 70.5, 70.2, 68.2, 66.8, 66.0, 18.3ppm(C-6); HRMS(ESI): m/z 计算值为 $C_9H_{15}N_3NaO_4[M+Na]^+$: 252.09548; 实际值: 252.09579。

[0236] 烯丙基 2-O-乙酰-4-叠氮基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(9)

[0237] 二醇 8(77mg, 0.34mmol) 溶于二氯甲烷(3.5mL)的溶液, 加入原乙酸三乙酯(0.6mL, 3.3mmol)和对甲苯磺酸(5mg, 0.03mmol)。将混合物在 50°C 搅拌 3 小时。当反应完成后, 所述反应液被三乙胺中和并浓缩。乙酸(80%, 8mL)被加入, 而该混合物在室温下被搅拌 30 分钟, 然后浓缩。化合物 9(91mg, 98%) 被用硅胶柱纯化(乙酸乙酯/己烷 1:10): $[\alpha]_{D20} = +78$ ($c = 1.0$ 在 $CHCl_3$ 中); 1H NMR(500MHz, $CDCl_3$): δ 5.08(dd, $^3J_{1,2} = 1.7$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.6$ Hz, 1H; H-2), 4.80(d, 1H; H-1), 2.15(s, 3H; OAc), 1.35ppm(d, 3H; H-6); ^{13}C NMR(126MHz, $CDCl_3$): δ 170.8, 133.2, 117.9, 96.5, 71.7, 69.2, 68.3, 66.9, 66.0, 21.0, 18.3ppm; 元素分析计算值为(%) $C_{11}H_{17}N_3O_5$: C 48.7, H 6.3, N 15.5; 实际值: C 48.8, H 6.2, N 15.3。

[0238] 2-O-乙酰基-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖(10)

[0239] 5(484mg, 1.33mmol) 溶于二氯甲烷(3mL)的溶液, 二甲胺(2M in THF, 1.8mL, 3.6mmol) 被逐滴加入。所述溶液随后在室温下被搅拌 2 天。蒸发溶剂后, 纯净的化合物 10(432mg) 被定量地得到: 1H NMR(500MHz, $CDCl_3$): δ 7.2-7.4(m, 5H; H-Ar), 5.30(s, 1H; H-1 β), 5.17(d, 1H; H-1 α), 2.19(s, 3H; OAc β), 2.13(s, 3H; OAc α), 1.38(d, 3H; H-6 β), 1.33ppm(d, 3H; H-6 α); ^{13}C NMR(126MHz, $CDCl_3$): δ 170.8, 170.3, 137.2, 136.8, 128-129, 92.9, 92.5, 78.5, 75.6, 71.7, 71.6, 71.2(C-5P), 68.5, 67.7, 67.0, 64.0, 63.4, 21.0, 20.9, 18.65, 18.5ppm(C-6P); 元素分析计算值为(%) $C_{15}H_{19}N_3O_5$: C 56.1, H 6.0, N 13.1; 实际值为: C 56.0, H 6.0, N 13.0。

[0240] 2-0-乙酰基-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基-N-苯基三氟乙酰基亚氨酸酯 (11)

[0241] 化合物 10 (1.04g, 3.2mmol) 被溶解于干燥的二氯甲烷 (30mL)。N-苯基三氟乙酰氯 (1.2mL, 9.6mmol) 和 CS_2CO_3 (3.2g, 9.6mmol) 被加入, 而该混合物在室温下被搅拌过夜。通过硅藻土过滤后, 化合物 11 (1.4g, 87%) 在硅胶柱中进行纯化 (己烷/乙酸乙酯 10:1), NMR (500MHz, CDCl_3): δ 7.4-6.8 (m, 10H; H-Ar), 106.2 (br s, 1H; H-1 α), 5.85 (br s, 1H; H-2 α), 5.8 (br s, 1H; H-1 β), 5.46 (br s, 1H; H-2 β), 2.2 (s, 3H; OAc β), 2.15 (s, 3H; OAc α), 1.44 (d, $^3J_{5,6} = 6.0\text{Hz}$, 3H; H-6 α), 1.33ppm (d, $^3J_{5,6} = 6.1\text{Hz}$, 3H; H-6 β); HRMS (ESI): m/z 计算值为 $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_4\text{NaO}_5[\text{M}+\text{Na}]^+$: 515.15128; 实际值: 515.15147。

[0242] 乙基 2-0-乙酰基-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)

[0243] 4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧-1-硫代- α -D-吡喃甘露糖苷 (14)

[0244] 供体 11 (3.44g, 7mmol) 和受体 13 (通过 12 获得自 5) (Peters&Bundle (1989) Can. J. Chem. 67, 491-496) (1.75g, 5.4mmol) 被溶解在无水二氯甲烷 (50mL) 中, 而 TMSOTf (0.1mL, 0.55mmol) 被在 0 $^\circ\text{C}$ 下加入。在 0 $^\circ\text{C}$ 搅拌下, 该反应在 30 分钟后完成, 然后在室温下用几滴三乙胺淬灭 30 分钟。二糖 14 (3.19g, 94%) 在经过快速色谱分离柱 (甲苯/乙酸乙酯 1:0, 然后 9:1) 后被纯化。核磁共振参数和物理常数与文献记载的一致 (Crump et al. (2003) Emerg. Infect. Dis. 9, 539-544): $[\alpha]_{\text{D}20} = +129$ (c = 1.2 在 CHCl_3 中); ^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ 7.4-7.2 (m, 10H; H-Ar), 5.39 (dd, $^3J_{1,2} = 1.6\text{Hz}$, $^3J_{2,3} = 3.2\text{Hz}$, 1H; H-2 II), 5.16 (d, $^3J_{1,2} = 1.1\text{Hz}$, 1H; H-1 I), 4.81 (d, 1H; H-1 II), 3.89 (dd, $^3J_{2,3} = 2.9\text{Hz}$, 1H; H-2 I), 2.53 (2qd, $^2J = 13\text{Hz}$, $^3J = 7.4\text{Hz}$, 2H; S- CH_2 - CH_3), 2.10 (s, 3H; Ac), 1.30 (d, 3H; H-6 II), 1.29 (d, 3H; H-6 I), 1.25ppm (t, 3H; S- CH_2 - CH_3); ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3): δ 170.0, 137.5, 137.2, 129-128, 99.7, 83.4, 78.2, 76.4, 75.5, 72.3, 71.7, 67.8, 67.7, 67.4, 64.5, 64.0, 25.7, 21.1, 18.6, 18.6, 15.0ppm; 元素分析计算值 (%) $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}$: C 57.5, H 6.1, N 13.4, S 5.1; 实际值: C 57.5, H 6.2, N 13.2, S 5.2。

[0245] 烯丙基 2-0-乙酰基-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 3)-2-0-乙酰基-4-叠氮基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷 (15)

[0246] 供体 14 (188mg, 0.3mmol) 和受体 9 (54mg, 0.2mmol) 被溶解于干燥的二氯甲烷 (6mL) 中, 过分子筛, 然后 NIS (72mg, 0.32mmol) 和三氟甲磺酸 (9 μL , 0.1mmol) 在 -30 $^\circ\text{C}$ 下被加入。该反应在 -30 $^\circ\text{C}$ 下搅拌 5 小时, 接着经硅藻土过滤。所述混合物用硫代硫酸钠和碳酸氢钾洗涤。三糖 15 (114mg, 65%) 经快速色谱法后获得纯化 (己烷/乙酸乙酯 10:1): $[\alpha]_{\text{D}20} = +64$ (c = 1.3 在 CHCl_3 中); ^1H NMR (600MHz, CDCl_3): δ 7.2-7.4 (m, 10H; H-Ar), 5.05 (dd, $^3J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, $^3J_{2,3} = 3.5\text{Hz}$, 1H; H-2 I), 4.97 (d, $^3J_{1,2} = 1.9\text{Hz}$, 1H; H-1 II), 4.9 (d, 1H; H-1 III), 4.76 (d, 1H; H-1 I), 4.01 (dd, $^3J_{2,3} = 3.0\text{Hz}$, 1H; H-2 II), 2.10, 2.09 (2s, 6H; OAc), 1.33 (d, $^3J_{5,6} = 6.0\text{Hz}$, 3H; H-6 I), 1.32 (d, $^3J_{5,6} = 6.6\text{Hz}$, 3H; H-6 III), 1.26ppm (d, 3H; H-6 II); ^{13}C NMR (126MHz, CDCl_3): δ 170.0, 169.8, 137.5, 137.1, 133.2, 127-129, 15 117.9, 101.0, 99.4, 96.2, 77.2, 77.1, 75.4, 73.3, 71.8, 71.6, 70.9, 68.5, 68.2, 67.8, 67.1, 66.9, 64.5, 63.8, 63.7, 21.0, 20.9, 18.5, 18.4ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 $\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{N}_9\text{NaO}_{12}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 858.33929; 实际值: 858.33904。

[0247] 2-O-乙酰基-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)2-O-乙酰基-4-叠氮基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖(16)

[0248] 烯丙基糖苷 15(76mg, 91 μ mol) 被溶解于 AcONa 的 AcOH/H₂O 9:1 溶液(0.2M, 2mL) 中, 并加入 PdCl₂(32mg, 180 μ mol)。所述混合物室温下搅拌过夜, 并用碳酸氢钠中和。所述产品用二氯甲烷萃取, 并用水洗。硅胶色谱(己烷/乙酸乙酯 6:1) 得到了半缩醛 16(54mg, 73%) : ¹H NMR(600MHz, CDCl₃): δ 7.2-7.4(m, 10H, H-Ar), 5.4(dd, ³J_{1,2}=1.9Hz, ³J_{2,3}=3.2Hz, 1H; H-2^{II}), 5.14(br s, 1H; H-1^I), 5.08(dd, ³J_{1,2}=1.9Hz, ³J_{2,3}=3.3Hz, 1H; H-2^I), 4.98(d, Vi, 2 = 2.0Hz, 1H; H-1^{II}), 4.9(d, 1H; H-1m), 2.11, 2.09(2s, 6H; OAc), 1.33(d, 3H; H-6^I), 1.32(d, 3H; H-6^{II}), 1.26ppm(d, 3H; H-6^{II}); ¹³C NMR(126MHz, CDCl₃): δ 170.1, 169.8, 137.5, 137.1, 127-129, 101.0, 99.4, 91.8, 77.2, 76.6, 75.4, 73.4, 71.8, 71.6, 71.2, 68.2, 67.8, 67.2, 66.9, 64.5, 63.8, 63.7, 21.0, 20.9, 18.5, 18.5, 18.4ppm; HRMS(ESI): m/z 计算值为 C₃₆H₄₅N₉NaO₁₂[M+Na]⁺: 818.30799; 实际值: 818.30635。

[0249] 2-O-乙酰基-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)2-O-乙酰基-4-叠氮基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基-N-苯基三氟乙酰亚胺(17)

[0250] 化合物 17(147mg, 79%) 是由三糖 16(153mg, 192 μ mol) 制备的, 如前所述用于 11, 并且作为一种混合物而被获得, α/β 3:2: ¹H NMR(600MHz, CDCl₃): δ (α) 7.4-6.8(m, 15H; H-Ar), 6.12(br s, 1H; H-1^I), 5.63(br s, 1H; H-2^I), 5.39(dd, ³J_{1,2}=1.9Hz, ³J_{2,3}=3.1Hz, 1H; H-2^{II}), 4.97(br s, 1H; H-1^{II}), 4.89(d, 1H; H-1^{III}), 4.0(br s, 1H; H-2^{II}), 2.16, 2.08(2s, 6H; OAc), 1.46(d, ³J_{5,6}=6.2Hz, 3H; H-6^I), 1.29(d, ³J_{5,6}=6.2Hz, 3H; H-6^{II}), 1.26ppm(d, ³J_{5,6}=6.2Hz, 3H; H-6^{II}); HRMS(ESI): m/z 计算值为 C₄₄H₄₉F₃N₁₀NaO₁₂[M+Na]⁺: 989.33757; 实际值: 989.33761。

[0251] 2-O-乙酰基-4-叠氮基的-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖(18)

[0252] NIS(90mg, 0.44mmol) 和水(100 μ L) 在 0 $^{\circ}$ C 下被加入到二糖硫苷 14(210mg, 0.33mmol) 的丙酮溶液中, 并在 0 $^{\circ}$ C 下搅拌 30 分钟, 并随后在室温下搅拌过夜。完成后, 碳酸氢钠固体被加入, 与丙酮一起蒸除。二氯甲烷/水萃取液随后用硅胶柱纯化, 得到所述半缩醛 18(144mg, 76%) : ¹H NMR(600MHz, CDCl₃): δ (α) 7.4-7.2(m, 10H; H-Ar), 5.42(dd, ³J_{1,2}=2Hz, ³J_{2,3}=3.2Hz, 1H; H-2^{II}), 5.12(dd, ³J_{1,2}=1.8Hz, ³J_{1,OH}=3.5Hz, 1H; H-1^I), 4.87(d, 1H; H-1^{II}), 3.89(dd, ³J_{2,3}=3Hz, 1H; H-2^I), 2.10(s, 3H; Ac), 1.30ppm(2d, 6H; H-6^I, H-6^{II}); ¹³C NMR(126MHz, CDCl₃): δ (α) 169.9, 137.7, 137.2, 129-127, 99.5, 93.6, 77.3, 75.5, 74.1, 72.3, 71.7, 67.7, 67.4, 67.3, 64.3, 64.0, 21.1, 18.8, 18.7ppm; 元素分析计算值(%) C₂₈H₃₄N₆O₈: C 57.7, H 5.9, N 14.4; 实际值: C 57.9, H 6.0, N 14.0。

[0253] 2-O-乙酰基-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖的-N-苯基三氟乙酰亚胺(19)

[0254] 二糖 18(538mg, 0.92mmol) 被溶解于干燥的二氯甲烷(9mL) 中, N-苯基三氟亚氨基氯化物(350 μ L, 2.8mmol) 与 CS₂CO₃(0.9g, 2.8mmol) 被加入, 并且所述混合物在室温下搅

拌过夜。在溶剂在硅胶（甲苯 / 乙酸乙酯 1:0 至 10:2）上的色谱蒸发后，获得纯化的亚胺酯 19 (623mg, 90%) : $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) : δ (α) 7.4–6.7 (m, 15H ;H-Ar), 6.05 (br s, 1H ;H-1¹), 5.41 (br s, 1H ;H-2¹¹), 4.86 (br s, 1H ;H-1¹¹), 3.85, (br s, 1H ;H-2¹), 2.10 (s, 3H ;Ac), 1.33 (d, $^3J_{5,6} = 6.2\text{Hz}$, 3H ;H-6¹), 1.18 ppm (d, $^3J_{5,6} = 6.2\text{Hz}$, 3H ;H-6¹¹) ; $^{19}\text{F NMR}$ (469MHz, CDCl_3) : δ (α) -75.7 ppm ; $^{13}\text{C NMR}$ (125MHz, CDCl_3) : δ 170.0, 143.3, 137.3, 137.2, 129–128, 124.7, 119.5, 99.5, 95.7, 77.1, 75.5, 72.9, 72.2, 71.8, 70.3, 68.0, 67.2, 63.9, 63.5, 21.1, 18.7, 18.5 ppm ; HRMS (ESI) : m/z 计算值为 $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{F}_3\text{KN}_7\text{O}_8$ [M+K]⁺ : 792.2366 ; 实际值 : 792.2363。

[0255] 5-甲氧羰基戊基醇 2-O-乙酰基-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二去氧- α -D-吡喃甘露糖基-(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖 (21)

[0256] 供体 19 (110mg, 0.15mmol) 和 5-甲氧羰基戊醇 20 (El Fangour et al. (2004) J. Org. Chem. 69, 2498–2503) (30mg, 0.2mmol) 在甲苯 (7ml) 溶液中，使用一些分子筛被加热到 100 $^{\circ}\text{C}$ ，并加入 TMSOTf (2 μL , 10 μmol)。在此温度下加热 1 小时后，该反应用吡啶淬灭，并将该混合物过滤。在硅胶层析色谱柱（洗脱剂：乙酸乙酯 / 己烷 1/6）上纯化，化合物 21 (59mg, 53%) 被获得了， $[\alpha]_{\text{D}20} = +78$ (c = 1.0 在 CHCl_3 中) ; $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) : δ 7.2–7.4 (m, 10H ;H-Ar), 5.41 (dd, 1H, $^3J_{1,2} = 1.9\text{Hz}$, $^3J_{2,3} = 3.2\text{Hz}$, H-2¹¹), 4.86 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, H-1¹¹), 4.66 (d, $^3J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, 1H ;H-1¹), 3.84 (dd, $^3J_{1,2} = 2\text{Hz}$, $^3J_{2,3} = 2.8\text{Hz}$, 1H ;H-2¹), 2.33 (t, $^3J_{d,e} = 7.5\text{Hz}$, 2H ;H-e), 2.09 (s, 3H ;Ac), 1.65 (quint, $^3J_{c,d} = ^3J_{d,e} = 7.6\text{Hz}$, 2H ;H-d), 1.57 (m, 2H ;H-b), 1.36 (m, 2H ;H-c), 1.31 (d, $^3J_{5,6} = 6\text{Hz}$, 3H ;H-6¹¹), 1.29 ppm (d, $^3J_{5,6} = 6\text{Hz}$, 3H ;H-6¹) ; $^{13}\text{C NMR}$ (125MHz, CDCl_3) : δ 174.1, 169.9, 137.7, 137.2, 129–128, 20 99.5, 98.7, 77.9, 75.5, 74.1, 72.2, 71.7, 67.7, 67.7, 67.4, 67.2, 64.3, 64.0, 51.6, 34.1, 29.2, 25.8, 24.8, 21.1, 18.7, 18.6 ppm ; 元素分析计算值为 (%) $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_{10}$: C 59.1, H 6.5, N 11.8 ; 实际值为 : C 59.0, H 6.6, N 11.4。

[0257] 5-甲氧羰基戊基醇 4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二去氧- α -D-吡喃甘露糖基-(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖 (22)

[0258] 在甲醇 (3ml) 中的化合物 21 (70mg, 98 μmol) 用 0.1M 的甲醇钠溶液 (0.1mL) 处理。1 小时后，反应完成，并用氢离子交换树脂中和。过滤，并在真空下去除溶剂，得到定量的纯净受体 22 (65mg) : $[\alpha]_{\text{D}20} = +90$ (c = 1.7 在 CHCl_3 中) ; $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) : δ 7.3–7.4 (m, 10H ;H-Ar), 4.94 (d, $^3J_{1,2} = 1.7\text{Hz}$, 1H ;H-1¹¹), 4.67 (d, $^3J_{1,2} = 2.1\text{Hz}$, 1H ;H-1¹), 3.99 (dd, $^3J_{2,3} = 3.1\text{Hz}$, 1H ;H-2¹¹), 3.84 (dd, $^3J_{2,3} = 3.0\text{Hz}$, 1H ;H-2¹), 3.35 (dt, $^2J = 9.7\text{Hz}$, $^3J_{a,b} = 6.4\text{Hz}$, 1H ;H-a), 2.33 (t, $^3J_{d,e} = 7.5\text{Hz}$, 2H ;H-e), 1.65 (quint, $^3J_{c,d} = 7.6\text{Hz}$, 2H ;H-d), 1.57 (m, 2H ;H-b), 1.36 (m, 2H ;H-c), 1.30 (d, $^3J_{5,6} = 6.2\text{Hz}$, 3H ;H-6¹¹), 1.30 ppm (d, 3H ;H-6¹) ; $^{13}\text{C NMR}$ (125MHz, CDCl_3) : δ 174.1, 137.6, 137.3, 129–128, 101.0, 98.9, 78.0, 77.8, 74.1, 72.3, 72.2, 67.7, 67.4, 67.3, 67.2, 64.5, 64.0, 51.6, 34.1, 29.2, 25.8, 24.8, 18.7, 18.6 ppm ; 元素分析计算值为 (%) $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_9$: C 59.3, H 6.6, N 12.6 ; 实际值 : C 59.2, H 6.45, N 12.2。

[0259] 5-甲氧羰基戊基 2-O-乙酰基-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二去氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 3)-2-O-乙酰基-4-叠氮基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二

脱氧- α -D-吡喃甘露糖基-(1 \rightarrow 2)-4-叠氨基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖(23)

[0260] 所述三糖亚胺酯 17 (45mg, 47 μ mol) 和二糖醇 22 (17mg, 25 μ mol) 溶解于二氯甲烷 (1mL) 并将 TMSOTf (1 μ L, 5 μ mol) 在 0 $^{\circ}$ C 下加入。所述混合物在 0 $^{\circ}$ C 下搅拌 30 分钟, 并在室温下搅拌 1 小时, 在用一滴吡啶淬灭之前。在硅胶柱 (洗脱剂: 乙酸乙酯 / 己烷 1/10) 上纯化, 得到纯的无糖 23 (25mg, 68%) : $[\alpha]_{D20} = +80$ (c = 1.0 在 CHCl_3 中) ; $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) : δ 7.2-7.4 (m, 20H ; H-Ar), 5.41 (dd, $^3J_{1,2} = 1.7\text{Hz}$, $^3J_{2,3} = 3.2\text{Hz}$, 1H ; H-2 $^{\text{V}}$), 5.13 (dd, $^3J_{1,2} = 1.9\text{Hz}$, $^3J_{2,3} = 3.2\text{Hz}$, 1H ; H-2 $^{\text{II}}$), 5.00 (d, $^3J_{1,2} = 1.7\text{Hz}$, 1H ; H-1 $^{\text{II}}$), 4.95 (d, $^3J_{1,2} = 1.5\text{Hz}$, 1H ; H-1 $^{\text{IV}}$), 4.90 (d, 1H ; H-1 $^{\text{V}}$), 4.82 (d, 1H ; H-1 $^{\text{III}}$), 4.61 (br s, 1H ; H-1 $^{\text{I}}$), 3.98 (dd, $^3J_{2,3} = 2.9\text{Hz}$, 1H ; H-2 $^{\text{II}}$), 3.84 (dd, $^3J_{2,3} = 2.3\text{Hz}$, 1H ; H-2 $^{\text{IV}}$), 3.81 (dd, $^3J_{2,3} = 2.3\text{Hz}$, 1H ; H-2 $^{\text{I}}$), 3.68 (s, 3H ; H-g), 3.58 (dt, $^2J = 9.7\text{Hz}$, $^3J_{a,b} = 6.6\text{Hz}$, 1H ; H-a), 3.34 (dt, $^3J_{a,b} = 6.4\text{Hz}$, 1H ; H-a), 2.32 (t, $^3J_{d,e} = 7.5\text{Hz}$, 2H ; H-e), 2.1 (s, 6H ; Ac), 1.65 (quint, $^3J_{c,d} = 7.6\text{Hz}$, 2H ; H-d), 1.55 (m, 2H ; H-b), 1.34 (m, 2H ; H-c), 1.30 (d, 3H ; H-6 $^{\text{V}}$), 1.29 (d, 3H ; H-6 $^{\text{IV}}$), 1.28 (d, 3H ; H-6 $^{\text{I}}$), 1.25 (d, 3H ; H-6 $^{\text{II}}$), 1.18 ppm (d, 3H ; H-6 $^{\text{III}}$) ; $^{13}\text{C NMR}$ (125MHz, 25CDCl_3) : δ 174.1, 169.9, 169.6, 137.7, 137.5, 137.5, 137.2, 129-128, 100.8, 100.3, 99.6, 98.8, 98.8, 77.8, 77.4, 76.8, 76.1, 75.5, 74.3, 73.9, 73.7, 72.3, 72.2, 72.0, 71.8, 70.6, 67.6, 68.4, 67.9, 67.9, 67.8, 67.3, 67.2, 64.6, 64.6, 64.2, 64.0, 63.9, 51.7, 34.1, 29.2, 25.8, 24.8, 21.1, 21.0, 18.8, 18.7, 18.6, 18.5, 18.4 ppm ; HRMS (ESI) : m/z 计算值为 $\text{C}_{69}\text{H}_{87}\text{N}_{15}\text{NaO}_{20}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1468.6144 ; 实际值 : 1468.6140。

[0261] 5-甲氧基羰基戊基-4-叠氨基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基-(1 \rightarrow 2)-4-叠氨基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基-(1 \rightarrow 3)-4-叠氨基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基-(1 \rightarrow 2)-4-叠氨基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基-(1 \rightarrow 2)-4-叠氨基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖(24)

[0262] 甲醇 (3mL) 中的五糖 23 (82mg, 57 μ mol), 用 0.1M 的甲醇钠溶液 (0.1mL) 处理。所述反应在室温下搅拌 1 小时, 接着用氢离子交换树脂中和。过滤, 蒸发溶剂并柱层析 (洗脱剂: 乙酸乙酯 / 甲苯 1:6), 得到了纯净的化合物 24 (67mg, 86%) : $[\alpha]_{D20} = +80$ (c = 1.1 在 CHCl_3 中) ; $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) : δ 7.2-7.4 (m, 20H ; H-Ar), 5.04 (d, $^3J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, 1H ; H-1 $^{\text{IV}}$), 4.98 (d, $^3J_{1,2} = 1.7\text{Hz}$, 1H ; H-1 $^{\text{II}}$), 4.95 (d, $^3J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, 1H ; H-1 $^{\text{V}}$), 4.86 (d, $^3J_{1,2} = 1.7\text{Hz}$, 1H ; H-1 $^{\text{III}}$), 4.62 (br s, 1H ; H-1 $^{\text{I}}$), 4.06 (dd, $^3J_{2,3} = 2.9\text{Hz}$, 1H ; H-2 $^{\text{IV}}$), 3.99 (dd, $^3J_{2,3} = 3.1\text{Hz}$, 1H ; H-2 $^{\text{II}}$), 3.94 (dd, $^3J_{2,3} = 2.9\text{Hz}$, 1H ; H-2 $^{\text{V}}$), 3.93 (dd, $^3J_{2,3} = 3.1\text{Hz}$, 1H ; H-2 $^{\text{III}}$), 3.83 (app. t, $^3J_{1,2} = ^3J_{2,3} = 2.9\text{Hz}$, 1H ; H-2 $^{\text{I}}$), 3.68 (s, 3H ; H-g), 3.34 (dt, $^3J_{a,b} = 6.4\text{Hz}$, 1H ; H-a), 3.24 (t, 1H ; H-4 $^{\text{I}}$), 2.32 (t, $^3J_{d,e} = 7.5\text{Hz}$, 2H ; H-e), 1.65 (quint, $^3J_{c,d} = 7.6\text{Hz}$, 2H ; H-d), 1.56 (m, 2H ; H-b), 1.34 (m, 2H ; H-c), 1.32 (d, 3H ; H-6 $^{\text{II}}$), 1.29 (d, 6H ; H-6 $^{\text{IV}}$, H-6 $^{\text{V}}$), 1.29 (d, 3H ; H-6 $^{\text{I}}$), 1.17 ppm (d, 3H ; H-6 $^{\text{III}}$) ; $^{13}\text{C NMR}$ (125MHz, CDCl_3) : δ 174.1, 137.5, 137.5, 137.4, 173.3, 129-128, 101.1, 100.8, 100.7, 100.5, 98.8, 79.0, 77.9, 77.8, 77.8, 77.3, 73.8, 73.5, 73.4, 72.4, 73.4, 72.3, 72.3, 69.6, 67.7, 68.4, 67.9, 67.6, 67.6, 67.3, 67.3, 64.6, 20 64.4, 64.0, 63.9, 63.9, 51.7, 34.1, 29.2, 25.8, 24.8, 18.7, 18.7, 18.7, 18.5, 18.4 ppm ; HRMS (ESI) : m/z 计算值为 $\text{C}_{65}\text{H}_{83}\text{N}_{15}\text{NaO}_{18}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1384.5933 ; 实际值 : 1384.5926。

[0263] 5-甲氧基羰基戊基 4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 3)4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖 (1)

[0264] 五糖 24 的溶液 (67mg, 49 μ mol) 在一种吡啶 / 三乙胺 1:1 的混合物 (6mL) 中, 用硫化氢饱和 1 小时, 随后并将该介质在室温下搅拌 24 小时。所述溶剂与甲苯共蒸, 且粗产品的质谱仅显示有一个峰对应于化合物 25, 并且没有不完全还原产生的产品: HRMS (ESI): m/z 计算值为 $C_{65}H_{94}N_5O_{18}[M+H]^+$: 1232.6588; 实际值: 1232.6577。此粗产品被直接用于甲酰化反应。

[0265] 化合物 25 被溶解于甲醇 (5mL) 中, 并向其中加入乙酸酐 / 甲酸 2:1 (0.5mL) 的溶液。所述混合物在室温下搅拌过夜。所述溶剂被蒸干, 且五糖 26 (43mg, 两步反应收率 63%) 通过色谱柱层析纯化 (洗脱剂: 甲醇 / 二氯甲烷 1:10): HRMS (ESI): m/z 计算值为 $C_{70}H_{93}N_5NaO_{23}[M+Na]^+$: 1394.6154; 实际值: 1394.6151。

[0266] 化合物 26 (43mg, 31 μ mol) 的乙酸 (8mL) 溶液, 在室温下在氢气气氛中与钯炭共同搅拌过夜。过滤和浓缩之后, 五糖 1 (17mg, 54%) 在反相 HPLC 柱 (MeCN/H₂O 15:85) 中进行纯化: ¹H NMR (600MHz, D₂O): δ 8.21-8.19 (Z) 和 8.02-8.00 (E) (m, 5H; NCHO), 5.20-4.90 (m, 5H; 5xH-1), 3.72-3.66 (m, 4H, H-a, H-g), 3.56-3.50 (m, 1H; H-a), 2.40 (t, ³J_{d,e} = 7.4Hz, 2H; H-e), 1.65-1.56 (m, 4H; H-b, H-d), 1.41-1.32 (m, 2H; H-c), 1.30-1.18ppm (m, 15H; 5x H-6); HRMS (ESI): m/z 计算值为 $C_{42}H_{69}N_5NaO_{23}[M+Na]^+$: 1034.4276; 实际值: 1034.4275。

[0267] 乙基 4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧-1-硫- α -D-吡喃甘露糖苷 (27)

[0268] 将甲醇 (10mL) 中的二糖 14 (570mg, 0.91mmol) 用 0.1M 的甲醇钠溶液 (0.3mL) 处理。所述反应在室温下搅拌 2 小时, 然后用氢离子交换树脂中和。过滤, 蒸干溶剂并进行柱层析 (洗脱剂: 乙酸乙酯 / 己烷 1:4), 得到纯的醇 27 (433mg, 81 %): $[\alpha]_{D20} = +175$ (c = 1.0 在 CHCl₃ 中); ¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ 7.5-7.3 (m, 10H; H-Ar), 5.18 (d, ³J_{1,2} = 1.4Hz, 1H; H-1^I), 4.91 (d, ³J_{1,2} = 1.5Hz, 1H; H-1^{II}), 3.99 (ddd, ³J_{2,3} = 3.2Hz, ³J_{2,OH} = 1.6Hz, 1H; H-2^{II}), 3.96 (dd, ³J_{2,3} = 3Hz, 1H; H-2^I), 2.61 (dq, ³J = 7.4Hz, ²J = 12.9Hz, 1H; S-CH₂), 2.55 (dq, ³J = 7.5Hz, 1H; S-CH₂), 1.30 (d, 6H; H-6^I, H-6^{II}), 1.27ppm (t, 3H; S-CH₂-CH₃); ¹³C NMR (126MHz, CDCl₃): δ 137.4, 137.2, 129-128, 101.1, 83.6, 78.3, 77.8, 76.1, 72.3, 72.3, 67.7, 67.5, 67.3, 64.7, 64.0, 25.8, 18.6, 18.6, 15.0ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 $C_{28}H_{36}N_6NaO_6S[M+Na]^+$: 607.2309; 实际值: 607.2303。

[0269] 乙基 2-0-乙酰基-4-叠氮基-S-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧-1-硫- α -D-吡喃甘露糖苷 (28)

[0270] 供体 19 (226mg, 0.30mmol) 和受体 27 (100mg, 0.17mmol) 被溶解于甲苯 (3mL) 过分子筛并将 TMSOTf (2 μ L, 11 μ mol) 在 100 °C 下加入。所述混合物在 100 °C 下搅拌 1 小时, 在用一滴吡啶淬灭反应之前。在过滤之后, 在硅胶柱上进行纯化, 使用甲

苯洗脱供体的离去基团,然后将混合物用乙酸乙酯/甲苯 5:95 洗脱,得到纯净的四糖 28(159mg, 81 %) [α]_{D20} = +122(c = 1.0 在 CHCl₃ 中); ¹H NMR(600MHz, CDCl₃): δ 7.4-7.3(m, 20H; H-Ar), 5.41(dd, ³J_{1,2} = 1.8Hz, ³J_{2,3} = 3.4Hz, 1H; H-2^{IV}), 5.10(d, ³J_{1,2} = 1.4Hz, 1H; H-1^I), 4.95(d, ³J_{1,2} = 1.8Hz, 1H; H-1^{III}), 4.85(d, 1H; H-1^{IV}), 4.84(d, ³J_{1,2} = 1.8Hz, 1H; H-1^{II}), 3.88(dd, ³J_{2,3} = 2.9Hz, 1H; H-2^{III}), 3.85(dd, ³J_{2,3} = 2.9Hz, 1H; H-2^{II}), 3.83(dd, ³J_{2,3} = 2.9Hz, 1H; H-2^I), 2.59(dq, ³J = 7.4Hz, ³J = 13Hz, 1H; S-CH₂), 2.53(dq, ³J = 7.5Hz, 1H; S-CH₂), 2.11(s, 3H; Ac), 1.27(2d, 6H; H-6^I, H-6^{II}), 1.25(t, 3H; S-CH₂-CH₃), 1.21(d, 3H; H-6^{IV}), 1.20ppm(d, 3H; H-6^{III}); ¹³C NMR(126MHz, CDCl₃): δ 169.9, 137.6, 137.3, 137.3, 137.2, 129-128, 100.7, 100.2, 99.3, 83.5, 77.9, 77.0, 76.8, 76.2, 75.6, 73.6, 73.6, 72.4, 72.3, 72.2, 71.7(CH₂-Ph), 68.1, 68.0, 67.8, 67.7, 67.3, 64.7, 64.4, 64.2, 64.0, 25.7, 21.1, 18.8, 18.7, 18.6, 18.5, 15.0ppm; HRMS(ESI): m/z 计算值为: C₅₆H₆₈N₁₂NaO₁₃S[M+Na]⁺: 1171.4642; 实际值: 1171.4644。

[0271] 烯丙基 2-0-乙酰基-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)-2-0-乙酰基-4-叠氮基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(29)

[0272] 供体 28(197mg, 171 μ mol) 和受体 9(37mg, 136 μ mol) 被溶解于干燥的二氯甲烷(5mL)中,经过分子筛,随后 NIS(46mg, 200 μ mol) 和三氟甲磺酸(6 μ L, 68 μ mol) 在 0°C 下被加入。该反应在此温度下搅拌 15 分钟,并接着经硅藻土过滤。所述混合物先用硫代硫酸钠洗涤,再用碳酸氢钾洗涤。五糖 29(125mg, 68%) 经快速色谱处理后被纯化(己烷/乙酸乙酯 6:1), [α]_{D20} = +88(c = 1.0 在 CHCl₃ 中); ¹H NMR(600MHz, CDCl₃): δ 7.5-7.2(m, 20H; H-Ar), 5.41(dd, ³J_{1,2} = 1.8Hz, ³J_{2,3} = 3.2Hz, 1H; H-2^V), 5.41(dd, ³J_{1,2} = 1.8Hz, ³J_{2,3} = 3.3Hz, 1H; H-2^I), 4.93(m, 3H; H-1^{II}, H-1^{III}, H-1^{IV}), 4.85(d, 1H; H-1^V), 4.75(d, 1H; H-1^I), 3.87(dd, ³J_{1,2} = 1.8Hz, ³J_{2,3} = 2.9Hz, 1H; H-2^{IV}), 3.82(dd, ³J_{1,2} = 1.8Hz, ³J_{2,3} = 2.9Hz, 1H; H-2^{III}), 3.2, 10, 2.08(2s, 6H; Ac), 1.33(d, 3H; H-6^I), 1.29(d, ³J_{5,6} = 6.2Hz, 3H; H-6^{III}), 1.24(d, ³J_{5,6} = 6.2Hz, 3H; H-6^{II}), 1.20(d, ³J_{5,6} = 6.2Hz, 3H; H-6^V), 1.14ppm(d, ³J_{5,6} = 6.2Hz, 3H; H-6^{IV}); ¹³C NMR(126MHz, CDCl₃): δ 170.1, 169.9, 137.6, 137.4, 137.3, 137.3, 129-128, 133.3, 118.1, 101.2, 100.5, 100.3, 99.2, 96.4, 11A, 77.0, 76.8, 75.6, 73.6, 73.5, 73.3, 72.4, 72.2, 72.0, 71.7, 71.0, 68.6, 68.3, 68.2, 68.0, 67.8, 67.3, 67.1, 64.6, 64.6, 64.2, 64.1, 64.0, 21.1, 21.0, 18.7, 18.6, 18.6, 18.6, 18.5ppm; HRMS(ESI): m/z 计算值为 C₆₅H₇₉N₁₅NaO₁₈[M+Na]⁺: 1380.562; 实际值: 1380.5611。

[0273] 2-0-乙酰基-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)-2-0-乙酰基-4-叠氮基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(30)

[0274] 烯丙基糖苷 29(40mg, 29 μ mol) 被溶于 AcOH/H₂O 9:1(0.6mL) 的溶液中,并加入 AcONa(10mg, 122 μ mol) 和 PdCl₂(10mg, 56 μ mol)。所述混合物在室温下搅拌过夜,并用碳酸氢钠中和。所述产品用二氯甲烷萃取,随后水洗,用硫酸镁干燥,过滤

7. 3, 67. 2, 64. 5, 64. 4, 64. 2, 64. 0, 51. 7, 34. 1, 29. 2, 25. 8, 24. 8, 21. 1, 18. 8, 18. 7, 18. 6, 18. 5ppm;元素分析计算值(%) $C_{61}H_{76}N_{12}O_{16}$:C 59. 40, H 6. 21, N 13. 63;实际值:C 59. 62, H 5. 93, N 13. 36。

[0279] 5-甲氧基羰基戊基 4-叠氮基 3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4-叠氮基 3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4-叠氮基 3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(33)

[0280] 甲醇(3mL)中的四糖 32(90mg, 73 μ mol)用 0.1M 的甲醇钠溶液(0.1mL)处理。该反应在室温下搅拌 2 小时,接着用氢离子交换树脂中和。过滤,蒸干溶剂并用硅胶柱进行色谱层析(洗脱剂:乙酸乙酯/己烷 1:6),得到纯的醇 33(73mg, 84 %): $[\alpha]_{D20} = +104$ ($c = 1.0$ 在 $CHCl_3$ 中); 1H NMR(600MHz, $CDCl_3$): δ 7. 4-7. 3(m, 20H;H-Ar), 4. 97(d, $^3J_{1,2} = 1.8$ Hz, 1H;H-1^{IV}), 4. 95(d, $^3J_{1,2} = 1.9$ Hz, 1H;H-1^{III}), 4. 87(d, $^3J_{1,2} = 1.9$ Hz, 1H;H-1^{II}), 4. 60(d, $^3J_{1,2} = 1.8$ Hz, 1H;H-1^I), 5. 40(dd, $^3J_{2,3} = 3.0$ Hz, 1H;H-2^{IV}), 3. 87(dd, $^3J_{2,3} = 3.0$ Hz, 1H;H-2^{III}), 3. 83(dd, $^3J_{2,3} = 2.9$ Hz, 1H;H-2^{II}), 3. 78(dd, $^3J_{2,3} = 2.9$ Hz, 1H;H-2^I), 3. 32(dt, $^3J_{a,b} = 6.4$ Hz, 1H;H-a), 2. 32(t, $^3J_{d,e} = 7.6$ Hz, 2H;H-e), 2. 30(br. s, 1H;OH), 1. 64(quint, $^3J_{c,d} = 7.6$ Hz, 2H;H-d), 1. 55(m, 2H;H-b), 1. 34(m, 2H;H-c), 1. 26(2d, 6H;H-6^I, H-6^{II}), 1. 20(d, 3H;H-6^{IV}), 1. 17ppm(d, 3H;H-6^{III}); ^{13}C NMR(126MHz, $CDCl_3$): δ 174. 1, 137. 5, 137. 5, 137. 3, 137. 3, 129-128, 100. 6, 100. 5, 100. 4, 98. 7, 77. 8, 77. 6, 77. 1, 76. 7, 74. 1, 73. 7, 73. 4, 20 72. 4, 72. 3, 72. 3, 72. 2, 67. 9, 67. 9, 67. 6, 67. 5, 67. 3, 67. 2, 64. 5, 64. 4, 64. 3, 64. 0, 51. 7, 34. 1, 29. 2, 25. 8, 24. 8, 18. 8, 18. 7, 18. 7, 18. 5ppm;HRMS(ESI): m/z 计算值为 $C_{59}H_{74}N_{12}NaO_{15}[M+Na]^+$:1213. 5289;实际值:1213. 5278。

