



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110072872 A

(43)申请公布日 2019.07.30

(21)申请号 201780067550.7

(22)申请日 2017.11.03

(30)优先权数据

1618635.5 2016.11.04 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.04.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2017/053322 2017.11.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/083490 EN 2018.05.11

(71)申请人 环境、食品及农村国务部

地址 英国阿德尔斯通

申请人 阿尔伯特大学董事会

(72)发明人 约翰·麦克吉文

劳伦斯·豪厄尔斯

露西·唐科姆比 大卫·邦德

萨塔德鲁·谢卡尔·曼达尔

萨斯米塔·萨卡尔

(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.

G07H 5/06(2006.01)

G07H 15/18(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书4页 说明书58页 附图10页

(54)发明名称

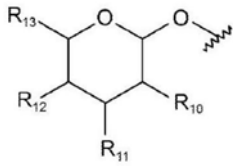
包含至少7个单元的4,6-二氧-4-酰胺基- α -吡喃糖的封闭的低聚糖及其结合物作为预防由布鲁氏菌生物引起的感染的疫苗

(57)摘要

提供了一种分子,其包含4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的七个或更多连续单元的链,每对单元通过C₁-C₂或C₁-C₃键连接,所述链具有末端和还原端,其中离还原端最远的链单元中的吡喃糖环与帽结构连接。帽结构不是4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖。还提供了包含分子的疫苗组合物和对动物接种疫苗以预防感染布鲁氏菌生物体的方法,该方法包括区分免疫和感染动物。还提供了检测样本中抗布鲁氏菌抗体存在的新型方法。

1. 一种分子, 包含4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的七个或更多个连续单元的链, 相邻的单元通过C₁-C₂或C₁-C₃键连接, 所述链具有一末端和一还原端, 其中离所述还原端最近的链单元中的吡喃糖环与一帽结构连接。

2. 根据权利要求1所述的分子, 其特征在于, 所述帽结构由结构式2组成:



结构式 2

其中R₂选自OH、一烷氧基, 或一烷基;

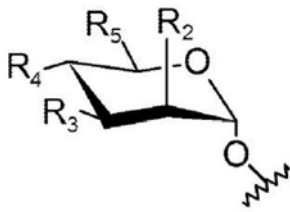
R₃选一酰胺基或其脱乙酰基变体、OH、一烷氧基、一烷基或一羟基化烷基;

R₄选自一酰胺基或其脱乙酰基变体、OH、一烷氧基、一烷基或一羟基化烷基, 或包含修饰的烷氧基, 所述修饰的烷氧基包含与接头分子缀合的烷基; 以及

R₅是烷基或羟基化烷基;

其中结构式2不是4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖。

3. 根据权利要求1所述的分子, 其特征在于, 结构式2是结构式2a:



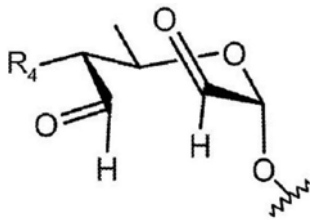
结构式 2a

4. 根据权利要求2或3所述的分子, 其特征在于, R₂、R₃、R₄均为OH且R₅是羟甲基。

5. 根据权利要求2或3所述的分子, 其特征在于, R₂和/或R₃是烷氧基, R₄是酰氨基或其脱乙酰基变体, R₅是烷基。

6. 根据权利要求5所述的分子, 其特征在于, R₂和/或R₃是甲氧基, R₄是甲酰胺基或其脱乙酰基变体, R₅是甲基。

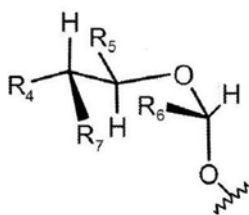
7. 根据权利要求1所述的分子, 其特征在于, 所述帽结构由结构式3组成:



结构式 3

其中R₄是酰氨基或其脱乙酰基变体、OH、一烷氧基、一烷基或一羟基化的烷基。

8. 根据权利要求1所述的分子, 其特征在于, 所述帽结构包括结构式4:



结构式 4

其中R₄是酰氨基或其脱乙酰基变体、OH、一烷氧基、一烷基或一羟基化的烷基；

R₅是一烷基或一羟基化的烷基；并且

R₆和R₇独立地选自-H、-CH₃、-CHO、-CH=NR₈、-CH=N-NHR₈、-CH₂(NH)_nR₈，其中n=1或2；此外其中R₈是含基团的非吡喃糖。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的分子，其特征在于，所述分子与载体连接。

10. 根据权利要求9所述的分子，其特征在于，在所述还原端的所述4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖从C₁连接到载体。

11. 根据权利要求10所述的分子，其特征在于，C₁通过 α -(CH₂)_n-C=O基团与所述载体连接，其中n=3-9。

12. 根据权利要求9或10所述的分子，其特征在于，所述载体是

a. 一蛋白；

b. 一荧光分子；

c. 一惰性两亲聚合物；或者

d. 一固体材料实体，例如一表面或一珠子。

13. 一种诊断缀合物，包含根据权利要求1至12中任一项所述的分子。

14. 根据权利要求13所述的诊断缀合物，其特征在于，还包含非perosamine糖，和/或一载体分子，和/或一细胞或细胞的一部分，和/或一非糖载体。

15. 一种疫苗组合物，包含根据权利要求1至8中任一项所述的分子和一疫苗载体实体。

16. 根据权利要求15所述的疫苗组合物，其特征在于，所述分子缀合至所述疫苗载体实体。

17. 根据权利要求15或16所述的疫苗组合物，其特征在于，所述分子在每对4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元之间仅包含C₁-C₂键。

18. 根据权利要求15或16所述的疫苗组合物，其特征在于，所述分子在一对4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元之间包含至少一个C₁-C₃键。

19. 根据权利要求15至18中任一项所述的疫苗组合物，其特征在于，包含至少约16个4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的单元。

20. 一种细胞，包含根据权利要求1至8中任一项所述的分子。

21. 根据权利要求20所述的细胞，其特征在于，包含根据权利要求6所述的分子。

22. 根据权利要求20或21所述的细胞，其特征在于，所述细胞是死亡的或减毒的细胞。

23. 根据权利要求22所述的细胞，其特征在于，所述细胞是玫瑰红测试抗原。

24. 一种疫苗组合物，包含根据权利要求20或21所述的细胞。

25. 根据权利要求15至19或24中任一项所述的疫苗组合物，其特征在于，还包含一佐剂。

26. 根据权利要求1至12中任一项所述的分子，或根据权利要求15至19,24或25中任一项所述的疫苗组合物，或根据权利要求20或21所述的细胞，用于对动物接种疫苗以预防感染布鲁氏菌生物体的方法。

27. 根据权利要求1至12或26中任一项所述的分子，或根据权利要求15至19,或24至26中任一项所述的疫苗组合物，或根据权利要求20-23中任一项所述的细胞，其特征在于，4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的一个或多个单元是4,6-二脱氧-4-甲酰氨基- α -吡喃甘露

糖。

28. 一种对动物接种疫苗以预防感染布鲁氏菌生物体的方法,其特征在于,包括向动物施用根据权利要求1至12中任一项所述的保护量的分子,或根据权利要求15至19或24至26中任一项所述的疫苗组合物,或向所述动物使用根据权利要求20或21所述的细胞。

29. 根据权利要求28所述的方法,其特征在于,还包括获得所述动物的生物样本,并使所述生物样本与DIVA抗原接触。

30. 根据权利要求29所述的方法,其特征在于,所述DIVA抗原包含二糖、三糖、四糖或单糖,所述二糖由通过C₁-C₃键连接或通过C₁-C₂键连接的4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的2个单元组成,所述三糖由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的3个单元组成并且包含C₁-C₂键和C₁-C₃键或包含两个C₁-C₂键,所述四糖由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的4个单元组成并且包含一中心C₁-C₃键和包含两个C₁-C₂键,所述单糖由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的1个单元组成,所述二糖或三糖或四糖或单糖与一非糖载体连接。

31. 根据权利要求29或30所述的方法,其特征在于,还包括使所述样品与一通用抗原接触,所述通用抗原包含4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的至少6个连续单元,所述4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的至少6个连续单元在大多数或所有对单元之间包含C₁-C₂键,并且在每对单元中可选地包含至少一个C₁-C₃键。

32. 根据权利要求31所述的方法,其特征在于,所述通用抗原具有或包含结构VIII、IX或XIX。

33. 一种用于检测感染了布鲁氏菌生物体的动物的方法,其特征在于,所述动物来自已知包含通过根据权利要求28所述的方法接种的个体的动物群体内,所述方法包括使得自所述动物的生物样品与DIVA抗原接触,其中检测到抗体与所述DIVA抗原结合表明所述样品是从感染布鲁氏菌生物的动物中获得的。

34. 根据权利要求33所述的方法,其特征在于,所述DIVA抗原包含二糖或三糖,所述二糖由通过C₁-C₃键连接的4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的2个单元组成,所述三糖由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的3个单元组成,并且包含一个中心C₁-C₃键和两个C₁-C₂键,所述二糖或三糖与一非糖载体连接。

35. 根据权利要求33所述的方法,其特征在于,所述DIVA抗原包含三糖、二糖或单糖,所述三糖由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的3个单元组成并且包含C₁-C₂键,所述二糖由通过C₁-C₂键连接的4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的2个单元组成,所述单糖由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的1个单元组成,所述三糖或二糖或单糖与一非糖载体连接。

36. 根据权利要求30至35中任一项所述的方法,其特征在于,每个4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖是4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D吡喃甘露糖。

37. 根据权利要求44所述的方法,其特征在于,所述DIVA抗原具有或包含结构III或结构VI,或结构IV或结构V或结构VII或结构XI或结构XII或结构II。

38. 一种包含根据权利要求15至19或24至27所述的疫苗组合物的试剂盒。

39. 根据权利要求38所述的试剂盒,其特征在于,所述疫苗组合物以冻干形式包装提供,并且所述试剂盒还包含适合用于将所述疫苗组合物重构成适于向动物施用的形式的溶液。

40. 根据权利要求38或39所述的试剂盒,其特征在于,还包含一种施用装置。

41. 根据权利要求21所述的获得细胞的方法,其特征在於,包括在布鲁氏菌细胞中表达 rfbT 基因。

42. 一种用于检测样品中的抗布鲁氏菌抗体的方法,其特征在於,包括使所述样品与包含根据权利要求1至12中任一项的分子的诊断性缀合物接触,或与根据权利要求14所述的诊断性缀合物接触。

43. 根据权利要求42所述的方法,其特征在於,所述分子包含4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的至少约7,8,9,10,11,12,13,14或15个连续单元,例如,4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的至少约16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29个或至少约30个连续单元。

44. 根据权利要求42或43所述的方法,其特征在於,在分子中,任何4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖可以是4,6-二脱氧-4-甲酰氨基- α -吡喃糖,例如,4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖。

45. 根据权利要求41-44中任一项所述的方法,其特征在於,所述分子是合成的,或者是从重组细菌获得的经修饰的OPS,或者是从天然存在的或重组的细菌中获得的并随后被修饰的OPS。

46. 根据权利要求41-45中任一项所述的方法,其特征在於,所述样品是从已知或疑似已经用基于布鲁氏菌“平滑细胞”的疫苗接种的动物获得的生物样品。

47. 根据权利要求41-46中任一项所述的方法,其是用于筛查通过布鲁氏菌生物体感染动物的方法,其特征在於,所述动物是已知已经接种了基于布鲁氏菌“平滑细胞”疫苗的群体的成员,其中样品是取自所述动物的生物样品,并且其中在所述样品中检测到抗布鲁氏菌抗体表明动物被或已经被布鲁氏菌生物体感染。

48. 一种检测样品中抗布鲁氏菌抗体存在的方法,其特征在於,包括使所述样品与包含由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的3个单元组成并且仅包含C₁-C₂键的三糖接触,和/或与包含由通过C₁-C₂键连接的4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的2个单元组成的二糖的抗原接触,其中所述三糖和/或二糖通过还原端直接与一非糖载体连接。

49. 一种检测样品中抗布鲁氏菌抗体的存在的方法,其特征在於,包括使所述样品与包含单糖的抗原接触,所述单糖由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的一个单元组成,所述单元通过C₁碳与一非糖载体连接。

50. 根据权利要求48或49所述的方法,其特征在於,还包括使所述样品与包含四糖的抗原接触,所述四糖由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的4个单元组成,并且包含一中心C₁-C₃键和两个C₁-C₂键,所述四糖通过所述还原端与一非糖载体连接。

51. 根据权利要求48至50中任一项所述的方法,其特征在於,任何4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖可以是4,6-二脱氧-4-甲酰氨基- α -吡喃糖,例如4,6-二脱氧-4-甲酰氨基- α -D-吡喃甘露糖。

52. 根据权利要求48所述的方法,其特征在於,所述三糖是结构XII和/或所述二糖是结构XI。

53. 根据权利要求49所述的方法,其特征在於,所述单糖是结构II。

54. 根据权利要求50所述的方法,其特征在於,所述四糖是结构VI。

包含至少7个单元的4,6-二氧-4酰胺基- α -吡喃糖的封闭的低聚糖及其结合物作为预防由布鲁氏菌生物引起的感染的疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及一种多糖分子,这种多糖分子可用作一种疫苗的组分,其中对动物接种此种疫苗以预防布鲁氏菌生物感染,从而可以进行DIVA(从免疫动物中区分感染)测试。本发明还涉及一种用于检测布鲁氏菌生物感染的新型诊断方法。

背景技术

[0002] 布鲁氏菌病是世界上最重要的人、畜共患的疾病之一,由布鲁氏菌属细菌引起。这些是非孢子形成的球杆菌杆,具有革兰氏阴性细菌特征的细胞壁,其包括肽聚糖、外膜蛋白和脂多糖(LPS)。物种*B.abortus*(牛布鲁菌)、*B.melitensis*(羊布鲁菌)和*B.suis*(猪布鲁菌)对动物和人类健康造成最大影响。这些物种的野生株的LPS具有O-多糖(OPS),O-多糖从细胞壁突出,主导表面并改变菌落的形态,使其描述为“光滑”物种和具有光滑型LPS的菌株。在其表面上没有OPS的菌株被描述为“粗糙型”并且具有粗糙型LPS。这种疾病在牲畜中的主要特征为生殖障碍,这一点在流产和男性不育方面表现最为明显。这导致动物生产的大量损失以及疾病向人类传播。或者,动物表面上看起来很健康。

[0003] 在全球大多数地区都能感受到这种疾病的影响。即使没有疾病,重要的是进行监测以维持无病状态。在大多数国家,这种疾病持续存在,或者可能正在重新出现,并且出现于野生动物保护区。

[0004] 只能通过大规模疫苗接种来控制地方性布鲁氏菌病。在患病率很高的情况下,试验和屠杀计划是超支的、不可持续的且使人不快的。在大规模疫苗接种一段时间后,通过接种替代动物可获得对疾病流行的进一步下行压力。然而,在实践中,可能难以实现足够覆盖的有效的疫苗接种。目前的疫苗没有足够的保护来消除疾病。因此,为了消除疾病,需要依赖于血清学的测试和屠宰计划。血清学诊断是维持疾病自由和促进牲畜贸易以及流行病学调查的关键工具。其他疾病检测方法,例如布鲁氏菌的直接培养和用于检测布鲁氏菌特异性DNA的PCR,不够灵敏且更加昂贵,并且对于培养而言,存在明显的健康威胁。由于低诊断灵敏度和由于疫苗接种引起的反应,通过细胞介导的反应的免疫诊断也并不充分有效(Pouillot等人(1997) *Vet Res* 28:365-374)。

[0005] 目前普遍认可的布鲁氏菌病疫苗是用于牛的(*B.abortus*)布鲁菌S19和(*B.abortus*)布鲁菌RB51,用于绵羊和山羊的*B.melitensis* Rev1。所有这些布鲁菌都具有显而易见的缺陷(Blasco等人(2015) *Veterinary Vaccines for Developing Countries*.FOA,Rome)。例如,这些布鲁菌都是活的(需要使用冷链进行分配),在牲畜中具有残余毒力并且对人类具有致病性。*B.abortus* RB51和*B.melitensis* Rev1都对抗生素具有抗性,这些抗生素在治疗人类疾病中很重要。*B.abortus* S19和*B.melitensis* Rev1可能失去合成OPS的能力,这导致保护功效的丧失。这对于*B.melitensis* Rev1(Mancilla等人(2010) *Journal of Bacteriology* 192:6346-6351)尤其成问题。

[0006] *B.abortus* S19和*B.melitensis* Rev1都是光滑型菌株,因此,它们的使用导致在

布鲁氏菌感染的常规血清学试验中反应的抗体的诱导。这是因为在这些测试中使用的血清学诊断抗原依赖于OPS的存在以使它们具有优异的灵敏度,而没有OPS的抗原是无效的诊断 (McGiven (2013) *Rev Sci Tech* 32:163-176)。这使得在许多情况下不能区分感染和免疫动物。这是有效控制的一个重大障碍,因为它极难有效地使用疫苗接种以及基于血清学诊断的测试和去除策略。

[0007] 粗糙型菌株 *B. abortus* RB51 用于减轻由于牛中的 *B. abortus* S19 接种引起的血清学反应。通过在利福平浸渍的生长培养基上传代来开发该粗糙型菌株 (Schurig 等人 (1991) *Vet Microbiol* 28:171-188)。在抗生素自发产生的许多突变中,有几种突变影响 OPS 合成。该菌株既不能合成 OPS,也不能在通过基因添加补充合成时将其输出到细胞表面 (Vemulapalli 等人 (2000) *Infect Immun* 68)。因此,该疫苗的使用不会产生抗 OPS 抗体,并且其对常规血清学的干扰是有限的。

[0008] 尽管 *B. abortus* RB51 具有这种优势,但其并没有被广泛采用。与 *B. abortus* S19 相比,*B. abortus* RB51 在牛中的保护功效和安全性受到质疑 (Moriyon 等人 (2004) *Veterinary Research* 35:1-38)。在小鼠保护模型中,主要动物模型,已经显示出比 *B. abortus* S19 明显更少的保护作用 (Monreal 等人 (2003) *Infection and Immunity* 71:3261-3271)。

[0009] 试图开发 *B. abortus* RB51 作为绵羊和山羊布鲁氏菌病的疫苗未能显示出保护作用 (Idrissi 等人 (2001) *Rev Sci Tech* 20:741-747)。粗糙型 *B. melitensis* 菌株也已在绵羊中作为疫苗进行评估,但显示出不足的保护功效 (Barrioret 等人 (2009) *Vaccine* 27:1741-1749)。粗糙型 *B. melitensis* 菌株 B115 已经应用于绵羊,但是显示出不够安全,其报道到流产率高 (Pérez-Sancho 等人 (2014) *Vaccine* 32:1877-1881)。对小鼠的研究先前已经表明,由于存在胞质 OPS,*B. melitensis* B115 诱导抗 OPS 抗体 (Cloeckert 等人 (1992) *J Gen Microbiol* 138:1211-1219)。对粗糙型 *B. melitensis* 突变体保护小鼠中的 *B. melitensis* 攻击的保护能力的综合研究得出结论,没有合成 OPS 的粗糙型变体的保护作用明显低于光滑型变体 (Gonzalez 等人 (2008) *PLoS ONE* 3:e2760)。

[0010] 已经不断显示抗 OPS 抗体在布鲁氏菌病的小鼠模型中具有保护作用 (Montaraz 等人 (1986) *Infection and Immunity* 51:961-963)。已显示体液和细胞介导的保护的组合具有协同效应 (Grilló 等人 (2006) *Vaccine* 24:2910-2916) 并提供最佳保护。尽管天然宿主中的数据不太确定,但如上所述,基于光滑型和粗糙型菌株的相对性质的证据是令人信服的,特别是对于小型反刍动物而言是令人信服的。