[0281] 5-甲氧基羰基戊基 2-0-乙酰基-4-叠氮基 3-0-苄基-4,6-二去氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4-叠氮基 3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4-叠氮基 3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(I \rightarrow 2)4-叠氮基 3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)2-0-乙酰基-4-叠氮基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4-叠氮基 3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4-叠氮基 3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4-叠氮基 3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(34)

[0282] 供体 31(104mg, 70 μ mol)和受体 33(73mg, 61 μ mol)被溶解于甲苯(1.5mL)中,过分子筛,并加入 TMSOTf(1 μ L, 5 μ mol)。该混合物在室温下搅拌 3 小时,再用一滴吡啶淬灭。过滤后,在硅胶柱上进行纯化,使用甲苯与乙酸乙酯梯度洗脱(从 0%至 10%),得到纯的九糖 34(45mg, 30%): $[\alpha]_{D20} = +95$ ($c = 1.0$ 在 $CHCl_3$ 中); 1H NMR(600MHz, $CDCl_3$): δ 7. 4-7. 2(m, 40H;H-5Ar), 5. 40(dd, $^3J_{1,2} = 1.9$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.1$ Hz, 1H;H-2^{IX}), 5. 12(dd, $^3J_{1,2} = 1.9$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.2$ Hz, 1H;H-2^V), 4. 97(d, $^3J_{1,2} = 1.5$ Hz, 2H;H-1), 4. 94(d, $^3J_{1,2} = 1.8$ Hz, 1H;H-1), 4. 93(d, $^3J_{1,2} = 1.8$ Hz, 1H;H-1), 4. 86(d, $^3J_{1,2} = 1.7$ Hz, 1H;H-1), 4. 85(d, $^3J_{1,2} = 1.8$ Hz, 1H;H-1), 4. 84(d, $^3J_{1,2} = 1.7$ Hz, 1H;H-1^{IX}), 4. 82(d, $^3J_{1,2} = 1.5$ Hz, 1H;H-1^V), 4. 59(d, $^3J_{1,2} = 1.1$ Hz, 1H;H-1^I), 3. 95(dd, $^3J_{2,3} = 2.8$ Hz, 1H;H-2), 3. 87(dd, $^3J_{2,3}$

5x H-1), 4.19-3.76 (m, 19H; 5x H-2, 5xH-3, 4xH-4, 5xH-5), 3.71-3.66 (m, 1H; H-a), 3.55-3.51 (m, 1H; H-a), 3.50-3.32 (m, 1H; H-4), 3.27 (t, $^3J_{f,g} = 6.2\text{Hz}$, 2H; H-f), 2.80 (t, 2H; H-g), 2.26 (t, $^3J_{d,e} = 7.4\text{Hz}$, 2H; H-e), 1.64-1.54 (m, 4H; H-b, H-d), 1.40-1.31 ppm (m, 2H; H-c), 1.30-1.16 (m, 15H; 5x H-6); HRMS (ESI): m/z 计算值为 $C_{43}H_{74}N_7O_{22}[M+H]^+$: 1040.4881; 实际值: 1040.4879。

[0294] 1-[(2-氨基乙基酰胺基)羧基戊基-4,6-二脱氧-4-甲酰氨基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4,6-二脱氧-4-甲酰氨基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖苷]-2-丁氧基环丁烯-3,4-二酮(40)

[0295] 向胺 38 (5mg, 4.8 μmol) 的水 (300 μL) 和乙醇 (200 μL) 的混合溶液中加入 3,4-二丁氧基-3-环丁烯-1,2-二酮的乙醇 (20%, 26 μL) 溶液, 并通过加入碳酸氢钠溶液调节 pH 至 8。在 0.5 小时后, 当薄层层析显示反应完全, 将反应混合物用乙酸中和, 并通过反相 HPLC (C18 柱) 且用水-乙腈梯度洗脱从而进行纯化。以 20% 的收率得到的产品的乙腈溶液, 经过冷冻干燥, 得到方酸 40 的白色粉末 (4.2mg, 73%) : $^1\text{H NMR}$ (600MHz, D_2O): δ 8.23-8.18 和 8.06-7.98 (m, 5H; NCHO), 5.18-5.87 (m, 5H; 5x H-1), 4.69 (m, 2H; H-h), 3.72-3.58 (m, 3H; H-a, 2x H-f), 3.51-3.36 (m, 4H; H-4, H-a, 2x 20H-g), 2.24-2.17 (m, 2H; H-e), 1.82-1.74 (m, 2H; H-i), 1.61-1.49 (m, 4H; H-b, H-d), 1.49-1.38 (m, 2H; H-j), 1.33-1.18 (m, 17H; 15x H-6, H-c), 0.96-0.91 (m, 3H; H-k); HRMS (ESI): m/z 计算值为 $C_{51}H_{81}N_7NaO_{25}[M+Na]^+$: 1214.5174, 实际值: 1214.5177。

[0296] (2-氨基乙基酰胺基)羧基戊基-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4,6-二去氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖苷(39)

[0297] 新蒸馏的乙二胺 (400 μL) 中的甲酯 2 (5.9mg, 3.46 μmol) 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 48 小时。薄层层析表明该反应几乎完成。将所述混合物浓缩, 溶于水, 并用 10% 的乙酸中和。将其用 SepPak C18 柱, 先用水然后用甲醇洗脱, 进行纯化。将含有产物的甲醇馏分合并, 浓缩, 然后再在 C18 柱的 HPLC 上用水-乙腈梯度洗脱, 从而纯化。获得该产品的 12% 的乙腈溶液。将其浓缩, 冻干, 得到所述胺 39, 其为白色粉末 (4.5mg, 75%) : $^1\text{H NMR}$ (500MHz, D_2O): δ 8.22-7.99 (m, 9H; NCHO), 5.20-4.86 (m, 9H; 9x H-1), 4.18-3.76 (m, 34H; 9x H-2, 9x H-3, 7x H-4, 9x H-5), 3.72-3.66 (m, 1H; H-a), 3.55-3.29 (m, 5H; 2x H-4, H-a, H-f), 2.81 (m, 2H; H-g), 2.26 (t, $^3J_{d,e} = 7.4\text{Hz}$, 2H; H-e), 1.65-1.58 (m, 4H; H-b, H-d), 1.40-1.30 (m, 2H; H-c), 1.30-1.16 (m, 27H; 9x H-6); HRMS (ESI): m/z 计算值为 $C_{71}H_{118}N_{11}O_{38}[M+H]^+$: 1732.7634; 实际值: 1732.7596。

[0298] 1-[(2-氨基乙基酰胺基)羧基戊基-4,6-二脱氧-4-甲酰氨基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4,6-脱氧-4-甲酰氨基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)-4-甲

酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基]-2-丁氧基环丁烯-3,4-二酮(41)

[0299] 溶解于水(0.3mL)中的所述胺39(4.5mg, 2.5 μ mol)溶液中被加入乙醇(0.2mL)。将其在室温下搅拌,并加入3,4-二丁氧基-3-环丁烯-1,2-二酮的乙醇(20%, 17 μ L)溶液,并通过小心地加入碳酸氢钠溶液将该反应混合物的pH调节至8。当薄层层析表明该反应已经反应完全时,用10%的乙酸中和该混合物,再通过反向HPLC(C18),用水-乙腈梯度洗脱,进行纯化。所获得的产品的20%的乙腈溶液被浓缩,并冷冻干燥,得到标题所述化合物41,其为白色粉末(3.7mg, 76%):¹H NMR(500MHz, D₂O): δ 8.31-8.08(m, 9H; NCH₀), 5.30-4.94(m, 9H; 9x H-1), 4.82-4.74(m, 2H; H-h), 4.28-3.42(m, 42H; 9x H-2, 9x H-3, 9x H-4, 9x H-5, H-a, H-f, H-g), 2.33-2.25(m, 2H; H-e), 1.91-1.82(m, 2H; H-i), 1.70-1.57(m, 4H; H-b, H-d), 1.56-1.48(m, 2H; H-j), 1.42-1.23(m, 29H, 9x H-6, H-c), 1.05-0.99(m, 3H, H-k); HRMS(ESI): m/z 计算值为 C₇₉H₁₂₅N₁₁Na₂O₄₁[M+2Na]⁺: 964.8909; 实际值: 964.8904。

[0300] 甲基4-叠氮基-2,3-二-O-苯甲酰基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(50) (Eichler et al. (1991) Glycoconjugate 8, 69-74)

[0301] 苯甲酰氯(2.0mL, 17.2mmol)被滴加到搅拌着的甲基4-叠氮基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷3(1.59g, 7.82mmol)的吡啶(5mL)溶液中(Bundle et al. (1998) Carbohydr. Res. 174, 239-251),在0 $^{\circ}$ C含有DMAP(0.191g, 1.56mmol)。所得的混合物在氩气保护下,在室温下搅拌10小时。然后,向此反应混合物中加入甲醇(2mL)。将反应液搅拌10分钟,然后用二氯甲烷稀释(100mL),再用盐酸溶液(1M, 2x 50mL)洗涤,水(100mL)洗,5%的碳酸氢钠溶液(50mL)洗涤,最后用盐水(30mL)洗。分离有机相,用硫酸镁干燥,再真空干燥。所得残留物用硅胶柱色谱纯化(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱),获得所述化合物(3.12g, 97%),其为白色泡沫状物质。分析数据为50: R_f = 0.40(乙酸乙酯/己烷, 1/9, v/v); [α]_D²¹ = -130.8(c = 1.1, CHCl₃); ¹H NMR(600MHz, CDCl₃): δ 8.21-7.31(m, 10H, H-Ar), 5.60(dd, 1H, J_{2,3} = 1.8Hz, H-2), 5.59(dd, 1H, J_{3,4} = 3.6Hz, H-3), 4.85(d, 1H, J_{1,2} = 1.2Hz, H-1), 3.83(dq, 1H, J_{3,4} = 10.2Hz, J_{5,6} = 6.0Hz, H-5), 3.76(dd, 1H, J_{4,5} = 10.2Hz, H-4), 3.45(s, 3H, -OCH₃) 1.48ppm(d, 3H, J_{5,6} = 6.0Hz, H-6); ¹³C NMR(126MHz, CDCl₃): δ 165.4, 165.3, 133.8, 133.5, 133.3, 130.2, 129.8, 129.8, 129.5, 129.3, 128.6, 128.5, 128.4, 98.6, 71.1, 69.8, 66.9, 63.5, 55.4, 18.6ppm; HRMS(ESI): m/z 计算值为 C₂₁H₂₁N₃O₆Na[M+Na]⁺: 434.1323, 实际值: 434.1317。

[0302] 1-O-乙酰基-4-叠氮基-2-,3-二-O-苯甲酰基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖(51)

[0303] 50(3.10g, 7.54mmol)的乙酸酐/乙酸/硫酸(50:20:0.5, 70mL)溶液在室温下搅拌6小时,然后倾倒入1M的碳酸钾冰水溶液(100mL)。随后,该混合物用二氯甲烷(-200mL)稀释,并用水洗(2x 100mL),5%的碳酸氢钠溶液洗涤,最后用盐水洗(30mL)。分离有机相,用硫酸镁干燥,并真空浓缩。所得残留物用硅胶层析色谱柱纯化(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱),得到所述目标化合物(3.04g, 92%),其

为白色泡沫状物质。51 的分析数据 $R_f = 0.30$ (乙酸乙酯 / 己烷, 1/9, v/v); $[\alpha]_D^{21} = -119.8$ ($c = 1.1$, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 7.35-8.09 (m, 10H, H-Ar), 6.25 (d, $J = 1.5\text{Hz}$, 1H, H-1), 5.65 (dd, $J_{2,3} = 3.5\text{Hz}$, 1H, H-2), 5.61 (dd, $J_{3,4} = 10.1\text{Hz}$, 1H, H-3), 3.91 (dq, $J = 10.2, 6.2\text{Hz}$, 1H, H-5), 3.85 (dd, $J_{4,5} = 10.1\text{Hz}$, 1H, H-4), 2.24 (s, 3H, -OC-CH₃), 1.51 (d, $J_{5,6} = 6.2\text{Hz}$, 3H, H-6); $^{13}\text{C NMR}$ (126MHz, CDCl_3): δ 168.4, 165.4, 165.4, 165.1, 133.7, 133.5, 129.9, 129.8, 129.1, 129.0, 128.6, 128.5, 90.7, 70.9, 69.4, 68.6, 63.0, 21.0, 18.7ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_7\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 462.1272, 实际值: 462.1265。

[0304] 4-叠氨基-2,3-二-O-苯甲酰基-4,6-二脱氧- α/β -D-吡喃甘露糖 (52)

[0305] 乙酸肼 (0.056g, 0.612mmol) 在氩气氛下被加入到搅拌着的 51 (0.224g, 0.510mmol) 的 DMF (1mL) 溶液中, 该溶液在 60 °C 下搅拌 30 分钟。然后, 将该混合物冷却至室温, 用乙酸乙酯 (50mL) 稀释, 用水洗 (2x 50mL), 再用盐水 (30mL) 洗。分离有机相, 用硫酸镁干燥, 并真空浓缩。所得残留物用硅胶层析色谱柱纯化 (乙酸乙酯-己烷梯度洗脱), 得到所述目标化合物 (0.191g, 95%), 其为白色泡沫状物质。52 的分析数据 $R_f = 0.30$ (乙酸乙酯 / 己烷, 1/4, v/v); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3): $\alpha:\beta$ ratio = 7:1; δ 7.11-8.06 (m, 20H, H-Ar), 5.78 (dd, $J_{2,3} = 3.0\text{Hz}$, 1H, H-2 _{β}), 5.66 (dd, $J_{3,4} = 10\text{Hz}$, 1H, H-3 _{α}), 5.63 (dd, $J_{2,3} = 3.2\text{Hz}$, 1H, H-2 _{α}), 5.36 (dd, $J_{1,2} = 1.6\text{Hz}$, 1H, H-1 _{α}), 5.30 (dd, $J_{3,4} = 10.3\text{Hz}$, 1H, H-3 _{β}), 5.07 (dd, $J_{1,2} = 1.5\text{Hz}$, 1H, H-1 _{β}), 1.52 (d, $J_{5,6} = 6.0\text{Hz}$, 3H, H-6 _{β}), 1.45ppm (d, $J_{5,6} = 6.2\text{Hz}$, 3H, H-6 _{α}); $^{13}\text{C NMR}$ (126MHz, CDCl_3): δ 166.1, 165.5, 165.4, 133.8, 133.5, 133.4, 130.0, 129.8 (x2), 129.4, 129.2 (x2), 128.9, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 92.9, 92.1, 73.3, 71.4, 70.9, 70.8, 70.2, 67.1, 63.6, 62.8, 18.7, 18.6ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值 $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_6\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 420.1166, 实际值: 420.1163。

[0306] 4-叠氨基-2,3-二-O-苯甲酰基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基三氯乙酰亚胺 (53)

[0307] 在室温下, 在氩气氛中, 向搅拌着的包含了 CCl_3CN (10.1mL, 100mmol) 的 52 (2.0g, 5.03mmol) 的二氯甲烷 (20mL) 溶液中加入 DBU (0.150mL, 1.00mmol)。10 分钟后, 将溶剂真空蒸干, 所得的残留物用硅胶柱色谱层析纯化 (乙酸乙酯-己烷梯度洗脱), 得到标题所述化合物 (2.335g, 86%), 其为灰白色泡沫状物质。53 的分析数据为: $R_f = 0.60$ (乙酸乙酯 / 己烷, 1/4, v/v); $[\alpha]_D^{21} = -101.9$ ($c = 1.0$, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 8.79 (s, 1H, N-H), 7.33-8.09 (m, 10H, H-Ar), 6.43 (d, $J_{1,2} = 1.5\text{Hz}$, 1H, H-1), 5.85 (dd, $J_{2,3} = 3.5\text{Hz}$, 1H, H-2), 5.68 (dd, $J_{3,4} = 10.5\text{Hz}$, 1H, H-3), 4.07 (dq, $J = 10.2, 6.2\text{Hz}$, 1H, H-5), 3.88 (dd, $J_{4,5} = 10.2\text{Hz}$, 1H, H-4), 1.53ppm (d, $J_{5,6} = 6.2\text{Hz}$, 3H, H-6); $^{13}\text{C NMR}$ (126MHz, CDCl_3): δ 165.3, 160.0, 133.7, 133.5, 129.9, 129.8, 129.1, 129.0, 128.7, 128.5, 94.7, 90.7, 70.9, 69.9, 68.1, 62.9, 18.7ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_6\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 563.0262, 实际值: 563.0251。

[0308] 甲基 4-叠氨基-3-O-苯甲酰基-2-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷 (55)

[0309] 在 0 °C, 滴加苯甲酰氯 (0.872mL, 7.5mmol) 到搅拌着的包含有

DMAP(0.166g, 1.36mmol) 的 54 的 吡 啶 (10mL) 溶 液 (Peters&Bundle(1989)Can. J. Chem. 67, 497-502) (2.0g, 6.82mmol) 中。所得混合物在室温下在氩气氛围中搅拌 3 小时。然后,将甲醇 (2mL) 加入到搅拌了 10 分钟的该反应的混合物中,接着用二氯甲烷 (80ml) 稀释,用盐酸溶液 (1M, 2x 50mL) 洗涤,用水 (100mL) 洗,用 5% 的碳酸氢钠溶液 (50mL) 洗涤,最后用盐水 (30mL) 洗涤。分离有机相,用硫酸镁干燥,之后真空浓缩。所得残留物用硅胶色谱柱 (乙酸乙酯 - 己烷梯度洗脱) 纯化,得到标题所述化合物 (2.47g, 91%), 其为油状物质。化合物 55 的分析数据为: $R_f = 0.50$ (乙酸乙酯 / 己烷, 1/9, v/v); $[\alpha]_D^{21} = -18.8$ ($c = 1.1$, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3): δ 7.13-8.10 (m, 10H, H-Ar), 5.32 (dd, $J_{3,4} = 10.4\text{Hz}$, 1H, H-3), 4.71 (d, $J_{1,2} = 1.4\text{Hz}$, 1H, H-1), 3.37 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 1.42ppm (d, $J_{5,6} = 6.2\text{Hz}$, 3H, H-6); $^{13}\text{C NMR}$ (126MHz, CDCl_3): δ 165.5, 137.5, 133.3, 129.9, 129.5, 128.5, 128.3, 127.8 (x2), 98.9, 74.8, 73.3, 73.2, 67.0, 63.2, 55.0, 18.5ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 420.1530, 实际值: 420.1521。

[0310] 1-0-乙酰基-4-叠氨基-3-0-苯甲酰基-2-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖 (56)

[0311] 将 55 (1.40g, 3.52mmol) 的乙酸酐 / 乙酸 / 硫酸 (50:20:0.5, 35mL) 溶液在室温下搅拌 3 小时,再将其倾倒入 1M 的碳酸钾冰水溶液 (100mL) 中。随后,将该混合物用二氯甲烷 (100mL) 稀释,用水洗 (2x 80mL),用 5% 的碳酸氢钠溶液 (50mL) 洗涤,最后用盐水 (30mL) 洗涤。分离有机相,用硫酸镁干燥,之后真空浓缩。所得残留物用硅胶色谱柱 (乙酸乙酯 - 己烷梯度洗脱) 纯化,得到标题所述化合物 (1.22g, 81%), 其为白色泡沫状物质。化合物 55 的分析数据为: $R_f = 0.30$ (乙酸乙酯 / 己烷, 1/9, v/v); $[\alpha]_D^{21} = -9.9$ ($c = 1.5$, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 7.10-8.08 (m, 10H, H-Ar), 6.17 (d, $J_{1,2} = 1.3\text{Hz}$, 1H, H-1), 5.29 (dd, $J_{3,4} = 10.5\text{Hz}$, 1H, H-3), 4.00 (dd, $J_{2,3} = 3.5\text{Hz}$, 1H, H-2), 2.15 (s, 3H, $-\text{O}-\text{CH}_3$), 1.42ppm (d, $J_{5,6} = 6.1\text{Hz}$, 3H, H-6); $^{13}\text{C NMR}$ (126MHz, CDCl_3): δ 169.0, 165.6, 136.9, 133.5, 129.9, 129.2, 128.5, 128.4, 128.0, 127.9, 91.1, 73.5, 73.0, 72.7, 69.6, 62.6, 21.0, 18.5ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 448.1479, 实际值: 448.1471。

[0312] 4-叠氨基-3-0-苯甲酰基-2-0-苄基-4,6-二脱氧 α/β -D-吡喃甘露糖 (57)

[0313] 在氩气氛围中,乙酸肼 (0.310g, 3.35mmol) 被加入到搅拌着的 56 (1.190g, 2.79mmol) 的 DMF (10mL) 溶液中,并在 60°C 下搅拌 30 分钟。然后,所述混合物被冷却至室温,用乙酸乙酯 (100mL) 稀释,再用水 (2x 80mL) 和盐水 (30mL) 洗涤。分离有机相,用硫酸镁干燥,之后真空浓缩。所得残留物用硅胶色谱柱 (乙酸乙酯 - 己烷梯度洗脱) 纯化,得到标题所述化合物 (0.912g, 85%), 其为白色泡沫状物质。化合物 57 的分析数据为: $R_f = 0.30$ (乙酸乙酯 / 己烷, 1/4, v/v); $^1\text{HNMR}$ (500MHz, CDCl_3): $\alpha:\beta$ ratio = 5:1; δ 7.16-8.14 (m, 20H, H-Ar), 5.43 (dd, $J_{3,4} = 10.4\text{Hz}$, 1H, H-3 $_{\alpha}$), 5.27 (dd, $J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, $J_{1,\text{OH}} = 3.3\text{Hz}$, 1H, H-1 $_{\alpha}$), 5.13 (dd, $J_{3,4} = 10.5\text{Hz}$, 1H, H-3 $_{\beta}$), 4.82 (dd, $J_{1,2} = 1.5\text{Hz}$, $15J_{1,\text{OH}} = 11.6\text{Hz}$, 1H, H-1 $_{\beta}$), 4.14 (dd, $J_{2,3} = 3.0\text{Hz}$, 1H, H-2 $_{\beta}$), 4.06 (dd, $J_{2,3} = 3.1\text{Hz}$, 1H, H-2 $_{\alpha}$), 1.46 (d, $J_{5,6} = 6.2\text{Hz}$, 3H, H-6 $_{\beta}$), 1.42ppm (d, $J_{5,6} = 6.1\text{Hz}$, 3H, H-6 $_{\alpha}$); $^{13}\text{C NMR}$ (126MHz, CDCl_3): δ 165.6 (x2), 137.4, 137.1, 133.8, 133.4, 129.9, 129.5, 128.7, 128.5, 128.3 (x2), 128.2, 127.9, 127.8, 93.2, 92.7, 76.3, 75.8, 75.7, 75.0, 72.9, 70.9, 67.2, 63.2, 62.6, 18.6, 18.5ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 C_{20}

$H_{21}N_3O_5Na[M+Na]^+$:406.1373, 实际值:406.1366。

[0314] 4-叠氨基 3-0-苯甲酰基-2-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基三氯乙酰亚胺 (58)

[0315] 在室温下,在氩气氛围中,向包含有 CCl_3CN (4.65mL, 46.4mmol) 的搅拌着的 57(0.890g, 2.32mmol) 的二氯甲烷 (15mL) 溶液中加入 DBU(70 μ L, 0.464mmol)。10 分钟后,将溶剂真空蒸干,并将所得残留物用硅胶色谱柱纯化(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱),以获得标题所述的化合物(1.136g, 93%),其为灰白色泡沫。化合物 58 的分析数据:

[0316] $R_f = 0.80$ (乙酸乙酯/甲苯, 1/9, v/v); $[\alpha]_D^{21} = -7.3$ ($c = 1.5$, $CHCl_3$); 1H NMR(600MHz, $CDCl_3$): δ 8.66(s, 1H, -C = NH), 7.12-8.10(m, 10H, H-Ar), 6.36(d, $J_{1,2} = 1.8$ Hz, 1H, H-1), 5.39(dd, $J_{3,4} = 7.2$ Hz, 1H, H-3), 4.26(dd, $J_{2,3} = 3.1$ Hz, 1H, H-2), 3.91-3.99(m, 2H, H-4, H-5), 1.48ppm(d, $J_{5,6} = 6.0$ Hz, 3H, H-6); ^{13}C NMR(126MHz, $CDCl_3$): δ 165.5, 160.4, 137.0, 133.5, 129.9, 129.2, 128.4, 128.0(x2), 127.9, 95.3, 90.8, 73.2, 73.0, 72.8, 70.1, 62.5, 18.6ppm; HRMS(ESI):m/z 计算值为 $C_{22}H_{21}Cl_3N_4O_5Na[M+Na]^+$:549.0470, 实际值:549.0465。

[0317] 甲基 4-叠氨基 2-0-苯甲酰基 3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷 (59)

[0318] 在 0 $^{\circ}C$ 下,苯甲酰氯(0.872mL, 7.5mmol) 被滴加入搅拌着的含有 DMAP(0.166g, 1.36mmol) 化合物 4(2.0g, 6.82mmol) 的吡啶(10mL) 溶液中。所得混合物在氩气氛围里在室温下被搅拌。然后甲醇(2mL) 被加入到该反应混合物中,搅拌 10 分钟,然后用二氯甲烷(-80mL) 稀释,再用盐酸溶液(1M, 2x 50mL) 洗涤,水(100mL) 洗,5%的碳酸氢钠溶液(50mL) 洗,最后用盐水(30mL) 洗。分离有机相,用硫酸镁干燥,之后真空浓缩。所得残留物用硅胶色谱柱(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱) 纯化,得到标题所述化合物(2.32g, 86%),其为白色泡沫状物质。化合物 59 的分析数据为: $R_f = 0.50$ (乙酸乙酯/己烷, 1/9, v/v); $[\alpha]_D^{21} = -27.9$ ($c = 1.7$, $CHCl_3$); 1H NMR(500MHz, $CDCl_3$): δ 7.21-8.10(m, 10H, H-Ar), 5.55(dd, $J_{2,3} = 3.2$ Hz, 1H, H-2), 4.77(d, $J_{1,2} = 1.8$ Hz, 1H, H-1), 3.91(dd, $J_{3,4} = 9.7$ Hz, 1H, H-3), 3.37(s, 3H, -OCH₃), 1.38ppm(d, $J_{5,6} = 6.0$ Hz, 3H, H-6); ^{13}C NMR(126MHz, $CDCl_3$): δ 165.6, 137.3, 133.3, 129.9, 128.4, 128.3, 128.1, 127.8, 98.8, 76.1, 71.4, 67.8, 66.8, 64.3, 55.1, 18.7ppm; HRMS(ESI):m/z 计算值为 $C_{21}H_{23}N_3O_5Na[M+Na]^+$:420.1530, 实际值:420.1528。

[0319] 1-0-乙酰基-4-叠氨基 2-0-苯甲酰基 3-0-苄基-4,6-二去氧 α/β -D-吡喃甘露糖 (60)

[0320] 化合物 59(2.06g, 5.19mmol) 在乙酸酐/乙酸/硫酸(50:20:0.5, 35mL) 中的溶液在室温下搅拌 3 小时,随后倾倒入 1M 的碳酸钾冰水溶液(100mL) 中。该混合物随后用二氯甲烷(-100mL) 稀释,并用水(2x 80mL) 洗,5%的碳酸氢钠溶液(50mL) 洗涤,最后用盐水(30mL) 洗。分离有机相,用硫酸镁干燥,之后真空浓缩。所得残留物用硅胶色谱柱(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱) 纯化,得到标题所述化合物(1.95g, 89%),其为白色泡沫状物质。化合物 60 的分析数据为: α/β 比 = 9:1(分离产率); α -端基差向异构体: $R_f = 0.45$ (乙酸乙酯/己烷, 1.5/8.5, v/v); $[\alpha]_D^{21} = +1.8$ ($c = 1.9$, $CHCl_3$); 1H NMR(500MHz, $CDCl_3$): δ 7.27-8.09(m, 10H, H-Ar), 6.16(d, $J_{1,2} = 2.0$ Hz, 1H, H-1), 2.13(s, 3H, -OC-CH₃), 1.40ppm(d, $J_{5,6} = 6.0$ Hz, 3H, H-6); ^{13}C NMR(126MHz, $CDCl_3$): δ 168.3, 165.3, 136.9, 133.5, 129.9, 129.3, 128.5, 128.4, 128.2, 91.1, 75.8, 71.6, 69.

3, 66.7, 63.8, 20.9, 18.7ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 $C_{22}H_{23}N_3O_6Na[M+Na]^+$: 448.1479, 实际值: 448.1475; β -端基差向异构体: $R_f = 0.40$ (ethyl acetate/hexane, 1.5/8.5, v/v); $[\alpha]_D^{21} = -50.2$ ($c = 1.2$, $CHCl_3$); 1H NMR (500MHz, $CDCl_3$): δ 7.27-8.13 (m, 10H, H-Ar), 5.82 (dd, $J_{2,3} = 3.5$ Hz, 1H, H-2), 5.77 (d, $J_{1,2} = 1.5$ Hz, 1H, H-1), 2.03 (s, 3H, -OC-CH₃), 1.46ppm (d, $J_{5,6} = 6.0$ Hz, 3H, H-6); ^{13}C NMR (126MHz, $CDCl_3$): δ 168.8, 165.8, 136.6, 133.4, 130.0, 129.5, 128.5 (x2), 128.1, 91.2, 78.1, 72.1, 71.4, 66.8, 63.6, 20.8, 18.6ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为: $C_{22}H_{23}N_3O_6Na[M+Na]^+$: 448.1479, 实际值: 448.1474。

[0321] 4-叠氨基-2-0-苯甲酰基-3-0-苄基-4,6-二去氧- α/β -D-吡喃甘露糖 (61)

[0322] 在氮气氛围中, 乙酸肼 (0.572g, 6.20mmol) 被加入到搅拌着的 60 (2.20g, 5.17mmol) 的 DMF (7mL) 溶液中, 然后在 60 °C 下搅拌 30 分钟。随后将该混合物冷却至室温, 用乙酸乙酯 (100mL) 稀释, 用水 (2x 80mL) 洗并用盐水 (30mL) 洗。分离有机相, 用硫酸镁干燥, 之后真空浓缩。所得残留物用硅胶色谱柱 (乙酸乙酯-己烷梯度洗脱) 纯化, 得到标题所述化合物 (1.83g, 93%), 其为白色泡沫状物质。化合物 61 的分析数据为: $R_f = 0.30$ (乙酸乙酯/己烷, 1/4, v/v); 1H NMR (500MHz, $CDCl_3$): α/β ratio = 5:1; δ 7.25-8.15 (m, 20H, H-Ar), 5.74 (dd, $J_{2,3} = 3.5$ Hz, 1H, H-2 $_{\beta}$), 5.60 (dd, $J_{2,3} = 3.1$ Hz, 1H, H-2 $_{\alpha}$), 5.32 (d, $J_{1,2} = 1.3$ Hz, 1H, H-1 $_{\alpha}$), 4.89 (s, 1H, H-1 $_{\beta}$), 1.47 (d, $J_{5,6} = 6.2$ Hz, 3H, H-6 $_{\beta}$), 1.40ppm (d, $J_{5,6} = 6.1$ Hz, 3H, H-6 $_{\alpha}$); ^{13}C NMR (126MHz, $CDCl_3$): δ 166.3, 165.7, 137.2, 136.8, 133.6, 133.3, 130.0, 129.9, 129.6, 129.2, 128.5, 128.4 (x2), 128.3, 128.2, 128.0, 127.8, 93.2, 92.5, 78.5, 75.6, 71.5 (x2), 71.3, 69.2, 68.2, 67.1, 64.3, 63.7, 18.7 (x2) ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 $C_{20}H_{21}N_3O_5Na[M+Na]^+$: 406.1373, 实际值: 406.1374。

[0323] 4-叠氨基-2-0-苯甲酰基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基三氯乙酰亚胺 (62)

[0324] 在室温下, 在氩气氛围下, 向搅拌着的包含有 CCl_3CN (9.50mL, 95.0mmol) 的 61 (1.820g, 4.75mmol) 的二氯甲烷 (20mL) 溶液中加入 DBU (140 μ L, 0.95mmol)。10 分钟后, 真空蒸干溶剂, 并将残留物用硅胶色谱柱纯化 (乙酸乙酯-己烷梯度洗脱), 获得标题所述的化合物 (2.0g, 80%), 其为灰白色泡沫状物质。化合物 62 的分析数据为: $R_f = 0.60$ (乙酸乙酯/己烷, 1/4, v/v); $[\alpha]_D^{21} = -10.8$ ($c = 1.0$, $CHCl_3$); 1HNMR (500MHz, $CDCl_3$): δ 8.70 (s, 1H, -C = NH), 7.28-8.12 (m, 10H, H-Ar), 6.31 (d, $J_{1,2} = 1.8$ Hz, 1H, H-1), 5.67 (dd, $J_{2,3} = 3.5$ Hz, 1H, H-2), 3.98 (dd, $J_{3,4} = 10.0$ Hz, 1H, H-3), 3.57-3.66 (dd, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, 1H, H-4), 1.38-1.44ppm (d, $J_{5,6} = 6.5$ Hz, 3H, H-6); ^{13}C NMR (126MHz, $CDCl_3$): δ 165.3, 159.8, 136.7, 129.9, 129.3, 128.6 (x3), 128.5 (x2), 128.4, 128.1, 95.0, 90.7, 75.2, 71.6, 69.9, 56.4, 63.7, 18.7ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 $C_{22}H_{21}Cl_3N_4O_5Na[M+Na]^+$: 549.0470, 实际值: 549.0475。

[0325] 乙基-4-叠氨基-2,3-二-0-苯甲酰基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-4-叠氨基-3-0-苄基-4,6-二脱氧-1-硫代- α -D-吡喃甘露糖苷 (63)

[0326] 糖基供体 53 (1.010g, 1.87mmol) 和糖基受体 13 (0.550g, 1.70mmol) 的混合物 (Peters&Bundle (1989) Can. J. Chem. 67, 491-496) 和新活化的分子筛 (3Å, 2.0g) 置于二

氯甲烷 (30mL) 中,在氩气保护下在室温下搅拌 5 小时。加入 TMSOTf (67 μ L, 0.374mmol), 而所得的混合物另外再搅拌 60 分钟。然后加入三乙胺 (1mL), 将固体滤出, 而残留物用二氯甲烷 (3x 20mL) 洗涤。将合并的滤液 (~ 100mL) 用 20% 的碳酸氢钠溶液 (50mL) 洗涤, 再用水 (50mL) 洗, 最后用盐水 (30mL) 洗。分离有机相, 用硫酸镁干燥, 之后真空浓缩。所得残留物用硅胶色谱柱 (乙酸乙酯 - 甲苯梯度洗脱) 纯化, 得到标题所述化合物 (1.073g, 90%), 其为白色泡沫状物质。化合物 63 的分析数据为: $R_f = 0.70$ (乙酸乙酯 / 甲苯, 1/9, 20v/v); $[\alpha]_D^{21} = -18.4$ ($c = 1.1$, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3): δ 7.12-8.03 (m, 15H, H-Ar), 5.70 (dd, $J_{2,3} = 3.2\text{Hz}$, 1H, H-2^B), 5.62 (dd, $J_{3,4} = 10.3\text{Hz}$, 1H, H-3^B), 5.24 (d, $J_{1,2} = 1.5\text{Hz}$, 1H, H-1^A), 4.98 (d, $J_{1,2} = 1.5\text{Hz}$, 1H, H-1^B), 2.54-2.67 (m, 2H, S-CH₂-), 1.44 (d, $J_{5,6} = 6.2\text{Hz}$, 3H, H-6^B), 1.37 (d, $J_{5,6} = 6.1\text{Hz}$, 3H, H-6^A), 1.29ppm (t, $J = 7.4\text{Hz}$, 3H, S-CH₂-CH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (126MHz, CDCl_3): δ 165.2, 164.9, 137.4, 25 133.4, 133.3, 129.8 (x2), 129.5, 129.3, 128.5 (x2), 128.4, 128.1, 127.9, 99.4, 83.3, 76.5, 72 4, 70.8, 69.5, 67.8, 67.6, 64.2, 63.5, 25 6, 18.6, 18.4, 14.9ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{N}_{60}\text{O}_8\text{SNa}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 725.2364, 实际值: 725.2350。

[0327] 乙基 4-叠氮基 2-0- 苯甲酰基 3-0- 苄基 -4, 6- 二脱氧 - α -D- 吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2) 4-叠氮基 -3-0- 苄基 -4, 6- 二脱氧 -1- 硫代 - α -D- 吡喃甘露糖苷 (64)

[0328] 将糖基供体 62 (1.980g, 3.76mmol) 和糖基受体 13 (1.106g, 3.42mmol) 的混合物以及新活化的分子筛 (3 \AA , 4.0g) 在氩气氛围下置于二氯甲烷 (30mL) 中室温下搅拌 5 小时。再加入 TMSOTf (0.136mL, 0.753mmol), 而将该所得的混合物另外再搅拌 1 小时。然后加入三乙胺 (1mL), 将固体滤出, 而残留物用二氯甲烷 (3x 30mL) 洗涤。将合并的滤液 (~ 120mL) 用 20% 的碳酸氢钠溶液 (50mL) 洗涤, 再用水 (50mL) 洗, 最后用盐水 (30mL) 洗。分离有机相, 用硫酸镁干燥, 之后真空浓缩。所得残留物用硅胶色谱柱 (乙酸乙酯 - 甲苯梯度洗脱) 纯化, 得到标题所述化合物 (2.010g, 85%), 其为白色泡沫状物质。化合物 64 的分析数据为: $R_f = 0.50$ (乙酸乙酯 / 甲苯, 1/9, v/v); $[\alpha]_D^{21} = +50.0$ ($c = 1.4$, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 7.21-8.11 (m, 15H, H-Ar), 5.63 (dd, $J_{2,3} = 2.5\text{Hz}$, 1H, H-2^B), 5.22 (d, $J_{1,2} = 1.0\text{Hz}$, 1H, H-1^A), 4.95 (d, $J_{1,2} = 1.7\text{Hz}$, 1H, H-1^B), 2.50-2.69 (m, 2H, S-CH₂-), 1.37 (d, $J_{5,6} = 6.2\text{Hz}$, 3H, H-6^B), 1.33 (d, $J_{5,6} = 6.2\text{Hz}$, 3H, H-6^A), 1.28ppm (t, $J = 7.3\text{Hz}$, 3H, S-CH₂-CH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (126MHz, CDCl_3): δ 165.3, 137.3, 137.1, 133.3, 129.9, 128.6, 128.5, 128.4 (x2), 128.2, 128.1, 127.9, 99.6, 83.3, 78.1, 76.6, 75.3, 72.3, 71.4, 67.7, 67.6, 64.4, 64.1, 25.6, 18.7, 18.5, 14.9ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为: $\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_7\text{SNa}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 711.2571, 实际值: 711.2570。

[0329] 5'-甲氧基羰基戊基 -4- 叠氮基 2, 3- 二 -0- 苯甲酰基 -4, 6- 二脱氧 - α -D- 吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 3) 4-叠氮基 -2-0- 苄基 -4, 6- 二脱氧 - α -D- 甘露吡喃糖苷 (67)

[0330] 将糖基供体 53 (0.292g, 0.540mmol) 和糖基受体 65 (0.200g, 0.491mmol) (Saksena et al. (2008) Carbohydr. Res. 343, 1693-1706) 的混合物与新活化的分子筛 (3 \AA , 0.6g) 在氩气氛围下置于二氯甲烷 (8mL) 中室温下搅拌 5 小时。再加入 TMSOTf (20 μ mL, 0.108mmol), 而将该所得的混合物另外再搅拌 1 小时。然后加入三乙胺 (1mL), 将固体滤出, 而残留物用二氯甲烷 (3x 20mL) 洗涤。将合并的滤液 (80mL) 用 20% 的碳酸氢钠溶液 (40mL) 洗涤, 再用水 (30mL) 洗, 最后用盐水 (20mL) 洗。分离有机

相,用硫酸镁干燥,之后真空浓缩。所得残留物用硅胶色谱柱(乙酸乙酯-甲苯梯度洗脱)纯化,得到标题所述化合物(0.374g,97%),其为白色泡沫状物质。化合物67的分析数据为:Rf = 0.40(ethyl acetate/toluene,0.5/9.5,v/v); $[\alpha]_D^{21} = -41.2$ (c = 1.6,CHCl₃);¹H NMR(600MHz,CDCl₃): δ 7.29-30 8.06(m,15H,H-Ar),5.72(dd,J_{2,3} = 3.3Hz,1H,H-2^B),5.66(dd,J_{3,4} = 10.3Hz,1H,H-3^B),5.29(d,J_{1,2} = 1.8Hz,1H,H-1^B),4.82(d,J_{1,2} = 1.8Hz,1H,H-1A),4.73 3.66(s,3H,-OCH₃),1 37(d,J_{5,6} = 6.0Hz,3H,H-6^B),1.36(d,J_{5,6} = 6.0Hz,3H,H-6^A);¹³C NMR(126MHz,CDCl₃): δ 174.0,165.2,165.1,137.6,133.5,133.3,129.8,129.4,128.6,128.5,128.4,127.9,127.6,99.2,97.0,78.6,72.5,70.7,70.0,67.7,67.6(x2),64.7,63.4,51.5,33.9,29.0,25.7,24.6,18.6,18.5ppm;HRMS(ESI):m/z 计算值为C₄₀H₄₆N₆O₁₁Na[M+Na]⁺:809.3117,实际值:809.3107。

[0331] 5'-甲氧基羰基戊基4-叠氮基-2,3-二-O-苯甲酰基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4-叠氮基3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)4-叠氮基-2-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(68)。

[0332] 糖基供体63(0.151g,0.216mmol)和糖基受体65(0.080g,0.196mmol)(Saksena et al.(2008)Carbohydr. Res. 343,1693-1706)的混合物以及新活化的分子筛(3 Å,0.5g)在氩气氛围下置于二氯甲烷(4mL)中室温下搅拌5小时。再加入MeOTf(133 μ mL,1.17mmol),而将该所得的混合物另外再搅拌48小时。然后加入三乙胺(1mL),将固体滤出,而残留物用二氯甲烷(3x 20mL)洗涤。将合并的滤液(70mL)用20%的碳酸氢钠溶液(40mL)洗涤,再用水(30mL)洗,最后用盐水(20mL)洗。分离有机相,用硫酸镁干燥,之后真空浓缩。所得残留物用硅胶色谱柱(乙酸乙酯-甲苯梯度洗脱)纯化,得到标题所述化合物(0.182g,89%),其为白色泡沫状物质。化合物68的分析数据为:Rf = 0.40(乙酸乙酯/甲苯,0.5/9.5,v/v); $[\alpha]_D^{21} = -27.7$ (c = 2.4,CHCl₃);NMR(600MHz,CDCl₃): δ 7.06-8.01(m,20H,H-Ar),5.71(dd,J_{2,3} = 3.3Hz,1H,H-2^C),5.58(dd,J_{3,4} = 10.4Hz,1H,H-3^C),5.07(s,2H,H-1^B H-1^C),20 4.78(d,J_{1,2} = 1.5Hz,1H,H-1A),1.46(d,J_{5,6} = 6.2Hz,3H,H-6^C),1.34(d,J_{5,6} = 6.5Hz,3H,H-6b),1.32ppm(d,J_{5,6} = 6.2Hz,3H,H-6^A);¹³C NMR(126MHz,CDCl₃): δ 174.0,165.2,164.9,137.6,137.4,133.4,133.2,129.8,129.7,129.5,129.3,128.5(x2),128.4,128.2,127.9,127.8,127.7,127.6,101.0,99.2,97.0,78.2,77.8,73.4,72.1,70.9,69.3,68.2,67.7,67.3,64.9,63.7,63.4,51.5,33.9,29.0,25.7,24.6,25 18.6(x2),18.5ppm;HRMS(ESI):m/z 计算值为C₅₃H₆₁N₉O₁₄Na[M+Na]⁺:1070.4230,实际值:1070.4233。

[0333] 5'-甲氧基羰基戊基4-叠氮基-3-O-苯甲酰基-2-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4-叠氮基3-O-苄基-4,6-二去氧- α -D-吡喃甘露糖苷(69)

[0334] 糖基供体53(0.168g,0.318mmol)和糖基受体66(0.118g,0.289mmol)的混合物(Saksena et al,(2005)Tetrahedron:Asymmetry 16,187-197)与新活化的分子筛(3 Å,0.350g)在氩气氛围下置于甲苯(3mL)中室温下搅拌2小时。再将其加热到95℃,再加入TMSOTf(12 μ mL,0.064mmol),而将该所得的混合物另外再搅拌1小时。然后加入三乙胺(1mL),将固体滤出,而残留物用二氯甲烷(3x30mL)洗涤。将合并的滤液(100mL)用20%的碳酸氢钠溶液(50mL)洗涤,再用水(30mL)洗,最后用盐水(20mL)洗。分离有机相,用硫酸镁干燥,之后真空浓缩。所得残留物用硅胶色谱柱(乙酸乙酯-甲苯梯度洗

脱) 纯化, 得到标题所述化合物 (0.203g, 91%), 其为白色泡沫状物质。化合物 69 的分析数据为: $R_f = 0.40$ (乙酸乙酯 / 甲苯, 0.5/9.5, v/v); $[\alpha]_D^{21} = -4.4$ ($c = 1.2$, CHCl_3); NMR (500MHz, CDCl_3): δ 7.00–8.06 (m, 15H, H-Ar), 5.30 (dd, $J_{3,4} = 9.9\text{Hz}$, 1H, H-3^B), 5.07–10 (d, $J_{1,2} = 1.7\text{Hz}$, 1H, H-1^B), 4.70 (d, $J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, 1H, H-1A), 3.69 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 1.39 (d, $J: 5.9\text{Hz}$, 3H, H-6^A), 1.34ppm (d, $J = 5.7\text{Hz}$, 3H, H-6^B); ^{13}C NMR (126MHz, CDCl_3): δ 174.0, 165.4, 137.4, 137.3, 133.2, 129.8, 129.5, 128.5, 128.4, 128.2, 127.8, 127.6, 99.1, 98.8, 78.6, 74.4, 73.3, 72.8, 72.6, 72.5, 67.6, 67.4, 67.3, 64.3, 63.1, 51.5, 33.9, 29.1, 25.7, 24.7, 18.5 (x2) ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为: $\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 795.3324, 实际值: 795.3314。

[0335] 5'-甲氧基羰基戊基 4-叠氮基-2-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷 (70)

[0336] 甲醇钠 (0.5mL, 0.5M 的溶液) 被加入到 69 (0.910g, 1.178mmol) 的甲醇 (20mL) 溶液中直至 pH 值变为 9, 而将所得的混合物在氩气保护下在室温下搅拌 4 小时。之后, 将该反应混合物用 Amberlite IR 120 氢离子交换树脂中和, 将固体滤出, 接着用甲醇洗涤。将合并的滤液真空浓缩, 并用硅胶色谱柱 (乙酸乙酯-甲苯梯度洗脱) 纯化, 得到标题所述化合物 (0.755g, 96%), 其为油状物质。化合物 70 的分析数据为: $R_f = 0.50$ (乙酸乙酯 / 甲苯, 1/9, v/v); $[\alpha]_D^{21} = +43.2$ ($c = 1.2$, CHCl_3); ^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ 7.11–7.41 (m, 10H, H-Ar), 5.11 (d, $J_{\text{H}2} = 1.3\text{Hz}$, 1H, H-1^B), 4.65 (d, $J_{1,2} = 2.0\text{Hz}$, 1H, H-1a), 3.68 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 1.30 (d, $J_{5,6} = 6.5\text{Hz}$, 3H, H-6^A), 1.29ppm (d, $J_{5,6} = 6.2\text{Hz}$, 3H, H-6^B); ^{13}C NMR (126MHz, CDCl_3): δ 174.0, 137.3, 137.1, 128.5, 128.2, 128.1, 128.0, 98.8, 97.9, 78.5, 76.5, 72.9, 72.6, 72.1, 69.8, 67.5, 30, 67.2, 67.1, 66.4, 64.6, 51.5, 33.9, 29.0, 25.7, 24.7, 18.5, 18.4ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_9\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 691.3062, 实际值: 691.3054。

[0337] 5'-甲氧基羰基戊基-4-叠氮基 2,3-二-0-苄甲酰基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 3)-4-叠氮基-2-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷 (71)

[0338] 糖基供体 53 (0.124g, 0.230mmol) 和糖基受体 70 (0.140g, 50.210mmol) 的混合物与新活化的分子筛 (3 Å, 0.5g) 在氩气氛围下置于二氯甲烷 (4mL) 中室温下搅拌 5 小时。再加入 TMSOTf (8 μL , 0.046mmol), 而将该所得的混合物另外再搅拌 1 小时。然后加入三乙胺 (1mL), 将固体滤出, 而残留物用二氯甲烷 (3x 20mL) 洗涤。将合并的滤液 (80mL) 用 20% 的碳酸氢钠溶液 (50mL) 洗涤, 再用水 (30mL) 洗, 最后用盐水 (20mL) 洗。分离有机相, 用硫酸镁干燥, 之后真空浓缩。所得残留物用硅胶色谱柱 (乙酸乙酯-甲苯梯度洗脱) 纯化, 得到标题所述化合物 (0.210g, 96%), 其为白色泡沫状物质。化合物 71 的分析数据为: $R_f = 0.40$ (乙酸乙酯 / 甲苯, 0.5/9.5, v/v); $[\alpha]_D^{21} = -29.0$ ($c = 1.2$, CHCl_3); ^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ 7.22–8.07 (m, 20H, H-Ar), 5.70 (dd, $J_{2,3} = 3.4\text{Hz}$, 1H, H-2^C), 5.59 (dd, $J_{3,4} = 9.8\text{Hz}$, 1H, H-3^C), 5.26 (d, $J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, 1H, H-1^C), 5.10 (d, $J_{1,2} = 1.6\text{Hz}$, 1H, H-1^B), 4.67 (d, $J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, 1H, H-1A), 3.68 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 1.35 (d, $J_{5,6} = 6.0\text{Hz}$, 3H, H-6^C), 1.29 (d, $J = 6.0\text{Hz}$, 3H, H-6^A), 1.28ppm (d, $J = 6.0\text{Hz}$, 3H, H-6^B); ^{13}C NMR (126MHz, CDCl_3): δ 174.0, 165.2, 165.0, 137.4, 137.3, 133.4, 133.2, 20, 129.8 (x2), 129.4, 129.3, 128.6, 128.5 (x2), 128.3, 128.2, 128.1, 127.8, 127.6,

99. 1, 98. 4, 78. 4, 77. 6, 76. 1, 73. 4, 72. 4, 71. 8, 70. 7, 69. 8, 68. 2, 67. 7, 67. 5, 67. 1, 64. 7, 63. 3, 51. 5, 33. 9, 29. 0, 25. 7, 24. 7, 18. 6(x2), 18. 5ppm; HRMS (ESI) :m/z 计算值为 $C_{53}H_{61}N_9O_{14}Na$ $[M+Na]^+$:1070. 4230, 实际值 :1070. 4249。

[0339] 5'-甲氧羰基戊基-4-叠氮基-2,3-二-O-苯甲酰基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)-4-叠氮基-2-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(72)

[0340] 糖基供体 63(0. 208g, 0. 296mmol) 和糖基受体 70(0. 180g, 0. 269mmol) 的混合物与新活化的分子筛(3 Å, 0. 5g) 在氩气氛围下置于二氯甲烷(4mL) 中室温下搅拌 4 小时。再加入 MeOTf(213 μ L, 1. 88mmol), 而将该所得的混合物另外再搅拌 48 小时。然后加入三乙胺(1mL), 将固体滤出, 而残留物用二氯甲烷(3x 20mL) 洗涤。将合并的滤液(70mL) 用 20% 的碳酸氢钠溶液(40mL) 洗涤, 再用水(30mL) 洗, 最后用盐水(20mL) 洗。分离有机相, 用硫酸镁干燥, 之后真空浓缩。所得残留物用硅胶色谱柱(乙酸乙酯-甲苯梯度洗脱) 纯化, 得到标题所述化合物(0. 321g, 91%), 其为白色泡沫状物质。化合物 72 的分析数据为: $R_f = 0. 30$ (乙酸乙酯/甲苯, 50. 5/9. 5, v/v); $[\alpha]_D = -17. 9$ (c = 1. 0, $CHCl_3$); NMR(600MHz, $CDCl_3$): δ 7. 05-8. 0(m, 25H, H-Ar), 5. 71(dd, $J_{2,3} = 3. 3$ Hz, 1H, H-2^D), 5. 58(dd, $J_{3,4} = 10. 3$ Hz, 1H, H-3^D), 5. 09(d, $J_{1,2} = 1. 5$ Hz, 1H, H-1^B), 5. 07(d, $J_{1,2} = 1. 6$ Hz, 1H, H-1^C), 5. 04(d, $J_{1,2} = 1. 6$ Hz, 1H, H-1d), 1. 31-1. 35(m, 6H, H-6^A, H-6^B), 1. 26ppm(d, $J_{5,6} = 6. 2$ Hz, 3H, H-6^C); ^{13}C NMR(126MHz, $CDCl_3$): δ 174. 0, 165. 2, 164. 8, 137. 5, 137. 4, 137. 3, 10-133. 3, 133. 2, 129. 8, 129. 7, 129. 5, 129. 3, 128. 5(x2), 128. 4, 128. 3, 128. 2, 128. 0, 127. 8(x2), 127. 7, 127. 6, 100. 8, 99. 2, 98. 8, 98. 3, 78. 4, 77. 9, 77. 4, 76. 4, 73. 7, 73. 2, 72. 5, 71. 9, 70. 9, 69. 3, 68. 1, 67. 9, 67. 7, 67. 5, 67. 2, 64. 6, 63. 6, 63. 4, 51. 5, 33. 9, 29. 1, 24. 7, 18. 6(x2), 18. 5ppm; HRMS (ESI) :m/z 计算值为 $C_{66}H_{76}N_{12}O_{17}Na$ $[M+Na]^+$:1331. 5344, 实际值 :1331. 5341。

[0341] 5'-甲氧羰基戊基-4-叠氮基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)-4-叠氮基-2-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(67a)

[0342] 甲醇钠(0. 2mL, 0. 5M 的溶液) 被加入到 67(0. 350g, 0. 445mmol) 的乙醇(5mL) 溶液中, 直到 pH 值变为 9, 而将所得的混合物在氩气氛围中在室温下搅拌 4 小时。然后, 将该反应混合物用 Amberlite IR 120 氢离子交换树脂中和, 将树脂滤出, 而残留物用甲醇洗涤。将合并的滤液真空浓缩, 所得残留物用硅胶色谱柱(乙酸乙酯-甲苯梯度洗脱) 纯化, 得到标题所述化合物(0. 221g, 86%), 其为白色泡沫状物质。化合物 67a 的分析数据为: $R_f = 0. 50$ (CH_3OH/CH_2Cl_2 , 0. 5/9. 5, v/v); $[\alpha]_D^{21} = +73. 4$ (c = 1. 0, $CHCl_3$); NMR(500MHz, $CDCl_3$): δ 7. 28-7. 41(m, 5H, H-Ar), 5. 07(s, 1H, H-1^B), 4. 78(s, 1H, H-1^A), 1. 32(d, $J_{5,6} = 6. 2$ Hz, 3H, H-6^A), 1. 27ppm(d, $J_{5,6} = 6. 2$ Hz, 3H, H-6^B); ^{13}C NMR(126MHz, $CDCl_3$): δ 174. 1, 137. 6, 128. 5, 127. 9, 127. 6, 101. 5, 96. 9, 78. 3, 76. 9, 72. 4, 70. 3, 70. 2, 67. 7, 67. 5, 67. 3, 65. 7, 64. 7, 51. 5, 33. 9, 29. 0, 25. 7, 24. 6, 18. 5, 18. 3ppm; HRMS (ESI) :m/z 计算值为 $C_{26}H_{38}N_6O_9Na$ $[M+Na]^+$:601. 2592, 实际值 :30 601. 2581。

[0343] 5'-甲氧羰基戊基-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖苷(44)

[0344] 将硫化氢气体鼓泡至搅拌着的 67a (0.150g, 0.259mmol) 的吡啶 (5mL) 与水 (2mL) 的混合物的溶液中, 在 40°C 下持续 0.5 小时, 并接着持续搅拌 16 小时。然后通氩气鼓泡至该溶液中持续 10 分钟, 将溶剂真空蒸干, 并将残留物与甲苯 (3x10mL) 共蒸, 然后干燥。高分辨率质谱分析显示相应胺化合物 67b 的反应的完成, 并且没有还原不完全而产生的产品。HRMS (ESI): m/z 计算值为 $C_{26}H_{43}N_2O_9[M+H]^+$: 527.2963; 实际值: 527.2964。此粗产品被直接用于甲酰化反应。

[0345] 在 -20°C 下, 甲醇 (5mL) 中的化合物 67b 被加入了一种新制备的甲酸酐²² (5ml, 乙醚溶液) 并搅拌 3 小时, 随后缓慢地升温至室温。然后, 溶剂被蒸出, 而将该残留物过硅胶色谱柱 (甲醇 - 二氯甲烷梯度洗脱), 得到二糖 67c。HRMS (ESI): m/z 计算值为 $C_{28}H_{42}N_2NaO_{11}[M+Na]^+$: 605.2681; 实际值: 605.2675。

[0346] 将化合物 67c 溶解于 CH_3OH/H_2O (2:1, 6mL) 中, 向其中加入了碳上的 $Pd(OH)_2$ (20%, 0.050g)。随后在室温下将其在氢气的压力下搅拌 16 小时。通过硅藻土过滤并用甲醇 (3x10mL) 清洗后, 再将溶剂真空蒸除。将所述残留物用硅胶色谱纯化 (甲醇 - 二氯甲烷梯度洗脱), 得到标题所述的化合物 (0.075g, 超过 3 步的收率为 59%), 其为白色泡沫状物质。44 的分析数据为: Rf = 0.20 (CH_3OH/CH_2Cl_2 , 1.5/8.5, v/v); 1H NMR (700MHz, D_2O): δ 8.21 (d, J = 15.4Hz) and 8.03 (d, J = 13.3Hz), 2H, NCHO), 4.81-4.95 (m, 2H, 2x H-1), 3.70 (s, 3H, -OCH₃), 1.20-1.30ppm (m, 6H, 2x H-6); ^{13}C NMR (126MHz, D_2O): δ 178.5, 168.9, 168.8, 165.8, 165.7, 103.3, 103.2, 100.6, 100.5, 77.8 (x2), 70.2, 70.0, 69.9 (x2), 68.9 (x2), 68.8 (x2), 68.6, 68.4, 68.2, 67.8, 57.6, 56.5, 53.1, 52.7, 52.6, 51.6, 29.1, 25.9, 25.0, 17.8, 17.7, 17.6ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 $C_{21}H_{36}N_2O_{11}Na[M+Na]^+$: 515.2211, 实际值: 515.2210。

[0347] (2'-氨基乙基酰氨基) 羧基戊基-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 3)4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖苷 (81)。

[0348] 在新蒸出的 1,2-二氨基乙烷 (0.5mL) 中的 44 (0.009g, 0.018mmol) 的溶液, 在 65°C 下搅拌 48 小时。然后将过量的试剂在真空中除去, 并将残留物与甲醇共蒸 (3x 10mL) 并干燥。该残留物用反相 HPLC 在 C18 柱上用水 - 乙腈进行梯度洗脱以完成纯化, 再冷冻干燥, 得到标题所述的化合物 (0.0075g, 79%), 其为一种白色泡沫状物质。化合物 81 的分析数据为: Rf = 0.15 (CH_3OH/CH_2Cl_2 , 1/1, v/v); 1H NMR (700MHz, D_2O): δ 8.19-8.22 (Z) and 8.01-8.02 (E) (m, 2H, NCHO), 4.80-4.95 (m, 2H, 2x H-1), 1.19-1.30 (m, 6H, 2x H-6); ^{13}C NMR (126MHz, D_2O): δ 178.4, 168.9, 168.8, 165.8, 165.7, 103.6, 103.3 (x2), 100.6, 100.5, 77.8, 77.4, 71.1, 70.4, 70.2, 70.0, 69.8, 69.0, 68.8 (x3), 68.6, 68.4, 68.2, 67.8, 57.6, 56.5, 54.5, 52.6, 51.8, 51.6, 41.7, 41.4, 40.7, 36.7, 29.2, 26.0, 25.9, 17.9, 17.8, 17.7 (x2) ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 $C_{22}H_{40}N_4O_{10}Na[M+Na]^+$: 543.2637, 实际值: 543.2642。

[0349] 1-[(2'-氨基乙基酰氨基) 羧基戊基-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 3)4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖]-2-丁环丁烯-3,4-二酮 (87)

[0350] 向搅拌着的 81 (0.0075g, 0.014mmol) 的水 (0.5mL) 和乙醇 (0.4mL) 溶液中加入 3,4-二丁氧基-3-环丁烯-1,2-二酮 (20% 的乙醇溶液, 70 μ L) 的溶液, 并通过小心地加入 1% 的碳酸氢钠溶液将 pH 调节至 8。0.5 小时后, TCL 显示反应完全; 将该

反应混合物用(10%)乙酸中和,并真空浓缩。所得残留物用反相 HPLC 在 C18 柱上用水-乙腈梯度洗脱,进行纯化,并冷冻干燥,得到标题所述的化合物(0.0089g, 92%),其为白色泡沫状物质。87 的分析数据为:Rf = 0.20(甲醇/二氯甲烷, 1.5/8.5, v/v); ^1H NMR(500MHz, D_2O): δ 8.26-8.30(Z) and 8.09-8.12(E) (m, 2H, NCHO), 4.83-5.03(m, 2H, 2x H-1), 1.26-1.37(m, 6H, 2x H-6), 0.99-1.05ppm(m, 3H, $-\text{CH}_3$); ^{13}C NMR(126MHz, D_2O): δ 189.8, 189.6, 184.3(x2), 178.5, 178.1, 178.0, 177.9, 174.8, 174.7, 168.8, 165.8, 165.7, 103.3, 103.2, 100.5(x2), 77.8, 75.4, 75.3, 70.2, 70.0, 69.9, 30.69.0, 68.9(x2), 68.8, 68.7, 68.6, 68.4, 68.2, 67.7, 57.6, 56.5, 52.7, 52.6, 51.7, 45.2, 40.3, 40.2, 36.7, 32.4, 31.2, 29.3(x2), 26.2, 26.1, 25.9(x2), 19.1, 19.0, 17.8(x2), 17.7, 13.9ppm; HRMS(ESI): m/z 计算值为 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_{13}\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 695.3110, 实际值: 695.3113。

[0351] 5'-甲氧羰基戊基-4-叠氮基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)-4-叠氮基-2-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(68a)

[0352] 甲醇钠(0.2mL, 0.5M 的溶液)被加入到 68(0.352g, 50.336mmol) 的甲醇(5mL) 溶液中,直至 pH 变为 9,而所得混合物在氩气氛围下在室温下搅拌 4 小时。随后将该反应混合物用 Amberlite IR 120 氢离子交换树脂中和,将树脂滤出并接着用甲醇洗涤。将合并的滤液真空浓缩,所得残留物用硅胶色谱柱(乙酸乙酯-甲苯梯度洗脱)纯化,得到标题所述化合物(0.256g, 91%),其为灰白色泡沫状物质。化合物 68a 的分析数据为:Rf = 0.30(乙酸乙酯/甲苯, 1/4, v/v); $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = +72.4$ (c = 1.0, CHCl_3); ^1H NMR(500MHz, CDCl_3): δ 7.27-7.39(m, 10H, H-Ar), 5.02(s, 1H, H-1^B), 4.93(s, 1H, H-1^C), 4.77(s, 1H, H-1^A), 3.67(s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 1.24ppm(d, $J_{5,6} = 6.2\text{Hz}$, 3H, H-6^C); ^{13}C NMR(126MHz, CDCl_3): δ 174.0, 137.6, 137.4, 128.6, 128.5, 15.128.1, 127.9, 127.5, 101.0(x2), 97.0, 78.3, 77.8, 73.1, 72.5, 72.1, 70.2, 69.9, 67.9, 67.6, 67.4, 67.3, 65.8, 64.8, 64.0, 51.5, 33.9, 29.0, 25.6, 24.6, 18.6, 18.5, 18.3ppm; HRMS(ESI): m/z 计算值为 $\text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{N}_9\text{O}_{12}\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 862.3706, 实际值: 862.3691。

[0353] 5'-甲氧羰基戊基-4,6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4,6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)-4,6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖苷(44)

[0354] 将硫化氢气体鼓泡至搅拌着的 68a(0.114g, 0.136mmol) 的吡啶(5mL) 与水(2mL) 的混合物的溶液中,在 40 $^\circ\text{C}$ 下持续 0.5 小时,并接着持续搅拌 16 小时。然后通氩气鼓泡至该溶液中持续 10 分钟,将溶剂真空蒸干,并将残留物与甲苯(3x10mL) 共蒸,然后干燥。高分辨率质谱分析显示相应胺化合物 68b 的反应的完成,并且没有还原不完全而产生的产品。HRMS(ESI): m/z 计算值为 $\text{C}_{39}\text{H}_{60}\text{N}_3\text{O}_{12}[\text{M}+\text{H}]^+$: 762.4172; 实际值: 762.4171。此粗产品被直接用于甲酰化反应。

[0355] 在 -20 $^\circ\text{C}$ 下,甲醇(5mL) 中的化合物 68b 被加入了一种新制备的甲酸酐²²(5ml, 乙醚溶液) 并搅拌 3 小时,随后缓慢地升温至室温。然后,溶剂被蒸出,而将该残留物过硅胶色谱柱(甲醇-二氯甲烷梯度洗脱),得到二糖 68c。HRMS(ESI): m/z 计算值为 $\text{C}_{42}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 868.3838; 实际值: 868.3827。

[0356] 将化合物 68c 溶解于 $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (2:1, 5mL) 中,向其中加入了碳上的 $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (20%, 0.040g)。随后在室温下将其在氢气的压力下搅拌 16 小时。通过硅藻土

过滤并用甲醇 (3x10mL) 清洗后,再将溶剂真空蒸除。将所述残留物用硅胶色谱纯化 (甲醇-二氯甲烷梯度洗脱),得到标题所述的化合物 (0.046g, 超过 3 步的收率为 51%), 其为白色泡沫状物质。45 的分析数据为: $R_f = 0.40$ (CH₃OH/CH₂Cl₂, 3/7, v/v); ¹H NMR (700MHz, D₂O): δ 8.20-8.24 (Z) 10 and 8.02-8.06 (E) (m, 3H, NCHO), 4.82-5.08 (m, 3H, 3x H-1), 1.21-1.32 ppm (m, 9H, 3x H-6); ¹³C NMR (126MHz, D₂O): δ 178.5, 168.8, 168.7, 165.8 (x2), 165.6 (x2), 103.4, 103.3, 102.9, 101.8, 101.7, 100.6, 100.5, 79.0 (x2), 78.9, 78.2, 78.0, 77.7 (x3), 70.0, 69.9, 69.8, 69.4, 69.2, 69.0, 68.9 (x2), 68.8 (x2), 68.7, 68.6 (x2), 68.5 (x2), (x2), 67.9, 67.7, 57.8, 57.7, 56.4, 53.1, 52.8, 52.7, 51.9, 34.6, 29.1, 25.9, 25.0, 15.18.1, 17.9 (x3), 17.8, 17.7 ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 C₂₈H₄₇N₃O₁₅Na [M+Na]⁺: 688.2899, 实际值: 688.2895。

[0357] (2'-氨基乙基酰氨基) 羧基戊基-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 3) 4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖苷 (82)

[0358] 45 (0.012g, 0.018mmol) 在新蒸馏的 1,2-二氨基乙烷 (0.5mL) 中的溶液, 在 65°C 下搅拌 48 小时。然后将过量的试剂在真空中除去, 并将残留物与甲醇共蒸 (3x 10mL) 并干燥。该残留物用反相 HPLC 在 C18 柱上用水-乙腈进行梯度洗脱以完成纯化, 再冷冻干燥, 得到标题所述的化合物 (0.0112g, 90%), 其为一种白色泡沫状物质。化合物 82 的分析数据为: $R_f = 0.10$ (甲醇/二氯甲烷, 1/1, v/v); ¹H NMR (500MHz, D₂O): δ 8.26-8.31 (Z) and 8.08-8.13 (E) (m, 3H, NCHO), 4.88-5.16 (m, 3H, 3x H-1), 1.20-1.37 (m, 9H, 3x H-6); ¹³C NMR (126MHz, D₂O): δ 178.4, 178.2, 168.8 (x2), 165.9, 165.8, 165.6 (x3), 103.3 (x2), 101.7 (x2), 100.5 (x2), 79.0, 77.7, 70.0, 69.9, 69.2, 69.0, 68.9, 68.8, 68.6, 68.4, 68.0, 67.7, 57.8, 57.7, 52.8, 52.7, 51.9, 41.530 (x2), 41.5, 41.4, 40.9, 40.6 (x2), 36.6, 29.2, 26.0 (x2), 25.9, 25.8, 18.1, 18.0, 17.9 (x3), 17.7 ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 C₂₉H₅₁N₅O₁₄Na [M+Na]⁺: 716.3325, 实际值: 716.3311。

[0359] 1-[(2'-氨基乙基氨基) 羧基戊基-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 3) 4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖苷]-2-丁氧基环丁烯-3,4-二酮 (88)

[0360] 向搅拌着的 82 (0.0075g, 0.011mmol) 的水 (0.5mL) 和乙醇 (0.4mL) 溶液中加入 3,4-二丁氧基-3-环丁烯-1,2-二酮 (20% 的乙醇溶液, 50 μ L) 的溶液, 并通过小心地加入 1% 的碳酸氢钠溶液将 pH 调节至 8。0.5 小时后, TCL 显示反应完全; 将该反应混合物用 (10%) 乙酸中和, 并真空浓缩。所得残留物用反相 HPLC 在 C18 柱上用水-乙腈梯度洗脱, 进行纯化, 并冷冻干燥, 得到标题所述的化合物 (0.0065g, 71%), 其为白色泡沫状物质。88 的分析数据为: $R_f = 0.20$ (甲醇/二氯甲烷, 1/4, v/v); ¹H NMR (500MHz, D₂O): δ 8.27-8.31 (Z) and 8.08-8.13 (E) (m, 3H, NCHO), 4.86-5.15 (m, 3H, 3x H-1), 1.26-1.36 (m, 9H, 3x H-6), 0.98-1.05 ppm (m, 3H, -CH₃); ¹³C NMR (126MHz, D₂O): δ 189.8, 189.6, 184.3 (x2), 178.5, 178.1, 178.0, 177.9, 174.8, 174.7, 168.8, 168.7, 165.8 (x2), 165.6, 103.4, 103.3, 102.9, 101.8, 101.7, 100.6, 100.5, 79.0, 78.8, 78.2, 78.0, 77.7 (x2), 75.4, 75.3, 70.0, 69.9, 69.3, 69.2, 69.0, 68.9, 68.9, 68.8, 68.6, 68.5 (x2), 68.4, 68.3, 67.9, 67.7, 57.8, 57.7, 56.5, 52.8, 52.8, 52.7, 51.9, 45.0, 40.3, 40.2, 36.7, 32.4, 29.3 (x2), 26.2, 26.

1, 25.9(x2), 19.1, 19.0, 18.1, 17.9(x3), 17.7, 13.9ppm; HRMS(ESI): m/z 计算值为 $C_{37}H_{59}N_5O_1$, $Na[M+Na]^+$: 868.3798, 实际值: 868.3800。

[0361] 5'-甲氧羰基戊基-4-叠氮基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)-4-叠氮基-2-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(71a)。

[0362] 甲醇钠(0.5mL, 0.5M的溶液)被加入到71(0.458g, 0.473mmol)的甲醇(5mL)溶液中,直至pH变为9,而所得混合物在氩气氛围下在室温下搅拌4小时。随后将该反应混合物用Amberlite IR 120氢离子交换树脂中和,将树脂滤出并接着用甲醇洗涤。将合并的滤液真空浓缩,所得残留物用硅胶色谱柱(乙酸乙酯-甲苯梯度洗脱)纯化,得到标题所述化合物(0.341g, 93%),其为灰白色泡沫状物质。化合物68a的分析数据为: $R_f = 0.30$ (乙酸乙酯/甲苯, 1/4, v/v); $[\alpha]_D^{21} = +58.9$ ($c = 1.3$, $CHCl_3$); NMR(500MHz, $CDCl_3$): δ 7.12-7.39(m, 10H, H-Ar), 5.08(d, $J_{1,2} = 18$ Hz, 1H, H-1^B), (d, $J_{1,2} = 1.6$ Hz, 1H, H-1^C), 4.66(d, $J_{1,2} = 1.6$ Hz, 1H, H-1A), 3.68(s, 3H, -OCH₃), 1.28-1.32(m, 6H, H-6^A, H-6^B), 1.19ppm(d, $J_{5,6} = 6.2$ Hz, 3H, H-6^C); ¹³C NMR(126MHz, $CDCl_3$): δ 174.1, 137.3(x2), 128.5, 128.4, 128.2, 128.1, 127.8, 101.5, 98.8, 98.1, 78.4, 77.5, 76.4, 73.2, 72.6, 71.7, 70.1, 70.0, 67.9, 67.5, 67.4, 65.5, 64.7, 64.4, 51.5, 33.9, 29.0, 25.7, 24.6, 18.6, 18.5, 18.2ppm; HRMS(ESI): m/z 计算值为 $C_{39}H_{53}N_9O_{12}Na[M+Na]^+$: 862.3706, 实际值: 862.3700。

[0363] 5'-甲氧羰基戊基-4,6-脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖苷(46)

[0364] 将硫化氢气体鼓泡至搅拌着的71a(0.157g, 0.187mmol)的吡啶(5mL)与水(2mL)的混合物的溶液中,在40°C下持续0.5小时,并接着持续搅拌16小时。然后通氩气鼓泡至该溶液中持续10分钟,将溶剂真空蒸干,并将残留物与甲苯(3x10mL)共蒸,然后干燥。高分辨率质谱分析显示相应胺化合物71b的反应的完成,并且没有还原不完全而产生的产品。HRMS(ESI): m/z 计算值为 $C_{39}H_{60}N_3O_{12}[M+H]^+$: 762.4172; 实际值: 762.4182。此粗产品被直接用于甲酰化反应。

[0365] 在-20°C下,甲醇(5mL)中的化合物71b被加入了一种新制备的甲酸酐²²(5mL, 乙醚溶液)并搅拌3小时,随后缓慢地升温至室温。然后,溶剂被蒸出,而将该残留物过硅胶色谱柱(甲醇-二氯甲烷梯度洗脱),得到二糖71c。HRMS(ESI): m/z 计算值为 $C_{42}H_{59}N_3O_{15}Na[M+Na]^+$: 868.3838; 实际值: 868.3834。

[0366] 将化合物71c溶解于 CH_3OH/H_2O (2:1, 5mL)中,向其中加入了碳上的Pd(OH)₂(20%, 0.050g)。随后在室温下将其在氢气的压力下搅拌16小时。通过硅藻土过滤并用甲醇(3x10mL)清洗后,再将溶剂真空蒸除。将所述残留物用硅胶色谱纯化(甲醇-二氯甲烷梯度洗脱),得到标题所述的化合物(0.053g, 超过3步的收率为43%),其为白色泡沫状物质。46的分析数据为: $R_f = 0.50$ (甲醇/二氯甲烷, 3/7, v/v); NMR(700MHz, D_2O): δ 8.20-8.24(Z) 30and 8.02-8.06(E) (m, 3H, N-Ci/O), 4.92-5.04(m, 3H, 3x H-1), 3.70(s, 3H, -OCH₃), 1.22-1.31ppm(m, 9H, 3x H-6); ¹³C NMR(176MHz, D_2O): δ 178.3, 168.7, 168.6, 165.6(x2), 165.5, 103.1, 102.9(x2), 102.8, 102.7(x2), 99.0(x3), 78.6(x2), 77.3, 77.2, 77.1, 70.1, 70.0, 69.8, 69.5, 69.4, 68.9, 68.8(x2), 68.7(x2), 68.6(x2), 68.5(x2), 68.4(x2), 68.3, 6

8. 2, 67. 8, 57. 7, 57. 4, 56. 3, 52. 9, 52. 8, 52. 4, 51. 3, 28. 9, 25. 7, 24. 8, 17. 6(x2), 17. 5, 17. 4 ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 $C_{28}H_{47}N_3O_{15}Na [M+Na]^+$: 688. 2899, 实际值: 688. 2893。

[0367] (2'-氨基乙基酰氨基) 羰基戊基-4, 6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)4, 6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4, 6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖苷(83)

[0368] 46(0. 010g, 0. 015mmol) 在新蒸馏的 1, 2-二氨基乙烷(0. 5mL) 中的溶液, 在 65 $^{\circ}C$ 下搅拌 48 小时。然后将过量的试剂在真空中除去, 并将残留物与甲醇共蒸(3x 10mL) 并干燥。该残留物用反相 HPLC 在 C18 柱上用水-乙腈进行梯度洗脱以完成纯化, 再冷冻干燥, 得到标题所述的化合物(0. 0084g, 81%), 其为一种白色泡沫状物质。化合物 83 的分析数据为: Rf = 0. 10(甲醇/二氯甲烷, 1/1, v/v); NMR(500MHz, D_2O): δ 8. 26-8. 31(Z) 和 8. 09-8. 13(E) (m, 3H, NCM), 4. 98-5. 11(m, 3H, 315xH-1), 1. 26-1. 38ppm(m, 9H, 3x H-6); ^{13}C NMR(126MHz, D_2O): δ 177. 7, 177. 2, 167. 9, 167. 8, 164. 9, 164. 8, 164. 6, 102. 4, 102. 2(x2), 102. 1, 101. 9(x2), 98. 3, 77. 9, 77. 8(x3), 76. 8, 76. 5(x2), 76. 4, 76. 2, 70. 0, 69. 9, 69. 5, 69. 3, 69. 0, 68. 8(x2), 68. 7, 68. 2, 68. 1, 68. 0(x2), 67. 9, 67. 8(x2), 67. 7, 67. 6(x2), 67. 5, 67. 1, 57. 0, 55. 5, 53. 5, 52. 0, 51. 7(x2), 51. 6, 50. 7, 50. 6(x2), 40. 4, 39. 9, 39. 5, 39. 0, 35. 7, 35. 6, 28. 2, 25. 1, 24. 9(x2), 17. 0, 16. 9, 16. 7(x2) ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 $C_{29}H_{51}N_5O_{14}Na [M+Na]^+$: 716. 3325, 实际值: 716. 3322。

[0369] 1-[(2'-R-氨基乙基酰氨基) 羰基戊基-4, 6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)-4, 6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4, 6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖苷]-2-丁氧基环丁烯-3, 4-二酮(89)

[0370] 向搅拌着的 83(0. 0074g, 0. 0106mmol) 的水(0. 5mL) 和乙醇(0. 4mL) 溶液中加入 3, 4-二丁氧基-3-环丁烯-1, 2-二酮(20%的乙醇溶液, 50 μ L) 的溶液, 并通过小心地加入 1%的碳酸氢钠溶液将 pH 调节至 8. 0. 5 小时后, TCL 显示反应完全; 将该反应混合物用(10%) 乙酸中和, 并真空浓缩。所得残留物用反相 HPLC 在 C18 柱上用水-乙腈梯度洗脱, 进行纯化, 并冷冻干燥, 得到标题所述的化合物(0. 0072g, 80%), 其为白色泡沫状物质。89 的分析数据为: Rf = 0. 20(甲醇/二氯甲烷, 1/4, v/v); 1H NMR(500MHz, D_2O): δ 8. 16-8. 21(Z) and 7. 99-8. 03(E) (m, 3H, NCHO), 4. 87-5. 01(m, 3H, 3x H-1), 1. 18-1. 27(m, 9H, 3x H-6); ^{13}C NMR(126MHz, D_2O): δ 189. 8, 189. 6, 184. 2, 178. 0, 177. 9(x2), 174. 8, 174. 7, 168. 8, 168. 7, 166. 6, 165. 8, 165. 7, 103. 1, 99. 1(x2), 78. 7, 77. 4(x2), 75. 4, 75. 3, 70. 2, 69. 7, 69. 6, 69. 1, 69. 0, 68. 9, 68. 7(x3), 68. 5, 68. 4, 53. 0, 52. 6, 51. 5, 45. 1, 44. 9, 40. 3, 40. 1, 36. 7, 32. 4, 29. 2, 26. 1, 26. 0, (x2), 19. 0(x2), 17. 8(x3), 17. 6, 13. 9ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值为 $C_{37}H_{59}N_5O_{17}Na [M+Na]^+$: 868. 3798, 实际值: 868. 3791。