[0011] 人们认识到寻求改良的布鲁氏菌疫苗是必需的,尽管已经进行了数十年的努力,但自从引入 *B. abortus* RB51 以来,没有对牲畜接种新的疫苗。对重组蛋白亚单位疫苗,布鲁氏菌蛋白表达载体或 DNA 疫苗的研究尚未对该领域产生任何影响。减毒的平滑型布鲁氏菌突变体与 *B. abortus* S19 和 *B. melitensis* 16M 一样,同样遇到了抗体诱导的问题,并且在其他方面例如安全性和功效方面没有表现出足够的额外优势,以推进实验室研究。

[0012] 正如所讨论的那样,有效的新发展受到持续且看似无法解决的问题的严重阻碍,即在牲畜的最佳疫苗保护和有效的血清学诊断方面需要 OPS。这一直是阻碍开发最佳保护性疫苗的障碍,该保护性疫苗可用于 DIVA (从免疫动物中区分感染) 疫苗和测试方案。

[0013] 布鲁氏菌 OPS 中的主要结构元素是 4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-吡喃甘露糖 (D-Rha4NFo) 单元的均聚物,其可变 α (1 \rightarrow 2) 和 α (1 \rightarrow 3) 连接 (Meikle 等人 (1989) *Infect Immun*

57:2820-2828)。布鲁氏菌不同菌株中每种键型的比例似乎在 $\alpha(1\rightarrow3)$ 键型的0至20%频率之间变化,其余为 $\alpha(1\rightarrow2)$ 型。值得注意的是,仅发现*B.suis* biovar 2型菌株缺乏 $\alpha(1\rightarrow3)$ 键(Zaccheus等人(2013)PLoS One 8:e53941)。

[0014] 如在W02014/170681中所广泛讨论的(其内容通过引用整体并入本文),布鲁氏菌和小肠结肠炎O:9同源聚合物OPS中 $\alpha(1\rightarrow2)$ 和 $\alpha(1\rightarrow3)$ 键的相对比例和分布产生不同,但不一定完全描述的抗体结合表位。在布鲁氏菌中,有三种不同的抗原表位可以在OPS中找到,其中有确凿的结构证据(Bundle等人(1989)Infect Immun 57:2829-2836),如表1所示:

[0015] 表1:OPS表位

[0016]

表位名称	perosamines 数量	特性	存在于如下的 OPS 中
C/Y	3 to 4	N-甲酰基 perosamines 仅通过 $\alpha(1\rightarrow2)$ 键连接	所有光滑型布鲁氏菌株以及 小肠结肠炎耶尔森氏菌 O: 9
A	5 或更多	N-甲酰基 perosamines 通过 $\alpha(1\rightarrow2)$ 键连接	主要在所有 A-显性布鲁氏菌株和小肠结肠炎耶尔森氏菌 O: 9 中
M	2-6	至少一个 $\alpha(1\rightarrow3)$ 连接存在零个, 一个或两个相邻的 $\alpha(1\rightarrow2)$ 键; 表位中 $\alpha(1\rightarrow3)$ 连接的位置未定义	主要在 M-显性 OPS 布鲁氏菌株内,但在较小程度上,也在 A-显性菌株内。未在 enterocolitica O: 9 或 <i>B.suis</i> biovar 2 中发现

[0017] Nielsen等人(Nielsen et al(1989)Am J Vet Res 50:5-9)表明在OPS的非还原末端区域中存在另外的表位。这些作者推测在用*B.abortus* S19接种疫苗期间产生了该理论表位的抗体。

[0018] 布鲁氏菌OPS形成为D-Rha4NFo嵌段共聚物(Kubler-Kielb&Vinogradov(2013)Carbohydrate Research 378:144-147),其中两个聚合物元素组合成为一个分子,以及三个非D-Rha4NFo糖在还原端形成衔接子和引物区(Kubler-Kielb&Vinogradov(2013)Carbohydrate Research 366:33-37)。在还原端发现的第一个D-Rha4NFo聚合物元素是D-Rha4NFo单元的序列,D-Rha4NFo单元都是 $\alpha(1\rightarrow2)$ 连接的。该序列与含有中心 $\alpha(1\rightarrow3)$ 链的一个或多个四糖D-Rha4NFo单元的第二聚合物元素连接,否则键是 $\alpha(1\rightarrow2)$ 。如上所述, $\alpha(1\rightarrow3)$ 链的存在构成了“M表位”的特定特征。布鲁氏菌的M显性菌株的OPS具有与 $\alpha(1\rightarrow2)$ 连接的聚合物偶联的几个这些四糖单元的多个四糖单元。A显性菌株的OPS含有一种或两种末端

四糖,这些末端四糖与较长的 α (1 \rightarrow 2)连接的聚合物偶联。因此,在每个OPS分子的尖端附近存在 α (1 \rightarrow 3)连接,无论其是否来自布鲁氏菌的A或M显性菌株。

[0019] 该连接细节的重要性在于它基本上改变了OPS的形状并影响抗体联结。在使用单克隆抗体(mAb)(Bundle等人(1989) *Infect Immun* 57:2829-2836)和吸收的单特异性多克隆血清的许多研究中已经显示了上述这一点,其中单特异性多克隆血清在布鲁氏菌的经典生物分型方案中用于将菌株分类为A、M或混合的A和M血清型(Alton等人(1994) *INRA Editions*)。

[0020] 具有相似OPS结构的其他革兰氏阴性细菌感染可诱导与布鲁氏菌OPS交叉反应的抗体(Corbel(1985) *Vet. Bull.* 55:927-942),引起假阳性血清学反应(FPSR)。其中引用最多的是小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9,因为它具有仅由 α (1 \rightarrow 2)连接的D-Rha4NFo单元组成的均聚物(Caroff等人(1984) *Eur J Biochem* 139:195-200)。

[0021] W02014/170681中公开的发明涉及基于布鲁氏菌OPS结构的各种合成寡糖结构。所述结构均含有至少两个4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-D-吡喃甘露糖单元,并且在单元对之间包含至少一个 α (1 \rightarrow 3)键。根据寡糖中包含的单元数,该结构可用作“通用”抗原,能够检测针对任何布鲁氏菌或小肠结肠炎耶尔森氏菌OPS产生的抗体,或作为“M特异性”抗原,其能够检测仅针对包含 α (1 \rightarrow 3)键的布鲁氏菌OPS产生的抗体(McGiven等人(2015) *Journal of Clinical Microbiology*)。这使用户第一次能够区分感染布鲁氏菌的动物和可能感染布鲁氏菌或小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9的动物。

发明内容

[0022] 本发明人新近发现并表征了布鲁氏菌OPS的另一重要结构特征,其能够首次提供可在如本文所述的DIVA测试系统内使用的疫苗。

[0023] 如下文进一步讨论的,本文所述的初始工作还导致评估几种合成寡糖结构的血清学诊断特性,否则这些特性将不被考虑。其中一些在布鲁氏菌病的血清学诊断试验中表现出令人惊讶的优越性质。

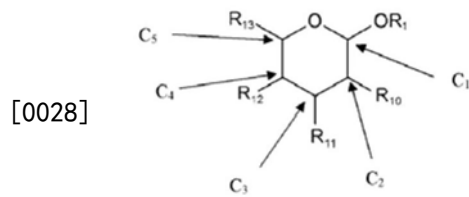
[0024] 根据本发明的第一方面,提供了一种分子,其包含结构式1的4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的七个或更多个连续单元的链,相邻的单元通过C₁-C₂或C₁-C₃糖苷键连接,该链具有末端和还原端,其中离还原端最远的链单元中的吡喃糖环与帽结构连接,例如从C₂或C₃连接。在本文公开的本发明的所有方面和实施例中,帽结构不是通过其C₁与分子的其余部分连接的4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -D-吡喃糖(即,不是4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -D-吡喃甘露糖或4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -D-吡喃葡萄糖)。

[0025] 在整个说明书中使用的术语“4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖”表示如下结构式1中所定义的4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖。

[0026] 帽结构用于破坏发明人在布鲁氏菌OPS中新识别的表位,确定其依赖于聚合物的末端(即,非还原端)存在的完整的单4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -D-吡喃甘露糖单元。因此,帽结构可以是特别通过除去或取代C₂和C₃上的-OH基团(下面的结构式1中的R₁₀和R₁₁)来破坏结构式1的末端4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖结构的任何结构;以下进一步描述具体的非限制性实例。这种破坏可以通过产生针对与本发明相一致的分子的抗体并确定抗体是否能够结合通用抗原和如下文将详细描述DIVA抗原来确定。如果抗体能够结合通用抗原但

不能结合DIVA抗原,则该分子是尖端表位被破坏的分子,即该分子包含如本文所述的帽结构。

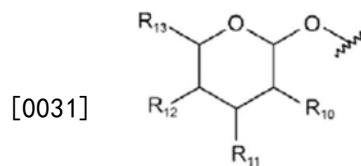
[0027] 在整个说明书中提及的4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的单元具有结构式1所示的结构:



结构式 1

[0029] 其中 R_1 如下所定义, R_{10} 和 R_{11} 独立地选自-OH或4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖(当结构式1的4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元位于非末端位置的聚合物中,其中通过其通过其 C_2 或 C_3 与另外的4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元连接,如下面更详细描述); R_{12} 选自甲酰胺基、乙酰氨基、丙酰胺基和丁酰胺基的酰胺基; R_{13} 为- CH_3 。该结构中的碳原子数也如上所示。

[0030] 在任何给定的4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元中,基团 R_1 可以是糖分子,例如另一种4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元,使得单个单元表现为结构式1a,与邻近的糖连接:



结构式 1a

[0032] 或者,如果 R_1 位于多糖链的“还原端”,则 R_1 可以是H或烷基,例如甲基或乙基,或可以是非perosamine糖,或可以是任何其他非perosamine分子,例如蛋白质、脂质,大分子(其中任何一个可以连接(即连接)到更大的实体,例如全细胞),或本文所用的连接基团,以将多糖连接到实体例如疫苗载体。如果该单元为结构式1a的形式,通过 C_1 与相邻的糖连接,则其可称为4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖。在整个说明书中使用的术语“吡喃糖”包括吡喃糖和吡喃糖排列。同样地,在本说明书中提及“吡喃甘露糖”可以指吡喃甘露糖或吡喃甘露糖基,并且提及“吡喃葡萄糖”可以指吡喃葡萄糖或吡喃葡萄糖基。

[0033] 因此,4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元链的“还原端”是存在4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的末端,其中 C_1 是未与另外的4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖连接。在这种情况下, R_1 可以是(例如)H或甲基、非perosamine糖或如上所述的另一种非perosamine分子。

[0034] 4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元链的“末端”是在离还原端最远的链中具有单元的末端。通过举例以及进一步的说明,“末端”和“还原端”在下面的结构I中指出,并且等同的术语适用于本文讨论的4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元的任何聚合物。

[0035] 在整个说明书中,“ C_1 - C_2 糖苷键”(或“ C_1 - C_2 键”)是两个吡喃糖环之间的 α (1 \rightarrow 2)键,“ C_1 - C_3 糖苷键”(或“ C_1 - C_3 键”)是两个吡喃糖环之间的 α (1 \rightarrow 3)键。

[0036] 在本文所述的本发明的任何实施例中,链内的任何4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖可以是4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -吡喃糖,例如,4,6-二脱氧-4-甲酰- α -D吡喃甘露糖。

如上所述,这形成了布鲁氏菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌的OPS。4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖具有如下结构式Ib所示的结构:



结构式 1b

[0038] 其中 R_1 、 R_{10} 和 R_{11} 如上所定义。

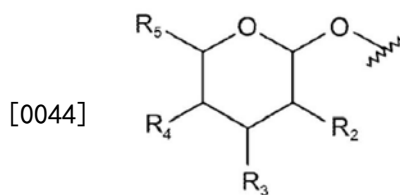
[0039] 或者,链内的任何(或全部)4,6-二脱氧-4-酰胺基- α -吡喃糖可以是4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -吡喃葡萄糖,例如,4,6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃葡萄糖。4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -吡喃糖和4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -吡喃葡萄糖的单位均可包括在根据本发明所述的分子中。

[0040] 4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖的单元以三种状态之一存在于天然OPS聚合物中。它们可以位于还原端、末端或还原端和末端之间。如果一个单元处于还原端,则它通过 C_2 或 C_3 与另外的4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖连接,并且在OPS中,它还通过还原端(C_1)与非perosamine糖连接。如果4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖位于还原端和末端之间,则它与两个相邻的4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖结合,其中一个通过还原端(C_1)结合,另一个通过 C_2 或 C_3 结合。最后,如果4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖在末端,则其通过其还原(C_1)端仅与一个相邻的4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖连接。没有其他键,并且碳2和3都带有羟基,而不具有与它们相连的附加糖。因此,末端糖单元在聚合物中是独特的,因为它是唯一在 C_2 和 C_3 上具有未取代的羟基的糖。

[0041] 如下面进一步讨论并形成本发明的基础,在OPS中没有任何附加的糖附接到该末端4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃吡喃糖单元使其特别易于被免疫系统的分子所接近,本发明人利用该免疫系统提供了一种分子,该分子可以有效地用作疾病控制系统中的疫苗,该系统还包括使用本文所述的DIVA测定法。因此,本文公开的发明涉及4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃糖聚合物(特别是4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖聚合物),其在末端处不含4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃糖单元(即4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖或者4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃葡萄糖)。

[0042] 包含在根据本发明的分子中的帽结构与分子中的4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃糖单元连接,所述分子离链的还原端最远,即,所述分子在末端。也就是说,没有本文所述的本发明任何方面的实施例,其中最远端的4,6-二脱氧-4-酰胺基- α -吡喃糖单元连接到帽结构,然后该帽结构进一步通过其 C_1 连接(即,连接)到4,6-二脱氧-4-酰胺基- α -吡喃糖的单个单元或者连接到4,6-二脱氧-4-酰胺基- α -吡喃糖的多个单元的链的还原端。

[0043] 在根据本发明的分子中,帽结构可以由结构式2组成:



结构式 2

[0045] 其中R₂选自-OH,由1,2,3,4或5个碳原子组成的烷氧基,或由1,2,3,4或5个碳原子组成的烷基;

[0046] R₃和R₄独立地选自酰氨基(可以是甲酰胺基、乙酰胺基、丙酰胺基或丁酰胺基或其脱乙酰基变体)、-OH、C₁至C₅烷氧基、C₁至C₅烷基或全部或部分羟基化的C₁至C₅烷基;以及

[0047] R₅是C₁至C₅烷基或全部或部分羟基化的C₁至C₅烷基。如上所述,帽不是4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖(4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖或4,6-二脱氧-4-甲酰胺- α -D-吡喃葡萄糖),因此排除结构式2的实施例,其中R₂和R₃均为-OH且R₄为甲酰胺基且R₅为甲基。

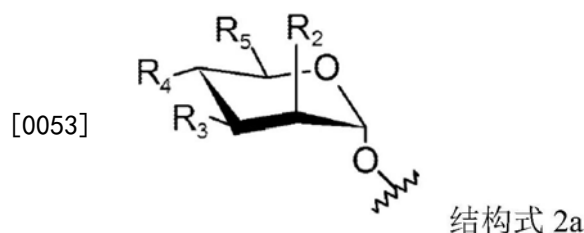
[0048] 关于羟基化烷基的术语“完全或部分羟基化”表示羟基化烷基中可存在一个或多个羟基。例如,如果羟基化烷基包含多于一个碳原子,则可存在多于一个羟基。在整个说明书中,术语“C₁至C₅”表示可以有1,2,3,4或5个碳原子。

[0049] 在一个实施例中,R₂、R₃和R₄均为-OH且R₅为羟甲基。帽结构的该实施例可以称为“甘露糖帽”。

[0050] 或者,R₂和/或R₃可以是烷氧基,R₄可以是酰氨基或其脱乙酰基变体,R₅可以是烷基。在该排列的一个具体实施例中,R₂和/或R₃是甲氧基,R₄是甲酰胺基或其脱乙酰基变体,R₅是甲基。

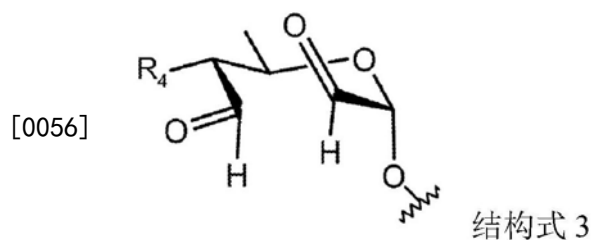
[0051] R₄可以可选地包含修饰的烷氧基,其包含与接头分子缀合的烷基,例如方酸盐或双琥珀酰亚胺基戊二酸酯。接头分子可以进一步与蛋白质如牛血清白蛋白(BSA)或破伤风类毒素连接。在R₄为这样的实施例的情况下,R₂、R₃和/或R₅可以是如上所述的任何一种。

[0052] 结构式2可具有如下结构式2a所示的排列:



[0054] R₂、R₃、R₄和R₅如上所定义。如上所述,其中帽结构由结构式2a组成,R₂和R₃均为OH且R₄为甲酰胺基且R₅为甲基的实施例被排除在外(即,结构式2不是4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖或4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃葡萄糖)。其中帽结构由结构式2a组成,R₂和R₃均为OH,R₄是乙酰胺基、丙酰胺基或丁酰胺基,且R₅是甲基的实施例也被排除在外。

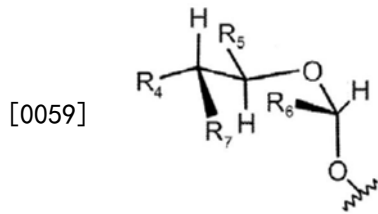
[0055] 在根据本发明的替代分子中,帽结构可以是氧化的4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖,其中吡喃糖环被破坏。例如,帽结构可由结构式3组成:



[0057] 其中R₄是酰氨基(可以是甲酰胺基、乙酰胺基、丙酰胺基或丁酰胺基或其脱乙酰基

变体, 优选甲酰胺基或其脱乙酰基变体)、-OH、C₁至C₅烷氧基、C₁至C₅烷基, 或全部或部分羟基化的C₁至C₅烷基。

[0058] 帽结构可包括结构式4:



结构式 4

[0060] 其中R₄是酰氨基(其可以是甲酰胺基、乙酰胺基、丙酰胺基或丁酰胺基、其脱乙酰基变体, 优选甲酰胺基、其脱乙酰基变体)、-OH、C₁至C₅烷氧基、C₁至C₅烷基或全部或部分羟基化的C₁至C₅烷基;

[0061] R₅是C₁至C₅烷基或全部或部分羟基化的C₁至C₅烷基; 并且

[0062] R₆和R₇独立地选自-H、-CH₃、-CHO、-CH=NH、-CH=NR₈、-CH=N-NH₂、-CH=N-NHR₈、-CH₂NH₂、-CH₂NHNH₂或-CH₂(NH)_nR₈, 其中n=1或2。

[0063] R₆和R₇可以相同或者可以各自为选自该组中的不同基团。R₈是不含吡喃糖的基团, 即不含任何含吡喃糖的分子的基团。当R₆和R₇均为-CH=NR₈, 或者均为-CH=N-NHR₈, 或者均为-CH₂(NH)_nR₈时, R₈在R₆和R₇中不需要相同。