[0371] 5'-甲氧基羰基戊基-4-叠氮基-4, 6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4-叠氮基-3-0-苄基-4, 6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)-4-叠氮基-2-0-苄基-4, 6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)4-叠氮基-3-0-苄基-4, 6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(72a)

[0372] 甲醇钠(0. 5mL, 0. 5M 的溶液) 被加入到 72(0. 391g, 0. 299mmol) 的甲醇/THF 混合(4:115mL) 溶液中, 直至 pH 变为 9, 而所得混合物在氩气氛围下在室温下搅拌 5 小时。随后将该反应混合物用 Amberlite IR 120 氢离子交换树脂中和, 将树脂

滤出并接着用甲醇洗涤。将合并的滤液真空浓缩,所得残留物用硅胶色谱柱(乙酸乙酯-甲苯梯度洗脱)纯化,得到标题所述化合物(0.311g, 95%),其为油状物质。化合物 72a 的分析数据为:Rf = 0.40(乙酸乙酯/甲苯, 1/4, v/v); $[\alpha]_D^{21} = +51.2$ (c = 20 1.0, CHCl₃); ¹H NMR(500MHz, CDCl₃): δ 7.10-7.39(m, 15H, H-Ar), 5.07(d, 2 = Hz, 1H, H-1^B), 5.02(d, = 1.6Hz, 1H, H-1^C), 4.91(d, 4, 2 = 1.5Hz, 1H, H-1D), 4.66(d, J_{1,2} = 2.0Hz, 1H, H-1A), 3.68(s, 3H, -OCi/3), 1.26-1.35(m, 9H, H-6^A, H-6^B, H-6^C), 1.17ppm(d, J_{5,6} = 5.9Hz, 3H, H-6 °); ¹³C NMR(126MHz, CDCl₃): δ 174.0, 137.4, 137.3, 128.5, 128.4, 128.2, 128.0(x2), 127.8, 127.5, 101.0, 100.8, 98.8, 25 98.2, 78.4, 77.9, 77.5, 76.4, 73.2, 72.5, 72.1, 71.8, 70.0, 69.7, 67.9(x2), 67.5(x2), 65.8(x2), 64.7, 64.6, 63.9, 51.5, 33.9, 29.0, 25.7, 24.7, 18.6(x2), 18.5, 18.3ppm; HRMS(ESI): m/z 计算值为 C₅₂H₆₈N₁₂O₁₅Na[M+Na]⁺: 1123.4806, 实际值: 1123.4812。

[0373] 5'-甲氧羰基戊基-4,6-二脱氧-4-甲酰-α-D-吡喃甘露糖基(1→2)-4,6-二脱氧-4-甲酰-α-D-吡喃甘露糖基(1→3)-4,6-二脱氧-4-甲酰-α-D-吡喃甘露糖基(1→2)-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-α-D-吡喃甘露糖基(47)

[0374] 将硫化氢气体鼓泡至搅拌着的 72a(0.146g, 0.132mmol) 的吡啶(5mL) 与水(2mL) 的混合物的溶液中,在 40°C 下持续 0.5 小时,并接着持续搅拌 16 小时。然后通氩气鼓泡至该溶液中持续 10 分钟,将溶剂真空蒸干,并将残留物与甲苯(3x10mL) 共蒸,然后干燥。高分辨率质谱分析显示相应胺化合物 72b 的反应的完成,并且没有还原不完全而产生的产品。HRMS(ESI): mlz 计算值为 C₅₂H₇₇N₄O₁₅[M+H]⁺: 997.5380; 实际值: 997.5366。此粗产品被直接用于甲酰化反应。

[0375] 在 -20°C 下,甲醇(5mL) 中的化合物 72b 被加入了一种新制备的甲酸酐 01ah 等(5ml, 乙醚溶液) 并搅拌 3 小时(Angew(1979)Chem. Int. Ed. 18, 614), 随后缓慢地升温至室温。然后,溶剂被蒸出,而将该残留物过硅胶色谱柱(甲醇-二氯甲烷梯度洗脱),得到二糖 72c。HRMS(ESI): mlz 计算值为 C₅₆H₇₆N₄O₁₉Na[M+Na]⁺: 1131.4996; 实际值: 1131.4992。

[0376] 将化合物 72c 溶解于 CH₃OH/H₂O(2:1, 5mL) 中, 向其中加入了碳上的 Pd(OH)₂(20%, 0.050g)。随后在室温下将其在氢气的压力下搅拌 16 小时。通过硅藻土过滤并用甲醇(3x10mL) 清洗后,再将溶剂真空蒸除。将所述残留物用硅胶色谱纯化(甲醇-二氯甲烷梯度洗脱), 得到标题所述的化合物(0.068g, 超过 3 步的收率为 61%), 其为白色泡沫状物质。47 的分析数据为: Rf = 0.30(甲醇/二氯甲烷, 3/7, v/v); NMR(500MHz, D₂O): δ 8.26-8.33(Z) and 8.06-8.14(E) (m, 4H, NC O), 4.98-5.20(m, 4H, 4x H-1), 3.85-4.28(m, 16H, 4x H-2, 4x H-3, 4x H-4, 4x H-5), 1.28-1.39ppm(m, 12H, 4x H-6); ¹³C NMR(126MHz, D₂O): δ 178.5, 168.8, 168.7, 168.6, 165.8, 165.6, 103.3, 103.2, 102.9, 102.8, 102.7, 101.9, 101.6, 99.3, 99.2, 79.3, 78.9, 78.7, 78.5, 78.4, 78.1, 77.3, 69.9(x2), 3069.8, 69.7, 69.4, 69.3, 69.0, 68.9, 68.8(x2), 68.7, 68.6, 68.5, 68.4, 68.3, 68.0, 58.0, 56.5, 53.1, 52.9, 52.8, 52.7, 51.8, 34.6, 29.1, 25.9, 25.0, 18.1(x2), 18.0(x2), (x2), 17.8(x2), 17.7(x2) ppm; HRMS(ESI): m/z 计算值 C₃₅H₅₈N₄O₁₉Na[M+Na]⁺: 861.3587, 实际值: 861.3580。(2'-氨基乙基酰氨基)羰基戊基-4,6-二脱氧-4-甲酰-α-D-吡喃甘露糖基(1→2)-4,6-二脱氧-4-甲酰-α-D-吡喃甘露糖基(1→3)-4,6-二脱氧-4-5 甲酰-α-D-吡喃甘露糖基(1→2)-4,6-二脱氧-4-甲

酰氨基- α -D-吡喃甘露糖苷 (84)

[0377] 47(0.0134g, 0.016mmol) 在新蒸馏的 1,2-二氨基乙烷 (0.5mL) 中的溶液, 在 65°C 下搅拌 48 小时。然后将过量的试剂在真空中除去, 并将残留物与甲醇共蒸 (3x 10mL) 并干燥。该残留物用反相 HPLC 在 C18 柱上用水-乙腈进行梯度洗脱以完成纯化, 再冷冻干燥, 得到标题所述的化合物 (0.0113g, 82%), 其为一种白色泡沫状物质。化合物 84 的分析数据为: $R_f = 0.10$ (甲醇/二氯甲烷, 1/1, v/v); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, D_2O): δ 8.16-8.23 (Z) and 7.98-8.05 (E) (m, 4H, NCHO), 4.84-5.10 (m, 4H, 4x H-1), 2.22-2.28 (m, 2H, $-\text{CH}_{2f}$), 1.54-1.64 (m, 4H, $-\text{CH}_{2e}$, $-\text{CH}_{2c}$), 1.30-1.41 (m, 2H, $-\text{CH}_{2d}$), 1.18-1.30ppm (m, 12H, 4xH-6); $^{13}\text{CNMR}$ (125 MHz, D_2O): δ 177.4, 167.9 (x2), 164.9, 164.6, 102.6, 102.3 (x3), 101.9 (x2), 101.0 (x2), 100.8, 98.6, 98.3, 78.1, 77.5 (x2), 76.8, 76.4, 76.0, 70.3, 70.2, 70.1, 70.0 (x2), 69.5, 69.2, 68.9 (x3), 68.0, 67.8, 67.6 (x2), 53.9, 53.8, 53.6, 52.0, 51.8, 50.8 (x2), 40.6 (x3), 39.7, 28.2, 25.0, 24.9 (x2), 17.3, 17.0, 16.8 (x3) ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值 $20\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{N}_6\text{O}_{18}\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 889.4013, 实际值: 889.4020。

[0378] 1-[(2'-氨基乙基氨基)羰基戊基-4,6-二脱氧-4-甲酰氨基- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-4,6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 3)-4,6-脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖苷]-2-丁氧基环丁烯-3,4-二酮 (90)

[0379] 向搅拌着的 84 (0.013g, 0.015mmol) 的水 (0.5mL) 和乙醇 (0.4mL) 溶液中加入 3,4-二丁氧基-3-环丁烯-1,2-二酮 (20% 的乙醇溶液, 70 μL) 的溶液, 并通过小心地加入 1% 的碳酸氢钠溶液将 pH 调节至 8。0.5 小时后, TCL 显示反应完全; 将该反应混合物用 (10%) 乙酸中和, 并真空浓缩。所得残留物用反相 HPLC 在 C18 柱上用水-乙腈梯度洗脱, 进行纯化, 并冷冻干燥, 得到标题所述的化合物 (0.0109g, 72%), 其为白色泡沫状物质。90 的分析数据为: $R_f = 0.20$ (甲醇/二氯甲烷, 1/4, V/V); $^1\text{H NMR}$ (600MHz, D_2O): δ 8.18-8.24 (Z) and 7.98-8.06 (E) (m, 4H, NCHO), 4.90-5.10 (m, 4H, 4x H-1), 1.20-1.35 (m, 14H, $-\text{CH}_{2d}$, 4x H-6) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (126MHz, D_2O): δ 189.8, 184.3 (x2), 178.5, 178.2, 178.1, 178.0, 177.9, 174.8, 174.7, 168.8, 168.7, 165.8, 165.6, 103.3 (x2), 103.2, 102.8 (x2), 102.7, 101.7 (x2), 101.6 (x2), 99.2, 578.9 (x2), 78.4, 78.1, 77.3, 75.4, 75.3, 69.9 (x2), 69.8 (x2), 69.7, 69.3, 69.0 (x2), 68.9, (x4), 68.6 (x2), 68.5, 68.4 (x2), 68.0, 62.5, 52.9, 52.8 (x2), 52.7, 51.8, 45.2, 44.2, 40.6, 40.3, 40.2, 36.7, 34.4, 32.4, 29.2, 26.2, 26.1, 26.0 (x2), 25.9 (x2), 19.3, 19.1, 19.0, 18.1, 18.0 (x2), 17.9, 17.8 (x2), 17.7 (x2), 14.0, 13.9 ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值 $\text{C}_{44}\text{H}_{70}\text{N}_6\text{O}_{21}\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1041.4486, 实际值: 1041.4484。

[0380] 5'-甲氧基羰基戊基-4-叠氮基-2-0-苯甲酰基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷 (73)

[0381] 糖基供体 64 (0.743g, 1.08mmol) 和糖基受体 66 (0.400g, 0.982mmol) 的混合物 (Cheng, et al. (2010) *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 4771-4774) 与新活化的分子筛 (3 \AA , 1.5g) 在氩气氛围下置于二氯甲烷 (10mL) 中室温下搅拌 4 小时。再加入 MeOTf (0.890mL, 7.86mmol), 而将该所得的混合物另外再搅拌 48 小时。然后加入三乙胺 (1mL), 将固体滤出, 而残留物用二氯甲烷 (3x 30mL) 洗涤。将合并的滤液 (100mL) 用 20%

的碳酸氢钠溶液 (40mL) 洗涤,再用水 (30mL) 洗,最后用盐水 (20mL) 洗。分离有机相,用硫酸镁干燥,之后真空浓缩。所得残留物用硅胶色谱柱 (乙酸乙酯 - 甲苯梯度洗脱) 纯化,得到标题所述化合物 (0.865g, 85%), 其为油状物质。化合物 73 的分析数据为: $R_f = 0.50$ (乙酸乙酯 / 甲苯, 0.5/9.5, v/v); $[\alpha]_D^{21} = +36.7$ ($c = 1.3$, CHCl_3), NMR (500MHz, CDCl_3): δ 7.15-8.11 (m, 20H, H-Ar), 5.61 (dd, $J_{2,3} = 3.0\text{Hz}$, 1H, 25H-2^c), 4.99 (d, $J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, 1H, H-1^B), 4.90 (d, $J_{1a} = 2.0\text{Hz}$, 1H, H-1^c), 4.64 (s, 1H, H-1a), 3.70 (s, 3H, -OCH₃), 1.30 (d, $J_{5,6} = 6.0\text{Hz}$, 6H, H-6^B, H-6^C), 1.25ppm (d, $J_{5,6} = 6.0\text{Hz}$, 3H, H-6a); ¹³C NMR (126MHz, CDCl_3): δ 174.0, 165.3, 137.4, 137.3, 137.2, 133.3, 129.9, 129.8, 128.5 (x3), 128.4, 128.3, 128.1, 128.0 (x2), 127.9, 100.4, 98.7, 77.6, 76.7, 75.4, 74.2, 74.1, 72.2, 72.1, 71.4, 67.7 (x2), 67.5, 67.1, 64.4, 30 64.1 (x2), 51.5, 33.9, 29.1, 25.7, 24.7, 18.7, 18.6ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值 $\text{C}_{53}\text{H}_{63}\text{N}_9\text{O}_{13}\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1056.4438, 实际值: 1056.4436。

[0382] 5'-甲氧羰基戊基-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷 (74)

[0383] 甲醇钠 (0.7mL, 0.5M 的溶液) 被加入到 73 (0.855g, 0.827mmol) 的甲醇 (10mL) 溶液中,直至 pH 变为 9,而所得混合物在氩气氛围下在室温下搅拌 4 小时。随后将该反应混合物用 Amberlite IR 120 氢离子交换树脂中和,将树脂滤出并接着用甲醇洗涤。将合并的滤液真空浓缩,所得残留物用硅胶色谱柱 (乙酸乙酯 - 甲苯梯度洗脱) 纯化,得到标题所述化合物 (0.720g, 94%), 其为油状物质。化合物 74 的分析数据为: $R_f = 0.30$ (乙酸乙酯 / 甲苯, 0.5/9.5, v/v); $[\alpha]_D^{21} = +94.4$ ($c = 1.1$, CHCl_3); NMR (500MHz, CDCl_3): δ 7.29-7.45 (m, 15H, H-Ar), 4.95 (br. s., 2H, H-1^B, H-1^c), 4.63 (d, $J_{1a} = 2.0\text{Hz}$, 1H, H-1a), 3.70 (s, 3H, -OCffj), 1.28-1.31 (m, 6H, H-6^B, H-6^C), 1.21ppm (d, $J_{5,6} = 6.2\text{Hz}$, 3H, H-6^A); ¹³C NMR (126MHz, CDCl_3): δ 174.0, 137.4, 137.3, 15 137.1, 128.6 (x2), 128.3 (x2), 128.2 (x3), 128.1, 100.5 (x2), 98.7, 77.6, 77.5, 76.9, 73.3, 72.2, 72.1 (x2), 67.7, 67.5, 67.3, 67.2, 67.1, 64.4, 64.2, 63.8, 51.5, 33.9, 29.0, 25.7, 24.7, 18.6 (x2), 18.3ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值 $\text{C}_{46}\text{H}_{59}\text{N}_9\text{O}_{12}\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 952.4175, 实际值: 952.4176。

[0384] 5'-甲氧羰基戊基-4-叠氮基-2-O-苯甲酰基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷 (75)

[0385] 糖基供体 64 (0.262g, 0.381mmol) 和糖基受体 74 (0.322g, 0.346mmol) 的混合物与新活化的分子筛 (3 Å, 0.5g) 在氩气氛围下置于二氯甲烷 (8mL) 中室温下搅拌 4 小时。再加入 MeOTf (0.320mL, 2.77mmol), 而将该所得的混合物另外再搅拌 48 小时。然后加入三乙胺 (1mL), 将固体滤出, 而残留物用二氯甲烷 (3x20mL) 洗涤。将合并的滤液 (70mL) 用 20% 的碳酸氢钠溶液 (40mL) 洗涤,再用水 (30mL) 洗,最后用盐水 (20mL) 洗。分离有机相,用硫酸镁干燥,之后真空浓缩。所得残留物用硅胶色谱柱 (乙酸乙酯 - 甲苯梯度洗脱) 纯化,得到标题所述化合物 (0.461g, 86%), 其为白色泡沫状物质。化合物 73 的分析数据为: $R_f = 0.30$ (乙酸乙酯 / 甲苯 0.5/9.5, v/v); $[\alpha]_D^{21} = +52.7$ ($c = 1.0$, CHCl_3); ¹H NM

R(500MHz, CDCl_3): δ 7.16-(m, 30H, H-Ar), 5.60(dd, $J_{2,3} = 3.1\text{Hz}$, 1H, H-2^E), 4.98(d, $J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, 1H, H-1^D), 4.92(d, $J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, 1H, H-1^E), 4.88(d, $J_{1,2} = 2.0\text{Hz}$, 1H, H-1^C), 4.86(d, $J_{1a} = \text{Hz}$, 1H, H-1^B), 1.23-1.29(m, 9H, H-6^B, H-6^C, H-6^D), 1.19(d, $J_{5\text{fi}} = 6.2\text{Hz}$, 3H, H-56^E), 1.15ppm(d, $J = 6.2\text{Hz}$, 3H, H-6^A); ^{13}C NMR(126MHz, CDCl_3): δ 173.9, 137.4, 137.3, 137.1(x2), 133.3, 129.9, 129.8, 128.7, 128.6(x3), 128.5(x2), (x2), 128.3(x3), 128.2(x2), 128.1(x3), 127.9(x2), 100.4, 100.2, 100.1, 99.2, 77.4, 76.6, 75.3, 74.1, 74.0, 73.6, 72.2(x2), 72.1(x2), 71.3, 67.8(x2), 67.7(x2), 67.1, 64.4, 64.3, 64.2, 64.1(x2), 51.5, 33.9, 29.0, 25.7, 24.7, 18.6, 18.5(x2) 10ppm; HRMS(ESI): m/z calcd for $\text{C}_{79}\text{H}_{93}\text{N}_{15}\text{O}_{19}\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1578.6664, found: 1578.6667.

[0386] 5'-甲氧羰基戊基-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(76)

[0387] 甲醇钠(0.8mL, 0.5M的溶液)被加入到75(0.450g, 0.289mmol)的甲醇(10mL)溶液中,直至pH变为9,而所得混合物在氩气氛围下在室温下搅拌4小时。随后将该反应混合物用Amberlite IR 120氢离子交换树脂中和,将树脂滤出并接着用甲醇洗涤。将合并的滤液真空浓缩,所得残留物用硅胶色谱柱(乙酸乙酯-甲苯梯度洗脱)纯化,得到标题所述化合物(0.395g, 94%),其为油状物质。化合物76的分析数据为: $R_f = 0.40$ (乙酸乙酯/甲苯, 1/9, v/v); $[\alpha]_D^{21} = +81.2$ ($c = 1.0$, CHCl_3); ^1H NMR(600 MHz, CDCl_3): δ 7.28-7.41(m, 25H, H-Ar), 4.97(d, $J = 1.1\text{Hz}$, 1H, H-1E), 4.96(d, $J_{1,2} = 1.5\text{Hz}$, 1H, H-1d), 4.87(d, $J_{1,2} = 1.3\text{Hz}$, 1H, H-1^C), 4.85(d, $J_{1,2} = 1.3\text{Hz}$, 1H, H-1^B), 1.14-1.26ppm(m, 15H, H-6^A, H-6^B, H-6^C, H-6^D, H-6^E); ^{13}C NMR(126MHz, CDCl_3): δ 174.0, 137.3(x2), 137.2, 137.1(x2), 128.6(x4), 128.4(x2), 128.3(x3), (x2), 128.1(x2), 100.5, 100.4, 100.2(x2), 98.6, 77.7, 77.4, 76.6, 76.5, 74.0, 30, 73.6, 73.5, 73.3, 72.2(x2), 72.1(x2), 67.8, 67.7, 67.5, 67.3, 67.1(x2), 64.4, 64.2, 63.8, 51.5, 33.9, 29.0, 25.7, 24.7, 18.6(x2), 18.5(x2), 18.3ppm; HRMS(ESI): m/z 计算值 $\text{C}_{72}\text{H}_{89}\text{N}_{15}\text{O}_{18}\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1474.6402, 实际值: 1474.6406.

[0388] 5'-甲氧羰基戊基-4-叠氮基-2,3-二-0-苯甲酰基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-叠氮基-2,3-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(77)

[0389] 糖基供体53(0.158g, 0.292mmol)和糖基受体76(0.386g, 0.266mmol)的混合物与新活化的分子筛(3 \AA , 0.5g)在氩气氛围下置于二氯甲烷(5mL)中室温下搅拌5小时。再加入TMSOTf(11 μL , 0.058mmol),而将该所得的混合物另外再搅拌1小时。然后加入三乙胺(1mL),将固体滤出,而残留物用二氯甲烷(3x20mL)洗涤。将合并的滤液(80mL)用20%的碳酸氢钠溶液(50mL)洗涤,再用水(30mL)洗,最后用盐水(20mL)洗。分离有机相,用硫酸镁干燥,之后真空浓缩。所得残留物用硅胶色谱柱(乙酸乙酯-甲苯梯度洗脱)纯化,得到标题所述化合物(0.487g, 90%),其为白色泡沫状物质。化合物77的分析数据为: $R_f =$

0.70(乙酸乙酯/甲苯, 1/9, v/v); $[\alpha]_D^{21} = +31.7$ ($c = 1.4$, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3): δ 7.13–8.03(m, 35H, H-Ar), 5.70(dd, $J_{2,3} = 3.3\text{Hz}$, 1H, H-2F), 5.59(dd, $J_{3,4} = 10.2\text{Hz}$, 1H, H-3f), 5.02–5.03(m, 2H, H-1E, H-1F), 4.90(dd, $J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, 1H, H-1D), 4.88(dd, $J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, 1H, H-1^c), 4.86(dd, $J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, 1H, H-1^b), 1.14–1.3120ppm(m, 18H, H-6^A, H-6^B, H-6^C, H-6^D, H-6^E, H-6F); $^{13}\text{C NMR}$ (126MHz, CDCl_3): 165.2, 164.9, 137.4, 137.3, 137.1(x3), 133.4, 133.2, 129.8, 129.7, 129.5, 129.0, 128.7, 128.6(x3), 128.5(x2), 128.4(x3), 128.3(x2), 128.2, 128.1(x2), (x3), 100.4, 100.3, 100.1, 100.0, 98.9, 98.6, 77.4, 77.1, 76.6, 76.5, 74.0, 73.8, 73.5, 73.0, 72.3(x2), 72.2(x2), 72.1, 70.9, 69.4, 68.1, 67.9, 67.8(x2), 67.6, 2567.5, 67.1, 64.4, 64.3, 64.2(x2), 63.9, 63.4, 51.5, 33.9, 29.0, 25.7, 24.7, 18.6(x2), (x2), 18.4ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值 $\text{C}_{92}\text{H}_{106}\text{N}_{18}\text{O}_{23}\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1853.7570, 实际值: 1853.7550。

[0390] 5'-甲氧羰基戊基-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-3-0-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖(78)

[0391] 糖基供体 58(0.228g, 0.433mmol) 和糖基受体 74(0.366g, 0.394mmol) 的混合物与新活化的分子筛(3 Å, 0.500g) 在氩气氛围下置于甲苯(10mL) 中室温下搅拌 2 小时。再将其加热到 95 °C, 再加入 TMSOTf(16 μ mL, 0.087mmol), 而将该所得的混合物另外再搅拌 1 小时。然后加入三乙胺(1mL), 将固体滤出, 而残留物用二氯甲烷(3x30mL) 洗涤。将合并的滤液(100mL) 用 20% 的碳酸氢钠溶液(50mL) 洗涤, 再用水(30mL) 洗, 最后用盐水(30mL) 洗。分离有机相, 用硫酸镁干燥, 之后真空浓缩。所得残留物用硅胶色谱柱(乙酸乙酯-甲苯梯度洗脱) 纯化, 得到标题所述化合物(0.444g, 87%), 其为白色泡沫状物质。化合物 78 的分析数据为: $R_f = 0.50$ (乙酸乙酯/甲苯, 0.5/9.5, v/v); $[\alpha]_D^{21} = +42.1$ ($c = 1.0$, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3): δ 7.03–8.05(m, 25H, H-Ar), 5.29(dd, $J_{3,4} = 10.3\text{Hz}$, 1H, H-3^b), 5.07(d, $J_{1,2} = 1.6\text{Hz}$, 1H, H-1D), 4.96(d, $J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, 1H, H-1^c), 4.91(d, $J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, 1H, H-1^b), 1.22–1.29ppm(m, 12H, H-6^A, H-6^B, H-6^C, H-6^D); $^{13}\text{C NMR}$ (126MHz, CDCl_3): δ 174.0, 165.4, 137.4, 137.3(x2), 137.1, 133.3, 129.8, 129.5, 128.7, 128.6(x2), 128.4, 128.3(x2), 128.2(x2), 128.1, 127.8, 127.6, 15 100.6, 100.1, 98.8, 98.6, 77.9, 77.4, 76.9, 74.4, 74.2, 72.9, 72.8, 72.7, 72.6, 72.5, 72.3, 68.1, 67.8, 67.7, 67.5, 67.1, 64.4, 64.2, 64.1, 63.1, 51.5, 33.9, 29.0, 25.7, 24.6, (x2), 18.4, 18.3ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值 $\text{C}_{66}\text{H}_{78}\text{N}_{12}\text{O}_{16}\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1317.5551, 实际值: 1317.5549。

[0392] 5'-转甲氧羰基戊基-4-叠氮基-2-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(79)

[0393] 甲醇钠(0.8mL, 0.5M 的溶液) 被加入到 78(0.434g, 0.335mmol) 的甲醇(10mL) 溶液中, 直至 pH 变为 9, 而所得混合物在氩气氛围下在室温下搅拌 4 小时。随后将该反应混合物用 Amberlite IR 120 氢离子交换树脂中和, 将树脂滤出并接着用甲醇洗涤。将合并的滤液真空浓缩, 所得残留物用硅胶色谱柱(乙酸乙酯-甲苯梯度洗脱) 纯化, 得到标题所述化

合物 (0.356g,

[0394] 89%), 其为白色泡沫状物质。化合物 79 的分析数据为: $R_f = 0.50$ (乙酸乙酯/甲苯, 1/9, v/v); $[\alpha]_D^{21} = +65.6$ ($c = 1.3$, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 7.13-7.42(m, 20H, H-Ar), 5.10(d, $J_{1,2} = 0.9\text{Hz}$, 1H, H-1D), 4.93(d, $J_{1,2} = 17\text{Hz}$, 1H, H-1C), 4.90(d, $J_{1,2} = 1.8\text{Hz}$, 1H, H-1^B), 1.19-1.29ppm(m, 12H, H-6^A, H-6^B, H-6^C, H-6^D); $^{13}\text{C NMR}$ (126MHz, CDCl_3): δ 174.0, 137.3(x2), 137.2, 137.1, 128.7, 128.6(x2), 128.4, 128.3(x2), 128.2, 128.1(x2), 100.5, 100.2, 98.6, 97.8, 77.8, 77.5, 76.9, 76.5, 74.1, 73.1, 72.7, 72.5, 72.3, 72.2, 70.0, 67.9, 67.8, 67.5, 67.3, 67.1, 66.5, 64.5, 64.4, 64.3, 51.5, 33.9, 29.1, 25.7, 24.7, 18.7, 18.6, 18.4, ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值 $\text{C}_{59}\text{H}_{74}\text{N}_{12}\text{O}_{15}\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1213.5289, 实际值: 1213.5284。

[0395] 5'-甲氧羰基戊基-4-叠氮基-2,3-二-O-苯甲酰基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基的 S-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)-叠氮基-2-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(80)

[0396] 糖基供体 63(0.220g, 0.313mmol) 和糖基受体 79(0.339g, 0.285mmol) 的混合物与新活化的分子筛(3 Å, 0.5g) 在氩气氛围下置于二氯甲烷(10mL) 中室温下搅拌 4 小时。再加入 MeOTf(260 μ L, 2.28mmol), 而将该所得的混合物另外再搅拌 48 小时。然后加入三乙胺(1mL), 将固体滤出, 而残留物用二氯甲烷(3x20mL) 洗涤。将合并的滤液(100mL) 用 20% 的碳酸氢钠溶液(40mL) 洗涤, 再用水(40mL) 洗, 最后用盐水(20mL) 洗。分离有机相, 用硫酸镁干燥, 之后真空浓缩。所得残留物用硅胶色谱柱(乙酸乙酯-甲苯梯度洗脱) 纯化, 得到标题所述化合物(0.479g, 92%), 其为白色泡沫状物质。化合物 80 的分析数据为: $R_f = 0.60$ (乙酸乙酯/甲苯, 0.5/9.5, v/v); $[\alpha]_D^{21} = +15.3$ ($c = 1.0$, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3): δ 7.06-(m, 35H, H-Ar), 5.71(dd, $J_{2,3} = 3.3\text{Hz}$, 1H, H-2F), 5.58(dd, $J_{3,4} = 10.3\text{Hz}$, 1H, H-3f), 5.09(d, $J_{1a} = 1.2\text{Hz}$, 1H, H-1E), 5.05-5.07(m, 2H, H-1^o, H-1F), 4.95(d, $J_{1a} = 1.7\text{Hz}$, 1H, H-1^c), 4.90(d, $J_{1,2} = 1.7\text{Hz}$, 1H, H-1^B), 1.20-1.29ppm(m, 15H, H-6^A, 25H-6b, H-6c, H-6^D, H-6e); $^{13}\text{C NMR}$ (126MHz, CDCl_3): δ 174.0, 165.2, 164.9, 137.5, 137.3, 137.2, 137.1, 133.4, 133.3, 129.8(x2), 129.5, 129.4, 129.0, 128.7, 128.6(x2), 128.5(x3), 128.4(x2), 128.3(x2), 128.2(x2), 128.1, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 100.5, 100.2, 99.2, 98.6, 98.2, 77.9, 77.7, 77.5, 76.9, 76.4, 74.1, 73.6, 73.1, 72.5, 72.4, 72.2(x2), 72.0, 71.0, 69.4, 68.2, 68.1, 67.9, 67.8, 67.7, 67.5, 67.1, 30.64.7, 64.5, 64.4, 64.3, 63.6, 63.5, 51.5, 33.9, 29.1, 25.7, 24.7, 18.6(x3), 18.5(x2), ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值 $\text{C}_{92}\text{H}_{110}\text{N}_{19}\text{O}_{23}[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 1848.8016, 理论值: 1848.8005。

[0397] 5'-甲氧羰基戊基-4-叠氮基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-0-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基(77a)

[0398] 甲醇钠(0.8mL, 0.5M 的溶液) 被加入到 77(0.483g, 0.264mmol) 的甲醇(12mL) 溶

液中,直至 pH 变为 9,而所得混合物在氩气氛围下在室温下搅拌 6 小时。随后将该反应混合物用 Amberlite IR 120 氢离子交换树脂中和,将树脂滤出并接着用甲醇洗涤。将合并的滤液真空浓缩,所得残留物用硅胶色谱柱(乙酸乙酯-甲苯梯度洗脱)纯化,得到标题所述化合物(0.375g, 87%),其为油状物质。化合物 77a 的分析数据为:Rf = 0.30

[0399] (乙酸乙酯/甲苯, 1.5/8.5, v/v); $[\alpha]_D^{21} = +101.4$ (c = 1.1, CHCl₃); ¹H NMR(500MHz, CDCl₃): δ 7.28-7.40(m, 25H, H-Ar), 4.98(d, J_u = 1.5Hz, 1H, H-151^F), 4.90(d, J'' = 1.5Hz, 1H, H-1^E), 4.89(d, J_{1,2} = 1.5Hz, 1H, H-1[°]), 4.86(d, J_{1,2} = Hz, 1H, H-1[°]), 4.85(d, J_{1,2} = 2.0Hz, 1H, H-1^B), 1.13-1.26ppm(m, 18H, H-6^A, H-6^B, H-6^C, H-6^D, H-6^E, H-6^F); ¹³C NMR(126MHz, CDCl₃): δ 174.0, 137.4(x2), (x3), 128.7(x2), 128.6(x2), 128.4(x2), 128.3(x4), 128.1(x2), 100.7, 00.4, (x2), 100.1, 98.6, 77.5, 76.9, 76.6(x2), 74.1, 73.6, 73.5, 73.3, 73.2, 2.3(x2), 20 72.2(x2), 70.2, 70.0, 67.9, 67.8(x2), 67.5, 67.4, 67.1, 65.8, 64.4, 64.3, 64.2, 51.5, 29.1, 25.7, 24.7, 18.6(x2), 18.5(x3), 18.2ppm; HRMS(ESI): m/z 计算值 C₇₈H₉₈N₁₈O₂₁Na[M+Na]⁺: 1645.7046, 实际值 1645.7043。

[0400] 5'-甲氧羰基戊基-4,6-二脱氧-4-甲酰-α-D-吡喃甘露糖基(1→2)4,6-脱氧-4-甲酰-α-D-吡喃甘露糖基(1→2)4,6-二脱氧-4-甲酰-α-D-吡喃甘露糖基(1→2)4,6-二脱氧-4-甲酰-α-D-吡喃甘露糖基(1→2)二脱氧-4-甲酰-α-D-吡喃甘露糖基(1→2)-4,6-二脱氧-4-甲酰-α-D-吡喃甘露糖苷(48)

[0401] 将硫化氢气体鼓泡至搅拌着的 77a(0.130g, 0.080mmol) 的吡啶(5mL) 与水(2mL) 的混合物的溶液中,在 40°C 下持续 0.5 小时,并接着持续搅拌 16 小时。然后通氩气鼓泡至该溶液中持续 10 分钟,将溶剂真空蒸干,并将残留物与甲苯(3x10mL) 共蒸,然后干燥。高分辨率质谱分析显示相应胺化合物 77b 的反应的完成,并且没有还原不完全而产生的产品。HRMS(ESI): mlz 计算值为 C₇₈H₁₁₁N₆O₂₁[M+H]⁺: 1467.7797; 实际值: 1467.7795。此粗产品被直接用于甲酰化反应。

[0402] 在 -20°C 下,甲醇(5mL) 中的化合物 77b 被加入了一种新制备的甲酸酐(5ml, 乙醚溶液) 并搅拌 3 小时(Angew(1979)Chem. Int. Ed. 18, 614), 随后缓慢地升温至室温。然后,溶剂被蒸出,而将该残留物过硅胶色谱柱(甲醇-二氯甲烷梯度洗脱),得到二糖 77c。HRMS(ESI): mlz 计算值为 C₈₄H₁₁₁N₆O₂₇Na[M+Na]⁺: 1635.7492; 实际值: 1635.7485。

[0403] 将化合物 77c 溶解于 CH₃OH/H₂O(2:1, 5mL) 中,向其中加入了碳上的 Pd(OH)₂(20%, 0.050g)。随后在室温下将其在氢气的压力下搅拌 16 小时。通过硅藻土过滤并用甲醇(3x10mL) 清洗后,再将溶剂真空蒸除。将所述残留物用硅胶色谱纯化(甲醇-二氯甲烷梯度洗脱),得到标题所述的化合物(0.052g, 超过 3 步的收率为 55%), 其为白色泡沫状物质。48 的分析数据为:Rf = 0.20(甲醇/二氯甲烷, 2/3, v/v); ¹H NMR(500MHz, D₂O): δ 8.17-8.19(Z) and 7.99-8.02(E) (m, 6H, NCi/O), 4.84-5.20(m, 6H, 6x H-1), 1.16-1.27ppm(m, 18H, 6xH-6); ¹³C NMR(126MHz, D₂O): 5178.5, 168.8, 165.9, 103.0, 102.9, 101.6, (x2), 99.2, 78.6, 78.3, 78.1(x2), 78.0(x2), 77.9, 69.9(x2), 69.2(x2), 69.0, 68.9(x2), 68.8, 68.7, 68.6(x2), 68.5(x3), 57.9, 57.7, 53.1, 53.0, 52.9, 52.8(x2), 52.7, 20 49.9, 34.6, 29.0, 25.8, 24.9, 17.9(x2), 17.8, 17.7(x2), 17.6(x2) ppm; HRMS(ESI): m/z 计算值 C₄₉H₈₀N₆O₂₇Na[M+Na]⁺: 1207.4964, 实际值: 1207.4941。

[0404] (2'-氨基乙基酰氨基) 羰基戊基-4,6-二脱氧-4-甲酰-α-D-吡喃甘露糖基

(1 → 2)-4, 6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖基 (1 → 2)4, 6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖基 (1 → 2)-4, 6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基 (1 → 2)-4, 6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖基 (1 → 2)4, 6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖苷 (85)

[0405] 48(0.034g, 0.029mmol) 在新蒸馏的 1, 2-二氨基乙烷 (0.5mL) 中的溶液, 在 65°C 下搅拌 48 小时。然后将过量的试剂在真空中除去, 并将残留物与甲醇共蒸 (3x 10mL) 并干燥。该残留物用反相 HPLC 在 C18 柱上用水-乙腈进行梯度洗脱以完成纯化, 再冷冻干燥, 得到标题所述的化合物 (0.034g, 97%), 其为一种白色泡沫状物质。化合物 85 的分析数据为: $R_f = 0.20$ (甲醇); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, D_2O): δ 8.16-8.19 (Z) and 7.98-8.02 (E) (m, 6H, NCM), 4.81-5.19 (m, 6H, 6x H-1), 1.14-1.26ppm (m, 18H, 6x H-6); $^{13}\text{C NMR}$ (126MHz, D_2O): 5177.4, 177.1, 167.9, 167.8, 164.6, 102.4, 102.1, 102.0 (x2), 100.8, 100.7, 100.6 (x2), 98.6, 98.3 (x2), 77.6, 77.3, 77.2, 77.1, 77.0, 76.8, 70.4, 70.3, 70.1, 70.0, 69.4, 69.2, 69.0 (x2), 68.3 5 (x2), 68.0 (x2), 67.9 (x2), 67.8 (x2), 67.7 (x2), 67.6 (x2), 67.5 (x2), 67.0, 57.0, 56.9, 53.9, 53.8, 53.6, 52.0, 51.9 (x2), 51.8 (x2), 51.7, 40.9, 40.4, 40.0, 39.7, 35.7, 25.0 (x2), 24.9, 17.1 (x2), 17.0 (x2), 16.9 (x3), 16.8, 16.7ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值 $\text{C}_{50}\text{H}_{84}\text{N}_8\text{O}_{26}\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 1235.5389, 实际值: 1235.5384。

[0406] 1-[(2'-氨基乙基酰氨基) 羰基戊基-4, 6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基 (1 → 2)-4, 6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖基 (1 → 2)4, 6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖基 (1 → 2)-4, 6-二脱氧-4-甲酰氨基 AD-吡喃甘露糖基 (1 → 2)-4, 6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖基 (1 → 2)4, 6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖苷]-2-丁氧基环丁烯-3, 4-二酮 (91)