[0064] 例如, R₈可以是或可以包含非吡喃糖分子, 该非吡喃糖分子将存在于R₆或R₇中的N原子与载体, 例如疫苗载体蛋白(例如破伤风类毒素或解毒的白喉毒素), 或诸如牛血清白蛋白的蛋白连接。

[0065] 非吡喃糖分子可以衍生自用作接头的分子, 例如二(N-琥珀酰亚胺基)戊二酸(DSG)、3,4-二丁氧基-3-环丁烯-1,2-二酮(也称为二丁基二乙酸酯)或己二酸二酰肼(ADH)。或者, 在R₆或R₇中, 最靠近结构式4的其余部分的N原子例如通过还原胺化过程可以衍生自附着的分子(如下面概述的载体)。

[0066] 载体可以是荧光分子、两性两亲聚合物、固体材料实体(例如表面或珠子), 或实体(例如细胞(可以是活细胞、减毒细胞或死细胞)或细胞膜或其部分。载体可以是如下所述的疫苗载体实体。载体可以是布鲁氏菌蛋白质, 即天然存在于布鲁氏菌生物体中的蛋白质, 所述布鲁氏菌生物体来自天然或重组来源。布鲁氏菌蛋白质可位于细胞表面/附着于细胞表面。

[0067] 根据本发明所述的分子可包含4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的至少7个连续单元, 例如, 至少8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29或至少约30个连续单元。分子可以是合成的, 或者可以是改性的OPS, (例如, 从天然存在的或重组的生物体(通常是细菌)中分离或纯化来获得所述改性的OPS, 所述天然存在的或重组的生物体包含合成OPS所需的基因, 例如从大肠杆菌细菌或布鲁氏菌属细菌或小肠结肠炎耶尔森氏菌O:9中获得所述OPS, 或者可以通过对这种细菌中获得的OPS进行改性所获得的分子。专门的C₁-C₂连接的OPS可能是优选的。因此, 该分子可以包含至少约4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的40,50,60,70,80,90或至少约100个连续单元。该分子可以连接一种或多种非perosamine糖, 例如在分子还原端的天然存在的OPS中发现的那些非perosamine糖, 和如下所述的残余核心糖。这种糖的实例是Kdo(3-脱氧-D-甘露醇-辛-2-磺酸)。根据本发

明第一方面的分子可以形成如下所述的玫瑰红测试抗原的一部分,经修饰以包括包含如上文和本文其他地方所述的帽结构的分子。同样地,该分子可以形成血清凝集试验(SAT)抗原的一部分,或补体固定试验(CFT)抗原的一部分,其可以采取细胞或亚细胞部分的形式。该分子还可以构成光滑脂多糖大分子的O-多糖元素。该分子可以通过直接在抗原组分中的任何一种上进行化学反应形成(即,不需要事先纯化OPS)。

[0068] 包含结构式3或4所示的帽结构的分子可以是提供封端分子的反应或方法中的中间体。例如,结构式3可以是反应中的中间体,以提供包含本文举例说明的结构式4所示的帽结构的分子。

[0069] 上述根据本发明的任何分子可以连接到载体上,例如其中R₈是如上所述的载体分子。替代地或另外地,在还原端的4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖可以通过连接分子从C₁连接到载体,所述连接分子可以任选地包括 α -(CH₂)_n C=O基团,其中n=3-9。替代地或另外地,连接基团可包括由使用二琥珀酰亚胺戊二酸(DSG)和/或己二酸二酰肼(ADH)的连接方法得到的方酸基团和/或基团。其他连接布置在本领域中是公知的,并且例如在本文其他地方提到的W02014/170681中进行了讨论。

[0070] 还原端C₁和载体之间的连接还可以包括一种或多种非perosamine糖,例如在分子还原端的天然存在的OPS中发现的那些非perosamine糖和残余核心糖,所述残余核心糖保留为弱酸水解方法的人工制品,以从脂质A中释放出OPS以及释放处核心的剩余部分。在通过该方法制备的OPS还原端处发现的糖的实例是Kdo(3-脱氧-D-甘露-辛-2-酮磺酸)。Kdo可通过其端基(还原)碳(其在Kdo中是C₂)与载体连接,或使用本领域熟知的方法(例如使用碳二亚胺交联剂将羧酸与胺偶联)通过羧酸与载体连接。根据本发明所述的任何分子可以连接到蛋白质载体,(在分子中包含帽之前或之后;例如,酶可以在上面提到的重组生物体中表达)例如使用寡糖基转移酶从还原端连接。

[0071] 载体可以是蛋白质,例如破伤风类毒素或解毒的白喉毒素,或蛋白质,例如牛血清白蛋白(BSA)。载体可以是荧光分子、两性两亲聚合物、或固体材料实体,例如表面或珠子。载体可以是布鲁氏菌蛋白质,即天然存在于布鲁氏菌生物体中并且通过天然或重组方式产生的蛋白质。合适的蛋白质包括,例如:二氧四氢嘧啶合酶、L7/L12核糖体蛋白、GroEL(热休克蛋白)、GroES(热休克蛋白),MBP(麦芽糖结合蛋白)、Cu-Zn SOD(铜-锌超氧化物歧化酶)Omp31(外膜蛋白31)、p39(周质结合蛋白)、bp26(也称为Omp28)、U-Omp16(未脂质化的Omp16)、U-Omp19(未脂质化的Omp19)。载体可以是如下所述的疫苗载体实体。

[0072] 根据本发明第一方面的分子可以形成诊断缀合物的一部分。本说明书中使用的术语“诊断缀合物”表示寡糖分子(例如根据本发明第一方面的分子,或如下定义的DIVA抗原寡糖)(直接或通过另外的元素)连接到如上所述的非perosamine糖,和/或如上所述的载体分子,和/或细胞或细胞的一部分,和/或如下所述的非糖载体。诊断缀合物可以是sLPS或OPS分子,OPS分子被修饰以包括帽结构,和/或可以形成细胞或亚细胞组分的一部分,例如如上所述的RBT抗原、SAT抗原或CFT抗原。

[0073] 本发明的第二方面提供了一种疫苗组合物,其包含根据本发明第一方面的分子和疫苗载体实体。所述分子可以与疫苗载体实体缀合。疫苗载体实体可包括,例如,蛋白质或肽,其可以是本领域已知的任何蛋白质或肽,可用作抗原分子的缀合物以形成疫苗。通过非限制性示例,疫苗载体实体可以包括破伤风类毒素(Verez-Bencomo等人(2004) Science

305:522-525), 解毒的白喉毒素, 例如CRM 197 (Mawas等人 (2002) *Infection and Immunity* 70:5107-5114), 或其他高免疫原性蛋白质 (Svenson&Lindberg (1981) *Infection and Immunity* 32:7)。疫苗载体实体还可以包含免疫原性颗粒, 例如脂质体、胶束、微球、纳米颗粒或无活性病毒颗粒, 其中寡糖掺入颗粒表面。疫苗载体实体可以包含布鲁氏菌蛋白, 即天然存在于布鲁氏菌生物体中或在重组生物 (例如大肠杆菌或布鲁氏菌生物体) 中出现 (即, 表达) 的蛋白, 或者衍生自这种蛋白的肽 (例如这种蛋白的片段)。作为非限制性实例, 合适的蛋白质包括, 例如: 二氧四氢喋啶合酶、L7/L12核糖体蛋白、GroEL (热休克蛋白)、GroES (热休克蛋白)、MBP (麦芽糖结合蛋白)、Cu-Zn SOD (铜-锌超氧化物歧化酶) Omp31 (外膜蛋白31)、p39 (周质结合蛋白)、bp26 (也称为Omp28)、U-Omp16 (未脂质化的Omp16)、U-Omp19 (未脂质化的Omp19)。

[0074] 所述疫苗组合物可包含根据本发明第一方面的分子, 这种分子是包含修饰的OPS分子的sLPS分子, 该OPS分子包含与末端4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖连接的帽结构。

[0075] 在一个实施例中, 在所述疫苗组合物中, 该分子在每对4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元之间仅包含C₁-C₂键, 即, 在分子的每对单元之间存在C₁-C₂键。在另一个实施例中, 在所述疫苗组合物中, 该分子在一对4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖单元之间包含至少一个C₁-C₃键。

[0076] 在根据本发明第二方面的疫苗组合物中, 该分子可包含4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的至少约7,8,9,10,11,12,13,14或15个连续单元。例如, 该分子可包含4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的至少约16个单元, 例如, 至少约17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29或至少约30个连续单元。该分子可以是合成的, 或者可以是改性的OPS, (例如, 从天然存在的或重组的生物体 (通常是细菌) 中分离或纯化来获得所述改性的OPS, 所述天然存在的或重组的生物体包含合成OPS所需的基因, 例如从大肠杆菌细菌或布鲁氏菌属细菌或小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9中获得所述OPS, 或者可以通过对这种细菌中获得的OPS进行修饰 (以包括本文所述的帽结构) 所制备的分子。因此, 该分子可包含至少约40,50,60,70,80,90或至少约100个连续单元的4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖。

[0077] 根据本发明的第三方面, 提供了包含根据本发明第一方面的分子的细胞 (或从细胞获得的亚细胞级分)。细胞可以是细菌细胞, 例如布鲁氏菌细胞或小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9细胞或大肠杆菌细胞。细胞可以是死亡的或减毒的细胞, 其可以另外染色; 例如, 包含根据本发明第一方面的分子的细胞可以是玫瑰红测试抗原, 其中RBT细胞表面上的至少一个OPS已经被修饰以例如通过使用如本文所述的氧化方法形成根据第一方面的分子。

[0078] 可以通过任何已知的转化方法将分子从细胞外部引入细胞。或者, 可以将细胞工程化以表达包含如上所述的帽结构的OPS, 例如, 结构式2的帽结构, 其中R₂和/或R₃是甲氧基, R₄是甲酰胺基, R₅是甲基。例如, 细胞是布鲁氏菌细胞或小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9细胞, 其可被工程化以表达来自生物霍乱弧菌0:1小川的rfbT基因。

[0079] 本发明的第四方面提供了一种疫苗组合物, 其包含根据本发明第三方面的细胞, 其是布鲁氏菌细胞或小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9细胞。

[0080] 根据本发明第二或第四方面的疫苗组合物可以进一步包含赋形剂和/或稀释剂, 所述赋形剂和/或稀释剂适合于将组合物施用于需要预防布鲁氏菌感染接种疫苗的受试

者。在不应用发明活性的情况下,选择合适的组分在本领域技术人员的常规能力范围内。

[0081] 例如,本发明的疫苗组合物可以方便地使用药学上可接受的赋形剂或稀释剂来配制,例如水溶剂、非水溶剂、无毒赋形剂、例如盐、防腐剂、缓冲剂等。非水溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油和可注射的有机酯如乙酸乙酯。水溶剂包括水、醇/水溶液、盐溶液、肠胃外载体如氯化钠、林格氏葡萄糖等。防腐剂包括抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体。根据常规技术调节疫苗组合物的各种组分的pH值和精确浓度。

[0082] 在某些情况下,还可能需要配制疫苗组合物以包含佐剂以增强免疫应答。这些佐剂包括所有可接受的免疫刺激化合物,例如细胞因子、毒素或合成组合物。常用的佐剂包括氢氧化铝、磷酸铝、磷酸钙、弗氏佐剂和Quil-A皂苷。除佐剂外,可能需要与疫苗缀合物共同施用生物反应调节剂(BRM)以下调抑制性T细胞活性。

[0083] 用于施用疫苗组合物的可能载体包括但不限于脂质体、胶束和/或纳米颗粒。脂质体是微观囊泡,其由围绕水性隔室的一个或多个脂质双层组成。脂质体在组成上类似于细胞膜,因此,脂质体通常可以安全地施用并且是可生物降解的。用于制备脂质体和配制各种分子的技术(例如,包封)是众所周知的。

[0084] 取决于制备方法,脂质体可以是单层的或多层的,并且大小可以变化,直径范围为约0.02 μm 至大于约10 μm 。脂质体也可以吸附到几乎任何类型的细胞,然后释放包封的药剂。或者,脂质体与靶细胞融合,由此脂质体的内容物排空到靶细胞中。或者,吸收的脂质体可被吞噬细胞内吞。内吞作用之后是脂质体脂质的溶酶体内降解和包封剂的释放。在本发明的上下文中,根据本发明的疫苗组合物可包含位于脂质体表面的根据本发明第一方面的分子,以促进抗原呈递而不破坏脂质体或内吞作用。然而,不管机制或递送如何,结果是相关疫苗组合物和/或分子的细胞内处置。

[0085] 脂质体载体可以是阴离子的或阳离子的。阴离子脂质体载体包括pH敏感性脂质体,其在内吞作用和内体酸化后破坏或融合内体膜。

[0086] 可用于本发明组合物和方法的其他合适的脂质体包括多层囊泡(MLV)、寡层囊泡(OLV)、单层囊泡(UV)、小单层囊泡(SUV)、中等大小单层囊泡(MIN)、大单层囊泡(LUV)、巨型单层囊泡(GUV)、多囊泡(MVV)、反相蒸发法制备的单层或寡层囊泡(REV)、反相蒸发法制备的多层囊泡(MLV-REV)、稳定的多层囊泡(SPLV)、冷冻和解冻的MLV(FATMLV)、挤压法制备的囊泡(VET)、弗氏压碎器(FPV)制备的囊泡,通过融合制备的囊泡(FUV)、脱水-再水合囊泡(DRV)、和bubblesomes(BSV)。制备这些脂质体的技术是本领域公知的。

[0087] 其他形式的递送颗粒,例如微球等也可用于递送疫苗。

[0088] 在一个实施例中,所述疫苗组合物可以包含在动物饲料(即适合动物食用的食品)中,所述动物饲料包含根据本发明的疫苗组合物。在非限制性实例中,疫苗组合物可以是丸粒、碎屑或糊状物的形式,其还可以进一步包括例如谷物、草和/或蛋白质组分。该组合物也可以包含在饮用液体中和/或通过喷雾施用到动物周围的大气中,进而被动物吸入。

[0089] 根据本发明第一方面的分子,或根据本发明第二方面和第四方面的疫苗组合物,或根据本发明第三方面的细胞,可以用作对动物接种预防由布鲁氏菌生物体所感染的方法中的疫苗。所述方法可包括本发明的第五方面的方法。

[0090] 因此,本发明的第五方面提供了一种对动物接种疫苗以预防布鲁氏菌生物体感染和/或降低布鲁氏菌生物体感染风险的方法,该方法包括向动物施用保护量本发明的第一

方面的分子,或根据本发明的第二方面或第四方面的疫苗组合物,或根据本发明的第三方面的细胞。疫苗接种是预防平滑型菌株布鲁氏菌生物体感染,例如、*B. abortus*、*B. melitensis*和/或*B. suis*。该方法包括通过向动物施用分子或疫苗组合物或细胞在动物中诱导免疫应答。该方法可以进一步包括从动物获得生物样品并使生物样品与DIVA抗原接触并且检测没有或几乎没有抗体结合至DIVA抗原。本文提及的DIVA抗原定义如下。DIVA抗原包括W02014/170681中公开的抗原,其特异于抗OPS抗体,OPS抗体由于感染了平滑型菌株布鲁氏菌生物体而被诱导,所述布鲁氏菌生物体具有包含4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖单元的聚合物的OPS,并且在每对相邻单元之间包含C₁-C₂或C₁-C₃糖苷键。这种抗原在该公开中称为“特异性M-抗原”。

[0091] DIVA抗原可包含DIVA抗原寡糖,其由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -D-吡喃甘露糖的2个、3个、4个或5个连续单元组成。例如,它可以包含二糖,所述二糖由通过C₁-C₃键连接的4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -D-吡喃甘露糖的2个单元组成,

[0092] 和/或可以包含四糖,所述四糖由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -D-吡喃甘露糖的4个单元组成同时包含中心C₁-C₃键和两个C₁-C₂键,所述二糖或四糖通过还原端与非糖载体连接。在四糖中,“中心C₁-C₃键”表示C₁-C₃键出现在四糖中的第二和第三4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃甘露糖单元之间。

[0093] 或者,DIVA抗原可以包含DIVA抗原寡糖,其三糖,所述三糖是由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -D-吡喃甘露糖的三个单元组成,并且包含一个C₁-C₃键和一个C₁-C₂键,或者包含两个C₁-C₂键。在另一个替代方案中,DIVA抗原可以包含DIVA抗原寡糖,其是二糖,所述二糖由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -D-吡喃甘露糖的两个单元和C₁-C₂键组成,所述二糖通过还原端连接到非糖载体。

[0094] 或者,DIVA抗原可以包含DIVA抗原寡糖,其是五糖,所述五糖由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -D-吡喃甘露糖的5个单元组成,并且包含一个C₁-C₃键和三个C₁-C₂键,C₁-C₃键位于来自非还原端的第二和第三4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -D-吡喃甘露糖单元之间,所述五糖通过还原端连接(即连接)到非糖载体上。

[0095] 在另一个替代方案中,DIVA抗原可包含单糖,所述单糖由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -D-吡喃甘露糖的1个单元组成,所述单糖通过C₁碳连接到非糖载体。

[0096] 本说明书中使用的术语“非糖载体”可以指不含糖基的载体,例如破伤风类毒素或解毒白喉毒素等蛋白、或牛血清白蛋白(BSA)等蛋白。

[0097] 非糖载体可以是荧光分子、惰性两亲聚合物、脂质或糖脂,或固体材料实体,例如表面或珠子。这些载体的使用允许检测样品中抗体存在的各种测定形式,例如ELISA,FPA,TR-FRET,侧向流动测定或如下所述的基于珠子的凝集测定。

[0098] “固体”珠包含非液体结构,例如凝胶珠或乳胶珠。因此,DIVA抗原可以是或形成诊断缀合物的一部分,诊断缀合物可以是具有至少一种如本文所述的DIVA抗原寡糖的表面形式,DIVA抗原寡糖通过连接系统附着到其上,所述连接系统包括共价连接至寡糖。附着可以是,例如,通过蛋白质载体介导的被动吸收,或包含疏水性元件的非蛋白质载体分子,其通过如上所述的还原端共价连接到寡糖上。被动吸收是由于例如与表面的疏水和离子相互作用,表面例如聚苯乙烯、聚氯乙烯、胶乳、玻璃、硝化纤维、聚偏二氟乙烯。蛋白质载体可以是例如BSA。也可以使用固体实体表面上可用的其他官能团,例如马来酰亚胺(与巯基结合)、

胺(通过使用接头可获得的多种结合选择)、醛(与胺结合)或羧基(与胺结合)。

[0099] 本文所述的DIVA抗原可以是例如,如W02014/170681中所述的合成的缀合物。例如,DIVA抗原可以具有如下所述的结构III或结构VI,或结构IV或结构V或结构VII或结构XI或结构XII(参见下表2)。

[0100] 该方法可以包括通过同时或依次使生物样品(从动物中获得该生物样品,其中通过向动物施用分子或疫苗组合物或细胞,免疫应答已经被诱导)与两种或更多种DIVA抗原接触来使用多于一种的DIVA抗原。例如,如上所述的含有四糖的DIVA抗原可以与含有三糖的DIVA抗原组合使用,所述DIVA抗原包含三糖,所述三糖由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -D-吡喃甘露糖的三个单元组成,并且包含两个C₁-C₂键,所述三糖通过还原端与非糖载体连接。或者,如上所述的含有四糖的DIVA抗原可以与含有二糖的DIVA抗原组合使用,所述DIVA抗原包含二糖,所述二糖由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -D-吡喃甘露糖和C₁-C₂键组成,所述二糖通过还原端与非糖载体连接。例如,结构VI所示的DIVA抗原可以与结构XII所示的DIVA抗原和/或结构XI所示的DIVA抗原组合使用。

[0101] 在根据本发明任一方面的方法中,动物可以是反刍动物、骆驼科动物或吮吸动物,例如牛或猪动物,例如牛、猪、绵羊或山羊,或可以是人。本发明任何方面的生物样品可以是血液、血浆、血清、组织、唾液或乳汁样品。因此,生物样品不是仅包含抗体和/或寡糖或多糖(加上实验室试剂)的实验室样品,例如单克隆抗体制剂,而是包含许多其他组分的复杂样品,包括与要进行的方法无关的其他抗体。有利地,在动物样品中发现可以通过本文和W02014/170681中描述的DIVA抗原检测到的抗体的存在表明该动物是或已经感染了光滑型布鲁氏菌细菌,以引发免疫反应和抗体的产生。布鲁氏菌可以是任何光滑型菌株(那些呈现其表面含有4,6-二脱氧基-4-甲酰胺基-吡喃甘露糖的OPS的菌株)。在根据本发明的方法中缺乏与DIVA抗原的结合是确认动物未被这些生物体感染的手段。

[0102] 重要的是,当动物接种了根据本发明的疫苗时,未观察到对DIVA抗原的应答(即,未检测到或检测到很少与DIVA抗原结合的抗体),因为疫苗分子中不存在发明人鉴定的表位,其中表位的鉴定取决于末端4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -D-吡喃甘露糖的存在与否。因此,可以将这种测定中的阳性反应视为感染的确认。与现有方法相比,这一点是非常重要的优势,因为它提供了DIVA测试,能够区分免疫和感染动物。

[0103] 根据本发明任何方面的方法可包括使用ELISA测定,例如间接ELISA或竞争性ELISA,其设计在本领域技术人员的常规能力范围内。例如,在间接ELISA中,通过使用缀合的载体(例如,BSA,能够被动吸收至板上)将本文所述的DIVA抗原或DIVA抗原寡糖(或包含DIVA抗原寡糖的诊断缀合物)固定在ELISA板上,例如固定在非功能化的ELISA板上。然后将待测试的生物样品加入板中并培育一段时间,之后洗涤板。加入检测缀合物(例如HRP-缀合的蛋白-G或HRP-缀合的抗物种IgG)并对板进行培育、洗涤并随后通过适合于使用的检测缀合物的方法使板显色(在HRP的情况下,ABTS可能是合适的,如下所述)。这使得可以确定生物样品中存在的抗体与板上存在的抗原的结合水平(如果存在结合的话)。

[0104] 其他ELISA变体,例如阻断ELISA(Rhodes等人(1989) *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1:324-328)是本领域技术人员公知的,并且可以在不应用本发明技术的情况下使用。

[0105] 根据本发明的方法可包括使用TR-FRET方法,例如W02009/118570和W02011/

030168中所述的方法。在本文中,DIVA抗原或DIVA抗原寡糖可以直接或间接缀合至TR-FRET标记,例如在专利公开中所述的镧系元素螯合物(供体荧光团)或荧光素(受体荧光团)。

[0106] 如上所述,DIVA抗原或DIVA抗原寡糖(或包含DIVA抗原寡糖的诊断缀合物)可以通过直接或间接地将二-或三-或四-或五糖与荧光团缀合而形成,这将使得能够检测到通过例如美国专利5,976,820中所描述的荧光偏振结合抗原-抗体(Nasir&Jolley (1999) Comb Chem High Throughput Screen 2:177-190)。这形成了本文其他地方提到的荧光偏振测定(FPA)的基础。

[0107] 通过非限制性实例,可以在本发明中使用的其他测定形式包括侧向流动测定,其中抗原或寡糖被吸收到膜上,沿着该膜可以使血清(包含血清抗体)流动。

[0108] 血清可以与抗物种抗体混合,所述抗物种抗体用胶体金或乳胶珠标记(Abdoel等人(2008) Vet Microbiol 130:312-319)。另一种替代方案是基于珠子的凝集测定,例如其中抗原-BSA缀合物或寡糖-BSA缀合物被动地涂覆到乳胶珠上。然后将珠子加入血清样品中并观察凝集是否出现(表明抗体与珠子上的抗原结合)(Abdoel&Smits (2007) Microbiology and Infectious Disease 57:123-128)。

[0109] 该方法可以进一步包括使样品与通用抗原接触;在整个说明书中,“通用抗原”是包含4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的至少6个连续单元的抗原,所述4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖在大多数或所有单元对之间包含C₁-C₂键并且任选地在一对单元之间包含至少一个C₁-C₃键。该方法可包括检测抗体与通用抗原结合。这表明疫苗已在动物中引发免疫应答。通用抗原可以包含从布鲁氏菌生物体或从小肠杆菌或小肠结肠炎耶尔森氏菌O:9中获得的OPS(或OPS的部分);例如,OPS或其部分可以形成sLPS或整个细胞的一部分。或者,通用抗原可具有如下所述的结构VIII、IX或XIX。

[0110] 本发明的第六方面提供一种筛选已知包括已经用根据本发明第一方面的分子或根据本发明第二或第四方面的疫苗组合物或根据本发明的第三方面的细胞接种疫苗的个体的一群动物的方法,该方法包括使得自群体中的动物的生物样品与DIVA抗原接触,其中检测到抗体与DIVA抗原的结合表面该抗体是从感染了布鲁氏菌生物体的动物中获得的。因此,用于筛选的方法可以是检测一群动物中感染布鲁氏菌生物体的一只或多只动物的方法,其中所述一群动物包括已经按如上所述接种过疫苗的个体(即,已经施用了根据本发明的第一方面的分子或根据本发明的第二或第四方面的疫苗组合物或根据本发明的第三方面的细胞的动物),因为没有从免疫的动物获得的样品中检测到抗体结合到DIVA抗原。该方法可包括从群体中的每只动物获得生物样品的步骤。生物样品和DIVA抗原可以是如上关于本发明第五方面所述的任何抗原。

[0111] 本发明的第七方面提供了一种试剂盒,其包含根据本发明第二或第四方面的疫苗组合物。例如,疫苗组合物可以以冻干形式包装提供,并且试剂盒还可以包含适合用于将疫苗组合物重构成适于向动物施用的形式的溶液。替代地或另外地,所述试剂盒还可包含给药装置,所述给药装置包括例如针、注射器和/或移液管,其适于将疫苗组合物(其可以从冻干形式重构)施用给动物。

[0112] 本发明的第八方面提供了一种获得根据本发明第三方面的细胞的方法,包括在布鲁氏菌细胞或小肠结肠炎耶尔森氏菌O:9细胞中表达来自生物霍乱弧菌O:10gawa的rfbT基因。该基因在布鲁氏菌中的表达导致OPS与C₂上的甲氧基帽合成。

[0113] 本发明的第九方面提供了一种在样品中检测抗布鲁氏菌抗体的方法,该方法包括使样品与包含根据本发明第一方面的分子的诊断缀合物接触。所述诊断缀合物可以例如包含修饰的RBT抗原、SAT抗原、CFT抗原或包括根据本发明第一方面的分子的sLPS抗原。在该方法中,抗布鲁氏菌抗体不是针对*B. inopinata* B02的抗体。

[0114] 该分子可包含4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的至少约7,8,9,10,11,12,13,14或15个连续单元。例如,该分子可包含4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的至少约16个单元,例如,至少约17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29或至少约30个连续单位。任何4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖可以是4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -吡喃糖,例如4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖。该分子可以是合成的,或者可以是衍生自天然或重组来源的化学修饰的OPS。分子可以是来自重组生物(通常是细菌)获得的修饰的OPS,所述重组的生物体包含合成加帽的OPS所需的基因,例如来自大肠杆菌或布鲁氏菌或来自*Y. 小肠结肠炎细菌*如小结肠炎耶尔森氏菌0:9,其经过修饰以表达如上所述的rfbT基因。它可以是通过修饰(以包括如本文所述的帽结构)从通过生物体(通常是细菌)获得的OPS制备的分子,所述生物体包含合成OPS所需的基因。因此,该分子可包含4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的至少约40,50,60,70,80,90或至少约100个连续单元。

[0115] 样品可以是与本发明的其他方面相关的上文所述的任何类型的生物样品,所述生物样品取自疑似已经感染物种*B. abortus*,*B. melitensis*和*B. suis*的布鲁氏菌生物的动物。替代地或另外地,样品可以为一种生物样品,其取自已知或疑似已接种不是根据本发明的疫苗的动物,这些疫苗例如为*B. abortus* S19疫苗、*B. melitensis* Rev1疫苗或*B. abortus*,*B. melitensis*或*B. suis*的任何其他光滑型菌株的疫苗。有利地,当进行根据本发明第九方面的方法时,诊断缀合物不与以这种方式接种过疫苗的动物样品中存在的抗体结合,或者与布鲁氏菌sLPS抗原的结合相比,所述诊断缀合物减少了与这种抗原的结合。因此,这提供了替代的DIVA测试,允许继续使用现有技术的疫苗并具有更好地区分感染和免疫动物的能力。

[0116] 因此,根据本发明第九方面的方法可以提供一种筛选已知包含已经接种基于布鲁氏菌“平滑细胞”的疫苗(即,例如*B. abortus* S19疫苗、*B. melitensis* Rev1疫苗或*B. abortus*,*B. melitensis*或*B. suis*的任何其他光滑型菌株的疫苗)的个体的动物群的方法,该方法包括使得取自群体中的动物生物样品与包含根据本发明的第一方面的分子的诊断缀合物接触,其中检测到与诊断缀合物结合的抗体表明样品取自感染布鲁氏菌生物的动物。因此,筛选方法可以是一种用于检测动物群体中感染布鲁氏菌生物的一只或多只动物,所述这群动物已知包括那些已经接种了该段中所述的疫苗的个体。该方法可包括从群体中的每只动物获得生物样品的步骤。

[0117] 该方法可以采取如上文关于本发明的先前方面所述的ELISA测定、FPA测定、TR-FRET测定、侧向流动测定或基于珠子的凝集测定的形式。同样地,如上关于本发明的前述方面所述的动物和样品可以用于根据本发明的第九方面的方法中。

[0118] 本发明的第十方面提供了一种检测样品中抗布鲁氏菌抗体的存在的方法,包括使样品与包含由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的3个单元组成的三糖并且仅包含C₁-C₂键的诊断缀合物接触,和/或与包含由通过C₁-C₂键连接的4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的2个单元组成的二糖的诊断缀合物接触。三糖和/或二糖通过还原端直接或通过另一种元素与

非糖载体连接。或者,所述诊断缀合物可包含由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的1个单元组成的单糖,所述单糖通过C₁碳与非糖载体连接。第十方面还可包括使样品与诊断缀合物接触,所述诊断缀合物包含由4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖的4个单元组成的四糖并且包含一个中心C₁-C₃键和两个C₁-C₂键,所述四糖通过还原端直接或通过另一种元素与非糖载体连接(即连接)。任何4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -吡喃糖可以是4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -吡喃糖或4,6-二脱氧-4-酰氨基- α -D-吡喃甘露糖,例如,4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖。非糖载体可以是如上关于本发明第一方面所述的任何载体。包含三糖的诊断缀合物可具有结构XII;包含二糖的诊断缀合物可具有结构XI;包含单糖的诊断缀合物可具有结构II。包含四糖的诊断缀合物可具有结构VI。该方法可以采取如上关于本发明的先前方面所述的ELISA测定、FPA测定、TR-FRET测定、侧向流动测定或基于珠子的凝集测定的形式。同样地,如上关于本发明的前述方面所述的动物和样品可以用于根据本发明的第九方面的方法中。

[0119] 可在获得样品的动物已经或疑似已经感染或暴露于布鲁氏菌生物体后约10周或10周之后获得与诊断缀合物接触的样品,其中例如可在感染或暴露后的11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,30,35,40,50,53,55,或大约60周后获得与诊断缀合物接触的样品。在获得样品的动物已经或疑似已经感染或暴露于布鲁氏菌生物体后约16周或16周之后获得样品可能是优选的。样品可以在10-40周的时间内获得,例如在获得样品的动物已经或可能已经感染或暴露于布鲁氏菌生物体后15-40周的时间内获得。“暴露后1周”表示暴露后的一个日历周的时间加上或减去4天。因此,例如,“暴露后10周”表示在获得样品之前在约66天至约74天10个日历周加上或减去4天之间出现动物暴露或感染;“暴露后16周”表示在获得样品之前在约108天至约116天(16个日历周加上或减去4天)之间出现动物暴露或感染。

[0120] 在本说明书的整个说明书和权利要求书中,词语“包括”和“包含”以及词语的变体,例如“包括”和“包含”,意指(并且被认为可与之互换)“包括但不限于”并且不排除其他部分、添加剂、成分、整体或步骤。在本说明书的整个说明书和权利要求书中,除非上下文另有要求,否则单数形式包含复数形式。特别地,在使用不定冠词的情况下,除非上下文另有要求,否则说明书应被理解为考虑复数以及单数。

[0121] 根据以下实施例,本发明的其他特征将变得显而易见。一般而言,本发明扩展到本说明书(包括所附权利要求和附图)中公开的任何一个新颖特征或这些特征的任何新颖组合。因此,除非结合本发明的特定方面、实施例或示例描述的特征、整体、特征、化合物或化学部分与本文描述的任何其他方面、实施例或示例不相符,否则其可适用于本文描述的任何其他方面、实施例或示例。

[0122] 此外,除非另有说明,否则本文公开的任何特征可以由用于相同或类似目的的替代特征代替。

附图说明

[0123] 现在将仅通过示例的方式参考图1-16描述本发明的实施例,其中:

[0124] 图1示出了针对不同合成寡糖BSA缀合物(1-2个六糖=结构IX;1-3六糖=结构VIII;四糖=结构VI;三糖=结构V;三糖=结构IV;二糖=结构III;单糖=结构II)以及针

对不同的sLPS抗原(B.abortus S99;B.melitensis 16M sLPS;小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9sLPS)用TT-dsg-1,2hexa(结构I)接种的小鼠的血清的抗体结合谱,所述抗体结合谱示出为终点滴度;

[0125] 图2示出了使用甘露糖修饰的和等同的未修饰的寡聚糖胺BSA缀合物的牛血清的血清学iELISA滴度(Mono=结构II;C-Mono=结构XIII;Tri=结构V;C-Tri=结构XIV,Hexa=结构IX;C-Penta=结构XVIII;“Pos”表示来自已知感染动物的血清,“neg”表示来自已知未感染动物的血清);

[0126] 图3示出了针对不同合成寡糖BSA缀合物(七糖=结构XXII;四糖=结构VI;二糖=结构III)以及针对不同的sLPS抗原(B.abortus S99;B.melitensis 16M sLPS;小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9sLPS)用TT-dsg-1,2hepta(非红)(结构XXI)接种的小鼠的血清的抗体结合谱,所述抗体结合谱示出为iELISA的终点滴度;

[0127] 图4示出了显示为iELISA的终点滴度(y轴)的来自两组8只CD1小鼠的血清(免疫后48天)的抗体结合,其中用评估不同抗原(破伤风类毒素;B.abortus S99全细胞[A显性OPS];B.melitensis 16M全细胞[M显性OPS];B.suis biovar 2全细胞[仅 $\alpha(1\rightarrow 2)$ 连接的OPS];B.abortus S99 sLPS[A显性OPS];B.melitensis 16M sLPS[M显性OPS];1,2六糖=结构IX;1,3六糖=结构VIII;四糖=结构VI;三糖=结构XII;二糖=结构III)的两种类型的TT-布鲁氏菌OPS缀合物使所述小鼠免疫;水平条显示中值滴度,测试的滴度范围为 $\log_{10} 2.0$;

[0128] 图5示出了使用用于B.abortus S19接种后45天的牛中采集的20个血清样本(空心三角形)和感染了B.abortus野生菌株的牛中采集的60个样本(实心菱形)的B.abortus S99 sLPS(x轴)和缀合的(c)B.abortus S99 OPS(y轴)抗原(对OPS抗原加帽的缀合过程)的iELISA结果;

[0129] 图6示出了感染B.abortus的12头牛的12份血清的平均(实线)和个体(标记)iELISA结果(y轴)和4头未感染的牛的4份血清的平均(虚线)ELISA结果,其来自三种不同的ELISA(x轴),一种ELISA仅具有1,2连接的六糖(Hex 1,2=结构IX),一种ELISA仅具有1,2连接的三糖(Tri 1,2=结构XII)和一种ELISA含有单糖(Mono=结构II);

[0130] 图7示出了在每个采样时间点(感染后3,7,16,24和53周,x轴)实验感染B.abortus菌株544(A显性)的4只动物的血清样品的平均iELISA结果,所述iELISA来自两种ELISA,一种ELISA仅具有1,2个连接的六糖(结构IX),另一种ELISA具有1,2个连接的三糖(结构XII);

[0131] 图8示出了感染B.suis biovar 2(显性,OPS仅1,2个连接的)的17头猪的血清样品的iELISA结果,结果显示为'受感染',还示出了12头随机抽样的未感染的猪的血清样品的iELISA结果,结果显示为'Rand Non-In'。仅使用1,2-连接的三糖BSA缀合物(结构XII)(涂层浓度为 $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$)并使用1,2连接的三糖BSA缀合物(结构XII)和M四糖BSA缀合物(结构VI)的质量均匀混合物(每种抗原的涂层浓度为 $1.25\mu\text{g}/\text{ml}$,总浓度= $2.5\mu\text{g}$)进行ELISA。

[0132] 图9示出了使用B.abortus S99 sLPS抗原得到的实验感染了B.abortus 544(实线)的4头奶牛的20份血清的iELISA结果(y轴)和实验感染了小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9的4头奶牛的20份血清的iELISA结果(y轴),其中在感染后的3,7,16,24和53周(x轴)对所述奶牛进行采样;

[0133] 图10示出了使用1,2连接的多糖(结构IX)抗原得到的实验感染了B.abortus 544

(实线)的4头奶牛的20份血清的iELISA结果(y轴)和实验感染了小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9的4头奶牛的20份血清的iELISA结果(y轴),其中在感染后的3,7,16,24和53周(x轴)对所述奶牛进行采样;

[0134] 图11示出了使用1,2连接的三糖(结构XII)抗原得到的实验感染了B.abortus 544(实线)的4头奶牛的20份血清的iELISA结果(y轴)和实验感染了小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9的4头奶牛的20份血清的iELISA结果(y轴),其中在感染后的3,7,16,24和53周(x轴)对所述奶牛进行采样;

[0135] 图12示出了使用单糖(结构II)抗原得到的实验感染了B.abortus 544(实线)的4头奶牛的20份血清的iELISA结果(y轴)和实验感染了小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9的4头奶牛的20份血清的iELISA结果(y轴),其中在感染后的3,7,16,24和53周(x轴)对所述奶牛进行采样;

[0136] 图13是散点图,其示出了使用B.abortus S99 sLPS(x轴)的iELISA结果以及使用1,2连接的三糖BSA缀合物(结构XII)抗原(y轴)的iELISA结果,其中数据点示出了29头感染了B.abortus牛的29份血清样品的结果(‘感染的’,实心菱形),示出了31头感染了非布鲁氏菌的牛的31份血清样品的结果(‘FPSRs’,空心圆圈),其中这31头非布鲁氏菌感染的牛在布鲁氏菌疾病的常规血清学诊断检测中呈假阳性,还示出了20头随机选择的未感染的牛的20份血清的结果(‘Rand Non-In’,叉)