[0407] 向搅拌着的 85(0.0142g, 0.012mmol) 的水 (0.5mL) 和乙醇 (0.4mL) 溶液中加入 3, 4-二丁氧基-3-环丁烯-1, 2-二酮 (20% 的乙醇溶液, 50 μL) 的溶液, 并通过小心地加入 1% 的碳酸氢钠溶液将 pH 调节至 8。0.5 小时后, TCL 显示反应完全; 将该反应混合物用 (10%) 乙酸中和, 并真空浓缩。所得残留物用反相 HPLC 在 C18 柱上用水-乙腈梯度洗脱, 进行纯化, 并冷冻干燥, 得到标题所述的化合物 (0.014g, 88%), 其为白色泡沫状物质。91 的分析数据为: $R_f = 0.40$ (甲醇/二氯甲烷, 1/1, v/v); $^1\text{H NMR}$ (700MHz, D_2O): δ 8.20-8.23 (Z) and 8.02-8.07 (E) (m, 6H, NCHO), 4.88-5.34 (m, 6H, 6x H-1), 1.17-1.35 (m, 20H, $-\text{CH}_2\text{d}-$, 6x H-6), 0.88-1.00ppm (m, 3H, $-\text{CH}_3\text{l}$); $^{13}\text{C NMR}$ (126MHz, D_2O): δ 189.8, 189.6, 184.3, 178.5, 178.1, 177.9, 174.8, 174.7, 168.8, 25 165.9, 102.9 (x2), 101.5 (x3), 99.2 (x2), 78.5, 78.1 (x3), 78.0 (x2), 75.4, 75.3, 69.9, 69.0, 68.9, 68.7, 68.5, 57.9, 57.7, 53.0, 52.9 (x2), 52.6, 45.2, 45.0, 40.3, 40.2, 32.4, 32.3, 29.2, 26.1, 26.0, 25.9 (x2), 25.9, 19.2, 19.1, 19.0, 17.9 (x2), 17.8 (x2), 17.7 (x2), 13.9ppm; HRMS (ESI): m/z 计算值 $\text{C}_{58}\text{H}_{92}\text{N}_8\text{O}_{29}\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 1387.5862, 实际值: 1387.5856。

[0408] 5'-甲氧羰基戊基-4-叠氨基-4, 6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 → 2)4-叠氨基-苄基-4, 6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 → 3)-4-叠氨基-2-0-苄基-4, 6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 → 2)4-叠氨基-3-0-苄基-4, 6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 → 2)4-叠氨基-3-0-苄基-4, 6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖基 (1 → 2)54-叠氨基-3-0-苄

基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(80a)

[0409] 甲醇钠(0.8mL, 0.5M的溶液)被加入到80(0.413g, 0.225mmol)的甲醇(12mL)溶液中,直至pH变为9,而所得混合物在氩气氛围下在室温下搅拌6小时。随后将该反应混合物用Amberlite IR 120氢离子交换树脂中和,将树脂滤出并接着用甲醇洗涤。将合并的滤液真空浓缩,所得残留物用硅胶色谱柱(乙酸乙酯-甲苯梯度洗脱)纯化,得到标题所述化合物(0.334g, 91%),其为白色泡沫状物质。化合物80a的分析数据为: $R_f = 0.40$ (乙酸乙酯/甲苯, 1/9, v/v); $[\alpha]_D^{21} = +61.0$ ($c = 1.0$, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 7.14-7.38(m, 25H, H-Ar), 5.03-5.05(br. s., 2H, H-1D, H-151E), 4.94(d, $J_{1,2} = 1.5\text{Hz}$, 1H, H-1^c), 4.91(d, $J_{1,2} = 1.2\text{Hz}$, 1H, H-1^B), 4.90(d, $J_{1,2} = 1.2\text{Hz}$, 1H, H-1^f), 1.15-1.35ppm(m, 20H, $-\text{CH}_2\text{d}$, H-6^A, H-6^B, H-6^C, H-6^D, H-6^E, H-6^F); $^{13}\text{C NMR}$ (126MHz, CDCl_3): δ 174.0, 137.5, 137.4, 137.3, 137.2, 137.1, 128.7, (x3), 128.4(x2), 128.3(x2), 128.2(x2), 128.1(x2), 128.0(x2), 127.9, 127.5, 100.9, 100.4, 100.2, 98.6, 98.1, 78.0, 77.6, 77.5(x2), 76.9, 76.4, 74.0, 73.3, 20 73.1, 72.9, 72.5, 72.4, 72.2, 72.1, 71.9, 70.2, 69.9, 68.1, 67.9(x2), 67.8, 67.5(x2), 65.8, 64.6, 64.5, 64.4, 64.3, 64.0, 51.5, 33.9, 29.1, 25.7, 24.7, 18.6(x3), 18.5, 18.3ppm; HRMS(ESI): m/z 计算值 $\text{C}_{78}\text{H}_{98}\text{N}_8\text{O}_{21}\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1645.7046, 实际值: 1645.7035。

[0410] 5'-甲氧羰基戊基-4,6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4,6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 3)-4,6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖基(1 \rightarrow 2)-4,6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖苷(49)

[0411] 将硫化氢气体鼓泡至搅拌着的80a(0.150g, 0.092mmol)的吡啶(5mL)与水(2mL)的混合物的溶液中,在40 $^\circ\text{C}$ 下持续0.5小时,并接着持续搅拌16小时。然后通氩气鼓泡至该溶液中持续10分钟,将溶剂真空蒸干,并将残留物与甲苯(3x10mL)共蒸,然后干燥。高分辨率质谱分析显示相应胺化合物80b的反应的完成,并且没有还原不完全而产生的产品。HRMS(ESI): m/z 计算值为 $\text{C}_{78}\text{H}_{111}\text{N}_6\text{O}_{21}[\text{M}+\text{H}]^+$: 1467.7797; 实际值: 1467.7781。此粗产品被直接用于甲酰化反应。

[0412] 在-20 $^\circ\text{C}$ 下,甲醇(5mL)中的化合物80b被加入了一种新制备的甲酸酐²²(5mL, 乙醚溶液)并搅拌3小时,随后缓慢地升温至室温。然后,溶剂被蒸出,而将该残留物过硅胶色谱柱(甲醇-二氯甲烷梯度洗脱),得到二糖80c。HRMS(ESI): m/z 计算值为 $\text{C}_{84}\text{H}_{111}\text{N}_6\text{O}_{27}\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1657.7311; 实际值: 1657.7314。

[0413] 将化合物80c溶解于 $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (2:1, 5mL)中,向其中加入了碳上的 $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (20%, 0.050g)。随后在室温下将其在氢气的压力下搅拌16小时。通过硅藻土过滤并用甲醇(3x10mL)清洗后,再将溶剂真空蒸除。将所述残留物用硅胶色谱纯化(甲醇-二氯甲烷梯度洗脱),得到标题所述的化合物(0.066g, 3步的收率为60%),其为白色泡沫状物质。49的分析数据为: $R_f = 0.30$ (甲醇/二氯甲烷, 1/1, v/v); $^1\text{H NMR}$ (700MHz, D_2O): δ 8.20-8.25(Z) and 8.02-8.06(E)(m, 6H, NCHO), 4.89-5.23(m, 6H, 6x H-1), 1.19-1.31ppm(m, 18H, 6x H-6); $^{13}\text{C NMR}$ (176MHz, D_2O): δ 178.4, 168.6, 165.7(x2), 165.4(x2), 102.4, 101.5(x2), 101.3, 99.1(x2), 78.8, 78.4, 78.2, 78.0, 77.9, 77.6, 77.2, 69.7 20(x2), 69.6(x2), 69.5

[0419] BSA(11.7mg, 0.17 μmol) 和 40(4.2mg, 3.5 μmol) 被溶解在 0.5M 的硼酸盐缓冲液 (pH = 9, 350 μL) 中,并在室温下缓慢搅拌 3 天。然后,将此反应混合物用水稀释,并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下针对去离子水 (3x 2L) 进行透析,旋压并冻干。获得的偶联的产品为一种白色固体 (12.5mg, 84%) :MALDI-TOF-MS 显示该偶联物 42 的每个 BSA 平均有 16.4 个五糖。

[0420] 九糖方酸 41 与 BSA(43) 的偶联

[0421] BSA(5.5mg, 0.08 μmol) 和方酸 41(3.2mg, 1.6 μmol) 在硼酸盐缓冲液 (220 μL) 中的偶联如上述 42 中的方式一样进行实施。透析 (5 \times 2L) 并冻干后,获得了所述偶联物 43, 其为一种白色固体 (6mg, 74%)。从 MALDI-TOF-MS 图谱计算所得的结果显示每个 BSA 平均有 16.8 个九糖。

[0422] 方酸衍生物 87 与 BSA(93) 的偶联

[0423] 将 BSA(30mg, 0.451 μmol) 和二糖方酸 87(4.5mg, 6.77 μmol) 溶解于 0.5M 的硼酸盐缓冲液 (pH = 9, 600 μL) 中,并在室温下缓慢搅拌 3 天。然后,将此反应混合物用 Milli-Q 水稀释,通过微孔过滤管 (10,000MWC0, 4x 10mL) 过滤,冷冻干燥,得到的 BSA 偶联物 93 是一种白色泡沫状物质 (30.4mg, 89%)。MALDI-TOF 质谱分析表明偶联物 93 的每个 BSA 平均有 15.2 个二糖。

[0424] 方酸衍生物 88 与 BSA(94) 的偶联

[0425] 将 BSA(30mg, 0.451 μmol) 和三糖方酸 88(5.7mg, 6.74 μmol) 溶解于 0.5M 的硼酸盐缓冲液 (pH = 9, 700 μL) 中,并在室温下缓慢搅拌 3 天。然后,将此反应混合物用 Milli-Q 水稀释,通过微孔过滤管 (10,000MWC0, 4x 10mL) 过滤,冷冻干燥,得到的 BSA 偶联物 94 是一种白色泡沫状物质 (32.3mg, 91%)。MALDI-TOF 质谱分析表明偶联物 94 的每个 BSA 平均有 15.9 个三糖。

[0426] 方酸衍生物 89 与 BSA(95) 的偶联

[0427] 将 BSA(32.5mg, 0.489 μmol) 和三糖方酸 89(6.2mg, 7.34 μmol) 溶解于 0.5M 的硼酸盐缓冲液 (pH = 9, 700 μL) 中,并在室温下缓慢搅拌 3 天。然后,将此反应混合物用 Milli-Q 水稀释,通过微孔过滤管 (10,000MWC0, 4x 10mL) 过滤,冷冻干燥,得到的 BSA 偶联物 95 是一种白色泡沫状物质 (33.5mg, 87%)。MALDI-TOF 质谱分析表明偶联物 95 的每个 BSA 平均有 15.7 个三糖。

[0428] 方酸衍生物 90 与 BSA(96) 的偶联

[0429] 将 BSA(11mg, 0.165 μmol) 和四糖方酸 90(2.5mg, 2.45 μmol) 溶解于 0.5M 的硼酸盐缓冲液 (pH = 9, 400 μL) 中,并在室温下缓慢搅拌 3 天。然后,将此反应混合物用 Milli-Q 水稀释,通过微孔过滤管 (10,000MWC0, 4x 10mL) 过滤,冷冻干燥,得到的 BSA 偶联物 96 是一种白色泡沫状物质 (12mg, 92%)。MALDI-TOF 质谱分析表明偶联物 96 的每个 BSA 平均有 13.4 个四糖。

[0430] 方酸衍生物 91 与 BSA(97) 的偶联

[0431] 将 BSA(5mg, 0.0752 μmol) 和六糖方酸 91(1.5mg, 1.099 μmol) 溶解于 0.5M 的硼酸盐缓冲液 (pH = 9, 400 μL) 中,并在室温下缓慢搅拌 3 天。然后,将此反应混合物用 Milli-Q 水稀释,通过微孔过滤管 (10,000MWC0, 4x 10mL) 过滤,冷冻干燥,得到的 BSA 偶联物 97 是一种白色泡沫状物质 (5.5mg, 87%)。MALDI-TOF 质谱分析表明偶联物 97 的每个 BSA 平均有 13.8 个六糖。

[0432] 方酸衍生物 92 与 BSA(98) 的偶联

[0433] 将 BSA(5mg, 0.0752 μmol) 和六糖方酸 92(1.5mg, 1.099 μmol) 溶解于 0.5M 的硼酸盐缓冲液 ($\text{pH} = 9, 400 \mu\text{L}$) 中, 并在室温下缓慢搅拌 3 天。然后, 将此反应混合物用 Milli-Q 水稀释, 通过微孔过滤管 (10,000MWC0, 4x 10mL) 过滤, 冷冻干燥, 得到的 BSA 偶联物 98 是一种白色泡沫状物质 (6mg, 99%)。MALDI-TOF 质谱分析表明偶联物 98 的每个 BSA 平均有 10.8 个六糖。

[0434] 方酸衍生物 87 和共聚维酮聚合物 (99) 的偶联

[0435] 高负荷: 将共聚维酮聚合物 (6.9mg, 5.95 μmol , 1eq) 和二糖方酸 87(2.0mg, 2.97 μmol , 0.5eq) 溶解于 0.5M 的硼酸盐缓冲液 ($\text{pH} = 9, 500 \mu\text{L}$) 中, 并在室温下缓慢搅拌 2 天。接着, 加入 5% 的乙酸酐溶液 (1mL) 和饱和的碳酸氢钠溶液 (1mL), 并搅拌 3 小时。然后, 将此反应混合物用 Milli-Q 水稀释, 针对去离子水 (5x2L) 透析, 冷冻干燥, 得到共聚维酮聚合物偶联物 99a。

[0436] 低负荷: 将共聚维酮聚合物 (5.0mg, 4.31 μmol , 1eq) 和二糖方酸 87(0.5mg, 0.74 μmol , 0.166eq) 溶解于 0.5M 的硼酸盐缓冲液 ($\text{pH} = 9, 500 \mu\text{L}$) 中, 并在室温下缓慢搅拌 2 天。接着, 加入 5% 的乙酸酐溶液 (1mL) 和饱和的碳酸氢钠溶液 (1mL), 并搅拌 3 小时。然后, 将此反应混合物用 Milli-Q 水稀释, 针对去离子水 (5x2L) 透析, 冷冻干燥, 得到共聚维酮聚合物偶联物 99b。

[0437] 方酸衍生物 91 和共聚维酮聚合物 (100) 的偶联

[0438] 高负荷: 将共聚维酮聚合物 (5.0mg, 4.31 μmol , 1eq) 和六糖方酸 91(2.94mg, 2.15 μmol , 0.5eq) 溶解于 0.5M 的硼酸盐缓冲液 ($\text{pH} = 9, 500 \mu\text{L}$) 中, 并在室温下缓慢搅拌 2 天。接着, 加入 5% 的乙酸酐溶液 (1mL) 和饱和的碳酸氢钠溶液 (1mL), 并搅拌 3 小时。然后, 将此反应混合物用 Milli-Q 水稀释, 针对去离子水 (5x2L) 透析, 冷冻干燥, 得到共聚维酮聚合物偶联物 100a。

[0439] 低负荷: 将共聚维酮聚合物 (5.0mg, 4.31 μmol , 1eq) 和六糖方酸 91(1.0mg, 0.73 μmol , 0.166eq) 溶解于 0.5M 的硼酸盐缓冲液 ($\text{pH} = 9, 500 \mu\text{L}$) 中, 并在室温下缓慢搅拌 2 天。接着, 加入 5% 的乙酸酐溶液 (1mL) 和饱和的碳酸氢钠溶液 (1mL), 并搅拌 3 小时。然后, 将此反应混合物用 Milli-Q 水稀释, 针对去离子水 (5x2L) 透析, 冷冻干燥, 得到共聚维酮聚合物偶联物 100b。

[0440] 方酸衍生物 91 和破伤风类毒素 (101) 的偶联

[0441] 将六糖方酸 91(0.55mg, 0.403 μmol) 加入到破伤风类毒素 (2mg, 0.0133 μmol) 的 0.5M 的硼酸盐 ($\text{pH} = 9, 1\text{mL}$) 缓冲液中, 并在室温下缓慢搅拌 3 天。接着, 将该反应混合物用硼酸盐缓冲液冲洗, 通过微孔过滤管 (10,000MWC0, 4x 10mL) 过滤, 所得到的破伤风类毒素偶联物 101 被存储于 PBS 缓冲液中。MALDI-TOF 质谱分析表明偶联物 101 的每个破伤风类毒素平均有 12.6 个六糖。

[0442] 方酸 92(0.55mg, 0.403 μmol) 与六糖被加入到破伤风类毒素 (2mg, 0.0133 μmol) 的 0.5M 的硼酸盐缓冲液 ($\text{pH} = 9, 1\text{mL}$) 的溶液中, 并在室温下缓慢搅拌 2 天。接着, 将该反应混合物用硼酸盐缓冲液冲洗, 通过微孔过滤管 (10,000MWC0, 4x 10mL) 过滤, 所得到的破伤风类毒素偶联物 102 被存储于 PBS 缓冲液中。MALDI-TOF 质谱分析表明偶联物 102 的每个破伤风类毒素平均有 6.2 个六糖。

[0443] 特异性 M- 抗原——关于源自布鲁氏杆菌和小肠结肠炎耶尔森菌 0 :9 的 OPS 的概念研究证明

[0444] 针对布鲁氏杆菌 A、M 菌株和小肠结肠炎耶尔森菌 0 :9sLPS 抗原的使用抗 M 特异性抗体 BM40 的单克隆抗体结合分析 (Greiser et al. (1987) Ann Inst Pasteur Microbiol 138, 549-560), 由热酚法制备 (Westphal et al. (1952) Z. Naturforsch. 7, 148-155), 证实了 BM40 在这种情况下应答反应的极高特异性。并没有可测的针对小肠结肠炎耶尔森菌 0 :9 sLPS 和连接至羊种布鲁氏杆菌 16M (一种 M 优势菌株) 的结合十倍于至布鲁氏杆菌流产 S99 菌株 (一种 A 优势菌株) 的结合。

[0445] 在进一步的探索性研究过程中, 上述的吸附方法 (Alton et al. (1994) Techniques for the 布鲁氏菌病 Laboratory, pages 53-54; INRA Editions, ISBN-10:2738000428; Kittelberger et al (1998) Vet. Microbiol. 60, 45-57) 被进行了评估, 通过使用感染了布鲁氏杆菌流产 544 菌株 (一种 A 优势菌株) 的牛或感染了小肠结肠炎耶尔森菌 0 :9 的牛的牛血清实验。一种残留的抗布鲁氏菌 sLPS 效价在间接 ELISA 在小肠结肠炎耶尔森菌 0 :9 吸附样品中被观察到, 所述吸附样品指的是来自一些, 并非所有的, 感染了布鲁氏杆菌的动物的血清的样品。

[0446] 源自实验中被感染的牛的血清也通过间接 ELISA 试剂盒进行了评估, 使用羊种布鲁氏杆菌 16M 和从光滑的 LPS 纯化而来的小肠结肠炎耶尔森菌 0 :9 OPS 抗原, 使用弱酸水解和大小排阻色谱法 (Meikle et al. (1989) Infect Immun 57, 2820-2828), 经使用鲎变形细胞溶解物反应测试证明脂质 -A 是游离的 (Ding et al. (2001) Trends Biotechnol. 19, 277-281)。选自感染后 3, 7, 16, 24 和 53 周的牛的样品取自实验中感染了布鲁氏杆菌流产 544 菌株的四个动物, 以及取自实验中感染了小肠结肠炎耶尔森菌 0 :9 的四个动物中的每个。这些样品先前已经描述了, 并且还通过常规的血清学测定法完成上述布鲁氏菌病测试 (McGiven et al. (2008) Journal of Immunological Methods 20, 7-15)。

[0447] 所述 OPS 羊种布鲁氏杆菌 16M 优选自布鲁氏杆菌流产 A 优势菌株 OPS, 这是由于 α -1, 3 键和 M 抗原决定簇具有更高的频率, 以致于结构变动的极端情况在天然 4, 6- 二脱氧 -4- 甲酰胺基 - α -D- 吡喃甘露糖的均聚物中将被表示出来。

[0448] 由于其高的溶解度, 纯化的 OPS 抗原不能由被动吸收有效地结合 ELISA 聚苯乙烯酶标板 (除非结合至含有疏水区的载体分子)。为了使得它们在固相的固定化, 使用了 Carbo-BIND™96 孔酶标板 (康宁, 产品编号 2507), 其在孔表面具有酰肼官能团。这些酰肼基团与醛类自发地发生反应, 通过氧化反应其可以在碳水化合物中生成。

[0449] 所述 OPS 以 100 μ g/ml 被氧化 : 用 10mM 偏高碘酸钠和 50mM 醋酸钠缓冲液 (SAB) 处理, pH 5.5, 在暗处于 4°C 反应 30 分钟。此后, 将该抗原稀释至 0.5-0.125 μ g/ml, 在 SAB 中, pH 5.5, 并且 100 μ l 被加入到 Carbo-BIND™酶标板的孔。所述板在 37°C 下培育 1 小时, 再用 4 倍的 200 μ l 磷酸盐缓冲盐水以及 0.05% 吐温 -20 (PBS-T20) 洗涤, 然后拍干。

[0450] 血清在缓冲液 (西格玛 #B6429) 中被稀释至 1/50, 将 100 μ l 的此液体加入到抗原包被的平板的每个孔中, 重复测试各样品。将所述板在室温下在旋转振荡器上以 160rpm 的转速培育 1 小时, 然后用上述的 PBS-T20 洗涤。

[0451] 一个 HRP 偶联的蛋白 G 偶联物 (热电 #31499), 在缓冲液中被稀释至 1 μ g/ml, 随后被加入 100 μ l 至该板的每个孔中, 所述板随后进行如上所述的培育和清洗以检测血清。

然后将板用 ABTS (2, 2' - 联氮 - 双 (3- 乙基苯并噻唑 -6- 磺酸) 二铵盐) 和过氧化氢基底反应 10-15 分钟, 用 0. 4mM 的叠氮化钠终止反应, 并在 405nm 波长处读数。为了复制的光密度被平均化, 而空白 (仅用缓冲液代替血清) OD 值被减去。此数值随后被表达为一个共同的阳性对照血清样品的百分比, 来自布鲁氏杆菌生化 1 型流产菌株 (A 优势菌株) 感染的牛的牛血清。

[0452] 正如预期的那样, 在布鲁氏杆菌和小肠结肠炎耶尔森菌 0 :9 OPS 抗原之间有很多交叉反应, 以两组血清, 即源自那些实验中感染了流产布鲁氏杆菌菌株 544 和那些实验中感染了小肠结肠炎耶尔森菌 0 :9 的牛。通过从羊种布鲁氏杆菌 OPS iELISA 中分割结果, 通过来自小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS iELISA 得出一个简单的比例值 (从此被称为 'Bm16M/Ye0:9 比率'), 各个样品计算出了额外的结果。从而, 较高的 Bm16M/Ye0:9 比率表示至羊种布鲁氏杆菌 16MOPS 抗原的反应强度要强于至小肠结肠炎耶尔森菌 0 :9 抗原的反应强度, 相对于更低的 Bm16M/Ye0:9 比率值。这组数据的分析表明对于两个不同的样本群体的 Bm16M/Ye0:9 比率值之间存在一个非常显著的区别 ($P = 0. 008$, 学生, t 检验用于不成对数据), 来自感染了布鲁氏杆菌的动物的平均值高于感染了小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 的动物的平均值。因此, 在来自与这两种抗原类型反应的两个群体的血清方式上存在着一个显著的区别, 来自感染了布鲁氏杆菌的动物的血清以相对较高的强度与羊种布鲁氏杆菌 16M OPS 反应, 反之亦然。该结果表明在所述 2 种血清种群之间的抗 OPS 抗体谱中具有显著的和可检测的差异。

[0453] 作为这个相关 OPS ELISA 结果的发现一个结果, 同样的方法被应用到归档至来自英国的牛血清领域。共有来自单个动物的 45 个样品, 通过培养证实感染了布鲁氏杆菌流产菌株生化 1 型 (A 优势菌株), 得到了检测。同样地, 来自单个动物的 68 个样品也进行了检测, 这些样品的血清取自 1996 年至 1999 年间, 自从英国官方正式声明布鲁氏菌病游离状态以来, 已经超过 10 年了, 这些布鲁氏菌病在传统的血清学检查中呈阳性, 例如 B. 流产 S99 SLPS iELISA, SAT 和 CFT (Nielsen et al. (2009) "Bovine brucellosis" In: Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals 2009 ; Office International Des Epizooties, Paris, pg 10-19), 但对于其来说, 并没有布鲁氏菌病的培养的或流行病学证据。用这些来自实验中被感染的动物的数据, 在对于两个不同的血清型的 Bm16M/Ye0:9 比率值之间有一个非常显著的区别 ($P = 0. 000012$, 学生, t 检验用于不成对数据)。像之前一样, 确认具有布鲁氏菌病的牛的血清平均具有更高的值 (见图 2)。

[0454] 来自羊种布鲁氏杆菌和小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS iELISAs 的结果被进行评估, 以找到对于每一个产生最高约登指数的正 / 负截止, ($YI = \frac{\text{诊断的灵敏度 [DSn]} + \text{诊断特异性 [DSp]} - 1}{2}$)。这些优化的 YI 值以及与相关的 DSn 和 DSp 的数据显示在表 3 中。

[0455] 表 3- 用于 OPS iELISAs 作为测试牛血清的性能数据

[0456]

检测	最佳约登指数 (YI=DSn+Dsp-1)			ROC -曲线下面积	
	YI 估计值	DSn%	Dsp%	AUC	95% 置信区间
小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS iELISA	0.1297	64.44	48.53	0.5065	0.3964-0.6167
羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISA	0.4232	55.56	86.76	0.7065	0.6024-0.8106
Bm16M/YeO:9 比率值	0.5343	66.67	86.76	0.8056	0.7219 -0.8892

[0457] 为了进一步评估每一个 OPS iELISAs 诊断的有效性,采用了受试者操作特征曲线分析 (ROC),特别是该曲线下面积的评估 (AUC) (Hanley and McNeil(1982)Radiology 143, 29-36)。在本文中,AUC 代表了该测试的能力,以从感染了布鲁氏杆菌的动物与没感染的动物中正确地分类样本。表 2 中的数据表明羊种布鲁氏杆菌 OPS iELISA 比小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS iELISA 具有更高的优化的 YI 和 AUC 数值。

[0458] 在表 4 中,涉及 AUC 数据之间显著区别的测试的 P 值被列了出来。用于 AUC 数据之间显著区别的测试通过使用配对样本的方法而实施 (Hanley and McNeil(1983)Radiology 148, 839-843)。

[0459] 表 4- 在牛血清上进行 OPS iELISAs 测试的 ROC AUC 数据的比较

[0460]

测试 AUC (P = [单尾])之间的区别	小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS iELISA	羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISA
羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISA	<0.0001	
Bm16M/YeO:9	<0.0001	0.239

[0461] 这里的数据表明,对于小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 与羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISAs 的 AUC 值之间存在显著的区别 (P<0. 0001),并因此,该测定是明显地十分优越的。当使用 Bm16M/YeO:9 比率值时的诊断性能的提高也如表 3 和表 4 所示。优化的 YI 值远远大于两个个体的 OPS iELISA 测定的值。所示 Dsp 等于羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISA 的 DSp,而 DS_n 较高。相较于用于羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISA 的 AUC(P = 0. 239),AUC 也越大,但并不显著。

[0462] 这是强有力的证据证明了为确定感染状况的一个组合比率的方法更加优于一个单独检测的解读,当有显著交叉反应时,由于相似但不相同的抗原。用于羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISA 的单独数据与作为比率分析的组合的数据表明 M 抗原决定簇在已经观察到的抗体结合的显著差异中发挥着重要的作用。样品的 Bm16M/YeO:9 比率值评价,是一种相对粗糙的尝试,以描绘出源自普通个体的贡献的特异性抗体和抗原决定簇做出的对总体效价的贡献。

[0463] 相同的 OPS iELISA 方法也适用于 41 个样品,所述样品源自对玫瑰孟加拉测试

(RBT) 与 iELISA 呈阳性的猪个体 (Olsen, (2010) “Porcine Brucellosis” In:Office International Des Epizooties, Paris), 并源自现有技术确定感染了布鲁氏杆菌猪种生化 1 型菌株的牛群, 其为一种 A 优势菌株 OPS 生化型 (Meikle et al. (1989) Infect Immun 57, 2820-2828 ;Olsen, (2009) “Porcine Brucellosis” In:Office International Des Epizooties, Paris, pages 3-4)。另外的 52 个样品进行了检测, 它们选自英国的动物个体, 官方声称为布鲁氏杆菌猪种游离型, 在其中的样品在传统的血清学检测中呈阳性的牛群中, 所述传统的血清学检测例如为 :RBT, cELISA, iELISA (Olsen, (2009) “Porcine Brucellosis” In:Office International Des Epizooties, Paris, pages 3-4), 其中所获得的样品中并没有布鲁氏菌病的流行病学证据。

[0464] 与来自牛的血清样品中的数据, 对于两个不同的血清学组的 Bm16M/Ye0:9 比率值之间存在极其显著的区别 ($P = 0.000000006$, 使用非配对学生 t 检验)。与之前一样, 确认了布鲁氏菌病的猪血清具有更高的平均值, 相对于假阳性血清学样本的平均值 (图 3A)。这些样品也由布鲁氏杆菌流产 S99 菌株 (A 优势菌株) OPS iELISA (图 3B) 进行了检测, 而数据的比率表达类似于 Bm16M/Ye0:9 比率值, 被进行了评估。在布鲁氏杆菌流产 S99 菌株与小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS iELISA 的比例结果之间具有显著的区别, 对于不同的血清组, 如观察到的 Bm16M/Ye0:9 比率值, 所述区别并不是很大 ($P = 0.023$)。事实上, 来自两种布鲁氏杆菌 OPS 抗原、布鲁氏杆菌羊种 16M 和布鲁氏杆菌流产 S99 菌株的结果之间的差异, 比小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 和布鲁氏杆菌流产 S99 菌株的结果之间的差异更为显著 ($P = 0.000000016$)。

[0465] 这反映了这些具有 A 优势的布鲁氏杆菌流产 S99 菌株的 OPS 抗原的已知结构, 仅仅具有约 2% 的 α -1, 3 键, 相较于含 20% α -1, 3 键的 M 优势的布鲁氏杆菌 16M OPS 以及含 0% α -1, 3 键的小肠结肠炎耶尔森菌。

[0466] 如上所述的优化后的 YI, 对于单个的 OPS iELISAs 和 Bm16M/Ye0:9 比率值, 猪血清的结果如表 5 所示, 其中, Bm16M/Ye0:9 > 布鲁氏杆菌羊种 16M > 布鲁氏杆菌流产 S99 菌株 > 小肠结肠炎耶尔森菌 0:9。

[0467] 表 5- 在猪血清上用于 OPS iELISAs 测试的性能统计数据

[0468]

测试	优化的约登指数 ($YI = DS_n + DS_p - I$)			ROC-曲线下面积	
	YI 估算	DS _n %	DS _p %	AUC	95%置信区间
小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS iELISA	0.3588	87.80	48.08	0.6445	0.5328-0.7562
布鲁氏杆菌流产 S99 菌株 OPS iELISA	0.6472	87.80	76.92	0.8607	0.7832-0.9382
羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISA	0.7087	80.49	90.38	0.9135	0.8559-0.9710
羊种布鲁氏杆菌 16M/小肠结 肠炎 耶尔森菌 0:9	0.7678	90.24	86.54	0.9085	0.8437-0.9733

[0469] 关于 AUC 的数据是相似的, 其中 :布鲁氏杆菌羊种 16M > Bm16M/Ye0:9 比率值 > 布鲁氏杆菌流产 S99 菌株 > 小肠结肠炎耶尔森菌 0:9。对于小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS

iELISA 的 AUC, 相对于其他三个结果 (表 6) 要小得多 ($P < 0.0001$)。对于布鲁氏杆菌流产菌株和羊种布鲁氏杆菌 OPS iELISAs ($P = 0.066$) 的 AUC 之间存在一个弱显著性的区别。

[0470] 表 6- 用于猪血清上的 OPS iELISAs 检测的 ROC AUC 数据比较

[0471]

检测 AUC (P = [单尾]) 之间的差异	小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS iELISA	布鲁氏杆菌流产 S99 OPS iELISA	布鲁氏杆菌羊种 16M OPS iELISA
布鲁氏杆菌流产 S99 OPS iELISA	<0.0001		
布鲁氏杆菌羊种 16M OPS iELISA	<0.0001	0.066	
Bml6M/Ye0:9	<0.0001	0.174	0.452

[0472] 同样的方法被应用到 21 个血清样品, 所述血清样品源自单个 ELISA 阳性猪来自被现有技术确认感染了猪种布鲁氏杆菌生化 2 型的猪群, 并与来自未感染的猪的 52 个样品的数据相比, 但在英国的血清反应呈阳性的猪群, 以及至源自布鲁氏杆菌生化 1 型感染的动物的所述 41 个样品。在所述 Bml6M/Ye0:9 比率结果中的源自猪种布鲁氏杆菌生化 2 型感染了的动物和源自未被感染的动物的血清之间并没有显著区别 ($P = 0.926$)。这符合最近的发现, 唯一用于布鲁氏杆菌, 来自猪种布鲁氏杆菌生化 2 型的 OPS 不包含任何 α -1, 3 键 (Zaccheus et al. (2013) PLoS One 8, e53941), 并因此所述 OPS 是高度相似的, 如果与小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 不完全相同。

[0473] 来自猪血清中的数据表明使用具有较高比例的 α -1, 3 键的 OPS 的方法, 提供了卓越的诊断特性。这是进一步的证据, 证明了 α -1, 3 键是显著的和有区别的对于多克隆血清的抗原决定簇的一部分, 所述血清源自天然地感染了布鲁氏杆菌的动物。

[0474] 研发的离散型 M 抗原决定簇抗原 (特异性 M- 抗原)

[0475] 来自 OPS iELISAs 的上述证据提供的激励用于确定额外的研究, 分离并应用“M”抗原决定簇至布鲁氏菌病血清学诊断, 为了增加结果的准确度。来自小肠结肠炎耶尔森菌 0:9、羊种布鲁氏杆菌 16M (M 优势菌株) 和布鲁氏杆菌流产 S99 菌株 (A 优势菌株) 的纯化的天然的 OPS 被用热的浓盐酸部分水解, 以获得二糖至十二糖。这些通过 LC-ESI-MS/MS 评估, 使用石墨化碳柱 (Ruhaak et al. (2009) Anal. Bioanal. Chem. 394, 163-174) 以将其分离并确认其为 4, 6- 二脱氧 -4- 甲酰胺基 - α -D- 吡喃甘露糖基的低聚物。

[0476] 源自布鲁氏杆菌流产 S99 菌株的低聚糖经受亲和层析, 使用具有固定化的布鲁氏杆菌抗 M 单克隆抗体 BM40 的亲和层析柱, 而洗涤和洗脱级分通过使用石墨化碳柱以及 LC-ESI-MS/MS 进行进一步评估 (Ruhaak et al. (2009) Anal. Bioanal. Chem. 394, 163-174) 以分离低聚糖。4, 6- 二脱氧 -4- 甲酰胺基 - α -D- 吡喃甘露糖基的四糖在结合处是容易被检测的, 随后洗脱, 用稀盐酸, 级分。的 LC-ESI-MS 色谱与发现于非亲合性选择的低聚糖衍生自三种天然抗原得到部分酸水解的那些四糖进行比较。

[0477] 然而, 用于羊种布鲁氏杆菌 16M 衍生的四糖的色谱相对比较简单 (图 4A), 而那些用于布鲁氏杆菌流产 S99 菌株 (图 4B) 和小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 (图 4C) 的色谱则较为复杂。由于整个色谱图中的质量相同, 在洗脱曲线中的差异几乎相似, 由于在结构和与其他低聚糖相互反应中的变化, 在石墨化柱中的分离过程, 显而易见的是, 发现于羊种布鲁氏杆菌

16M 四糖色谱中的主峰,洗脱约 9 分钟,这也在布鲁氏杆菌流产 S99 菌株而非小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 中发现了。布鲁氏杆菌流产 S99 菌株四糖的亲力的色谱,由抗 M 单克隆抗体选择(图 4D),看起来与未选中的四糖非常相似,源自自由酸水解的天然羊种布鲁氏杆菌 16M OPS 制备方法。从这项研究得出的结论是,源自布鲁氏杆菌 OPS 的四糖足够大,以形成一种可行的抗体表位,从而布鲁氏杆菌特异性抗 -M 单克隆抗体连接至一种四糖,其在布鲁氏杆菌流产菌株中是可检测出的,而在小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 中不是可检测出的。从先前存在的结构知识中,唯一已知的区别是所述 α -1,3 键。

[0478] 上述所有证据为该假设提供了一个良好的基础,一种四糖抗原包含所述 M 抗原决定簇,而最大限度地减少任何 C/Y 或 A 抗原决定簇式属性,会产生一种实用的血清学诊断抗原。4 种 4,6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖残基被合成(Sussex Research Laboratories Inc, Ottawa, Ontario, Canada)于一种四糖,其为依次为 α -1,2, α -1,3 和 α -1,2 键合连接,生成了具有式 VIII 所示结构的四糖:

[0479] 4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-甘露吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-甘露吡喃糖基-(1-3)-4,6-二去氧-4-甲酰胺基- α -D-甘露吡喃糖基-(1-2)-4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖(式 VIII)

[0480] 该分子以前没有被合成和应用,并在下面称为 TSM 抗原(“类似四糖 M 抗原”)。此结构的关键在于包括 α -1,3 键,同时结合最少数的 α -1,2 键,其对于待连结的 M 特异性抗体被认为是必要的;这具有最小化非 -M 特异性抗体的结合的效果。

[0481] TSM 抗原的分析

[0482] 所述抗原的结构由 MALDI-TOF 和 ESI-QTOF 质谱确定。单克隆结合特性通过竞争性 ELISA 被确认,其中标准聚苯乙烯 ELISA 板被涂覆有羊种布鲁氏杆菌 16M sLPS 抗原通过在碳酸盐缓冲液中的被动吸收。将所述板与抗 M 单克隆抗体 BM40,与源自羊种布鲁氏杆菌 16M、布鲁氏杆菌流产 S99 菌株、小肠结肠炎耶尔森菌 0:9、TSM 抗原的天然 OPS 以及缓冲对照共同培养。在清洗板之后,一种对 BM40 特异性的 HRP 偶联物被加入并被培养。清洗之后,所述板被用一种 HRP 底物以确定程度的研发,所述程度为 mAb-偶联物连接已被抑制的程度。

[0483] 图 5 所示的结果显示了 TSM 抗原能够抑制结合到一个更大的程度上,相较于小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 的当量浓度,并结合到一种相似的程度,如布鲁氏杆菌流产 S99 菌株 OPS。考虑到相较于 16M OPS 上的可用的多个结合位点的 TSM 抗原的单价态,所述结果提供了特异性 TSM-抗体结合的强有力的证据。

[0484] 一种类似的竞争性 ELISA 被用于测量抗 -A 和抗 -M 的兔类超级免疫单一特异性血清的结合抑制(如前所述的血清),通过使用来自羊种布鲁氏杆菌 16M、布鲁氏杆菌流产 S99 菌株、小肠结肠炎耶尔森菌 0:9、TSM 抗原的天然 OPS 以及缓冲对照。该结果表明通过 TSM(图 6A)该抗 M 血清优先抑制,相对于抗 -A 血清的抑制(图 6B),与理论预期一致。

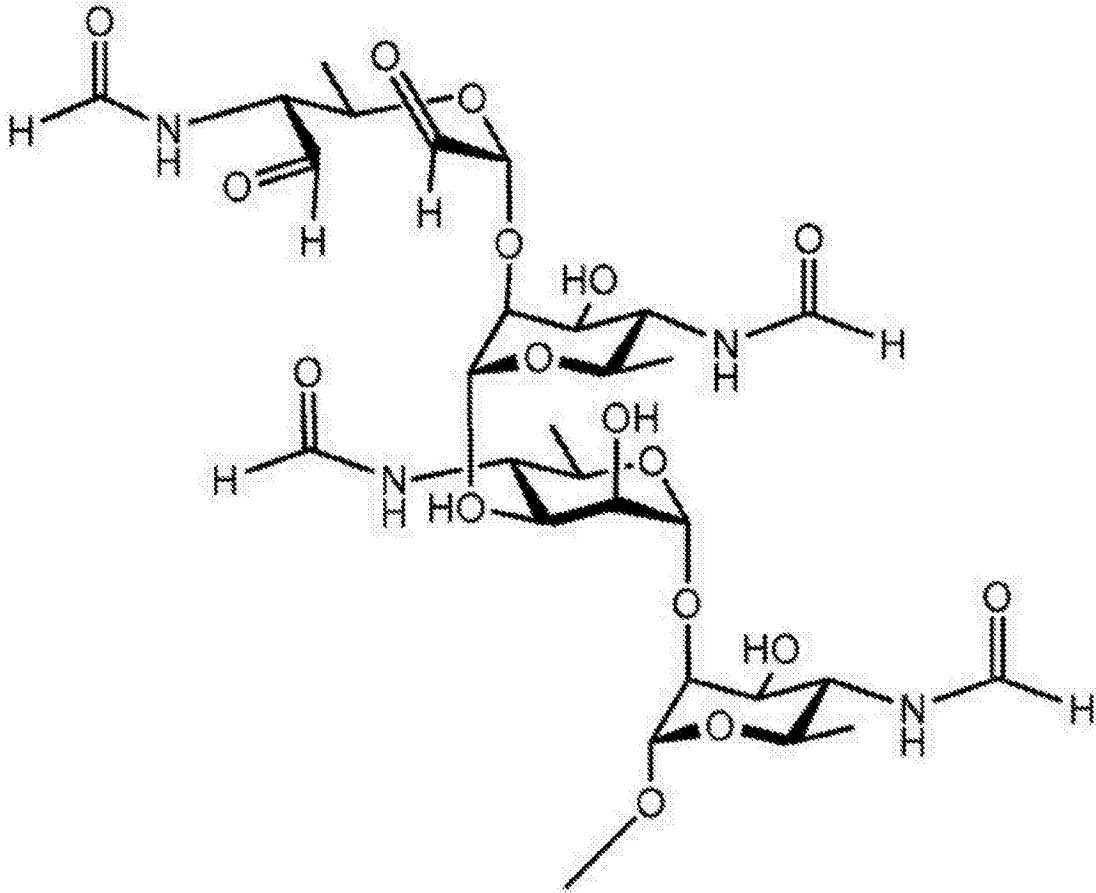
[0485] TSM 抗原在血清诊断中的应用

[0486] 所述 TSM 抗原化学偶联至一种 ELISA 板,以创造一种间接 ELISA 并且促进竞争性抗体相互作用的评估。由于抗原的高度可溶性性质及其小尺寸,被动吸收到 ELISA 平板表面并非直接的。与此相反,它化学偶联至一种 ELISA 板表面,与酰肼基官能化于间隔臂的末端(Coming Carbo-BIND™#2507)。如上所述,酰肼基团与醛类自发地反应,其经高碘酸氧化

可能生成于碳水化合物内。

[0487] 所述 TSM 抗原培养在 2mM 高碘酸钠, pH5.5 的 50mM 乙酸钠缓冲液, 在黑暗中 4°C 下持续 2.5 小时。这足以氧化的邻二醇的羟基, 在末端糖的二位碳和三位碳上 (Sussich et al. (2000) Carbohydr Res 329, 87-95), 该分子中唯一的邻二醇基团以生成以下结构:

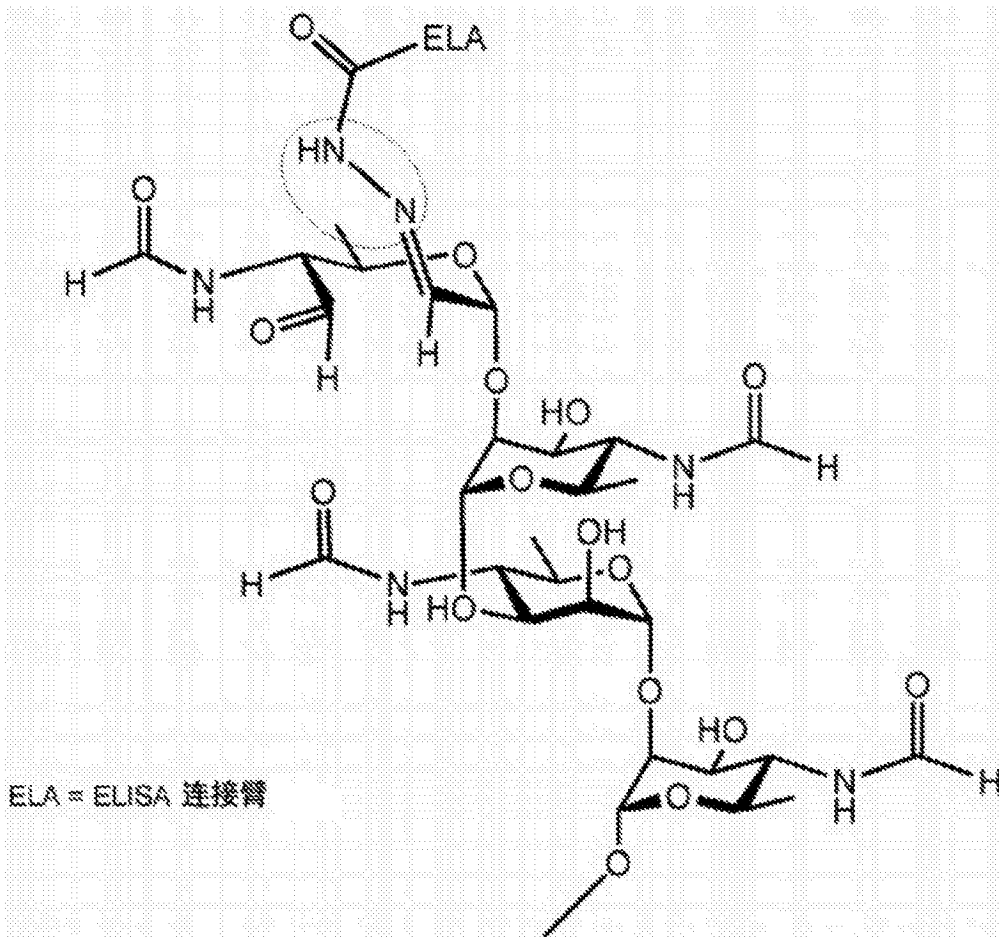
[0488]



[0489] 具有 BM40 抗 -M 单克隆抗体的竞争性的 ELISA 如上所述被应用于确认以上所示的氧化的 TSM 抗原 (oxiTSM) 保持了抗体相互作用。由 TSM 抗原和缓冲的过滤实现残余的高碘酸钠被从该反应中移除, 过 Sephadex G-10 的短柱 (GE 医疗集团), 其与过量的高碘酸钠反应, 并用洗脱缓冲液的适当体积, 允许所述 oxiTSM 抗原流过该柱子。除去偏高碘酸钠是必要的, 以防止 oxiTSM 进一步氧化, 并由反应与 ABTS (2, 2-联氮-双 (3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐) 的消除证实了移除。

[0490] 所述 oxiTSM 抗原接着被稀释至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 在 0.1M 的 pH5.5 的乙酸钠缓冲液并向 Carbo-BIND™板的每个孔中加入 100 μL , 所述 Carbo-BIND™板在 37°C 下培养 3 小时。在此培育过程中, 在氧化的四糖上的醛基与在连接至所述 ELISA 板表面的键合连接的末端的酰肼基自发地发生反应, 以形成稳定的共价腙键, 如下所示 (该腙键被示为一个虚线环):

[0491]



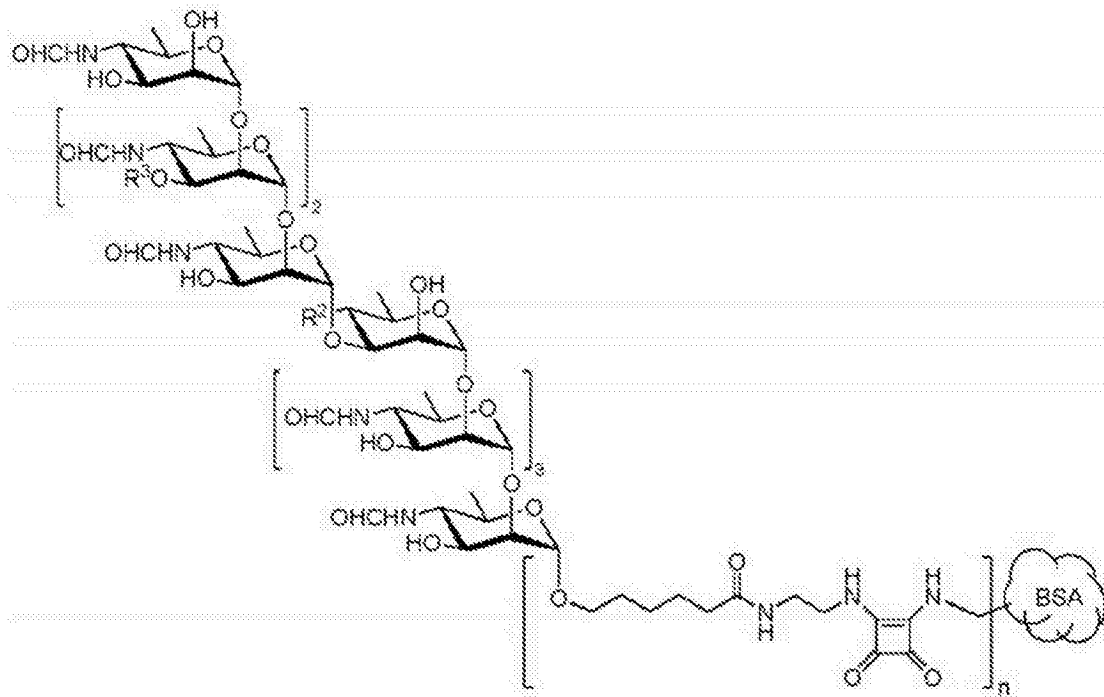
[0492] 在此之后,所述板的每个孔用 200 μ L 磷酸缓冲生理盐水清洗 4 次,所述磷酸缓冲生理盐水具有 0.5% 的吐温-20 (PBS-T20),之后拍干。这些涂覆有 ELISA 的板被用于检测现场的源自上述由传统现有技术确认感染了布鲁氏杆菌流产菌株 ($n = 45$) 的牛和没有布鲁氏菌病但在在一种或多种常规血清学诊断检测 ($n = 68$) 中与血清交叉反应的牛的血清。

[0493] 血清在缓冲液 (Sigma#B6429) 中被稀释至 1/50, 而将 100 μ L 此溶液加入到涂覆有抗原的板的每个孔中, 重复测试各样品。将此板在室温下在转速为 160rpm 的旋转振荡器上培养一小时, 然后用上述 PBS-T20 清洗。一个 HRP 偶联的蛋白 G 偶联物 (Thermo#31499) 在缓冲液中被稀释至 1 μ g/ml, 随后加入 100 μ L 至该板的每个孔中, 所述板接着被培养并按照如上所述清洗血清。然后将板用 ABTS (2, 2-联氮-双(3-乙基苯并噁唑-6-磺酸)二铵盐) 开发, 并用过氧化氢基底处理 10-15 分钟, 用 0.4mM 的叠氮化钠停止反应, 并在 405nm 波长处读数。为重复的光密度被平均, 并且将所述空 OD (仅为缓冲液以代替血清) 减去。此值然后表示为一个共同的阳性对照的百分比, 血清样本源自感染了布鲁氏杆菌的牛。

[0494] 所述 TSM 抗原 iELISA 对上述牛样品的同一种群进行评估, 用于羊种布鲁氏杆菌 16M 和小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS iELISAs 的评估, 45 源自布鲁氏杆菌流产生化 1 型 (A 优势菌株) 培养的阳性动物和 68 源自假阳性血清学反应器。对于 ELISA 的结果显示在图 7 中。

[0495] 另外的抗原低聚糖偶联物-ELISA 滴定法

[0496] 首先确定所述低聚糖的总长度, 必要提供特异性用于连接至抗-A 或抗-M 抗体, 合成五糖和九糖 BSA 偶联抗原对上述牛血清进行了评价。每种抗原包含了内置和居中设置的



43

[0504] 在一个实验中,BSA-碳水化合物-蛋白质偶联物 42 和 43(在 PBS 中 $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 被用于在 4°C 下过夜涂覆 96 孔微量滴定板 (MaxiSorp, Nunc)。所述板用 PBST(包含 0.05% (v/v) 吐温 20 的 PBS) 洗 5 次。mAb YsT9.1 的系列 V10 稀释和 Bm10 腹水或者上清液形式杂交瘤细胞培养,在包含 0.1% 的 BSA 的 PBST 中进行,将溶液分布在复制品中,在酶标板上,并在室温下培养 2 个小时。将板用 PBST 洗涤 (5 次),并将羊抗 IgG 抗体偶联至辣根过氧化物酶 (Kirkegaard&Perry 实验室;1:2000 稀释于 0.1% BSA/PBST; $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$)。将混合物随后培养 1 小时。所述板用 PBST 洗 5 次,然后加入 1:1 的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 ($0.4\ \text{g}/\text{L}$) 和 0.02% 双氧水溶液的混合物 (Kirkegaard&Perry 实验室; $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$)。2 分钟后,该反应由加入 1M 的磷酸 ($100\ \mu\text{L}/\text{孔}$) 而终止。吸光度在 450nm 读取。终点滴度记录为稀释,给出一 0.2 背景以上的吸收。

[0505] 所述单克隆抗体 (YsT9-1 和 Bm10) 先前证明是对布鲁氏杆菌 A 和 M 抗原有特异性 (Bundle et al. (1989) Infect. Immun. 57, 2829-2836), 被滴定到其终点,针对涂覆在 ELISA 板上的抗原 42 和 43(图 8)。所述九糖抗原 43 将抗 A 和 M 特异性抗体连接着等效亲和力,然而,五糖 42 显示对 M 特异性抗体的优选,当任然连接着所述 A 特异性抗体却具有约 10 倍的减少亲和力的时候。

[0506] 之前的研究表明,所述 YsT9-1 和 Bm10 抗体对于所述各个 O-多糖抗原具有亲和力的差异,在 400-1000 之间 (Bundle et al. (1989). Infect. Immun. 57, 2829-2836)。如所述的五糖抗原 42 显示出了对于 M 特异性抗体的优选。

[0507] 另外的抗原低聚糖偶联物-血清学检测研究与分析

[0508] 在进一步的实验中,所述偶联物 42 和 43 通过过夜培养被固定到标准聚苯乙烯酶标板的表面上,所述培养处于碳酸盐缓冲液中,在 4°C 下,以 $2.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 。所述酶标板按照上述方式洗涤,并且用 1/50 的缓冲液稀释的血清培养(备份)(见下文)30 分钟,在室温下培养,并且以 160rpm 的转速;此后,如上所述将其清洗并拍干。对于牛血清,HRP 偶

联的小鼠抗牛的 IgG1 偶联物被使用了。所述偶联物被稀释至在缓冲液工作浓度,并且所述板被培养,清洗再拍干,作为血清培育阶段。然后,该酶标板用 ABTS (2, 2- 联氮 - 双 (3- 乙基苯并噻唑 -6- 磺酸) 二铵盐) 和过氧化氢底物发展 10-15 分钟,用 0.4mM 的叠氮化钠终止反应并在 405nm 波长处读取数值。对于复制物的光密度,被平均,而该空白 OD (仅用缓冲液代替血清) 被减去。此数值随后被表达为一个来自布鲁氏杆菌感染的牛的共同的阳性对照血清样品的百分比。

[0509] 所述同样的方法被采用,通过 iELISA 以评估牛血清,以及五糖和九糖偶联物被用于评估牛血清,通过另外的 4 种低聚糖 BSA 偶联物。所述低聚糖为:

[0510] 4, 6- 二脱氧 -4- 甲酰胺基 α -D- 甘露吡喃糖基 -(1-2)-4, 6- 二脱氧 -4- 甲酰胺基 - α -D- 甘露吡喃糖基 -(1-3)-4, 6- 二脱氧 -4- 甲酰胺基 - α -D- 甘露吡喃糖基 -(1-2)-4, 6- 二脱氧 -4- 甲酰胺基 - α -D- 吡喃甘露糖 (四糖, 式 VIII)

[0511] 4, 6- 二脱氧 -4- 甲酰胺基 α -D- 甘露吡喃糖基 -(1-3)-4, 6- 二脱氧 -4- 甲酰胺基 - α -D- 甘露吡喃糖基 -(1-2)-4, 6- 二脱氧 -4- 甲酰胺基 - α -D- 甘露吡喃糖基 (三糖 (末端 α -1, 3 键), 式 XVI)

[0512] 4, 6- 二脱氧 -4- 甲酰胺基 α -D- 甘露吡喃糖基 -(1-2)-4, 6- 二脱氧 -4- 甲酰胺基 - α -D- 甘露吡喃糖基 -(1-3)-4, 6- 二脱氧 -4- 甲酰胺基 - α -D- 甘露吡喃糖基 (三糖 (末端 α -1, 2 键), 式 XVII)

[0513] 4, 6- 二脱氧 -4- 甲酰胺基 - α -D- 甘露吡喃糖基 -(1-3)-4, 6- 二脱氧 -4- 甲酰胺基 - α -D- 吡喃甘露糖 (二糖, 式 II)。

[0514] 这些抗原偶联至 BSA, 借助于一种如上所述的还原端 $-1-0-(CH_2)_5-COO-CH_3$ 的连接, 以形成类似以上所示的 42 和 43 的结构。由于偶联通过还原性末端发生, 在非还原端的所述键合连接被称为“终端键合连接”。

[0515] 所述 BSA- 九糖、五糖、四糖、三糖和二糖偶联物 iELISA (以及上述 oxiTSM iELISA) 被评估, 针对上述牛的现场样品的同一群体, 用于评估羊种布鲁氏杆菌 16M 和小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS iELISAs; 即是, 源自布鲁氏杆菌流产生化 1 型菌株 (A 优势菌株) 培养的阳性动物的 45, 以及源自假阳性血清学反应器的 68。通过图 7 和 9-11 散点显示的这些 iELISAs 的结果, 被评估以找到最佳约登指数, 因为每个 iELISA 和 ROC 分析被用于确定所 ROC 和 AUC。此数据如下表 7 所示, 伴随着 AUC 的 95% 的置信区间; 表 7 显示了来自表 3 的数据和另外的低聚糖的数据, 为了便于比较。表 8 示出的概率 (P) 值有关来自每个抗原检测的 AUC 数据之间的统计学显著差异测试。所述 AUCs 都与彼此相比较, 而使用正态分布模型计算出了 P 值。所述评估如现有假说所述的调查中是单尾的, 即说明更呈现 M 性的抗原将具有更高的 AUC 值。如表 7 和表 8 显示了来自表 4 中的之前的信息, 以及另外的低聚糖的数据。

[0516] 一种 ROC 曲线的选择如图 12 所示。该图显示了关于天然抗原检测的 ROC 曲线, 并且充分体现了羊种布鲁氏杆菌 16M OPS 相对于小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS 的优势。来自 M 状合成的 BSA- 五糖、BSA- 四糖和 BSA- 二糖偶联物 iELISAs 的数据也被显示出来, 并且图形描述了在诊断性能方面的进展, 即与在此结构中的 α -1, 2 键的还原反应相当, 并与所述 α -1, 3 键的保留相当。

[0517] 表 7-OPS 和合成的低聚糖 iELISAs 在牛血清检测中的性能统计数据

[0518]

检测	%老化 α -1,3 键	最佳约登指数(YI=DSn+DSp-I)			ROC-曲线下面积	
		YI 估算	DSn %	DSp %	AUC	95%置信区间
小肠结肠炎耶尔森菌 O:9 OPS iELISA	0	0.1297	64.44	48.53	0.5065	0.3964-0.6167
羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISA	20	0.4232	55.56	86.76	0.7065	0.6024-0.8106
九糖 iELISA	12.5	0.5713	68.89	88.24	0.8317	0.7512-0.9122
五糖 iELISA	25	0.6174	95.56	66.18	0.8667	0.8019 - 0.9314
三糖 (末端 α -1,2) iELISA	50	0.6091	73.33	86.76	0.8672	0.7976 - 0.9367
oxiTSM iELISA	33.3/50	0.6670	73.33	92.65	0.8948	0.8345 - 0.9550

[0519]

三糖 (末端 α -1,3) iELISA	50	0.7268	80.00	92.65	0.8987	0.8334 - 0.9640
四糖 iELISA	33.3	0.6745	73.33	94.12	0.9046	0.8478 - 0.9613
二糖 iELISA	100	0.7860	84.44	92.65	0.9310	0.8345 - 0.9550

[0520] 表 8-OPS 和合成的低聚糖 iELISAs 在牛血清检测中的 ROC AUC 数据的比较

[0521]

AUC (P = [单尾]) 之间的区别	YeO9	Bm	Bm/Ye	NS	PS	Trit1,2	OxiTSM	Trit1,3	Tetra
小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS iELISA (YeO9)									
羊种布鲁氏杆菌16M OPS iELISA (Bm)	< 0.0001								
Bm16M/Ye0:9 (Bm/Ye)	< 0.0001	0.0239							
九糖 iELISA (NS)	< 0.0001	0.0032	0.3050						
五糖 iELISA (PS)	< 0.0001	0.0005	0.0918	0.1003					
三糖 (末端 a-1, 2) iELISA (Trit1, 2)	< 0.0001	0.0007	0.1093	0.2148	0.4920				
oxiTSM iELISA (oxiTSM)	< 0.0001	< 0.0001	0.0239	0.0307	0.1867	0.2005			
三糖 (末端 a-1, 3) iELISA (Trit1, 3)	< 0.0001	< 0.0001	0.8080	0.0384	0.1736	0.1949	0.4522		
四糖 iELISA (Tetra)	< 0.0001	< 0.0001	0.0228	0.0146	0.0853	0.0359	0.3632	0.4207	
二糖 iELISA (Di)	< 0.0001	< 0.0001	0.0158	0.0087	0.0322	0.0322	0.1379	0.0901	0.2005

[0522] 表 7 中的数据显示了升序的 AUC 值的抗原 (最低的在顶部和最高的在底部)。本文中,AUC 的表示检测的能力,即能够正确地分类感染了布鲁氏杆菌的动物样品和那些没有

感染的动物样品。在此数据分析中,所有未感染布鲁氏杆菌的动物样品在在一种或多种常规血清学诊断布鲁氏菌病检测中呈假阳性。该结果(基于 AUC 数据)表明所述羊种布鲁氏杆菌 OPS 优于所述小肠结肠炎耶尔森菌 0:9OPS,并且据称这是由于前者的 OPS 中的 α -1,3 键的存在。在抗原结构中的键合连接的百分比即 α -1,3 键的百分比(其余为 α -1,2 键)也在此表中有显示。

[0523] 通常,所述 AUC 随着抗原内的 α -1,3 键的百分比的增加(以及 α -1,2 键的减少)而增加。这在在两个天然 OPS 抗原的比较之中是十分明显的,并且其在九糖、五糖、四糖和二糖 BSA 偶联物的 AUC 数据中也很明显。然而,有一些细微差别存在于数据之中,所述数据应当被视为如下所述,关于九糖 BSA 偶联物和羊种布鲁氏杆菌 16M OPS,氧化的四糖抗原和两种三糖 BSA 偶联物之间的比较。

[0524] 所有合成的 BSA 偶联的低聚糖抗原在此方面具有优异的诊断能力,相对于天然 OPS 抗原。这包括所述九糖 BSA- 偶联物,其相对于羊种布鲁氏杆菌 16M OPS 具有极小比例的 α -1,3 键。这种明显的异常可能是由于 α -1,3 键在天然结构中精确的定位而造成的,并且所述多价性的抗体可结合至此结构。

[0525] 它并不是直接地评估 oxiTSM 抗原相对于其它被调查的抗原的性能,由于方法上的差异,不仅仅是终端每个糖胺的断裂,从此结构的参与部分直接连接到官能化的 ELISA 板表面,并因此呈现所述还原糖作为抗原的尖端。出于这个原因,表 7 中所示的 α -1,3 键被示为 33.3/50 的依赖于到被氧化的终端的“每个糖胺”的该键合连接待定的意义。尽管有这些明显的障碍,所述 oxiTSM iELISA 具有更大的 AUC 值,相对于所述 BSA- 五糖和 α -1,2 终端的 BSA- 三糖偶联物 iELISAs。这可能是由于在末端的‘尖端’抗原决定簇的损耗,由于这不是由 oxiTSM 抗原展示出来的,由于末端糖的氧化和偶联。天然的‘尖端’抗原将类似于来自布鲁氏杆菌 A 和 M 优势菌株和小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 的 OPS。此‘尖端’抗原决定簇也可能解释了更高的对于 α -1,3 封端三糖的 AUC 值,相对于 α -1,2 封端三糖。根据最近披露的该结构图(Kubler-Kielb&Vinogradov(2013)Carbohydr. Res. 378, 144-147),在 M 优势菌株 OPS 中的大部分 OPS 分子的尖端为 α -1,2 连接的二糖,如也将在 OPS 的情况下源自布鲁氏杆菌 A 优势菌株以及小肠结肠炎耶尔森菌 0:9。所述 α -1,3 封端的三糖并不存在这种尖端,从而普通的抗-‘尖端’的抗原决定簇抗体结合的可能性会更小,相较于针对直线型 M 抗原决定簇的抗体。

[0526] 所述最高的 AUC 值由所述 BSA- 二糖偶联物 iELISA 产生。这显然比 BSA- 五糖偶联物 iELISA 的 AUC 值要高得多($P = 0.0322$),所述 BSA- 五糖偶联物 iELISA 本身的 AUC 值显著高于天然抗原的 AUC 值(小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 和羊种布鲁氏杆菌 16M OPS)。所述二糖中没有 α -1,2 键存在,仅仅有一个 α -1,3 键。在此数据的基础上,该结构具有极强的功能并表示了最小尺寸的 M20 抗原决定簇。如此小的结构结合至许多个多克隆抗体的能力,和以这种选择性的方式执行的行为,是一个令人惊讶的发现。单个 α -1,2 键的负面影响是如此的出人意料。所述能力以及在多大程度上所述二糖(以及其它 M 样低聚糖)能够选择性地结合至多克隆血清是预料不到的,其中的所述多克隆血清是由布鲁氏杆菌 A 优势菌株的感染而引起,上述预料不到的情况在此进行了第一次展示。

[0527] 来自最大的 YI 值的数据在很大程度上与 AUC 数据相一致,由于较小的 BSA- 低聚糖偶联物具有较少的 α -1,2 键合连接,提供了优异的诊断参数。主要的差异是 α -1,3 键

封端的 BSA- 三糖偶联物的优越的最大 YI 值相对于所述 BSA- 四糖偶联物。这可以通过参数进行合理化上面提出的关于‘尖端’抗原决定簇的还原以及 α -1, 2 键的消除。

[0528] 所有的 BSA- 低聚糖偶联物 iELISAs 也被用于来自上述八个动物的血清, 所述动物在实验中感染了布鲁氏杆菌流产 544 菌株 ($n = 4$) 或小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 ($n = 4$)。仅有收集自第 3, 7, 16 和 24 周的样品被检测了, 因为收集自第 53 周的布鲁氏杆菌流产菌株感染的动物的样品, 进行的传统的血清学诊断检测给出了矛盾的结果。

[0529] 来自实验中感染了牛的样品的结果显示在图 13-19。图 13 显示了源自羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISA 的结果, 并且展示了一个相当大的应答来自衍生自小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 感染的动物的血清。图 14 和 15 分别显示了源自九糖和五糖 BSA 偶联物 iELISA 的数据。来自羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISA 和五糖 BSA 偶联物 iELISA 的结果相互印证在一个简单的散点图 16 中。图 17 和 18 分别显示了源自四糖和二糖 BSA 偶联物 iELISA 的数据。虽然区分来自两个感染类型的抗体之间的能力不是绝对的, 图 18 显示了该双糖更加接近于实现这一目标。这种差异在散点图 19 中更容易看清, 表明来自四糖和二糖 BSA 偶联物 iELISA 的结果。

[0530] 来自实验中被感染的动物样品的所有的血清学数据 (第 3, 7, 16 和 24 周) 通过以下的定量标准进行评估。16 周的样品, 源自实验中感染了小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 的牛, 具有计算出来的数量上更大的血清滴度, 相对于源自实验中感染布鲁氏杆菌流产 544 菌株的最低的滴度样品。表 9 中对于每个血清学诊断检测显示出来了百分比。所述 CFT, SAT, sLPS iELISA 和 cELISA 和 FPA 数据之前已被发表 (McGiven et al. (2008) J. Immun. Meth. 20, 7-15), 并且显示了交叉反应的显著程度, 所述交叉反应发生在传统和现代血清检测中。

[0531] 虽然数据组相对较小, 该数据显示了二糖和三糖 BSA 偶联 iELISAs (使用在非偶联端具有一个 α -1, 3 键的三糖) 在区分衍生自两种感染的抗体中是最佳的。这展示了改进的诊断特异性的提供, 当检测现场的 FPSRs 的时候, 所述二糖具有与样品相同的有益效果, 即是已经在实验中感染了革兰氏阴性菌于占有的 OPS 结构中, 所述结构与布鲁氏杆菌的结构最相似。在此样本组中, 来自九糖、五糖、四糖和 α -1, 2 封端的三糖 BSA 偶联物 iELISAs 的结果相对于羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISAs 没有表现出优势。这两种在这方面表现最差的测定, 都具有 81.25% 的百分比, 为 iELISAs 进行的, 使用了来自布鲁氏杆菌流产 S99 菌株 (A 优势菌株) 的 sLPS 和所述小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 iELISA。这反映了这些有机体的 OPS 结构之间的相似程度高。

[0532] 表 9-16 周的样品的百分比, 所述样品源自实验中感染了小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 的牛, 其具有数量上更大的血清滴度, 相对于源自实验中感染了布鲁氏杆菌流产 544 菌株的牛的最低滴度样品

[0533]

传统检测和天然抗原	样品的百分比
补体结合试验	31.25
血清凝集试验	56.25

iELISA(sLPS, 布鲁氏杆菌流产 S99 菌株)	81.25
cELISA(sLPS, 羊种布鲁氏杆菌 16M)	43.75
荧光偏振检测	50.00
小肠结肠炎耶尔森菌 0:9 OPS iELISA	81.25
羊种布鲁氏杆菌 16M OPS iELISA	56.25
合成的低聚糖抗原	
九糖	56.25
五糖	75.00
四糖	75.00
三糖(末端 1, 2)	68.75
三糖(末端 1, 3)	18.75
二糖	12.50

[0534] 所述九糖、五糖、四糖和二糖 BSA- 偶联物 iELISAs 也是针对源自 125 随机抽样的非布鲁氏杆菌感染的牛的 125 个血清样本进行评估。结果由散点图展示, 具有源自布鲁氏杆菌感染的牛的结果 ($n = 45$), 在图 20(九糖和五糖) 和 21(四糖和二糖) 中。

[0535] 表 10- 合成的低聚糖 iELISAs 在牛血清检测中的性能统计数据(随机抽样的非布鲁氏杆菌感染的)

[0536]

检测	最佳约登指数(YI=DSn+DSp-I)			ROC-曲线下面积	
	YI 估算	DSn %	DSp %	AUC	95%置信区间

[0537]

九糖 iELISA	0.9920	100.0	99.20	0.9998	0.9992-1.000
五糖 iELISA	1.0000	100.0	100.0	1.0000	1.000-1.000
四糖 iELISA	0.9476	95.56	99.20	0.9964	0.9911-1.000
二糖 iELISA	0.8142	82.22	99.20	0.9108	0.8401-0.9814

[0538] 显示于散点图 20 和 21 以及表 10 中的所述结果, 表明九糖、五糖和四糖 BSA- 偶联物 iELISAs 是非常有效的血清学诊断检测。该数据也表明所述二糖 BSA- 偶联物 iELISA 在

区分这些样品类型方面不太有效,相较于其它的较大的具有 α -1, 2 键的低聚糖。当所述二糖 BSA- 偶联物被使用时,源自随机取样的被非布鲁氏杆菌感染的牛的血清具有更多类似的反应对于所观察到的样品 FPSR,相较于具有九糖、五糖和四糖 BSA- 偶联物 iELISAs 的情况。

[0539] 所述 oxiTSM BSA- 五糖和 BSA- 九糖抗原也被应用于检测小反刍动物血清中的特异性抗布鲁氏杆菌的抗体。所述 oxiTSM 抗原通过上述同样的方法被偶联至所述 Carbo-BIND™ 酶标板,而所述 BSA 偶联的低聚糖通过上述同样的方法被涂覆到酶标板上。使用上述用于牛血清的同样方法除了蛋白 G HRP 偶联物的使用以外的方法将检测完成。总之,61 个样品从个体绵羊和山羊进行评估,所述绵羊和山羊来自被确认感染了羊种布鲁氏杆菌生化 3 型的羊群(混合了 A 优势菌株和 M 优势菌株)且在使用羊种布鲁氏杆菌 sLPS 抗原的 iELISA 中呈阳性的羊群。将源自英国的绵羊和山羊的 94 个血清也进行了检测,所述绵羊和山羊一直是免于羊种布鲁氏杆菌的(图 22)。

[0540] 在图 22 中,对于布鲁氏杆菌感染种群为 32.5 的一个样品的最小的 X 轴值,因此没有来自此种群的隐藏于该数据的过度描绘的数据,源自非布鲁氏杆菌感染的种群。对于 16M OPS iELISA 而言被优化的 YI 值为 0.985 (95% CI = 0.952-1.000) 和所述 'M' 四糖 iELISA 的 YI 值是 0.816 (95% CI = 0.720-0.912)。两个 YI 值的 95% 置信区间没有重叠,这在诊断性能方面展示出一种重要的区别。然而,所述数据确实展示了 TSM 抗原检测了抗布鲁氏杆菌抗体于血清内,所述血清源自于感染了羊种布鲁氏杆菌的小反刍动物。图 23 中的数据表明通用九糖偶联物抗原的有效性,如基于此样品组,所述 DS_n 和 DS_p 都是 100%。

[0541] 最后,酶标板被涂覆如上所述的共聚聚维酮二糖偶联物 99a 和 99b 用于 BSA 偶联物。源自感染了猪种布鲁氏杆菌的患者的人类血清的系列 V10 的稀释被应用到板,而结合的抗体被山羊抗人类辣根过氧化物酶结合物所检测。结果如图 24 所示。这表明所述二糖能够检测源自人类患者的样品中的布鲁氏杆菌的感染。

[0542] 抗体结合研究

[0543] BSA 偶联物 98 (包含如式 XIV 所示的低聚糖) 和共聚维酮偶联物 100b (包含独占 α -1, 2 键的低聚糖) 被涂覆在上述酶标板上。鼠单克隆抗体的系列 V10 稀释,所述鼠单克隆抗体为 A 或 M 特异性,被应用于板和结合的抗体,被羊抗鼠 IgG 辣根过氧化物酶结合物检测到。抗体 YsT9.1 和 YsT9.2 是抗 -A 抗体。抗体 BM10 和 BM28 是 M- 特异性的。结果显示于图 25 和 26 中,并显示了二糖的结合特异性,以及独占的 α -1, 2 键合连接的低聚糖偶联物连接至一个抗 -M 抗体的失败。

[0544] 为评估一种呢抗 -M 抗体 mAb 至抗 BSA- 四糖、三糖和二糖偶联物的结合,它们每个以 5 μ g/ml (在 pH 为 10.0 的碳酸盐缓冲液中) 都被涂覆到酶标板上,加倍稀释相邻酶标板孔,并且按照上述方法所述板被培养并清洗,对于牛血清 iELISAs 以及所述 BSA 偶联物。一个 HRP- 偶联 BM40 mAb 的工作强度稀释被加入到每个孔中,并将此在室温下培育 30 分钟,然后按前述方法清洗。该板用 HRP ABTS 底物处理,而该反应在 15 分钟后由添加叠氮化钠而终止。所述 ELISA 板在 405nm 处读取数值,以测量每个孔的光密度。

[0545] 该结果(图 27)表明所述 BM40 mAb 连接至所述 BSA 偶联物;最有效的三糖以及几乎等同于所述四糖和二糖 BSA 偶联物。所述 BM40 mAb 至这些 3 个 BSA- 低聚糖结构的所述结合展示了 M 抗原决定簇的存在于它们之中,由于 BM40 先前已显示出对 M 优势菌株 OPS 的

高度特异性。除了结合 BM40 mAb, 本发明已经显示出这些结构也结合多克隆血清。因此, 有可能同时培养 HRP 偶联的 BM40 mAb 和血清抗体, 为了建立竞争性的 ELISA, 为了检测在血清中的多克隆抗体。使用二糖做到这一点的能力尤其值得注意, 由于这已经是抗原, 所述抗原提供 FPSRs 的最佳分辨率, 合并一个竞争元素到免疫检测中, 在诊断能力方面预计产量将得到进一步改进。

[0546] 疫苗接种研究

[0547] 一种疫苗糖偶联物包含一种低聚糖, 所述低聚糖由独占的 $-(1-2)-$ 键连接的 4, 6- 二脱氧 -4- 酰氨基 - α - 吡喃糖单元形成, 所述低聚糖共价结合到一种载体蛋白质, 例如破伤风毒素, 被评价其疫苗的有效性, 如下。所述过程基于疫苗的有效性检测的标准模型, 如诊断检测和疫苗的 OIE 手册中所描述 (Nielsen et al. (2009) In: Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals 2009; 300 office International Des Epizooties, Paris, Chapter: Bovine brucellosis, pg 22-29)。小鼠的对照组和实验组被建立用于评估。例如, 对照 1 组——仅仅使用 PBS 进行疫苗接种; 对照 2 组——使用未偶联的 'A' 低聚糖破伤风类毒素 + 助剂进行疫苗接种; 对照 3 组——使用 1×10^3 CFU 对每只鼠用布鲁氏杆菌流产 S19 菌株为基准疫苗进行皮下疫苗接种。该疫苗的实验组为, 第 4 组——用 'A' 型低聚糖破伤风类毒素糖偶联物进行疫苗接种; 而第 5 组——用 'M' 型低聚糖破伤风类毒素糖偶联物进行疫苗接种。接种之后, 这些小鼠面临的挑战是用 2×10^5 CFU (每只鼠) 的布鲁氏杆菌流产 544 菌株的腹腔接种。上述挑战 15 天后, 对小鼠实施安乐死, 其脾脏内的布鲁氏杆菌的数目列举提供了保护的一种度量。将小鼠也放血并用血清学来确定来自每组的抗体应答至所述 'A' 和 'M' 抗原决定簇。这提供了一种方法, 通过此方法评价低聚糖破伤风类毒素糖偶联物的 DIVA 潜力。