[0137] 图14是散点图,其示出了使用B.abortus S99 sLPS(x轴)的iELISA结果以及使用1,2连接的三糖BSA缀合物(结构XII)和M四糖BSA缀合物(结构VI)(y轴)的质量均匀混合物(每种抗原的涂层浓度为1.25 μ g/ml,总浓度=2.5 μ g)的iELISA结果,其中数据点示出了29头B.abortus感染牛的29份血清样品的结果(‘感染的’,实心菱形),示出了31头非布鲁氏菌感染的牛的31份血清样品的结果(‘FPSRs’,空心圆圈),其中这31头非布鲁氏菌感染的牛在布鲁氏菌疾病的常规血清学诊断检测中呈假阳性,还示出了20头随机选择的未感染的牛的20份血清的结果(‘Rand Non-In’,叉);

[0138] 图15是散点图,其示出了使用1,2连接的三糖BSA缀合物(结构XII)(x轴)的iELISA结果以及使用1,2连接的三糖BSA缀合物(结构XII)和M四糖BSA缀合物(结构VI)(y轴)的质量均匀混合物(每种抗原的涂层浓度为1.25 μ g/ml,总浓度=2.5 μ g)的iELISA结果,其中数据点示出了29头B.abortus感染牛的29份血清样品的结果(‘感染的’,实心菱形),示出了31头非布鲁氏菌感染的牛的31份血清样品的结果(‘FPSRs’,空心圆圈),其中这31头非布鲁氏菌感染的牛在布鲁氏菌疾病的常规血清学诊断检测中呈假阳性,还示出了20头随机选择的未感染的牛的20份血清的结果(‘Rand Non-In’,叉);以及

[0139] 图16示出了当应用于RBT抗原时氧化试剂(偏高碘酸钠[SMP])消耗的结果;该图示出了已知SMP浓度(x轴)相对于405nm(y轴)的光密度(OD)的标准曲线,其中各个数据点显示为黑色叉,以及在x轴的右边示出的氧化过程开始后的不同点处所提取的氧化试剂的OD值(细胞培育)。

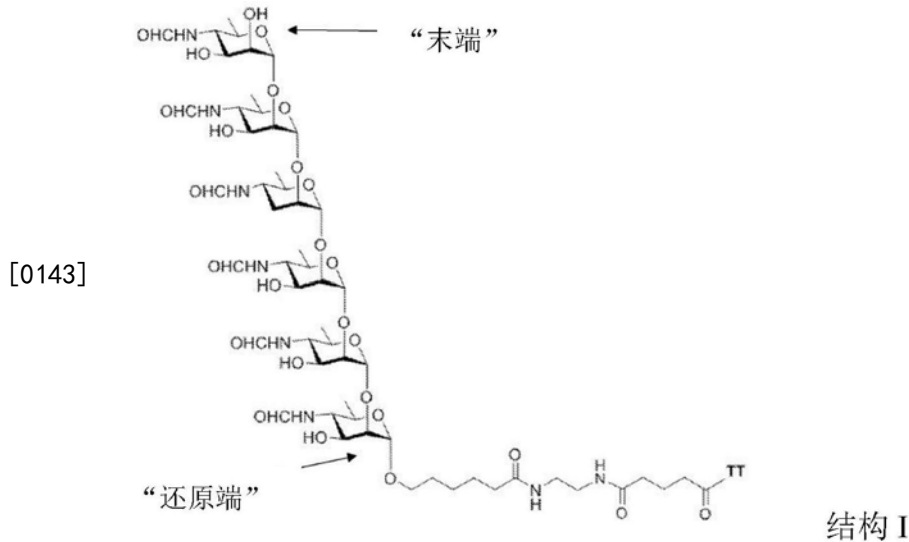
具体实施方式

[0140] 实施例1:开发可能的候选疫苗的初步工作

[0141] W02014/170681和(Ganesh等人(2014) Journal of the American Chemical

Society 136:16260-16269) 和 (McGiven等人 (2015) Journal of Clinical Microbiology 53:1204-1210) 中公开的内容表明可以开发由仅C₁-C₂键连接的4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖单元链形成的疫苗。这是因为观察到这些公开专利中描述的较短的寡糖(例如二糖或四糖)不太可能与由仅C₁-C₂连接的多糖所诱导的抗体结合,所述寡糖含有单个C₁-C₃键和有限数量C₁-C₂键。有人提出,具有C₁-C₂连接的多糖的疫苗然后能够区分感染具有OPS的生物体的动物,其中OPS中存在C₁-C₃键。

[0142] 因此,进行初始实验,其中通过二琥珀酰亚胺戊二酸(DSG)接头(结构I),用与破伤风类毒素缀合的C₁-C₂连接的六糖使小鼠免疫。结构I被称为“TT-dsg-1,2hexa”。



[0144] 由于缺乏C₁-C₃键,预期这些构建体仅产生针对A和C/Y表位的抗体,但不产生针对M表位的抗体。

[0145] 用TT-sq-1,2hexa和TT-dsg-1,2hexa免疫小鼠后,针对BSA-缀合的1,2-六糖(结构IX)测试动物的血清,并且如所预期的,显示出良好的反应。还针对来自布鲁氏菌abortus、布鲁氏菌melitensis和小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9的脂多糖(LPS)的天然细菌抗原测试了血清,并且再次观察到了良好的反应。

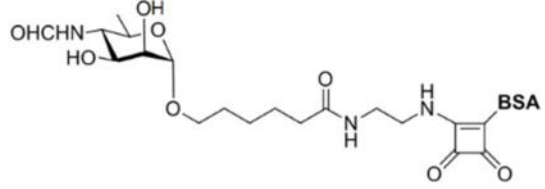
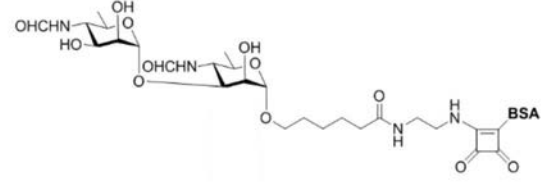
[0146] 然后用如前所述的各种合成寡糖缀合抗原测试血清,这些抗原如下表2中的结构II,III,IV,V,VI,VII和IX所示(其中,在第三列中,“S”表示4,6)-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃糖单元,S₂S表示由C₁-C₂和S₃S连接的相邻单元,S₃S表示由C₁-C₃连接的相邻单元。

[0147] 令人惊讶的是,发现尽管免疫抗原中不存在C₁-C₃键,但免疫的血清依然识别包括C₁-C₃糖苷键的抗原(图1)。

[0148] 对甚至单糖抗原(结构II)的意外抗体反应使发明人得出结论,最初提出的DIVA疫苗的开发将失败,因为任何寡糖,无论C₁-C₃键存在与否,至少会诱发这种反应。

[0149] 表2:合成的寡糖BSA缀合物

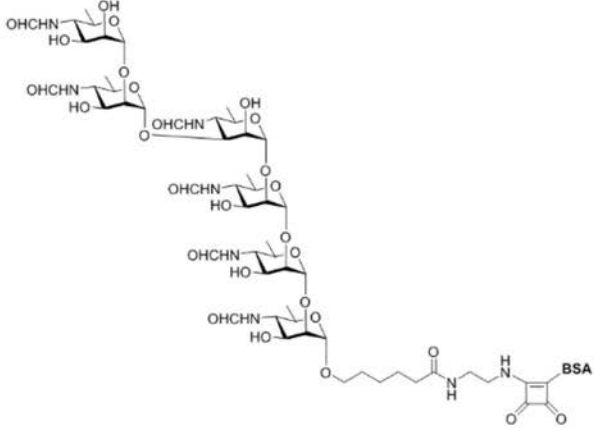
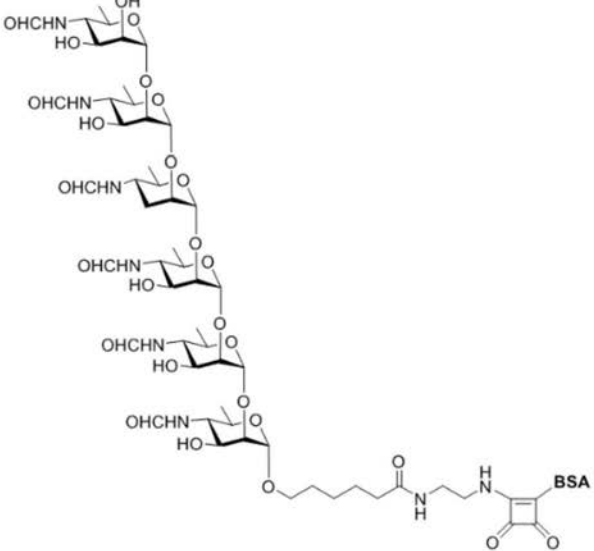
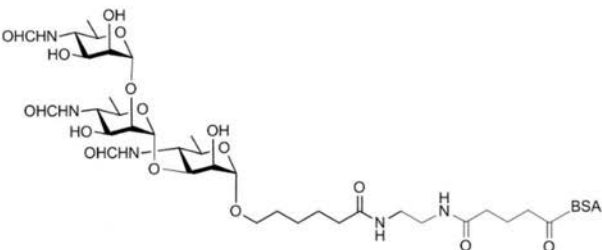
[0150]

	结构数	糖/键的形式	结构
单糖	II	S	
二糖 (C ₁ -C ₃ 连接的)	III	S3S	

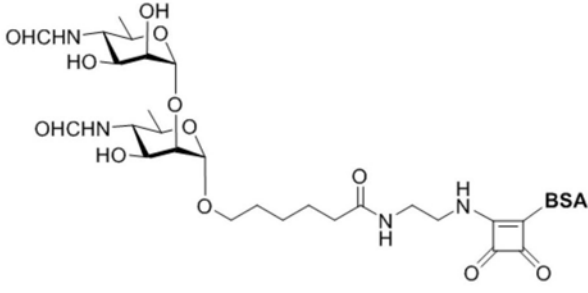
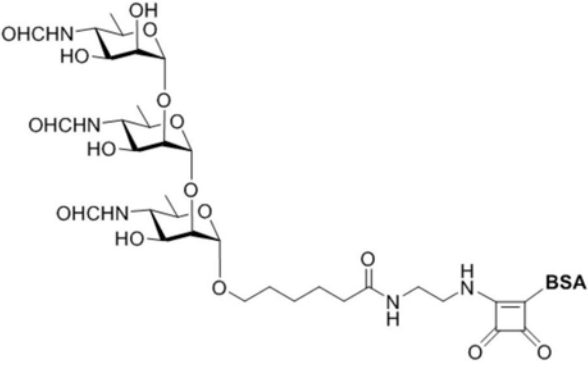
[0151]

	结构数	糖/键的形式	结构
三糖	IV	S2S3S	
三糖	V	S3S2S	
四糖	VI	S2S3S2S	
五糖	VII	S2S3S2S2S	

[0152]

	结构数	糖/键的形式	结构
六糖	VIII	S2S3S2S2S2S	
六糖	IX	S2S2S2S2S2S	
三糖 (DSG 连接的)	X	S2S3S	

[0153]

	结构数	糖/键的形式	结构
二糖 (C ₁ -C ₂ 连接的)	XI	S2S	
三糖 (仅 C ₁ -C ₂ 连接的)	XII	S2S2S	

[0154] 用于实施例1的方法

[0155] 动物:使用6-8周龄的雌性CD1小鼠(Charles River,Canada)研究免疫应答。有关动物的所有操作和实验均使用由阿尔伯塔大学生物科学学院动物护理委员会批准的方案进行。该协议根据加拿大动物保护协会(CCAC)指南获得批准。

[0156] 抗原:按照如前所述(Ganesh等人(2014) Journal of the American Chemical Society 136:16260-16269)或于以下附录中产生所有合成的寡糖抗原。对于动物实验,使用dsg-接头(二琥珀酰亚胺基戊二酸酯)将通过1,2糖苷键连接的perosamine的6个单元的六糖与破伤风类毒素(TT)缀合,以形成具有上述结构I(也称为“TT-dsg-1,2hexa”)的分子。用还原端胺封端的接头合成六糖(Ganesh等人(2014) Journal of the American Chemical Society 136:16260-16269)。将DMF和0.1M PBS缓冲液(4:1,0.5mL)中的六糖和DSG(15当量)混合物在室温下搅拌6小时。真空浓缩反应混合物,用EtOAc洗涤残余物10次,以除去过量的DSG。将所得固体真空干燥1小时,得到DSG活化的寡糖。向0.5M硼酸盐缓冲液(pH9)中的破伤风类毒素(0.025 μ mol)溶液中加入活化的六糖(0.518 μ mol),并在21 $^{\circ}$ C下缓慢搅拌活化的六糖(0.518 μ mol)3天。然后用PBS缓冲液洗涤反应混合物,通过微孔过滤管(10,000MWC0, 4 \times 10mL)过滤反应混合物,将得到的破伤风类毒素-缀合物储存在PBS缓冲液中。MALDI-TOF质谱分析表明缀合物在每个破伤风类毒素中平均具有11.7个六糖。

[0157] 为了通过ELISA筛选免疫应答,使用如前所述(例如,W02014/170681 squarate化

学 (Ganesh等人 (2014) *Journal of the American Chemical Society* 136:16260-16269) 将相同的六糖与不同的载体蛋白 (即牛血清白蛋白 (BSA)) 缀合, 以形成结构IX。另外, 还使用不同的合成寡糖 (表1中的结构II-VI和结构VIII) 筛选免疫应答。还使用来自布鲁氏菌 (*Brucella abortus*)、布鲁氏菌 (*Brucella melitensis*) 和小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 的不同天然sLPS。

[0158] 疫苗制剂: 在免疫初期通过公布的方案 (Lipinski等人 (2012) *Vaccine* 30:6263-6269) 新鲜制备明矾。简而言之, 分开制备0.2摩尔的 $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ 溶液和1.0摩尔的(碳酸氢钠) $NaHCO_3$ 溶液并对其进行过滤灭菌。然后在剧烈摇动下将10mL第二溶液(碳酸氢盐溶液)快速加入到20mL第一溶液中。为了避免由于泡腾引起的任何材料损失, 在200mL烧杯中进行混合的步骤。将得到的明矾沉淀物用PBS洗涤 (其先前已经过滤并通过高压灭菌器灭菌) 并在4000g下旋转7分钟。继续该洗涤循环直至上清液的pH与PBS (pH 7.3) 相同。最后, 将浓度为50mg/mL的明矾悬浮在PBS中, 加入硫柳汞 (0.01% w/v) 并将混合物储存在4°C。

[0159] 将明矾与TT-缀合物以5:1的重量比混合, 并使混合物摇动过夜, 然后施用于动物。

[0160] 免疫: 每21天就对动物继续免疫, 总免疫次数为3次。在每只小鼠上注射包含12 μ g TT-dsg-1, 2hexa (相当于1 μ g的1, 2-六糖) 的总体积250 μ l, 其中腹膜内注射150 μ l, 皮下注射剩余的100 μ l。在免疫开始前收集预先的血。最后一次注射后第10天对动物实施安乐死, 并收集最终的血。

[0161] 血清处理: 收集后, 将鼠血液在37°C下温育1小时, 然后以1500g离心10分钟。收集顶部的透明血清并将其储存在-20°C以供使用。

[0162] 免疫测定: 使用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 研究鼠血清中的抗体水平。遵循公开的方案 (Bundle等人 (2014) *Bioconjugate Chemistry* 25:685-697), 几乎没有修改。简而言之, 将聚苯乙烯微量滴定板与包被抗原 (1 μ g/mL, 100 μ L/孔) 在4°C的温度下温育过夜, 然后用PBST (0.05%吐温-20在磷酸盐缓冲盐水, PBS中) 洗涤 (5次)。然后将鼠血清以连续的 $\sqrt{10}$ 倍稀释液 (100 μ L/孔) 加入到包被的孔中。血清的起始稀释度为1:100。在室温下孵育2小时后, 用PBST洗涤板 (5次)。然后将板与100 μ L/孔的1:5000稀释的山羊抗小鼠IgG抗体一起在室温下温育30分钟, 其中所述山羊抗小鼠IgG抗体用HRP0 (KPL, 1.0mg/mL储备液) 进行标记, 然后用PBST洗涤 (5次)。加入过氧化物酶底物、3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB) 和 H_2O_2 。15分钟后, 通过加入磷酸 (1M, 100 μ L/孔) 淬灭反应。在450nm处读板, 并使用Origin软件处理数据。PBST中的0.1% BSA用于稀释所有血清。记录终点稀释度 (x_0) 作为血清稀释度, 得到高于背景的吸光度0.2, 并计算血清滴度作为 x_0 的倒数。使用Origin 9和GraphPad Prism软件处理所有数据。

[0163] 实施例2: 4, 6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃糖链的非还原端处的可能的表位的研究

[0164] 由于本发明人观察到针对结构I产生的抗体与甚至单糖抗原 (结构II) 的结合, 因此怀疑末端糖提供了抗体结合的表位 (在本文中称为“末端表位”)。为了研究单个perosamine (4, 6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖) 的结合潜力是否依赖于仅末端perosamine所具有的特定结构特征 (例如, 位于 C_2 和 C_3 上的羟基), 如下表3所述, 制备在非还原端包含“帽”结构的各种合成寡糖。如上所述, 使用方酸盐化学将一些寡糖与BSA连接, 通过DSG将一些寡糖与BSA连接。

[0165] 表3:进一步合成的寡糖BSA缀合物,在末端perosamine上提供“帽”结构

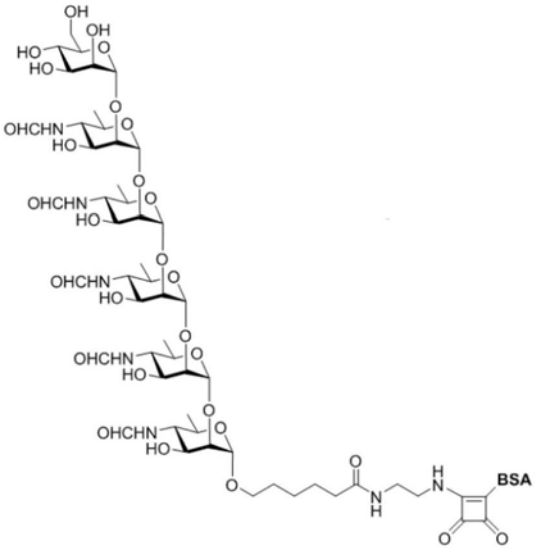
[0166]

	<u>结构</u> <u>数</u>	<u>糖/键的形</u> <u>式</u>	<u>结构</u>
--	-----------------------	--------------------------	-----------

[0167]

	结构数	糖/键的形式	结构
甘露糖连接 的单糖	XIII	S	
甘露糖连接 的三糖	XIV	S3S2S	
甲氧基修饰 的二糖	XV	S3S	
二甲氧基修 饰的二糖	XVI	S3S	
甲氧基修饰 的三糖	XVII	S2S3S	

[0168]

	结构数	糖/键的形式	结构
甘露糖连接的多糖	XVIII	S2S2S2S2S	

[0169] 用选择的上述结构测试野外感染牛的血清(图2)。这表明修饰糖链的非还原端确实对寡糖抗原的血清学反应性有影响。寡糖越短,影响越大,这表明随着线性表位变得更长,失去末端表位对抗体结合的影响成比例地降低。

[0170] 图2中的“阳性”数据点代表受感染动物的6份血清样品的平均结果,这些样品对常规血清学测定呈阳性。“阴性”数据点代表在这些测定中呈阴性的2个血清样品的平均结果。在阳性样品中,1/100血清稀释度下单糖(结构II)抗原的平均结果约为60%。改性单糖(结构XIII)的当量结果约为5%。滴度的降低至少为64倍,并且当使用改性的单硬脂胺(StructureXIII)时,阴性和阳性血清之间没有差异。相反,当使用未改性的单硬脂胺(结构II)时,观察到差异。因此,似乎没有与结构II结合的抗体可以结合改性形式,StructureXIII。本发明人的结论是,这些样品中的抗布鲁氏菌OPS抗体谱包括结合到单个4,6-二脱氧-4-甲酰- α -D-吡喃甘露糖单元的抗体,但这种结合只有在糖单元是唯一可能的末端位置时才可能实现。一旦4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖不再作为末端糖单元可用,而仅在线性排列中,这些抗体结合的能力受到严重阻碍。