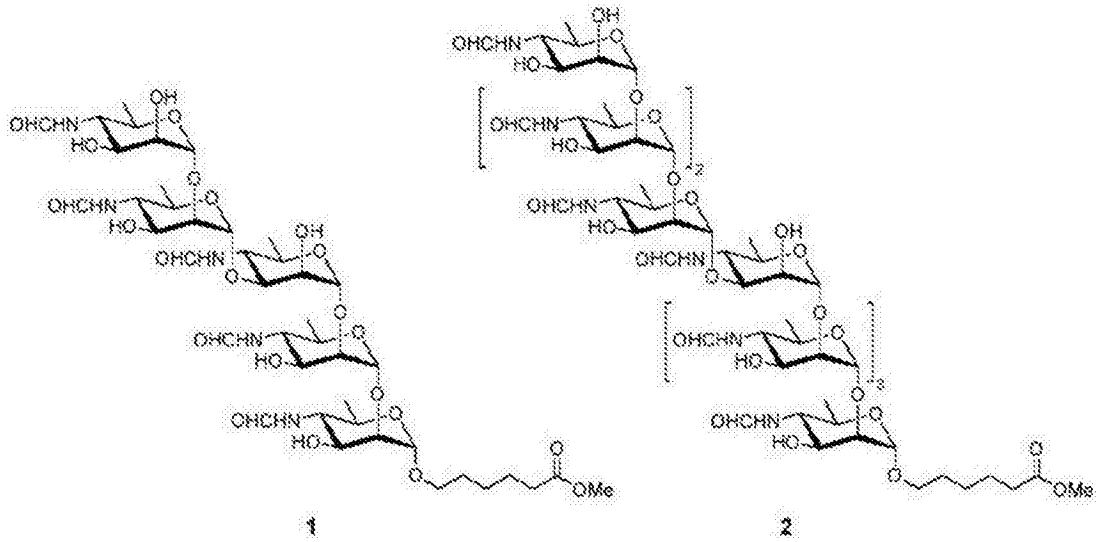


图 1

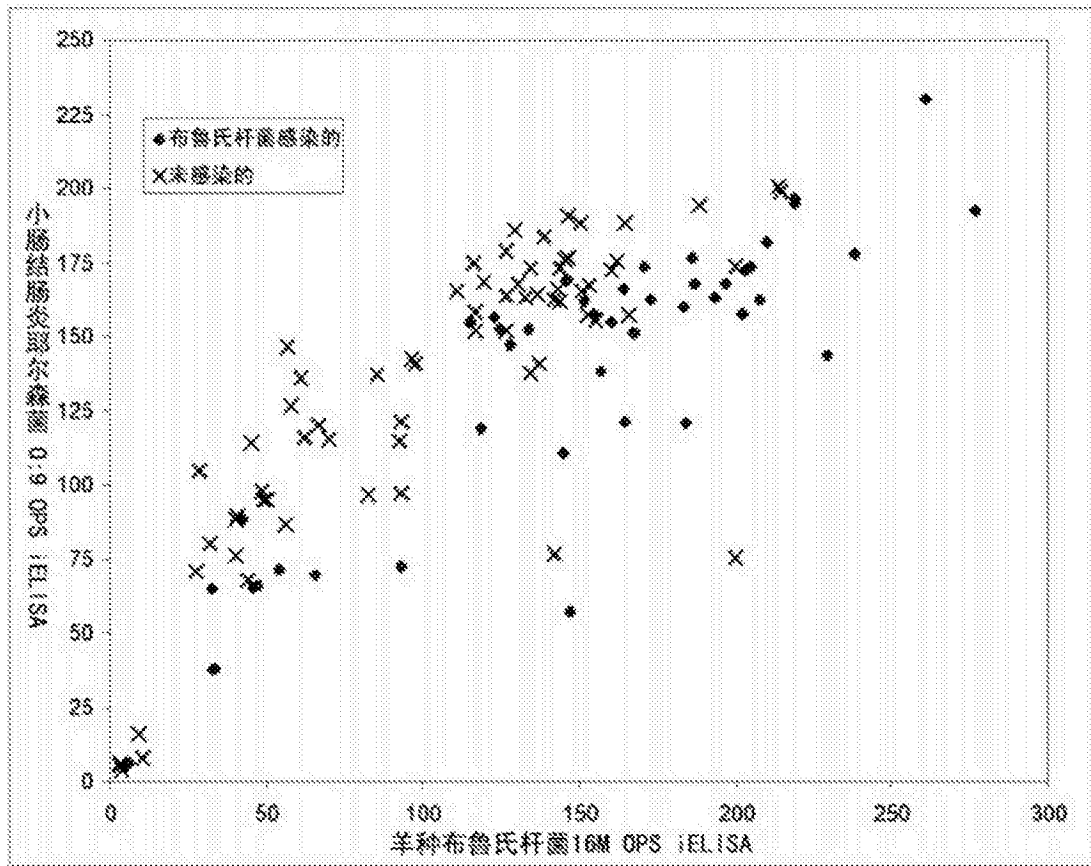


图 2

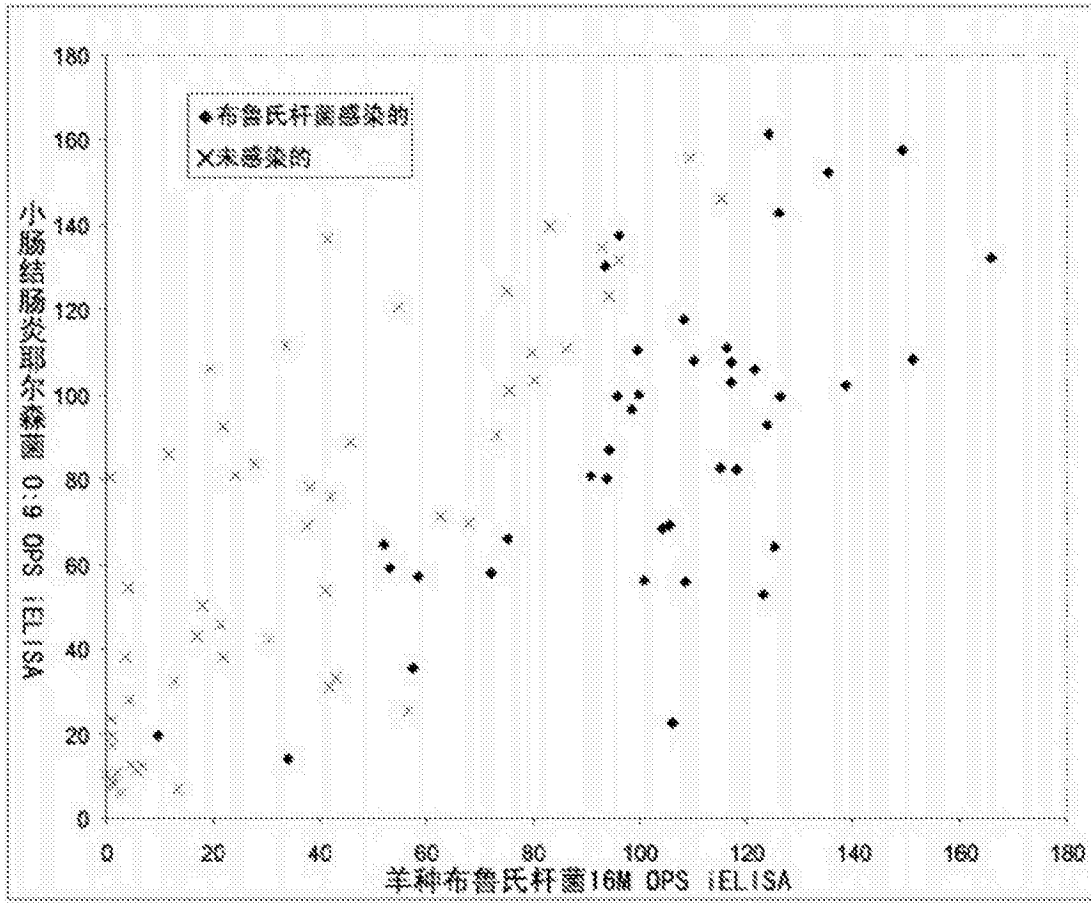


图 3A

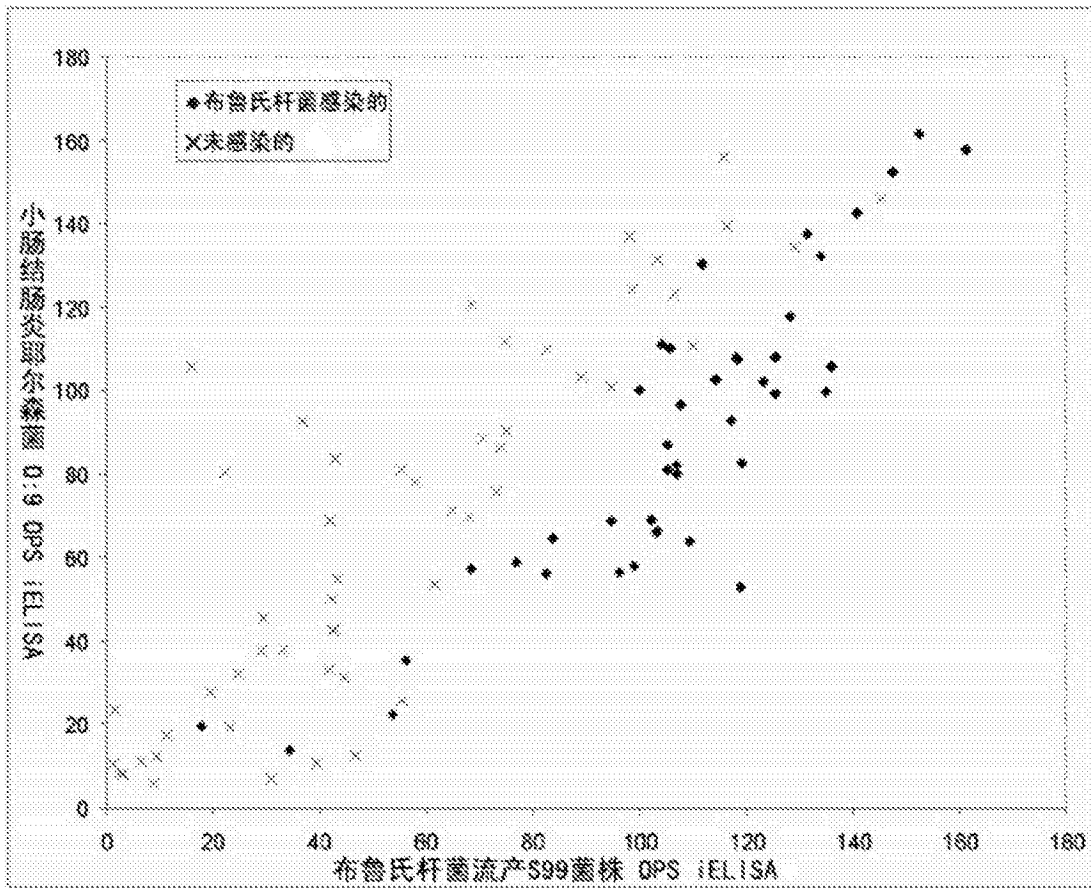


图 3B

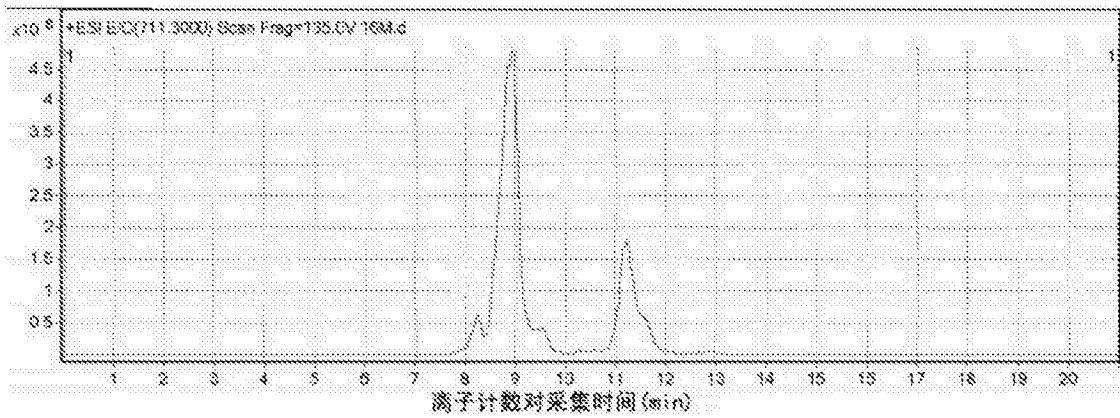


图 4A

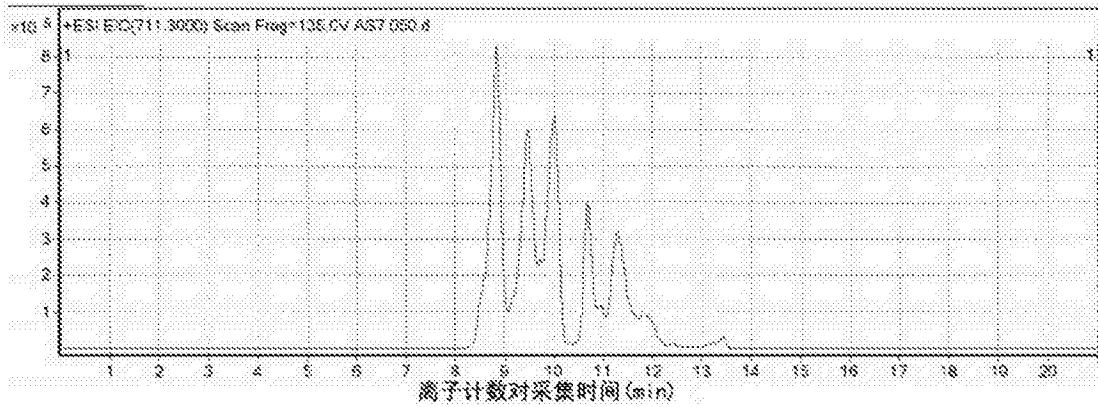


图 4B

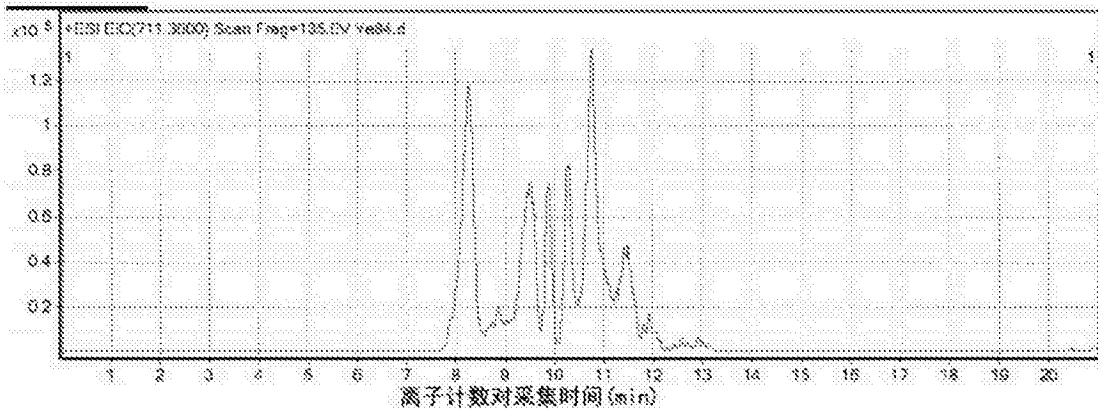


图 4C

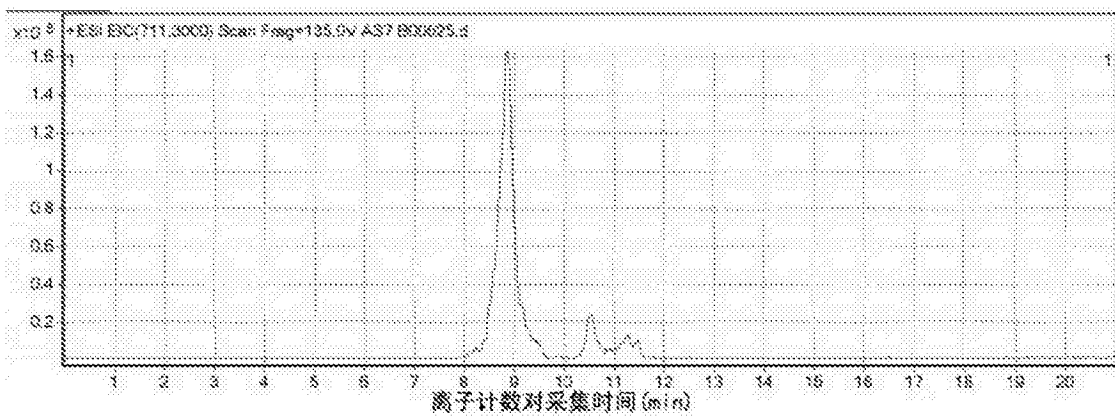


图 4D

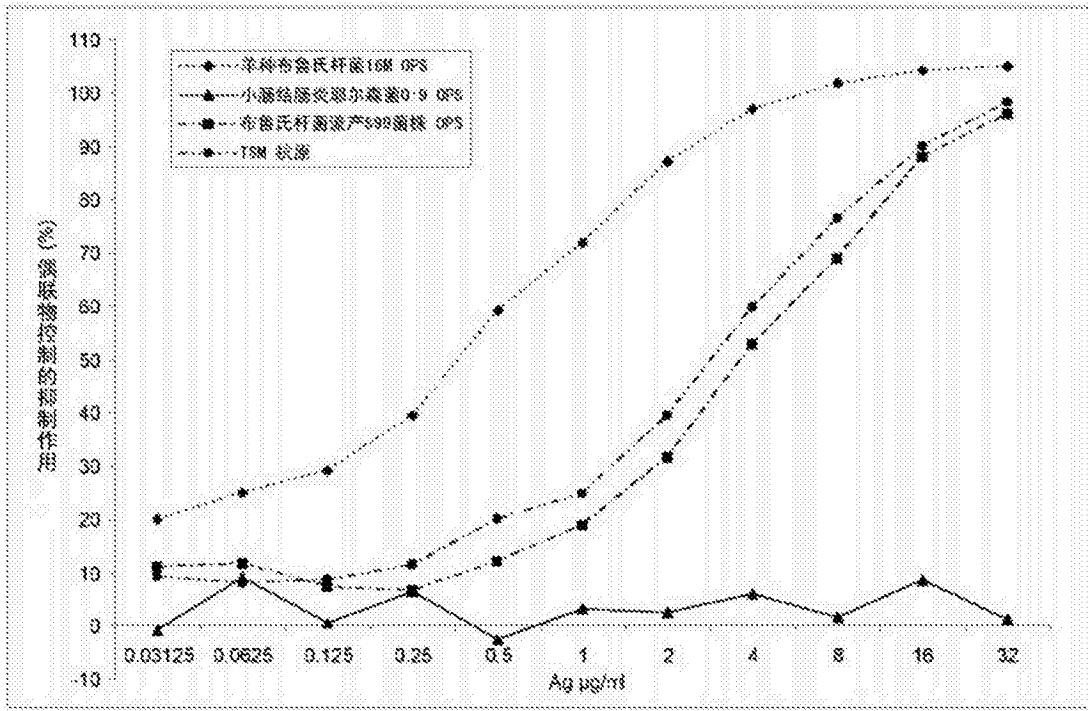


图 5

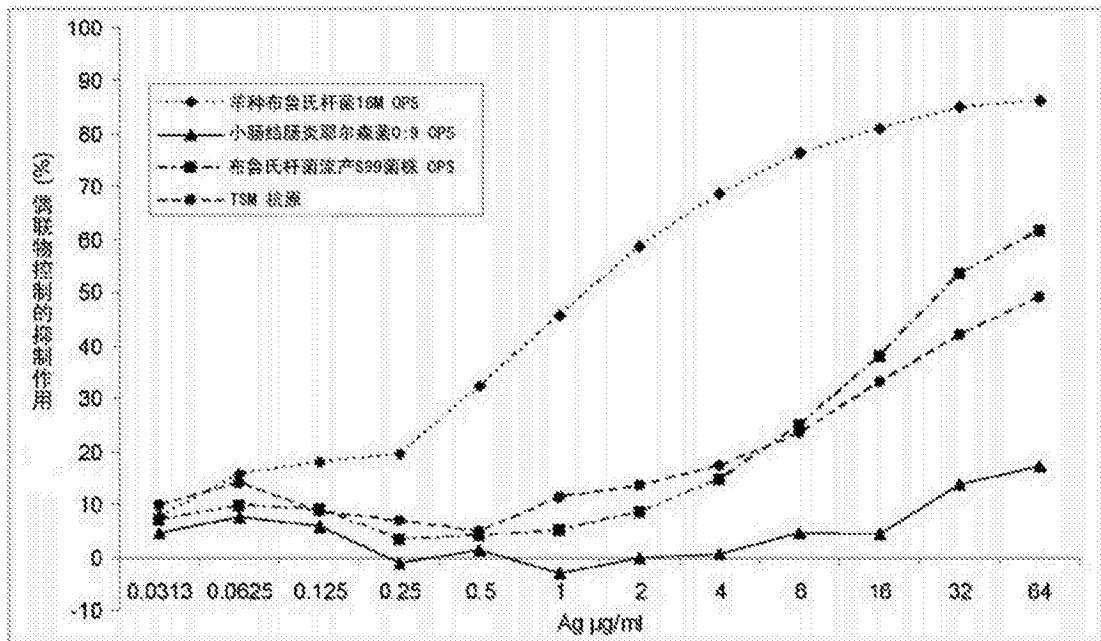


图 6A

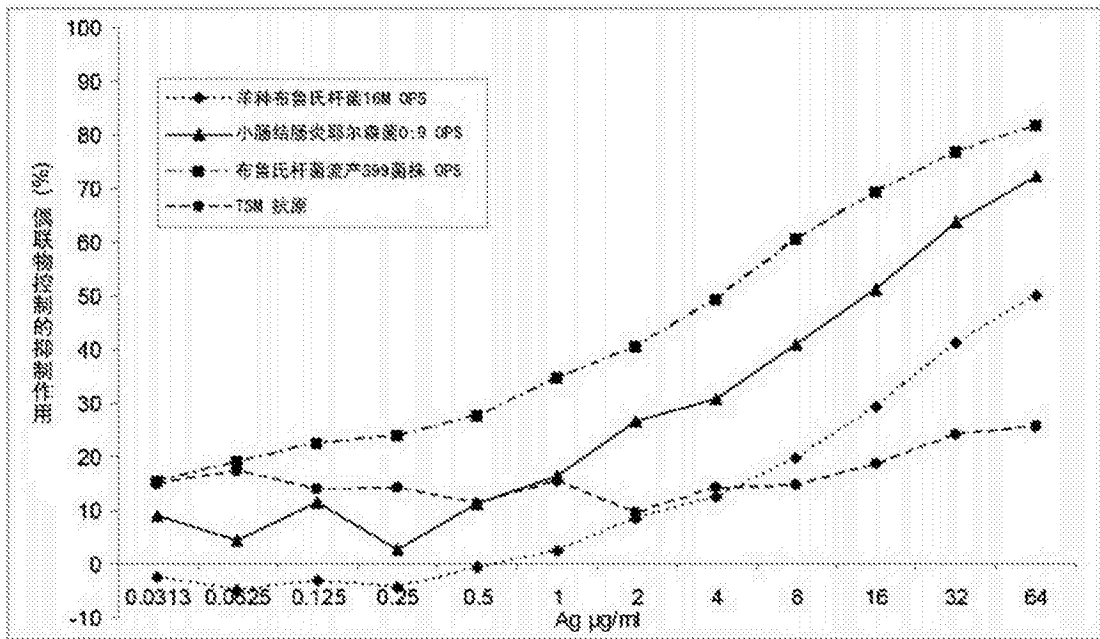


图 6B

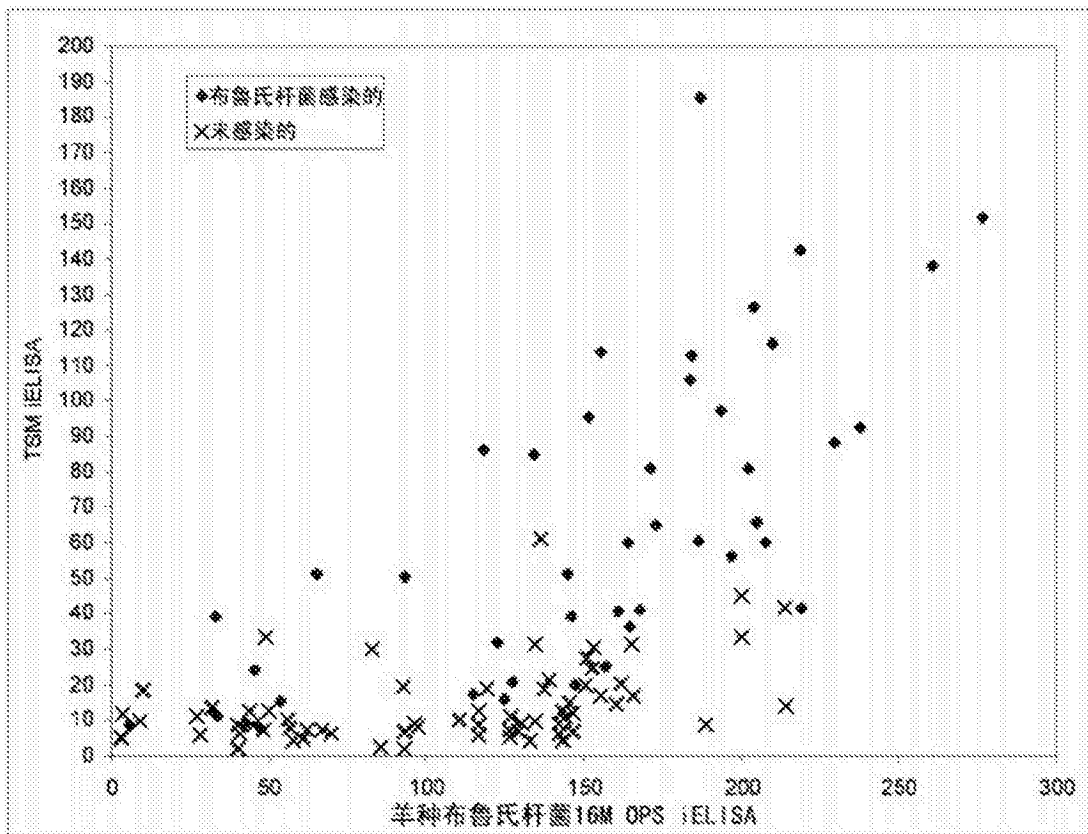


图 7

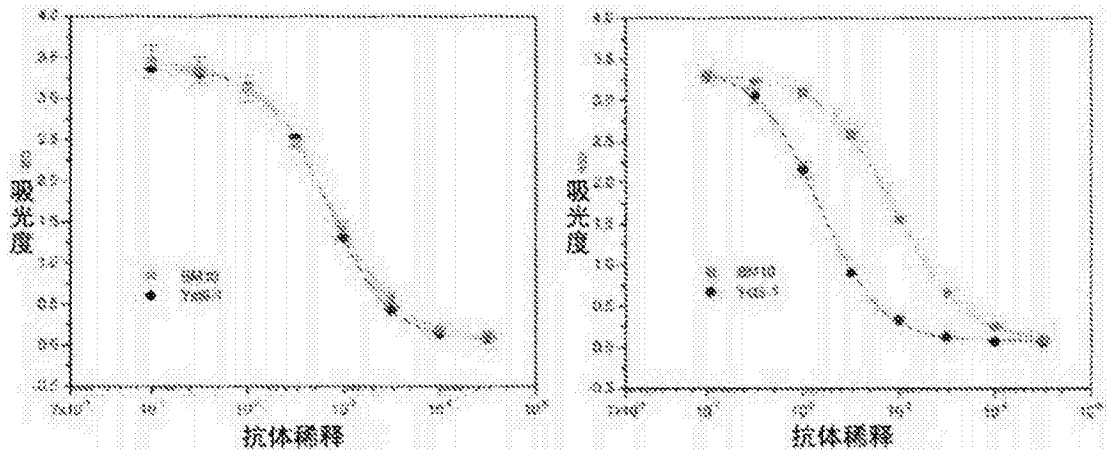


图 8

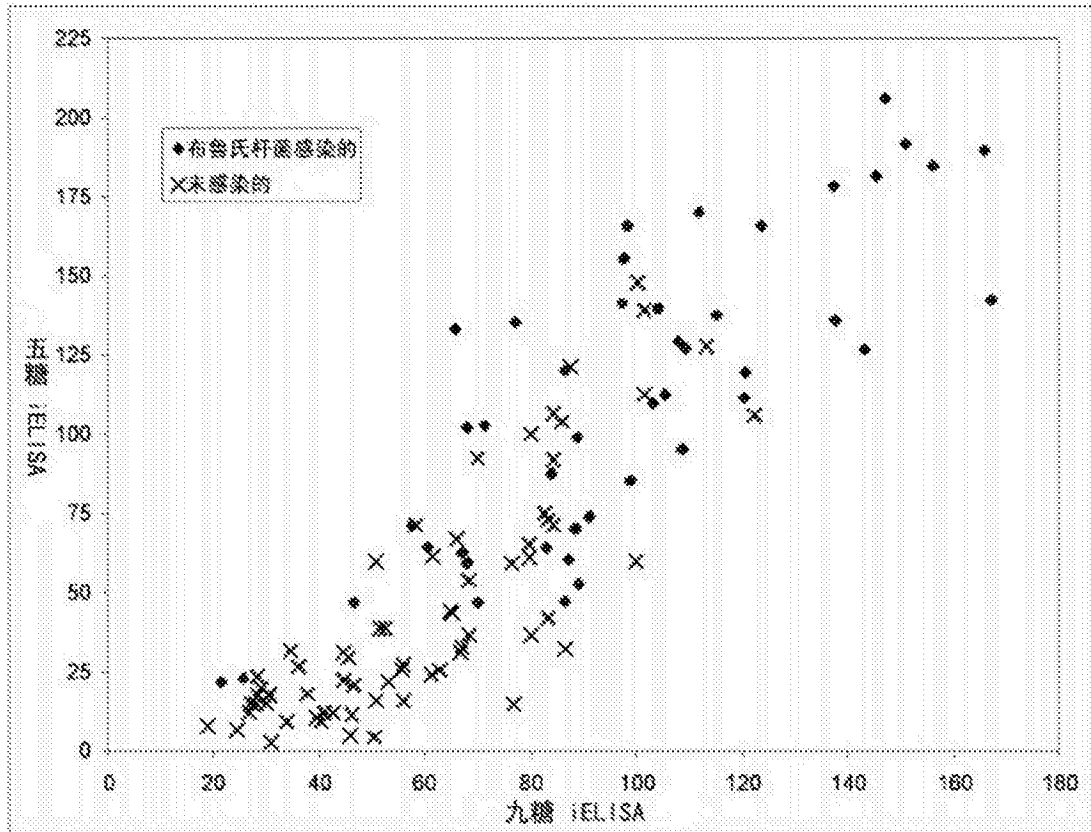


图 9

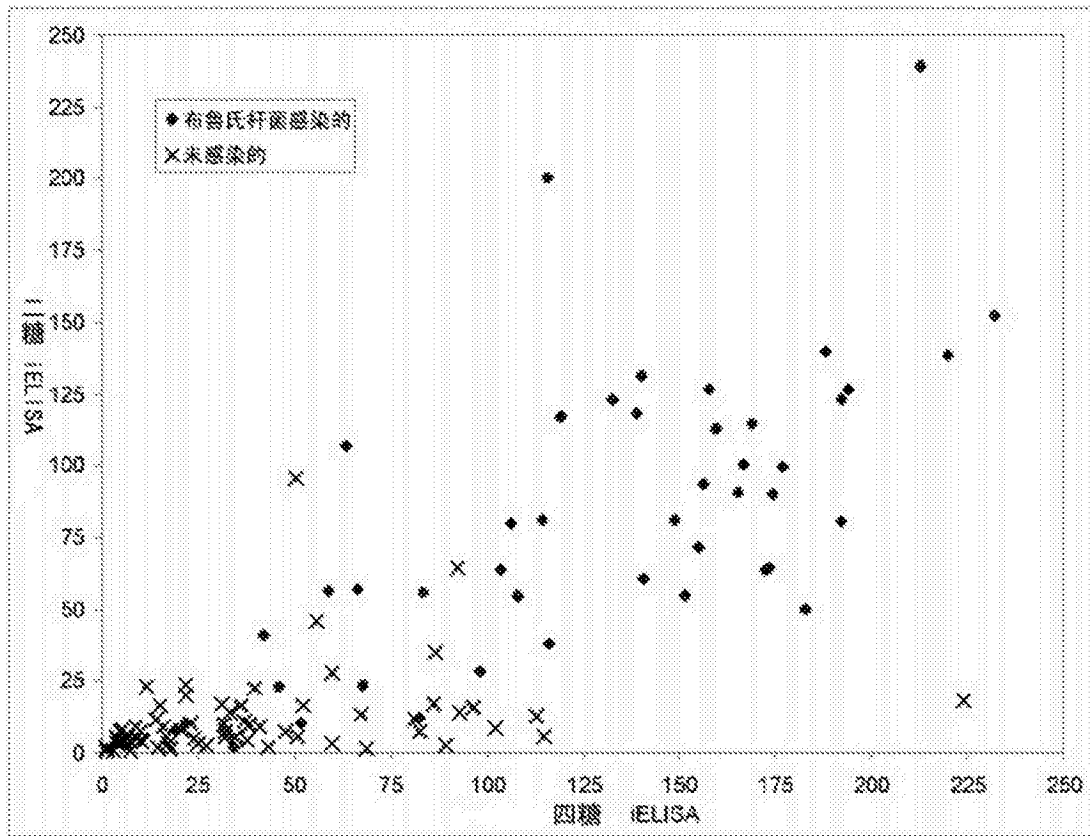


图 10

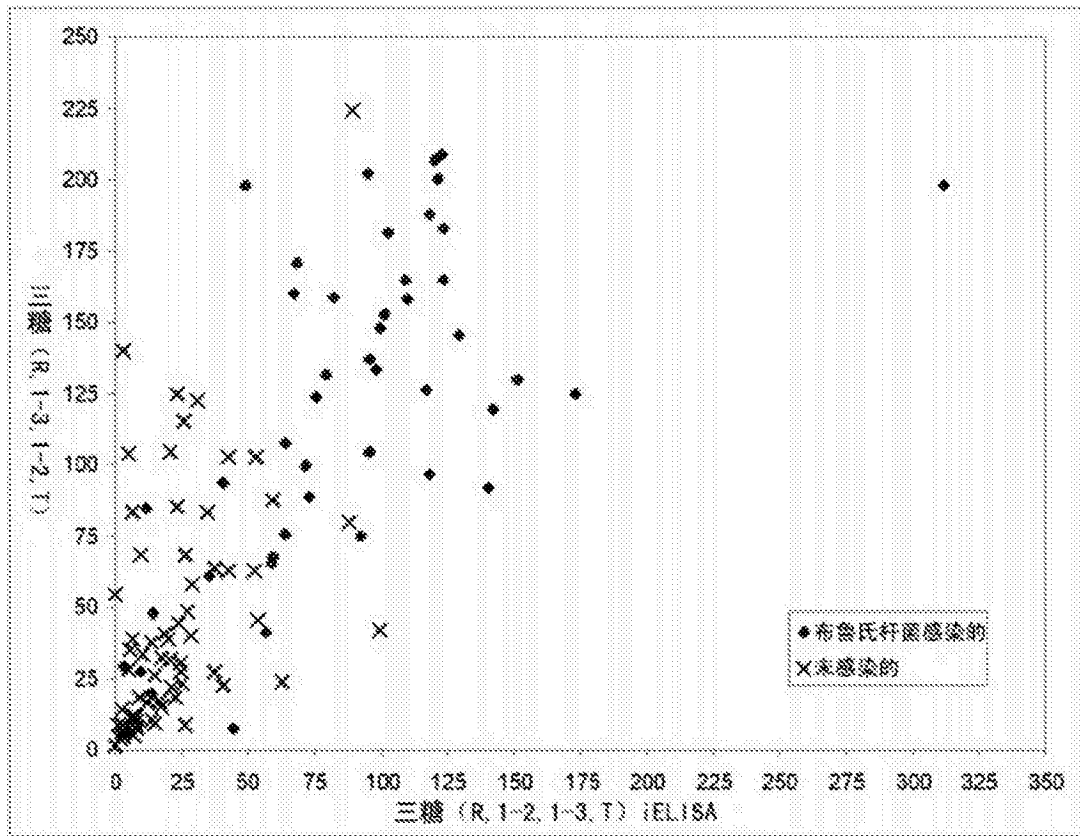


图 11

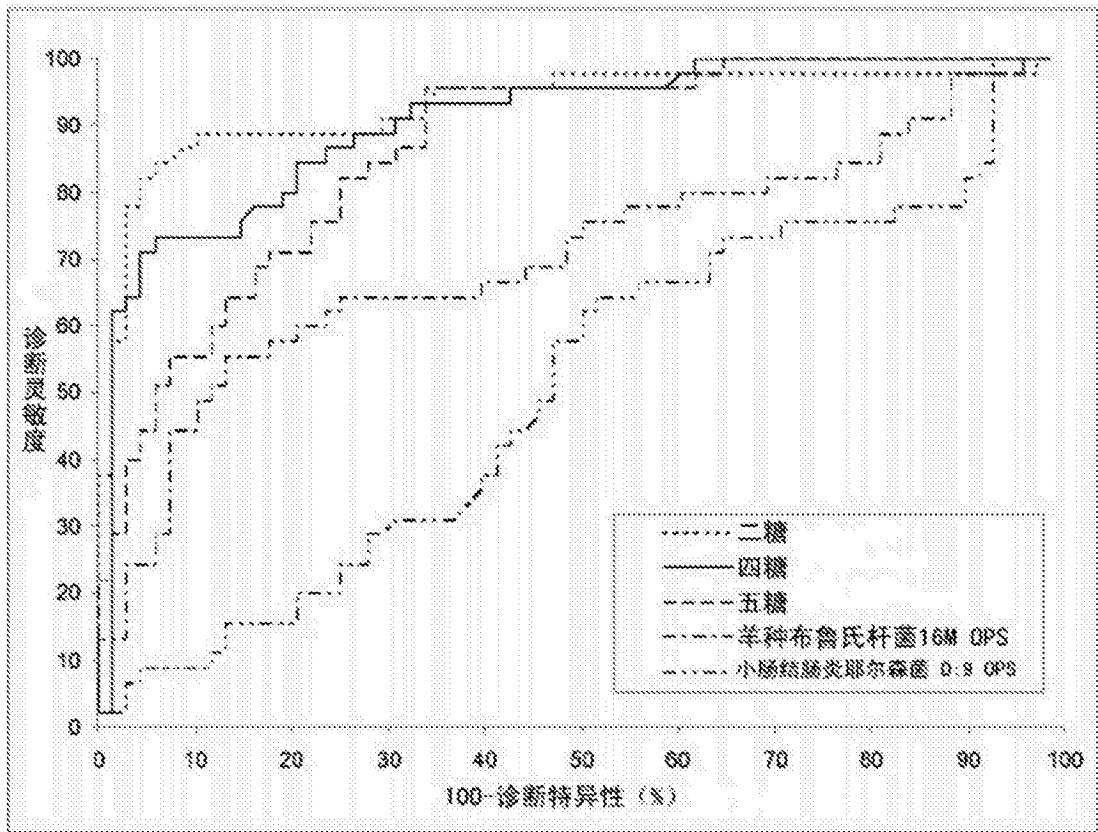


图 12

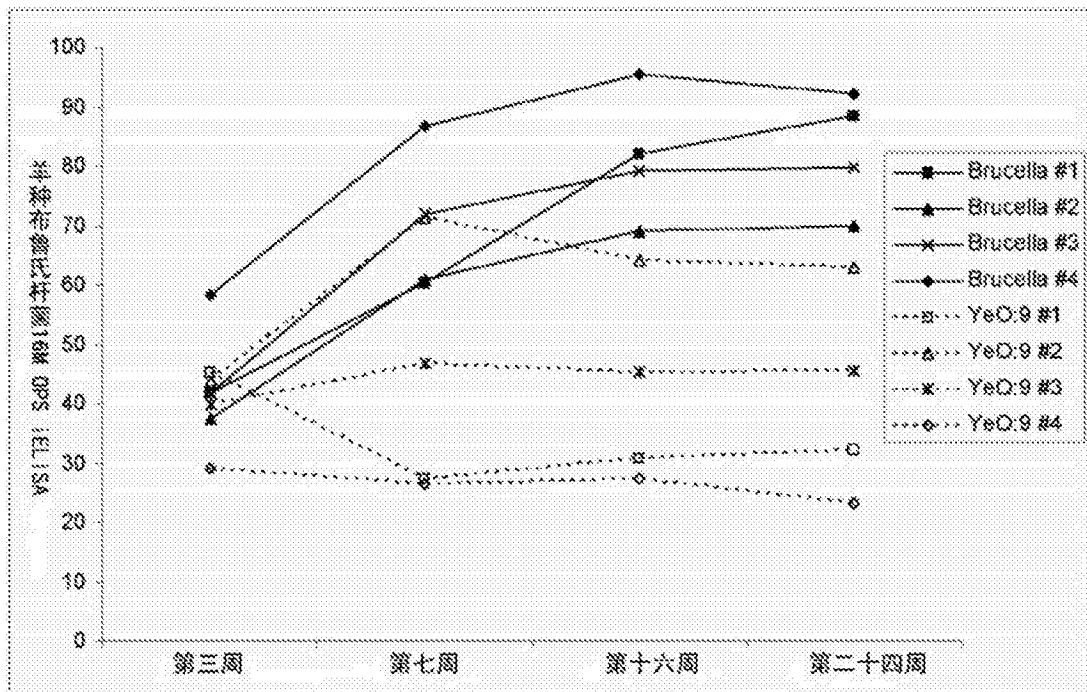


图 13

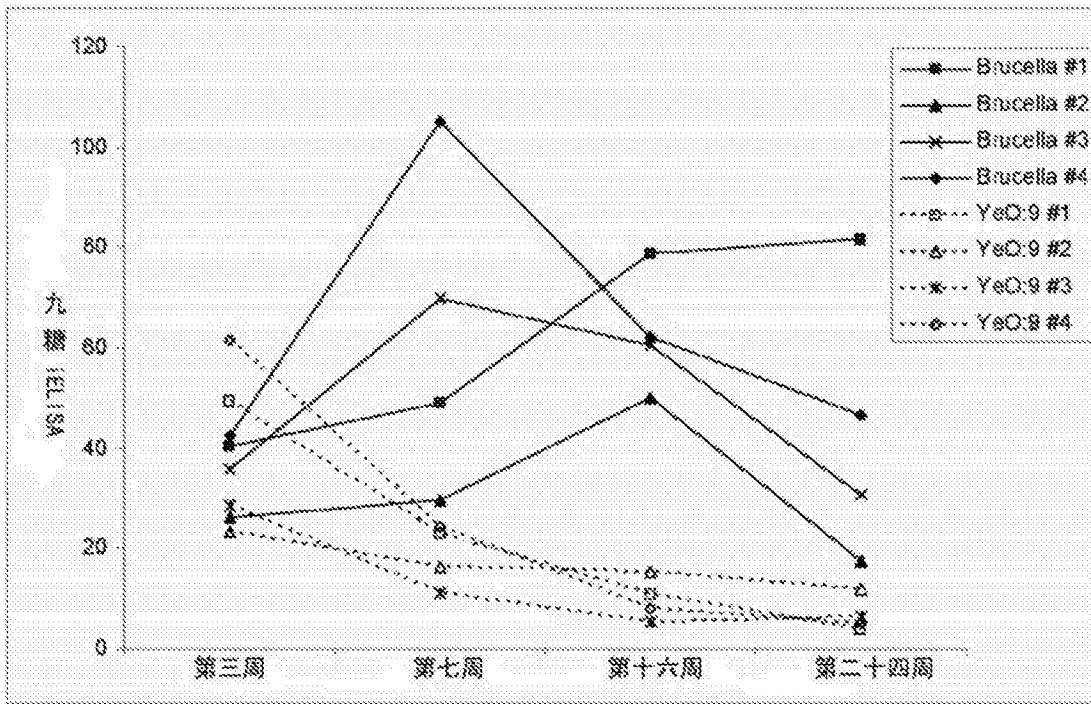


图 14

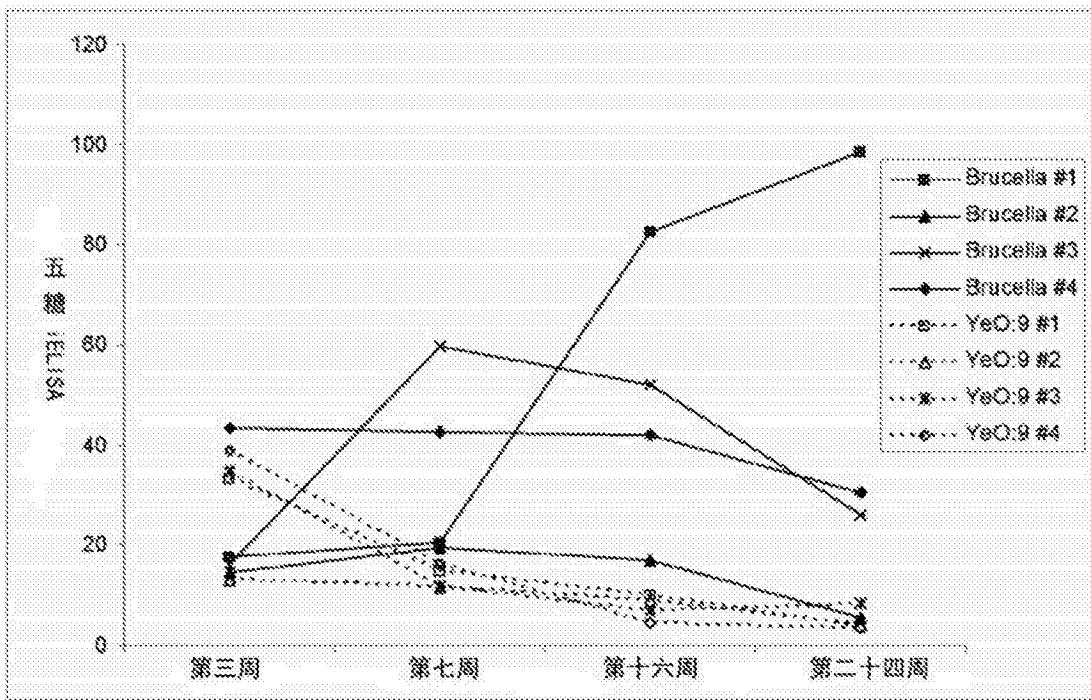


图 15

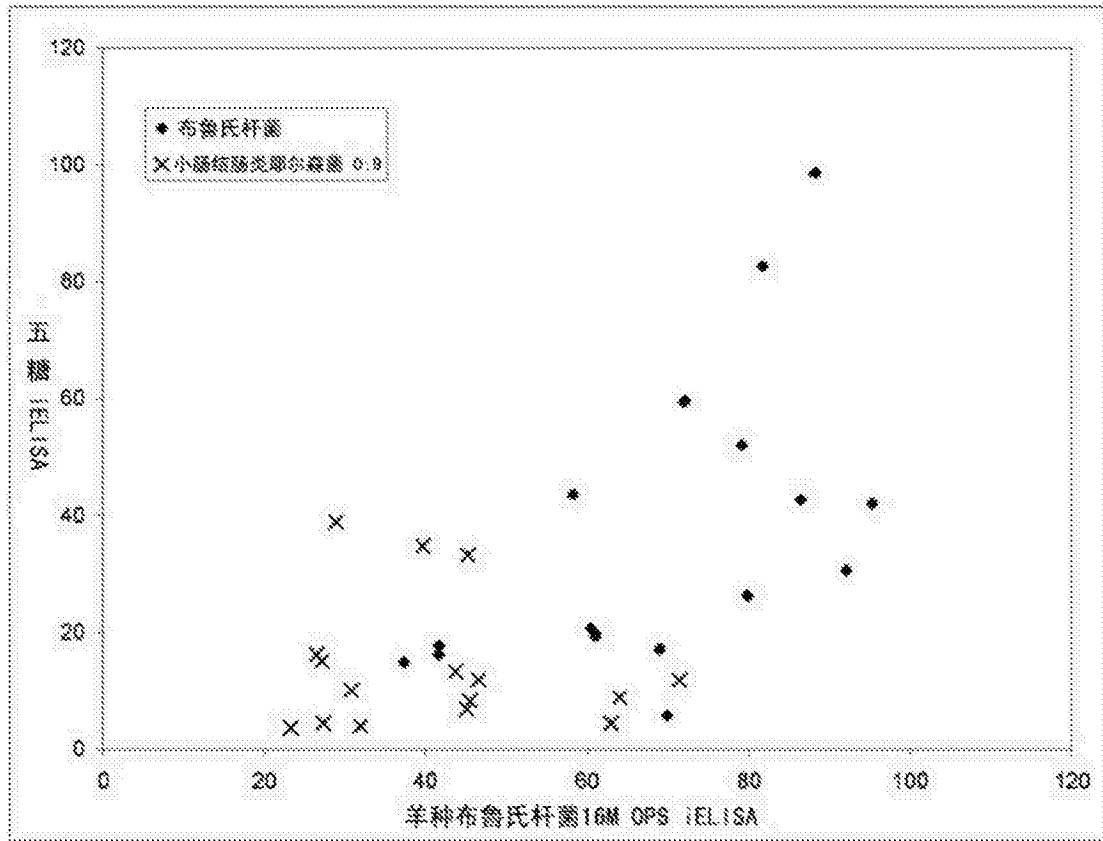


图 16

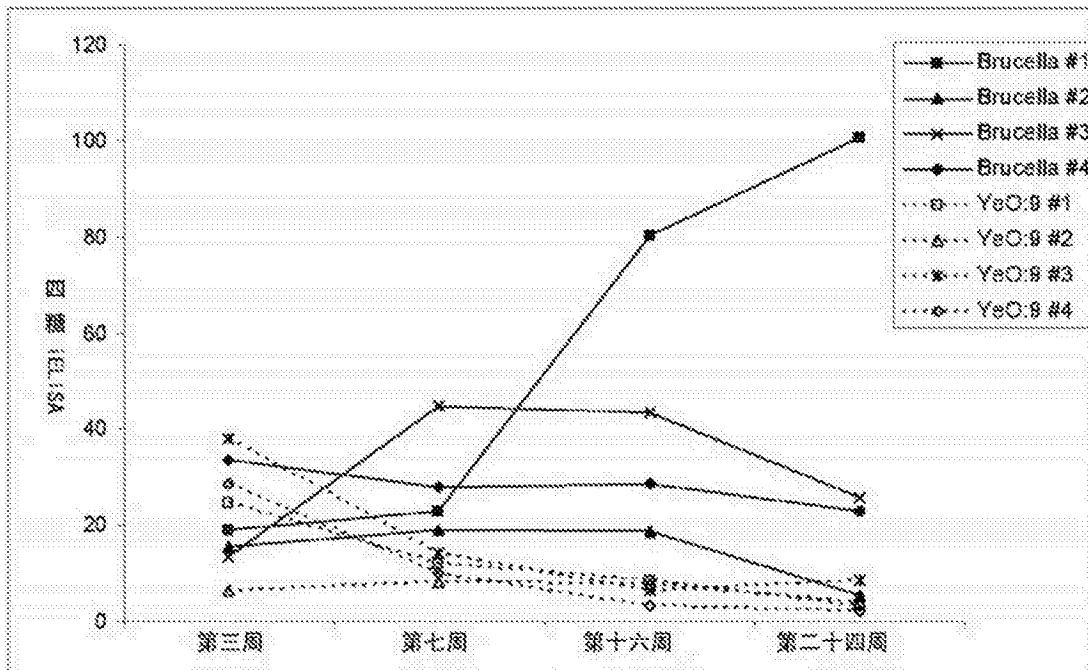


图 17

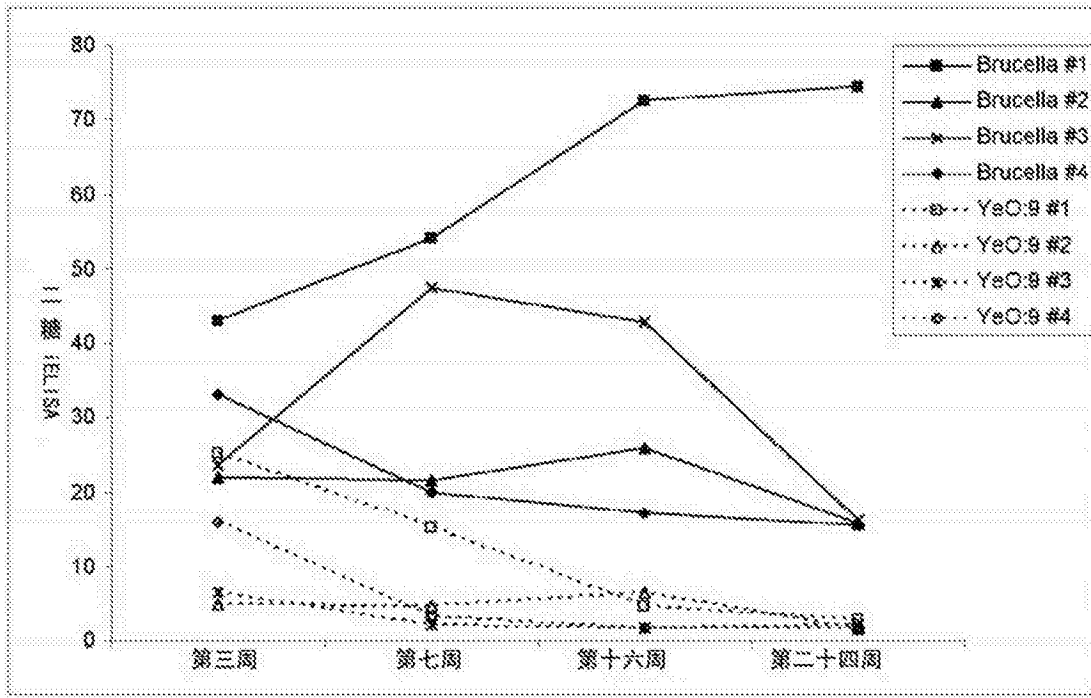


图 18

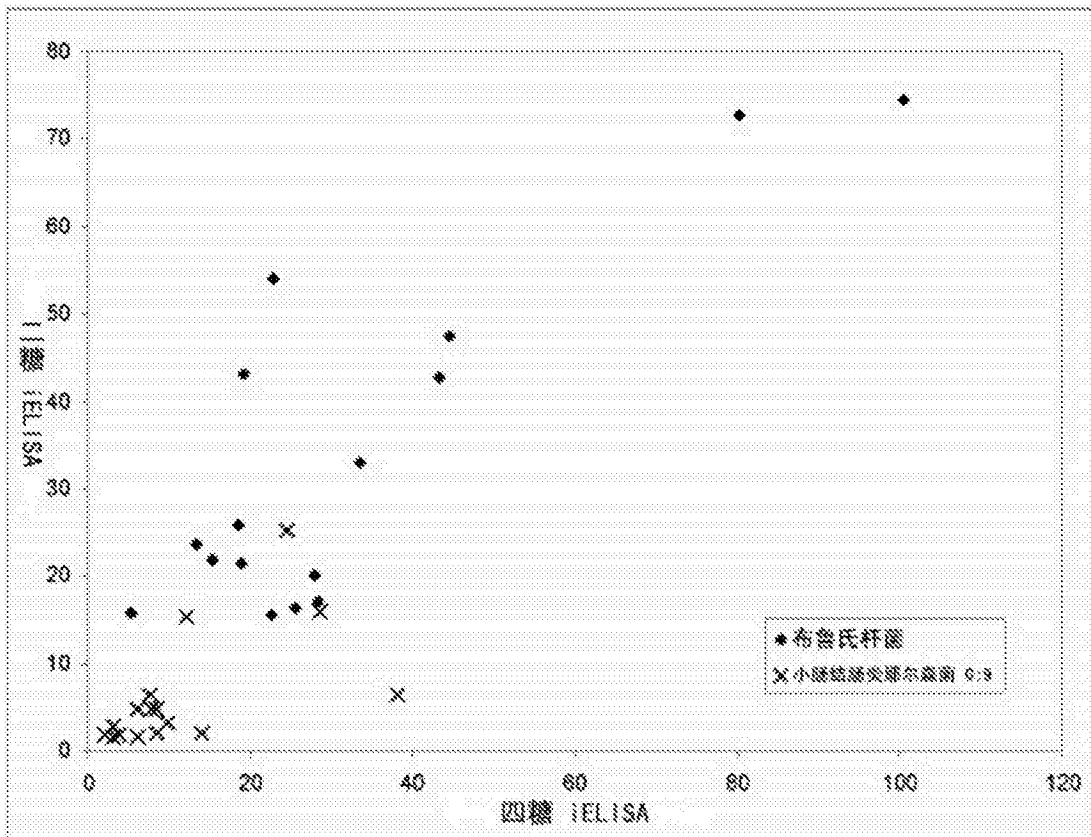


图 19

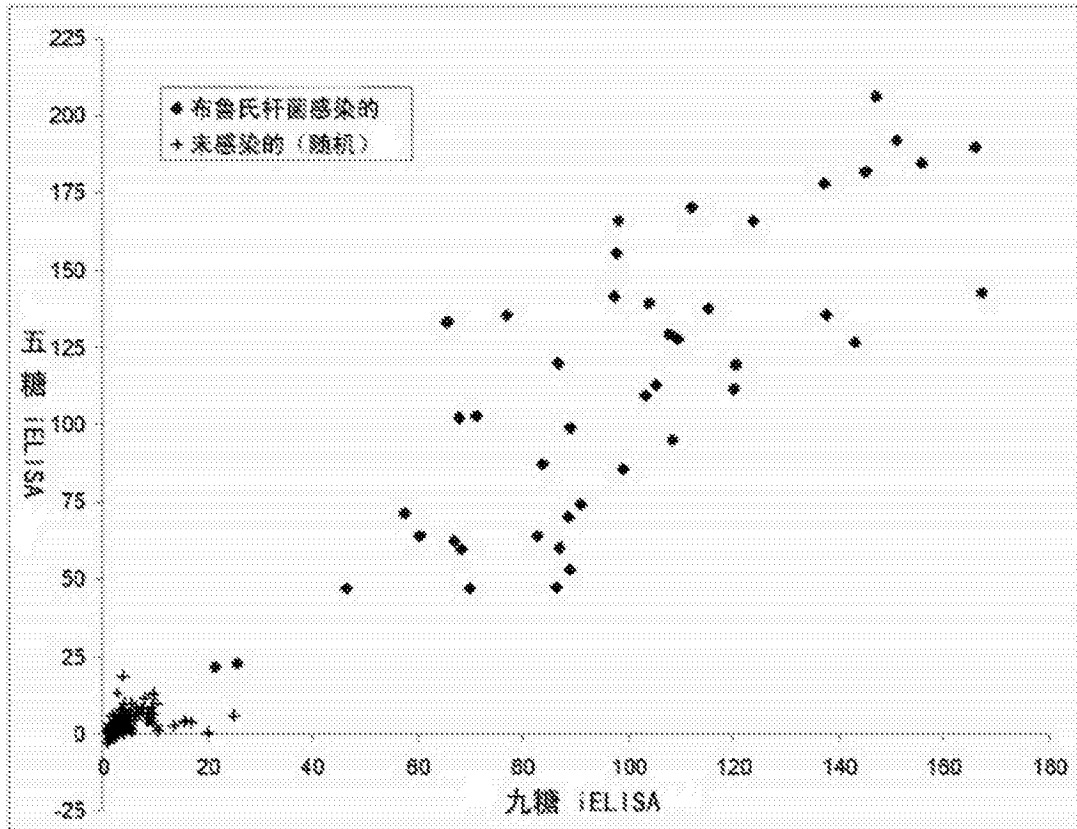


图 20

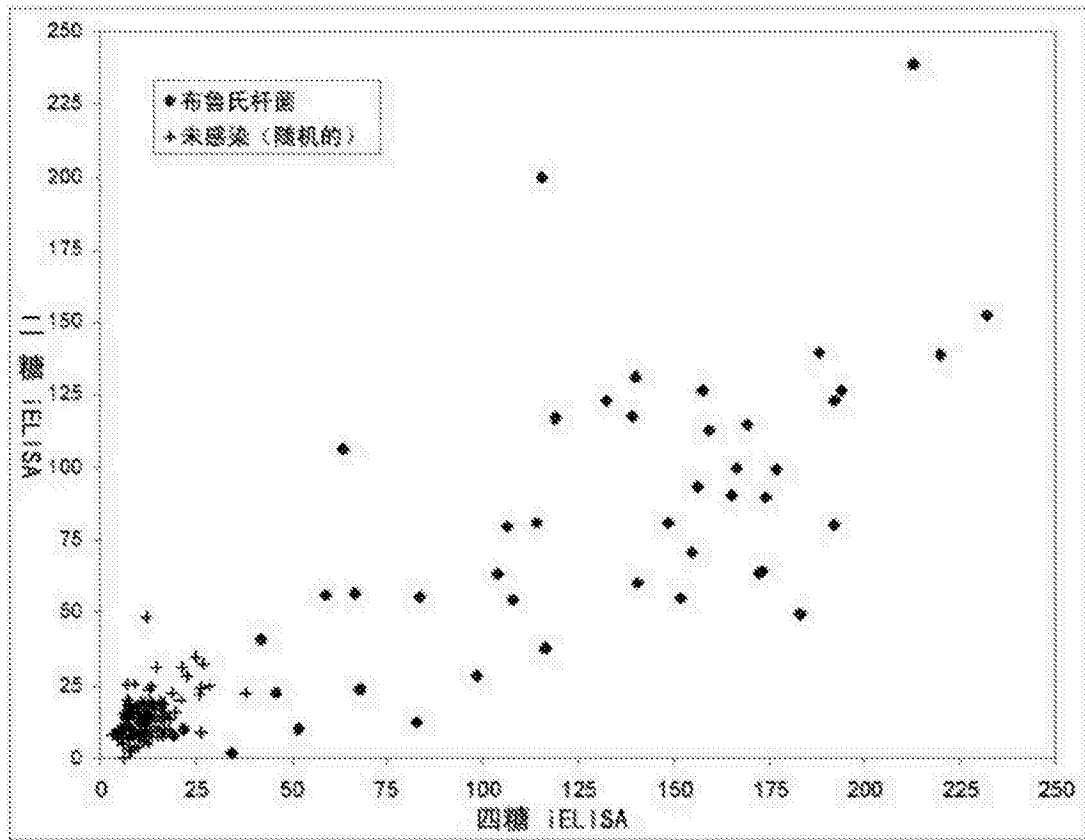


图 21

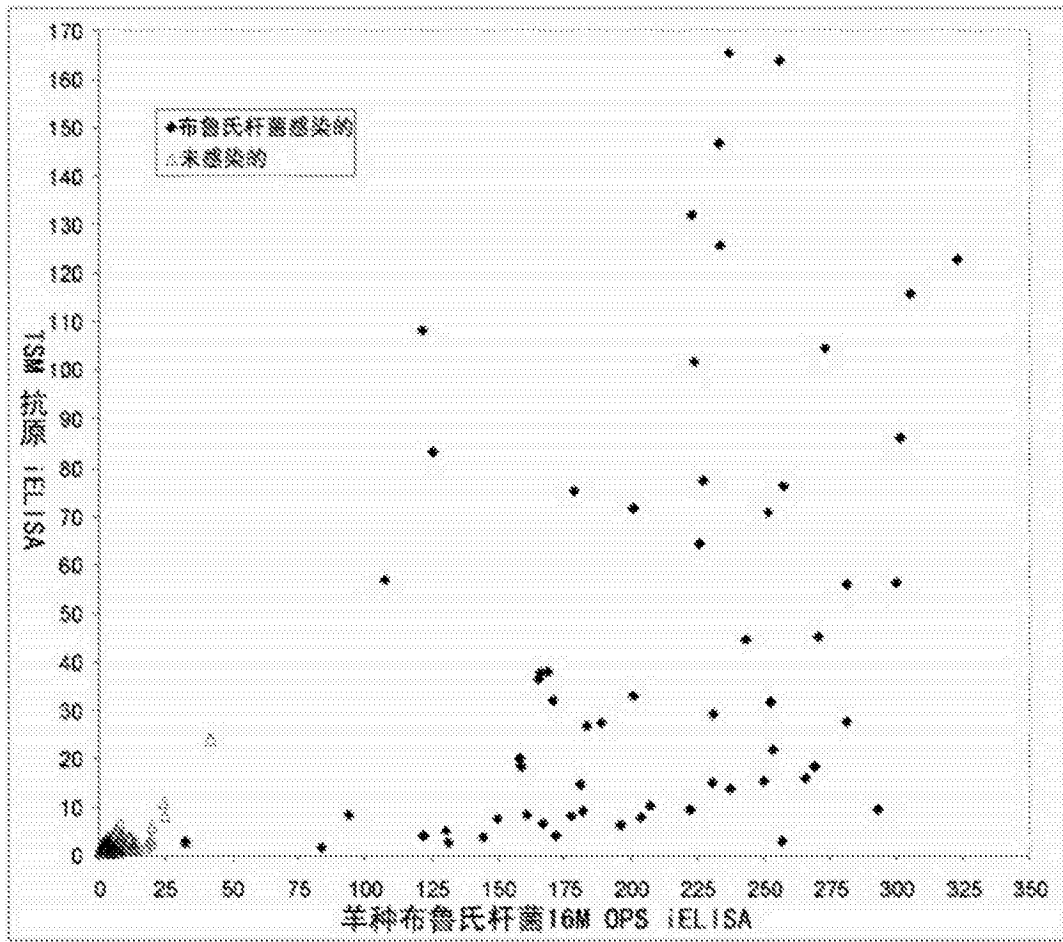