[0171] 尽管修饰的(结构XIV)和未修饰的(结构V)抗原之间的对比度不是那么大(滴度降低4-8倍),但评估三糖时仍出现了类似的图片。据推测,较低的对比度反映了结构XIV内三糖充当线性抗原的能力有所提高。在评估1-2个六糖(结构IX)和修饰的1-2个五糖(结构XVIII)时也观察到了这种模式。

[0172] 基于该证据,发明人得出结论,存在显著的抗OPS抗体子集,其中与短寡糖结合的抗OPS抗体抗原受到末端4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖单元的显著影响。

[0173] 使用感染了B.abortus的牛的血清进行类似的实验,使用通过OMe基团取代末

端perosamine上的C₂-OH(羟基)基团而修饰的各种寡糖抗原。下表4总结了总结结果。

[0174] 下表5显示了合成抗原应用于感染了B.abortus (n=20)，“受感染”样品和未感染牛 (n=20) “未感染”样品的血清的血清学数据。甘露糖连接的单糖 (结构XIII) 和甘露糖连接的三糖 (结构XIV) 抗原具有差的诊断特性 (低AUC[剂量反应曲线]值)，因为它们无效地区分“受感染”和“未感染”样品。结构XIII特别差，与未修饰的 (即未封端的) 单糖 (结构II) 的显著且完全出乎意料的诊断属性相反。

[0175] 表4:B.abortus感染牛的6份血清样品的结果

抗原	强阳性	弱阳性	阴性
单糖 squarate (结构 II)	6	0	0
1-3 二糖 squarate (结构 III)	6	0	0
t1-2 三糖 squarate (结构 IV)	6	0	0
t1-2 三糖 dsg (结构 X)	6	0	0
t1-3 三糖 squarate (结构 V)	6	0	0
仅 1-2 六糖 squarate (结构 IX)	6	0	0

抗原	强阳性	弱阳性	阴性
甘露糖连接的 1-2 多糖 squarate (结构 XVIII)	5	1	0
甘露糖连接的 t1-3 三糖 squarate(结构 XIV)	2	2	2
OMe-修饰的 t1-2 三糖 dsg (结构 XVII)	2	2	2
OMe-修饰的 1-3 二糖 dsg (结构 XV)	1	2	3
甘露糖连接的单糖 squarate(结构 XIII)	0	1 (极弱)	5

[0178] 基于表5中所示的结果，发明人得出结论，即使将单个OMe基团包含在末端单糖的C₂中也足以消除大部分抗体反应。这支持了以下概念，即末端的4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-

α -D-吡喃甘露糖在抗体识别方面是一种特定的结构,这种特定的结构与4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖单位的线性聚合物不同。

[0179] 表5:对B.abortus呈阳性的动物培养物的样品和随机的野外的未感染的样品的诊断性能属性(具有DSn,DSp和AUC的YI_{max})

[0180]

抗原	YI _{max}	DSn	DSp	AUC
甘露糖连接的单糖(结构XIII)	26.16	75	51.16	0.5558
甘露糖连接的三糖(结构XIV)	53.02	60	93.02	0.7733
甘露糖连接的多糖(结构XVIII)	78.72	95	83.72	0.9605
单糖(结构II)	83.02	90	93.02	0.9663
六糖(结构IX)	95	95	100	0.9942
多糖(结构VII)	100	100	100	1.00
无糖(以下结构XIX)	100	100	100	1.00
二糖(结构III)	100	100	100	1.00
四糖(结构VI)	100	100	100	1.00

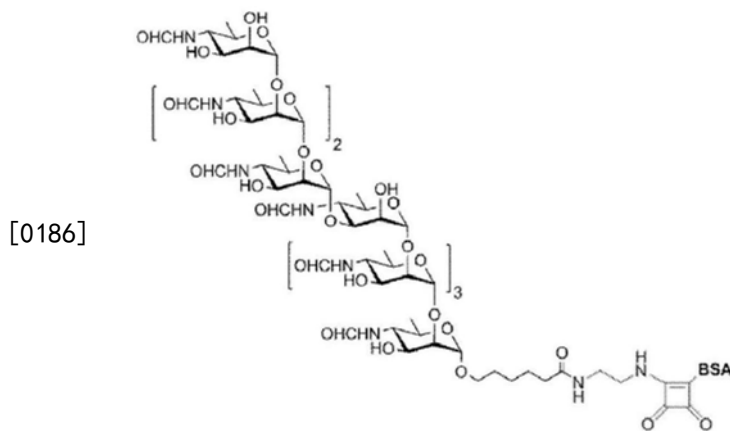
[0181] (DSn=诊断灵敏度(%);DSP=诊断特异性(%);AUC=(ROC)曲线下的面积;ROC=接收者操作员特征;YI=Youden指数(DSn+DSp-100);YI_{max}=最大YI值,该值可以通过+/-截止值的变化来实现。)

[0182] 因此,发明人提出,受感染动物血清的修饰寡糖的反应可能类似于用不具有尖端表位(即,没有末端4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -d吡喃甘露糖)的抗原免疫的动物血清中未修饰的寡糖的反应。在第一种情况下,只有抗线性抗体会结合,反应会很低(短寡糖很低)。在第二种情况下,抗尖端抗体不会结合,因此,观察到的唯一反应可能是来自抗线性抗体。这些抗体对短寡糖的反应也很低。

[0183] 用于实施例2的方法

[0184] 抗原:如上所述,使用dsg-接头(二琥珀酰亚胺基戊二酸酯)或使用squarate化学,将perosamine的寡糖与破伤风类毒素(TT)缀合。

[0185] 牛血清学研究:如前所述(McGiven等人(2015)Journal of Clinical Microbiology 53:1204-1210),使用酶联免疫吸附测定(ELISA)研究牛血清中的抗体水平。



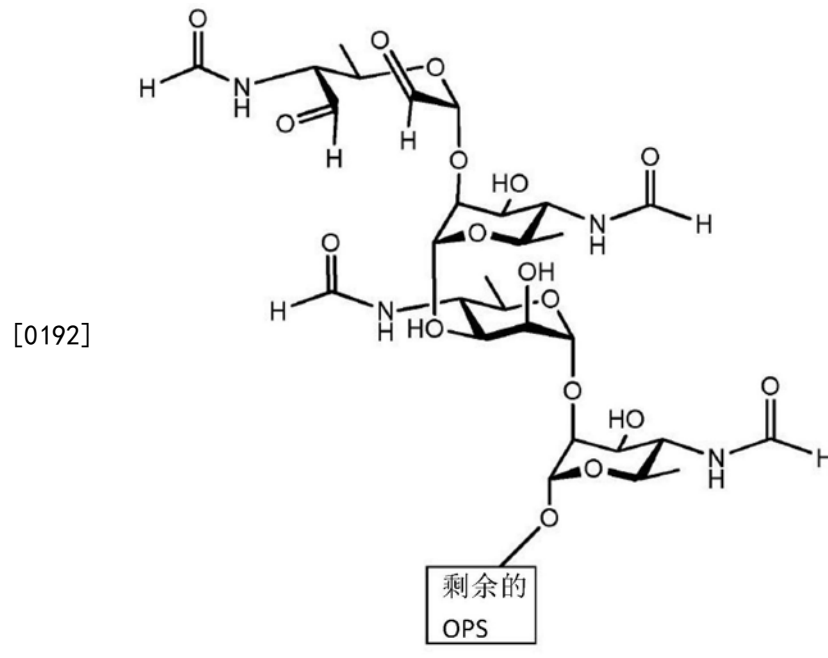
[0187] 实施例3:OPS末端糖的氧化以破坏末端表位

[0188] 发明人改编了Stefanetti等人的公开内容(Stefanetti等人(2014) Vaccine 32: 6122-6129)以破坏布鲁氏菌OPS中末端糖的结构。这些工人将鼠伤寒沙门氏菌的OPS用偏高碘酸钠进行温和氧化。氧化打开了鼠李糖环以产生醛,然后通过还原胺化将醛与CRM₁₉₇(遗传上解毒的白喉毒素)上的胺缀合。该方法中的鼠李糖是内糖,而不是末端糖。因此,氧化是可能的,因为聚合物通过C₁和C₄连接,因此C₂和C₃上的顺式连位羟基可用于氧化。在布鲁氏菌的情况下,perosamines具有D-鼠李糖框架(如D-甘露糖,但在C₆上缺少OH)但是,因为布鲁氏菌OPS中的每个非末端鼠李糖通过C₂或C₃与其末端邻居连接,所以只有在C₂和C₃上具有顺式连位羟基的鼠李糖才是末端。

[0189] 因此,在布鲁氏菌OPS上使用的类似的方法可用于产生如下所示的末端结构(结构XX)。

[0190] 用于实施例3的方法

[0191] 通过热酚提取纯化布鲁氏菌OPS(来自B.abortus S99和B.suis biovar 2[菌株Thomsen])(Westphal等人(1952) Uber die Extraction von Bakterien mit Phenol/Wasser.Z.Naturforsch.7:148-155),接着对其进行弱酸水解和尺寸排阻色谱(Meikle等人(1989) Infect Immun 57:2820-2828)。用于TT缀合的OPS在10mM偏高碘酸钠(SMP)和50mM乙酸钠缓冲液(pH5.5)中以2mg/ml浓度在黑暗中氧化1个小时。这足以氧化末端糖的第2和第3个碳上的连位二醇羟基。根据制造商的说明书(GE Healthcare),使用PD-10柱(Sephadex-G25柱)通过脱盐除去残留的SMP。适当体积的洗脱缓冲液允许OPS流过。



[0193] 实施例4:用加帽的六糖接种

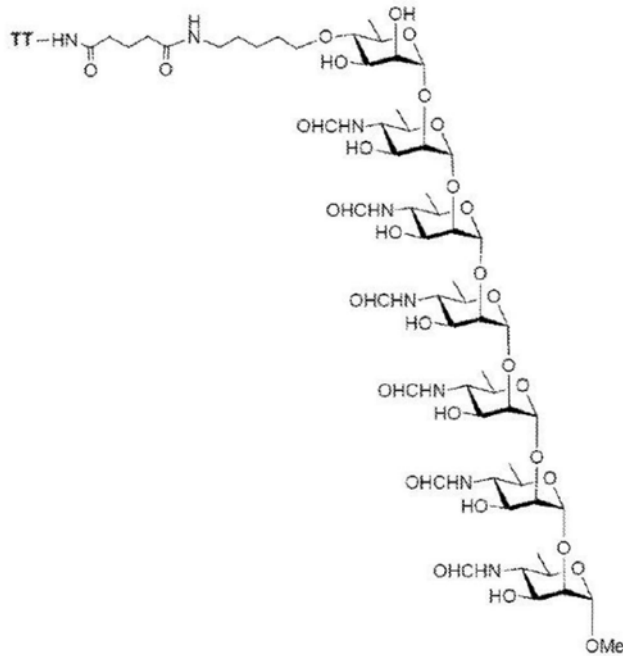
[0194] 鉴于尖端表位在抗体产生中的明显重要性,制备了通过糖链的非还原末端与TT连接的七糖(TT-dsg-1,2-hepta(非红色))(结构XXI)。这种缀合方法破坏了尖端表位,因为没有末端4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖可用。结构为下面的结构XXI。

[0195] 因此,这是一种封端了一种结构的多聚己糖,这种结构不是4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-D-吡喃甘露糖。

[0196] 使用该缀合物免疫小鼠,并通过iELISA针对各种抗原评估血清。图3显示了结果。

TT-dsg-1,2hexa (结构I) 接种的动物的实施例1的比较结果在图1中示出。这表明用尖端表位破坏了的结构XXI进行接种产生具有显著降低的结合亲和力的抗体,这种抗体是用于提出的诊断性结合抗原(二糖和四糖,分别为结构III和VI)。然而,仍然存在就二糖和四糖抗原所引起的反应,表明TT-dsg-1,2-七(非红色)(结构XXI)也不适合用作DIVA测试系统内的疫苗。

[0197]



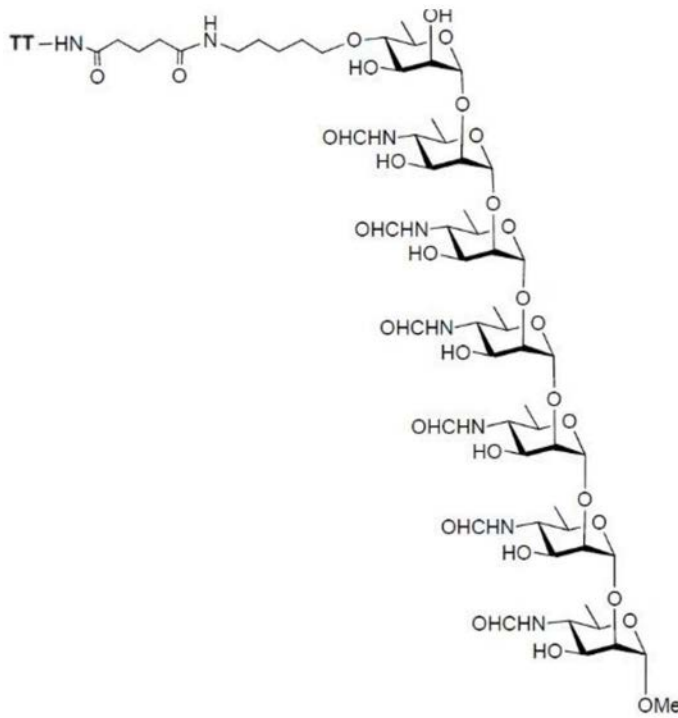
结构 XX1

[0198] 用于实施例4的方法

[0199] 动物;疫苗配方;免疫;血清处理;免疫测定:全部同实施例1中所述的内容一致

[0200] 抗原:根据前述方法 (Eis&Ganem (1988) Carbohydrate Research 176:316-323) 制备4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖六糖。

[0201] 为了通过ELISA筛选免疫应答,如前所述(例如,W02014/170681),将相同的七糖与牛血清白蛋白(BSA)缀合。得到的七糖(实际上是“封端的”六糖)具有以下结构:



[0202]

结构 XXII

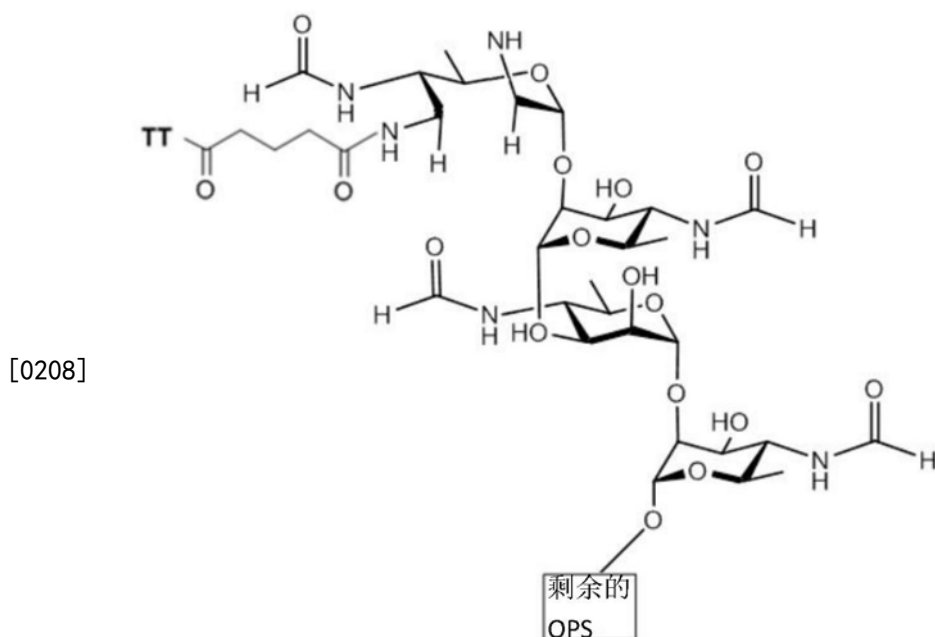
[0203] 可以在下文附录中找到用于制备TT-dsg-1,2-hepta (非红色) (结构XXI) 和BSA-dsg-1,2-hepta (非红色) (结构XXII) 的进一步合成和缀合方法。

[0204] 此外,还使用不同的合成寡糖(结构III,VI和IX)以及来自*B. abortus*和小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9的不同天然细菌细胞壁抗原筛选免疫应答:

[0205] 实施例5:用尖端缀合的多糖进行疫苗接种

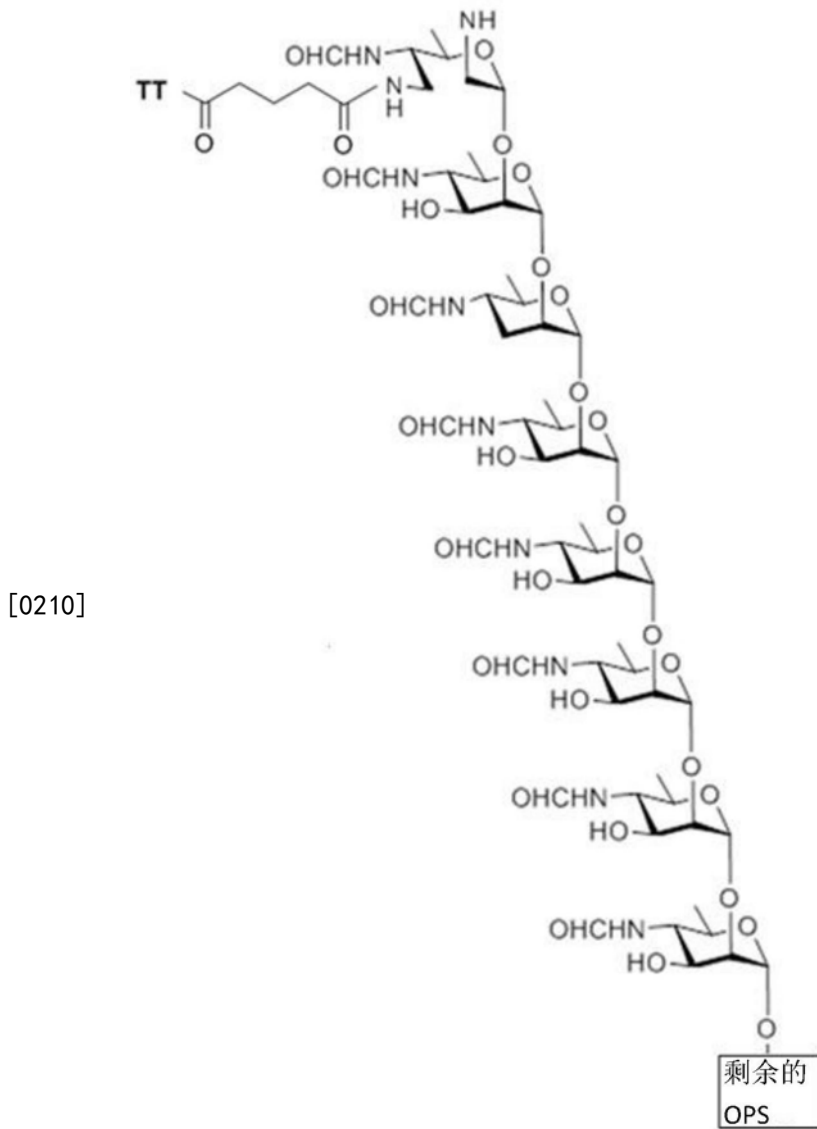
[0206] 本发明人接下来尝试使用通过非还原尖端与蛋白质载体缀合的更长的多糖进行疫苗接种,以进一步尝试获得可在DIVA测试系统内使用的疫苗。目的是获得一种疫苗分子,该疫苗分子将产生不会与所提出的诊断性结合抗原(分别为二糖和四糖,结构III和VI)结合的抗体。如W02014/170681中所述,这些抗原已经可用于区分感染布鲁氏菌的动物和未感染或感染了小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9的动物(或具有缺乏 α 1,3糖苷键的OPS的布鲁氏菌菌株)。

[0207] 如下所述,用来自*B. abortus* S99(其具有约2% α 1,3键)的OPS和来自*B. suis* bv 2strain Thomsen(仅具有 α 1,2连接多糖的菌株)的OPS免疫小鼠,这两种OPS均通过末端糖与TT缀合。因此,*B. abortus* S99衍生的结构是通过C₃实现与TT的缀合的下面的结构XXIII,或通过C₂或通过C₂和C₃实现与TT的缀合的相关结构。



结构 XXIII

[0209] B.suis bv 2-衍生的结构是以下结构XXIV。同样,在通过C₃实现的与TT的缀合的结构XXIV中,但是suis bv 2-衍生的结构可以是相关结构,其中通过C₂或通过C₂和C₃实现与TT的缀合。



结构 XXIV

[0211] 然后针对来自*B.abortus* S99、*B.melitensis* 16M菌株(约20% α 1,3链)的脂多糖(LPS)的细菌抗原,来自*B.abortus* S99、*B.melitensis* 16M和*B.suis* biovar 2的全细胞抗原,以及破伤风类毒素测试动物的最终出血血清。结果显示在图4中。还针对具有结构IX(“1,2-六糖”)、结构VIII(“1,3-六糖”)、结构VI(“四糖”)、结构XII(“仅1,2连接的三糖”)和结构III(“二糖”)的合成抗原测试血清。

[0212] 三糖(结构XII)包括在分析中,以便与仅1,2连接的六糖(结构IX)一起,可以评估仅1,2连接的寡糖的长度如何影响抗体的结合,所述抗体由具有结构XXIII和XXIV的糖缀合物免疫原诱导。当血清以1/100稀释度测试时,没有出现对三糖的反应(结构XII)。结果显示六糖(结构IX)和三糖(结构XIII)之间的平均滴度至少有十倍的差异。考虑到仅1,2-连接的三糖抗原被认为是抗C/Y抗体表位(表1)并且认为这些抗体可能是那些负责观察到布鲁氏菌抗原的A-显性(例如*B.abortus* S99)和M-显性(例如,*B.melitenis* 16M)血清型之间的交叉反应的抗体,这种差异的幅度大于预期值。

[0213] 为了证明抗原能够检测由布鲁氏菌感染诱导的抗体,针对来自天然和实验感染的

动物的血清评估这些三糖(结构XIII)和六糖抗原(结构IX)。当针对来自12头天然的非布鲁氏菌感染的牛和4头非布鲁氏菌感染的牛的血清测试三糖(结构XIII)和六糖抗原(结构IX)时,这两种抗原的ELISA结果显示在图6中。这表明两种抗原都能够检测来自受感染动物的所有血清,没有对来自未感染动物的血清的反应,表明它们可用作DIVA抗原。此外,它表明两种抗原之间的结果差异非常小;六糖(结构IX)的平均结果为138.6%,而三糖(结构XIII)的平均结果为125.9%。该图还显示了单糖(112.2%)(结构II)的结果。这些结果的大小是出乎意料的。

[0214] 结构XXIII和XXIV小鼠免疫的结果表明,抗线性表位抗体不是与短的仅1,2-连接的抗原结合的主要类型,抗尖端表位抗体才是与之连接的主要类型。在此评估之前,认为这些结构诱导的抗体不与含有1,3链的较短寡糖结合的主要原因是1,3链阻止针对1,2链的线性序列的抗体结合;人们认为尖端表位起着重要但较小的作用。现在用仅1,2连接的三糖产生的数据表明,尖端表位在血清学诊断中的作用要比之前想象的重要得多。

[0215] 还针对来自实验感染*B. abortus*菌株544(A-显性菌株)的4头牛的血清测试了仅1,2种连接的抗原中的两种抗原(结构VIII和XII,分别为六糖和三糖);在感染后第3,7,16,24和53周采集样品。这些样品的平均滴度如图7所示。对于五个采样日期中的四个采样周期,三糖的平均结果高于六糖的平均结果,而另一个日期的结果则非常接近。这些结果表明,当仅1,2连接的三糖和六糖抗原应用于采集自实验性和天然布鲁氏菌感染的牛的血清时,其具有非常相似且非常好的灵敏度。因此,在将两种抗原应用到用结构XXIII免疫的小鼠血清中时,在所述两种抗原中观察到的差异至少为10倍,这很可能是这种免疫诱导的抗体的性质所导致的,而不是由这两种抗原(因为这些抗原是等量的)之间的诊断灵敏度的内在差异所导致的。通过修饰过程在OPS中包含帽结构,防止形成OPS的尖端表位的抗体。因此,仅产生针对线性表位的抗体;六糖抗原的长度越长,能够结合的抗体就越多,但是三糖抗原的长度越短,能够结合的抗体不会变少。这些结果支持以下结论:仅1,2-连接的三糖抗原的大部分灵敏度取决于感染期间检测到产生的抗尖端表位抗体。这些差异使得仅1,2连接的三糖(结构XII)成为有效的DIVA诊断抗原。

[0216] 出于同样的原因,仅1,2连接的二糖(结构XI)抗原也是有效的DIVA诊断。显然它不会结合由包含本文所述的帽结构的分子诱导的抗体,例如结构XXIII和XXIV。图6和表5(DSn=90%,DSP=93.02%)中单糖(结构II)所示的诊断数据支持上述结论。这表明即使这种小抗原也具有出乎意料的高诊断灵敏度和特异性。

[0217] 通过进一步证明其作为DIVA抗原的效用,使用仅1,2连接的三糖抗原(结构XII)来检测感染了*B. suis* biovar 2的17头猪的血清中的抗布鲁氏菌OPS抗体和检测没有感染布鲁氏菌的12头猪的血清中的抗布鲁氏菌OPS抗体。还用特异性M-抗原四糖(结构VI)和仅1,2-连接的三糖缀合物(结构XII)的相等混合物(按缀合物诊断抗原的重量)测试这些样品。这些结果通过图8中的散点图示出。这表明三糖(结构XII)检测了来自17头受感染猪的所有样品,并且显示对来自12头未感染猪的任何样品没有反应。混合抗原制剂显示几乎相同的结果。因为biovar 2 OPS不含1,3链(Zacchus等人(2015)PLoS One 8,e53941),所以针对biovar 2 OPS的抗体不会与特定的M-抗原寡糖缀合物,例如四糖(结构VI)和二糖(结构III)很好地结合。然而,这些抗体确实与仅1,2连接的三糖(结构XII)结合良好;当仅1,2连接的三糖(结构XII)单独使用或与四糖组合使用时(结构VI),就是这种情况。这些结果表

明,本文所述的DIVA疫苗和诊断概念也可用于*B. suis* (包括*B. suis* biovar 2的感染)感染。

[0218] 由此可以看出,通过非还原末端与载体蛋白缀合的OPS接种疫苗提高了抗体结合细菌sLPS抗原,结合全布鲁氏菌细胞,结合仅 α 1,2六糖抗原(结构IX)以及结合通用抗原(例如如W02014/170681中所述的;结构VIII)的能力;然而,并没有观察到结合至较短的抗原(结构III,IV,V,VI和XII)。

[0219] 将该实施例的结果与实施例4的结果进行比较,对于提供的DIVA疫苗,发明人得出结论,需要至少七个4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖单元的较长聚合物。具有结构III,IV,VI和XII的短抗原结构未检测到针对这种缺乏末端尖端表位(由于通过聚合物的非还原端与疫苗载体蛋白缀合而被破坏的)的多糖的抗体,因此这些结构可用作DIVA剂,以区分已经用修饰多糖进行疫苗接种的动物和已经感染了布鲁氏菌的动物。

[0220] 用于实施例5的方法

[0221] 氧化和TT-缀合的OPS的制备:

[0222] 通过热酚提取纯化布鲁氏菌OPS (Westphal等人(1952) *Z. Naturforsch.* 7:148-155),接着对其进行温和酸水解和尺寸排阻色谱(Meikle等人(1989) *Infect Immun* 57:2820-2828)。用于TT缀合的OPS在10mM偏高碘酸钠(SMP)和50mM乙酸钠缓冲液(pH5.5)中以2mg/ml浓度在黑暗中氧化1个小时。这足以氧化末端糖的第2和第3个碳上的连位二醇羟基。根据制造商的说明书(GE Healthcare),使用PD-10柱(Sephadex-G25柱)通过脱盐除去残留的SMP。适当体积的洗脱缓冲液允许OPS流过。

[0223] 然后将氧化的OPS进行还原胺化。以最终浓度5mg/ml OPS将氧化的OPS在PBS中和0.5M氯化铵和0.1M氰基硼氢化钠中在37°C的温度下温育24小时,然后用Sephadex G-25柱脱盐,然后冷冻干燥。

[0224] 然后将5mg/ml OPS与5mg/ml DSG在PBS中在旋转振荡器上温育45分钟,然后用Zeba 40kDa柱脱盐至新鲜PBS中。然后将终浓度分别约为2.5和0.5mg/ml的OPS-DSG样品与破伤风类毒素(TT)一起进行温育。在室温下(在黑暗中)在旋转振荡器上进行2小时的温育。然后加入终浓度为2mg/ml的甘氨酸并将甘氨酸再培养15分钟。然后通过SEC-HPLC对样品进行分级以将糖缀合物与未掺入的OPS分离。通过SDS-PAGE银染和Western印迹证实糖缀合物与抗布鲁氏菌抗体的结合。

[0225] 动物和免疫:使用3组8只雌性CD1小鼠,在预出血时小鼠为7周龄。从每只小鼠(来自尾静脉)取出预出血(100 μ l)以制备血清,利用该血清建立针对天然和建议的DIVA抗原的基线抗体滴度。通过间接ELISA测定评估抗体滴度。

[0226] 两天后,用5 μ g指定的糖缀合物抗原免疫小鼠,该指定的糖缀合物悬浮在不含佐剂的生理PBS中。以100 μ l的体积皮下施用剂量。在免疫后19天,通过尾静脉从每只小鼠中取出100 μ l血液样品。再过2天(第1次免疫后21天),用相同的抗原、制剂、剂量、体积和通过与第1次免疫相同的途径第2次免疫小鼠。从第1次免疫开始的33天后,通过尾静脉从小鼠取出100 μ l血液样品。再过2天(第1次免疫后35天),用相同的抗原、制剂、剂量、体积和通过与第1次免疫相同的途径第3次免疫小鼠。在此之后两周(第一次免疫后49天),对小鼠实施安乐死,然后解剖小鼠,以在切割主动脉后从胸腔中提取血液。

[0227] 免疫测定:将平滑的LPS抗原*B. abortus* S99和*B. melitensis* 16M稀释至0.6 μ g/ml,并将TT在碳酸盐缓冲液(Sigma)中稀释为2.5 μ g/ml。将全细胞抗原*B. abortus* S99、

B.melitensis 16M和B.suisbiovar 2(Thomsen)在碳酸盐缓冲液(Sigma)中稀释为15.6 μ g/ml。合成抗原(结构III,VI,VII,VIII)在碳酸盐缓冲液(Sigma)中稀释为2.5 μ g/ml。

[0228] 将每孔100 μ l的每种抗原加入标准结合ELISA板(Nunc)中。将板在4-8 $^{\circ}$ C温育过夜,然后用PBS-Tween洗涤四次,每孔200 μ l,并在吸墨纸上轻拍干燥。

[0229] 在酪蛋白缓冲液中以1/100、1/316.22、1/1000、1/3162.27、1/10000、1/31622.7、1/100000、1/316227、1/1000000和1/3162270稀释对数稀释液中的小鼠血清,且每孔100 μ l加入抗原包被的板中。将单克隆抗体BM40在酪蛋白缓冲液(Sigma)中稀释5 μ g/ml,并加入到每孔100 μ l的板中,作为对照组。还包括阳性血清对照,来自用六糖结构I免疫的小鼠的小鼠血清和来自正常(未免疫)小鼠的阴性血清对照,每孔100 μ l作为对照。

[0230] 将板在室温下,在旋转器上以120rpm温育30分钟,然后用PBS-Tween洗涤四次,每孔200 μ l,并在吸墨纸上轻拍干燥。抗小鼠免疫球蛋白:HRP(Dako)在酪蛋白缓冲液(Sigma)中以1比1000稀释,并向板中加入100 μ l/孔。

[0231] 在室温下,在旋转器上以120rpm的速度针对合成抗原对板温育60分钟,针对sLPS和全细胞对板温育30分钟,然后用PBS-Tween洗涤板四次,每孔200 μ l,并在吸墨纸上轻拍干燥。将具有2,2'-联氨基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)(Sigma)和3%过氧化氢(Sigma)的底物缓冲液(pH4.0)(Fluka)加入板中,每孔100 μ l,并在室温下孵育20分钟。通过0.1M叠氮化钠减慢反应,每孔100 μ l,并在405nm吸光度下读板。数据计算为双孔的空白平均值,作为用二糖结构III测试的BM40对照孔的百分比,因为将其加入每个测试板中。

[0232] 通过减去未加入血清但如上所述另外处理的对照孔的OD来消除每个样品和稀释液的光密度(OD)。然后通过将OD表示为阳性对照的百分比来标准化样品的定量数据。(使用GraphPad Prism 6)计算末端滴度作为稀释度,在该稀释度下信号(表示为阳性对照的百分比)等于阳性/阴性阈值。该阈值计算为预出血样品的平均值加上预出血样品的标准偏差的1.96倍。

[0233] 牛和猪血清中的iELISA:为了进行ELISA,通过将2.5 μ g/ml(混合抗原涂层各1.25 μ g)的寡糖BSA缀合物(结构II,VI,IX,XII)在4 $^{\circ}$ C下在碳酸盐缓冲液中过夜温育,每孔100 μ l,没寡糖BSA缀合物(结构II,VI,IX,XII)被动地固定在标准聚苯乙烯ELISA板的表面上。将板用200 μ l/孔PBST(含有0.05%(v/v)Tween 20的PBS)洗涤4次,轻拍干燥。将血清在缓冲液中稀释1/50(一式两份),每孔加入100 μ l血清。将板在室温下以160rpm温育30分钟,然后如上所述洗涤并轻拍干燥。对于牛血清,使用HRP缀合的小鼠抗牛IgG1缀合物。对于猪血清,使用HRP-缀合的重组蛋白A/G。在血清温育阶段,将缀合物在缓冲液中稀释至工作强度,并温育、洗涤板并将其轻拍干燥。然后将板用ABTS(2,2'-联氨基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐)和过氧化氢底物显影10-15分钟,用0.4mM叠氮化钠终止并在405nm波长处读数。将重复的光密度取平均值,并减去空白OD(仅缓冲液而不是血清)。然后将该值表示为B.abortus感染的牛的常见阳性对照血清样品(用于测试牛血清的)或B.suis感染的猪的阳性对照血清样品(用于测试猪样品)的百分比。在每种情况下,始终采用阴性对照样品以确保数据的质量。

[0234] 使用相同的ELISA方法使用sLPS抗原进行测试。如针对寡糖缀合物所述的那样,将sLPS稀释至工作强度并被动涂覆至标准聚苯乙烯ELISA板。其余步骤按照通寡糖缀合物中所述的那样进行。

[0235] 使用上述抗原通过iELISA评估几个田间血清群。以上描述了具体的样品数量。归类为感染的所有样品均来自动物,这些动物已被确认为感染了组织的B.abortus(牛)或B.suis(猪)的细菌培养物,这些组织来自动物本身(大多数牛样品和所有猪样品),或(使用常规血清学)动物就布鲁氏菌病而言在血清学呈阳性,并且这些动物为已经确认为感染了B.abortus的细菌培养物的动物的成员。从2007年开始,从英国境内收集了非布鲁氏菌感染动物(牛和猪)的随机采集样品。

[0236] 对实验感染了B.abortus和小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9的牛的一组血清评估寡糖BSA缀合物(结构II,VI,IX和XII)、B.abortus sLPS和修饰(即,封端的)B.abortus OPS ELISA。两组4只Holstein/Fresian杂交牛通过眼部途径独立感染B.abortus菌株544(形成单位的109菌落),或通过隔天4次口服感染小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9(形成单位的1012菌落)。然后将两种动物组分开以防止交叉感染。在实验感染之前确认所有牛都没有耶尔森氏菌和布鲁氏菌,并且微生物学研究证实随后的感染已经发生。在感染后3,7,16,24和53周测试每只动物的血清。所有动物程序均按照1986年英国动物(科学程序)法进行。

[0237] 实施例6:使用加帽的OPS作为诊断抗原

[0238] 在牛中进行了一项研究,以评估新的基于OPS的抗原在区分由B.abortus或B.abortus S19疫苗的野生菌株诱导的抗体的潜能。

[0239] 使用标准iELISA方法评估两种基于OPS的抗原。这些是来自B.abortus S99的平滑脂多糖(sLPS)和源自B.abortus S99的纯化OPS的标准制剂,其中所述B.abortus S99已被修饰并缀合至载体以辅助附着于ELISA板表面(cOPS)。这种修饰和结合限制了OPS,即破坏了末端表位。

[0240] 针对以下血清组评估这些抗原(没有动物的多次取样:接种疫苗后45天取20个样品,从通过培养物确认了感染B.abortus野生菌株的畜群中取60个样品。结果如图5所示。此外,应用7个阴性对照和7个阳性对照。使用剂量为 $5-10 \times 10^9$ CFU的B.abortus S19通过结膜途径进行疫苗接种。

[0241] sLPS抗原在区分感染和未感染动物的样品方面最有效。正如可以预料的那样,它也最容易与免疫的动物的血清反应。cOPS抗原也检测到感染畜群的血清。主要发现是cOPS抗原在检测疫苗诱导的抗体时不太敏感,同时保留了由真实感染引起的针对场诱导的抗体的灵敏度。这通过AUC值(其用于区分感染的畜群和免疫的动物的血清)来证明,其cOPS抗原的AUC值为0.8817,sLPS抗原的AUC值为0.6800。这两个AUC值之间存在很大差异($P < 0.01$)。该研究表明,在出现B.abortus S19疫苗接种的地区,加帽的OPS抗原是一种优良的血清学工具。

[0242] 用于实施例6的方法

[0243] 抗原的制备:通过热酚提取纯化来源于B.abortus S99的布鲁氏菌sLPS(Westphal等人(1952)Uber die Extraction von Bakterien mit Phenol/Wasser.Z.Naturforsch.7:148-155)。通过温和的酸水解和尺寸排阻色谱(Meikle等人(1989)Infect Immun 57:2820-2828)从中得到OPS。将OPS在10mM偏高碘酸钠(SMP)和50mM乙酸钠缓冲液(pH5.5)中以2mg/ml浓度在黑暗中氧化1个小时。这足以氧化末端糖的第2和第3个碳上的连位二醇羟基。根据制造商的说明书(GE Healthcare),使用PD-10柱(Sephadex-G25柱)通过脱盐除去残留的SMP。适当体积的洗脱缓冲液允许OPS流过。