图 22

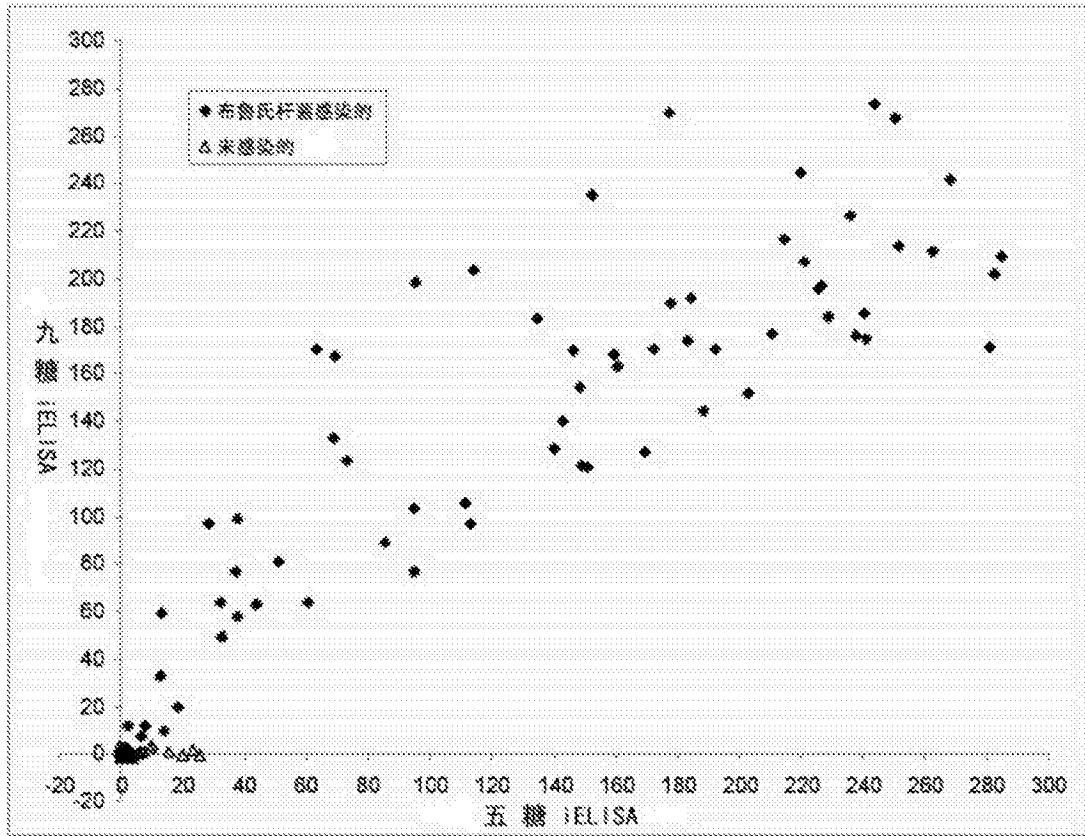


图 23

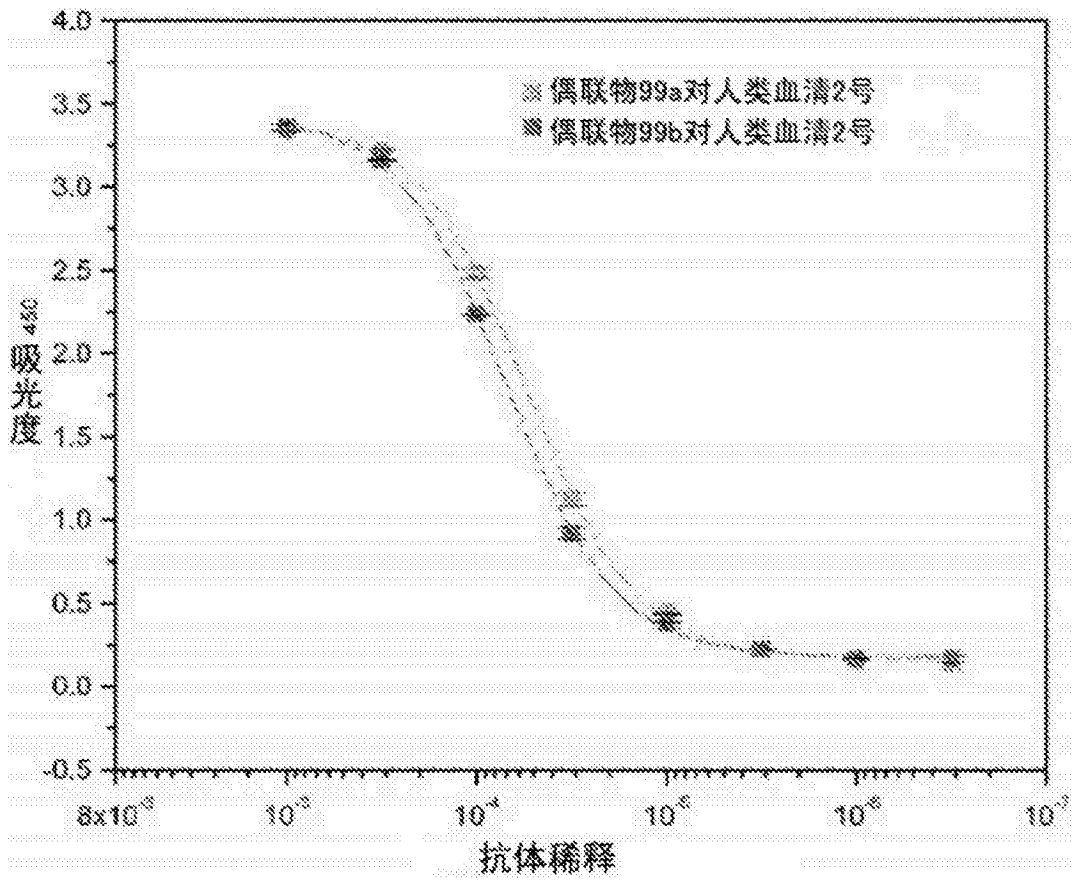


图 24

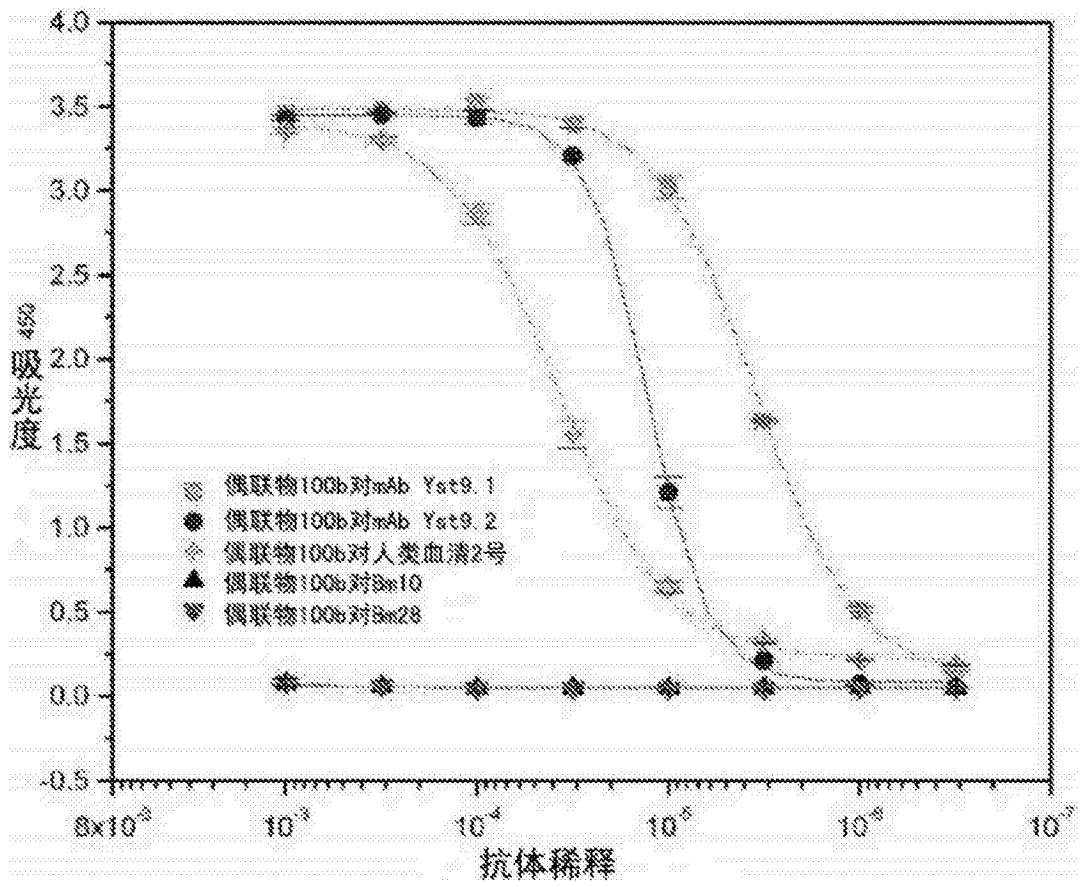


图 25

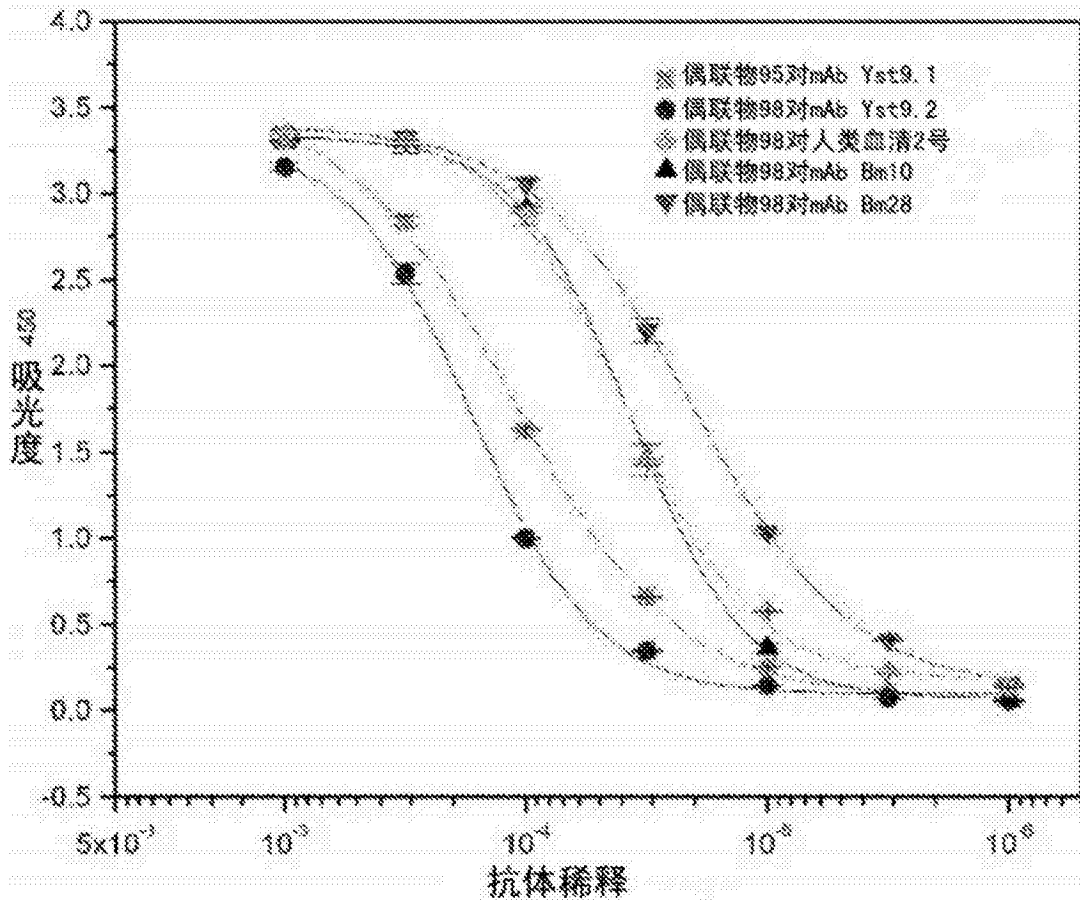


图 26

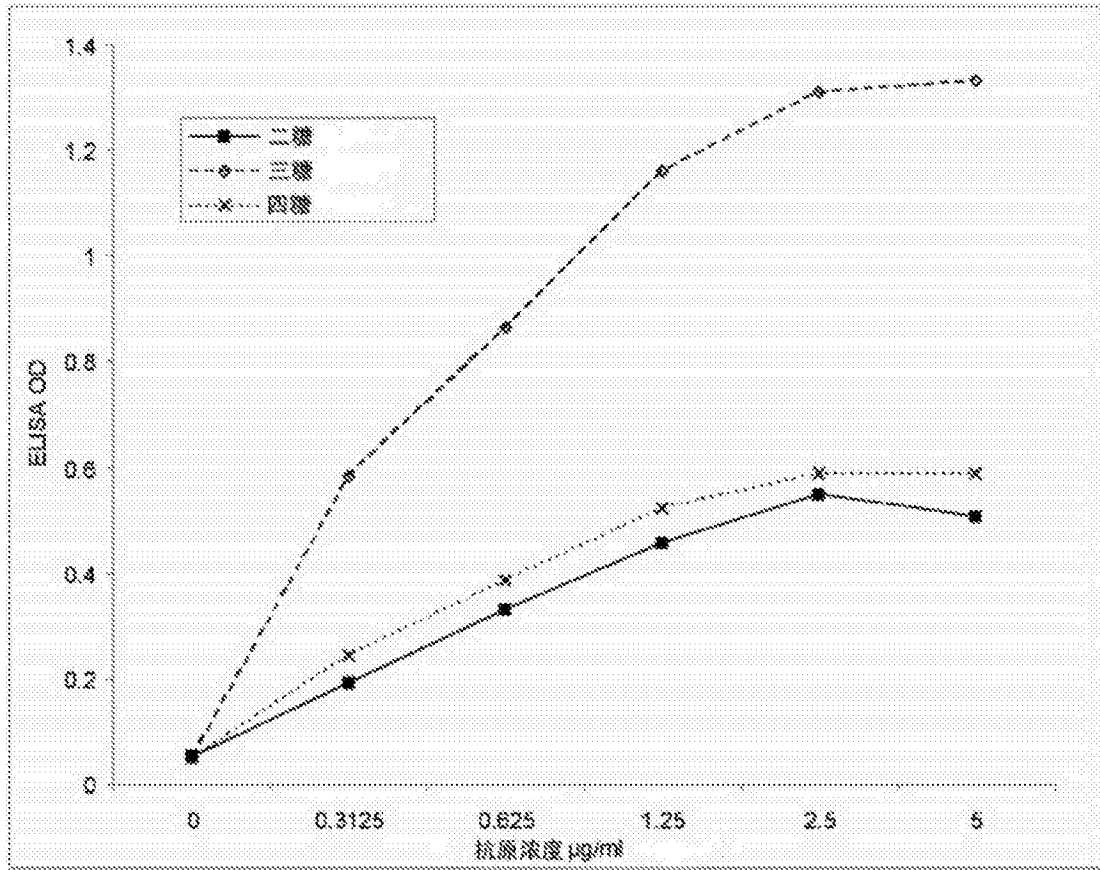


图 27

专利名称(译)	低聚糖偶联物和使用方法		
公开(公告)号	CN105264376A	公开(公告)日	2016-01-20
申请号	CN201480021950.0	申请日	2014-04-16
[标]发明人	约翰·麦克吉文 大卫·邦德 劳伦斯·豪厄尔斯 朱莉·吉亚尔 维吉雅·伽内什·那罗亚纳斯瓦密		
发明人	约翰·麦克吉文 大卫·邦德 劳伦斯·豪厄尔斯 朱莉·吉亚尔 维吉雅·伽内什·那罗亚纳斯瓦密		
IPC分类号	G01N33/53 A61K47/48		
CPC分类号	A61K47/6415 A61K47/646 A61K47/50 G01N33/5308 G01N33/56911 G01N2333/23 G01N2400/10 G01N33/53 A61K47/549 G01N2400/00		
代理人(译)	董科		
优先权	2013006882 2013-04-16 GB 61/812402 2013-04-16 US 61/812396 2013-04-16 US		
其他公开文献	CN105264376B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了一种检测样品中的抗M和/或抗A和/或抗C/Y抗体的存在的方法，所述方法包括：将样品与根据本发明所提供的诊断偶联物接触，包括包含有至少两个单元的4,6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖并包含相邻的4,6-二去氧-4-酰氨- α -吡喃糖单元之间的至少一个-(1-3)-连接的低聚糖，其中，吡喃糖的碳5位连接着R基团，R独立地选自-CH₂OH,-H或具有至少一个C原子的烷基，低聚糖共价连接到非糖分子或到表面。

抗原决定簇名称	佩鲁斯胺数	特点	存在于哪个OPS
C/Y	3-4	N-甲酰佩鲁斯胺专性地由 α 1,2 键连接	所有的布鲁氏杆菌光滑菌株和小肠结肠炎耶尔森菌 O: 9
A	5或更多	N-甲酰佩鲁斯胺由 α 1,2 键连接	主要分布在所有A-主导布鲁氏杆菌菌株以及小肠结肠炎耶尔森菌 O: 9 中
M	2-6	至少一个 α 1,3 键连接与至少一个相邻的 α 1,2 键连接；在不确定的抗原决定簇中 α 1,3 键连接	主要分布在 M-主导 OPS 布鲁氏杆菌菌株中，而且在较小程度上分布在 A-优势菌株中。未发现于小肠结肠炎耶尔森菌 O: 9 中。