[0244] 然后将氧化的OPS进行还原胺化。将氧化的OPS在PBS中以终浓度5mg/ml OPS和0.5M氯化铵和0.1M氰基硼氢化钠在37℃温育24小时,然后用Sephadex G-25柱脱盐,然后冷冻干燥。然后通过旋转振荡器上以5mg/ml与PBS中的5mg/ml DSG温育45分钟来活化OPS,然后用Zeba 40kDa MWC0柱脱盐至新鲜PBS中。将棕榈酸酰肼 (PAH) 在DMSO中溶解至10mg/ml,并将其中的1份加入到PBS中的9份OPS中,最终稀释为4.5mg/ml OPS和1mg/ml PAH。样品在室温下在旋转振荡器上反应2小时,然后通过用Zeba 40kDa MWC0柱脱盐到H₂O中,除去过量的PAH。然后将PAH缀合的OPS冷冻干燥。

[0245] 免疫测定:将sLPS和cOPS在碳酸盐缓冲液 (pH 10) 中分别稀释至0.5μg/ml和5μg/ml。将每孔100μl的每种抗原加入到标准结合ELISA板中。将板在4-8℃温育过夜,然后用洗涤溶液 (0.0014%w/v正磷酸氢二钠和0.1%Tween-20在H₂O中) 洗涤5次并轻拍干燥。

[0246] 将牛血清在含有0.1%吐温-20的PBS中稀释1/50,并将每孔100μl加入到抗原包被的板中。将板在室温下在旋转振荡器上温育1小时,然后如上所述洗涤并轻拍干燥。将蛋白A/G-HRP缀合物在含有0.1%吐温20的PBS中稀释至0.05μg/ml,并向每个孔中加入100μl。然后将板温育,洗涤并如上干燥用于血清温育。底物缓冲液是pH5.5的柠檬酸磷酸二钠。每25ml底物缓冲液加入10mg OPD (邻苯二胺二盐酸盐) 片剂和100μl 3% H₂O₂,每孔加入100μl。将板显影15-30分钟,然后在450nm处读取光密度 (OD)。通过减去仅加入缓冲液 (无血清) 的孔的OD来消除样品和对照组的OD。每个样品的消隐OD表示为共同阳性对照的消隐OD的百分比。

[0247] 疫苗接种研究:根据OIE陆生动物诊断试验和疫苗手册中,OIE (世界动物卫生组织) 对B.abortus S19和B.melitensis Rev1疫苗 (如关于牛布鲁氏菌病 (第2,4,3节) 的2009章节中所述和山羊和绵羊布鲁氏菌病 (第2,7,2节) 的免疫原性测试的要求来测试疫苗制剂的保护功效。如前面对实施例5所述,对小鼠进行免疫,除了在第49天它们受到挑战,即腹膜内递送100μl含有 2×10^5 CFU的B.abortus菌株544 (或B.melitensis菌株16M) 剂量。15天后杀死小鼠。

[0248] 同时评估参考批次的疫苗B.abortu S19和B.melitensis Rev1和阴性 (仅PBS) 对照组,以证明该程序已正确进行,并提供参考点,根据该参考点来评估新的疫苗的保护功效。下面描述通过获得脾脏重量和细菌负荷来量化保护功效的过程。

[0249] 无菌切除每个脾脏,除去脂肪,称重脾脏并将其均质化。或者,可将脾脏冷冻并在-20℃下保持24小时至7周。每个脾脏用玻璃研磨机 (或在stomacher中的足够无菌袋) 中无菌均质化,其重量为PBS的9倍,pH为6.8和同一种稀释剂中制成的每个匀浆的三个连续十倍稀释液 (1/10,1/100和1/1000)。

[0250] 将0.2ml稀释液在琼脂平板中一式四份涂布;将两个平板在10%CO₂气氛中温育 (允许疫苗和攻击菌株的生长),并将另外两个平板在空气中温育 (抑制B.abortus 544依赖于CO₂的攻击菌株的生长),两者都是在37℃下保持5天。

[0251] 在对应于显示少于300CFU的平板的稀释液中对布鲁氏菌的菌落进行计数。当在对应于1/10稀释度的平板中未见菌落时,认为脾脏被五种细菌感染。在下面的变化式后,即 $Y = \log (X/\log X)$,每个脾脏的这些数量的布鲁氏菌首先记录为X并表示为Y。然后计算平均值和标准偏差,其是每组六只小鼠的响应。

[0252] 当以下情况时,对照实验的条件是令人满意的:i) 未接种疫苗的小鼠 (Y的平均值)

的反应至少为4.5;ii)接种了参考S19疫苗的小鼠的反应低于2.5;以及iii)对每批6只小鼠计算的标准偏差低于0.8。

[0253] 实施例7:包含帽结构的完整全细胞诊断抗原(玫瑰红测试)

[0254] 当OPS也附着于其他分子时,可以消除OPS尖端。通过这些附着物,OPS可以形成较大实体的一部分,包括其自然延伸的整个细菌细胞。

[0255] 如本文所述,OPS链中的末端perosamine可以通过温和氧化降解,从而在OPS链的远端产生帽结构。如果反应保持在适当的条件下,则该反应对于作为OPS的末端perosamine的一部分的化学基团是非常特异的。因此,可以在OPS上进行降解(加帽),其中OPS存在于更复杂的分子和组分的组合中,而对非OPS组分没有任何显著或有害影响。因此,即使当OPS处于不纯状态时,也可以从上面的实施例6中所述的加帽OPS中获得诊断益处。

[0256] 使用称为玫瑰红试验(RBT)的诊断性全细胞凝集试验评估该方法。该试验通常用作布鲁氏菌病血清诊断的筛选试验,并且被OIE(世界动物卫生组织)描述为适合于该目的。诊断抗原由B.abortus(菌株S99或S1119-3,生物型1和A-显性)的完整全细胞组成,已经用玫瑰红染色法将这些完整的全细胞染成粉红色,然后将其悬浮在pH 3.65缓冲液(± 0.05)中。当抗原与含有抗布鲁氏菌抗体的测试血清混合时,这种染色极大地有助于凝集的可视化。

[0257] 与所有用于光滑型布鲁氏菌株(其来自物种B.abortus、B.melitensi和B.suis的那些布鲁氏菌)引起的布鲁氏菌病血清诊断的常规诊断试验一样,抗原中的主要诊断分子是OPS,因为这是在感染期间诱导的大多数抗体产生的分子(Ducrottoy等人(2016) *Veterinary Immunology and Immunopathology* 171:81-102)。

[0258] 为了给存在于细胞表面的RBT抗原内的OPS加帽(即,去尖端),通过离心将抗原与测定缓冲液分离并将抗原悬浮在冷(4°C)氧化试剂(在0.1M乙酸钠缓冲液pH5.5中的10mM偏高碘酸钠)。将细胞与这些试剂在黑暗中于4°C温育直至温和氧化反应完成。通过测量偏高碘酸钠随时间的消耗并达到将偏高碘酸钠补充至10mM导致不再进一步消耗的阶段来验证这一点。在这个阶段,认为细胞表面上的所有OPS都已被加盖(即,去尖端)。将细胞离心以将它们与氧化缓冲液分离并重悬于测试缓冲液中用于血清学评估。

[0259] 使用来自感染了B.abortus动物的已知阳性牛样品的稀释系列(在阴性牛血清中):1/2,1/4,1/8,1/16,1/32,1/64和1/128,比较氧化(加帽的)和未氧化的(非加帽的)抗原的分析灵敏度。还测试了用于稀释的阴性血清。结果显示两种抗原(氧化之前和之后)的分析灵敏度相同,观察到凝集至1/64稀释度。对于两者抗原而言,阳性血清和纯阴性血清的1/128稀释度为阴性。

[0260] 为了评估诊断灵敏度,将氧化(加帽的)和未氧化的(未加帽的)抗原应用于感染了非布鲁氏菌的牛的17份血清和感染了B.abortus的牛的17份血清。结果显示,来自感染了布鲁氏菌的牛的所有样品都与两种抗原凝集,而来自未感染的牛的所有样品都不与任一种抗原凝集。在该评估中使用的阳性和阴性对照也给出了两种抗原的正确结果。

[0261] 该研究表明,含有OPS的相对粗抗原可以在温和条件下氧化至完全,并且仍然是有效的血清学诊断抗原。已经表明该反应为OPS提供了帽结构。在该研究的发现中,氧化抗原区分布鲁氏菌感染和未感染动物的样品的能力没有变化。这与实施例6中提供的数据一致,其中氧化(封端/去除)OPS对这些样品类型的诊断属性是优异的。

[0262] 在该实施例中,加帽的OPS降低了对接种了B.abortusS19疫苗的动物的样品的灵敏度。氧化(即加帽)的RBT抗原也表现出这种性质,因此,氧化抗原在区分感染了光滑型布鲁氏菌菌株的动物血清和接种了光滑型布鲁氏菌疫苗(如B.abortus S19和B.melitensis Rev1)的动物血清方面优于非氧化抗原。

[0263] 这种对OPS加帽(去尖端)的方法也可以应用于含有诊断抗原的其他布鲁氏菌OPS,例如用于ELISA的sLPS(其中OPS附着于核心糖,核心糖又附着于脂质A),用于凝集测定(例如血清凝集测定、缓冲板凝集测试和补体固定测试)的其他抗原(全细胞、细胞裂解物或部分)。

[0264] 用于实施例7的方法

[0265] 如OIE手册(OIE 2016布鲁氏菌病章节2.1.4.陆生动物诊断试验和疫苗手册,OIE,巴黎)中所述进行RBT。将测试(和对照)血清加到RBT测试抗原的一侧,每种血清各30 μ l,接触光滑的白色表面。然后将测试(和对照)血清混合在一起以产生直径约2cm的椭圆形或圆形。将该混合物在室温(18-26 $^{\circ}$ C)下轻轻摇动4分钟。4分钟后,观察混合物并且认为任何可见的凝集是阳性的。如上所述,所有测试的样品都是使用这种方法完成的。每次测试都用到阳性血清和阴性对照血清。

[0266] 为了氧化RBT抗原,将一定体积的工作强度抗原以3000g离心以沉淀细胞。除去上清液和测试缓冲液,在除去的过程中将细胞重新悬浮于等体积的冷(+4 $^{\circ}$ C)氧化试剂(在0.1M乙酸钠缓冲液pH5.5中的10mM偏高碘酸钠)中。将细胞在黑暗中温育30分钟,然后如前所述进行离心。除去上清液并用新鲜的氧化试剂替换上清液。该过程再重复四次,因此抗原总共经历了6次30分钟的氧化,每小时补充氧化试剂。第5小时后,如上所述离心细胞,除去上清液并用原始体积的新鲜测试缓冲液替换上清液。补充过程允许反应继续进行而没有限制,这是因为消耗了偏高碘酸钠,并且没有偏离温和氧化条件,该温和氧化条件促进与OPS的末端perosamine上的邻位顺式二醇的特异性反应。

[0267] 通过将100 μ l氧化试剂分配到96孔ELISA板的单独孔中来测量提取的上清液中的偏高碘酸钠含量。然后在每个测试孔中加在pH4.0缓冲液中的100 μ l浓度为0.5mg/ml的ABTS(2,2-连氮双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)。偏高碘酸钠引起了颜色变化,这种颜色变化与该氧化剂浓度成比例。使用ELISA板读数器测量15分钟后的颜色变化,以测量405nm处的光密度。通过参考标准曲线计算测试样品中偏高碘酸钠的摩尔浓度,所述标准曲线通过使用含有已知浓度的偏高碘酸钠的对照孔建立。氧化试剂消耗的结果如图16所示,“A”表示前30分钟后的消耗,“B”表示两个30分钟后的消耗,依此类推。因此,该图显示了已知的偏高碘酸钠浓度相对于光密度(在405nm处的O.D.)和在氧化过程(在右侧)开始的不同点提取的氧化试剂的OD值的标准曲线。可以看出,在30分钟后,大多数偏高碘酸钠已被消耗。第一次补充(2个30分钟)并没有耗尽偏高碘酸钠,只有超过一半的偏高碘酸钠被消耗掉了。第二次补充(3个30分钟)剩余多于一半(约7mM)的偏高碘酸钠。第三次补充(4个30分钟)剩余约8mM浓度的偏高碘酸钠,第四次补充(5个30分钟)和第五次补充(6个30分钟)剩余约9mM的偏高碘酸钠。

[0268] 从该数据可以清楚地看出,当引入已经经历过偏高碘酸钠的细胞时,偏高碘酸钠被消耗并且消耗减慢然后有效地停止。图中的图表显示,在五轮氧化后,没有发生更多明显的试剂消耗。由此得出结论,抗原已被完全氧化,所有能够通过这种温和过程氧化的分子已

经被氧化。在该氧化过程之后,如上所述离心细胞,除去上清液,并将细胞重新悬浮于测试缓冲液中。然后通过应用于上述测试血清评估这些细胞的诊断功效。同时使用氧化的RBT抗原与未被氧化的原始RBT抗原。

[0269] 实施例8:使用仅1,2连接的三糖(结构XII)和二糖抗原(结构XI)作为布鲁氏菌病的血清学诊断抗原

[0270] 上述实施例5中描述了作为DIVA诊断的仅1,2-连接的三糖(结构XII)和二糖抗原(结构XI)的性质。通过证明这些抗原在检测牛的*B.abortus*感染和猪的*B.suis* (bivoar 2)感染方面的灵敏度来表明这些抗原的有效性。因此很好地确立了这些抗原在DIVA中的价值。

[0271] 在接种疫苗存在或不存在的条件下,进行了进一步的研究以评估这些抗原对常规血清学的适用性和优点。由于在本文描述的工作期间,已经证实了尖端表位在这些抗原的诊断灵敏度中发挥着重要作用,因此期望在小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9(仅1,2连接的4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-吡喃甘露糖基聚合物)上的OPS上存在相同的表位会导致交叉反应的产生以及出现可能过量的假阳性结果。来自感染了*B.suis* biovar 2的猪的血清对与仅仅1,2连接的三糖(结构XII)抗原表现出的强烈反应强化了这种期望(因为来自该生物变种的OPS的长重复元件与小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9的长重复元件相同)。

[0272] 为了评估这种交叉反应的程度,对实验感染*B.abortus*菌株544的四头牛以及实验感染小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9的四头牛的血清(使用在感染后第3,7,16,24和53周时采集的样品)进行了评估。为了测量相对于其他血清学诊断抗原的反应,使用几种不同的抗原进行测试,并且以线状图表示这些结果:*B.abortus* S99 sLPS(图9),仅1,2连接的六糖(结构IX)(图10),仅1,2-连接的三糖(结构XII)(图11)和单糖(结构II)(图12)。表6显示感染了小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9的牛的样品数,其血清学结果大于感染了*B.abortus*544牛的样品的最低血清学结果。如果灵敏度标准设定为100%(因为所有动物都已感染布鲁氏菌),则使用本发明方法测量了在该样品组内发生的假阳性结果的数量。100%测定灵敏度是在布鲁氏菌测试系统中是理想的,因为未能检测到布鲁氏菌阳性动物可能是毁灭性的。

[0273] 表6:感染了小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9的牛的样品数,其血清学结果大于感染了*B.abortus*544牛的样品的最低血清学结果。

[0274]

抗原	尖端存在/不存在	阳性小肠结肠炎耶尔森氏菌O: 9 样品数
<i>B.abortus</i> S99 sLPS	存在	15
仅 1,2 连接的六糖 BSA 缀合物 (结构 IX)	存在	11

[0275]

仅 1,2 连接的三糖 BSA 缀合物 (结构 XII)	存在	7
单糖 BSA 缀合物 (结构 II)	存在	4

[0276] 结果表明,当诊断抗原具有尖端表位时,小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9阳性样品的数量减少,因为随着抗原长度变小:sLPS>六糖>三糖>单糖,特异性增加。即使B.abortus、B.melitensis、B.suis和小肠结肠炎耶尔森氏菌0:90PS的末端perosamine完全相同,也会发生这种情况。(仅1,2个连接的)寡糖越短,对特异性的提升越大;这是无法预测的。

[0277] 对血清学结果的详细评估表明,虽然来自小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9感染动物的样品的结果最初高于仅1,2连接的三糖(结构XII),但是所有四只动物的样品的结果均快速下降。到第16周,所有四只动物的结果仍然低于感染了布鲁氏菌动物的最低结果。直到16周后,感染了布鲁氏菌的动物的结果才开始显著下降,即使这样,两只动物的结果仍很高。根据B.abortus S99 sLPS抗原(OIE为布鲁氏菌iELISA推荐的抗原)获得的血清学图显示感染了小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9的动物的结果立即在4例中的3例中下降(但不如仅1,2个连接的三糖的结果下降得那么快),以及其中感染了布鲁氏菌的动物2的样品在第53周开始相对变慢。感染了小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9的动物2的结果增加到第7周,且直到24周一直保持高。

[0278] 来自仅1,2连接的六糖(结构IX)抗原的结果显示三糖(结构XII)和S99 sLPS抗原的属性均适合其中间长度。尽管感染了小肠结肠炎耶尔森氏菌0:9的动物的样品的结果相对较快地下降,但动物2的结果从第2周到第7周一直增加。单糖的结果显示了感染类型之间良好区别,尽管感染了布鲁氏菌的动物的样品的一些结果非常低,这反映了该抗原的更有限的灵敏度。

[0279] 针对感染了B.abortus的牛场的29份血清样品,随机选择的未感染布鲁氏菌的牛的20分血清样品和在常规布鲁氏菌血清学诊断测定中呈假阳性的31份牛血清来测试仅1,2连接的三糖(结构XII)、B.abortus S99 sLPS以及仅1,2连接的三糖(结构XII)和四糖(结构VI)的混合物(按照质量均分)。数据以3个散点图呈现:B.abortus S99 sLPS和仅1,2连接的三糖(结构XII)(图13),B.abortus S99 sLPS和仅1,2连接的三糖(结构XII)和特异性M-抗原四糖(结构VI)的均分混合物(图14),以及仅1,2连接三糖(结构XII)和仅1,2连接的三糖(结构XII)和特异性M-抗原四糖(结构VI)的均分混合物(图15)。

[0280] 图13至15的散点图显示所有三种抗原制剂完全区分受感染动物的样品和随机选择的未感染动物的样品。但是,在所有情况下,与FPSR群体的样品存在相当大的重叠。当灵敏度高时,抗原分离感染了布鲁氏菌的动物和FPSR群体中的样品的能力如表7所示。对高灵敏度的需求反映了样品群体和测试要求。结果显示在100%和96.6%的诊断灵敏度下,仅1,2-连接的三糖(结构XII)以及仅1,2-连接的三糖(结构XII)和M-抗原四糖(结构VI)的均分混合物均优于本地B.abortus S99 sLPS(OIE推荐的当前标准抗原)。

[0281] 表7:当测试阳性/阴性截止值适应不同的抗原灵敏度时,有关FPSR群体的特异性(括号中示出阳性样品的数量)

[0282]

诊断灵敏度	B.abortus S99 sLPS	仅1,2连接的三糖	混合物
100.0%	0.0% (0)	12.9% (4)	9.7% (3)
96.6%	16.1% (5)	38.7% (12)	35.5% (11)
93.1%	58.1% (18)	45.2% (14)	38.7% (12)

[0283] 现场血清和实验感染血清的结果和结论是一致的。在最高水平的诊断灵敏度下, 用仅1,2连接的三糖(结构XII)获得的特异性优于用天然sLPS抗原(目前的标准抗原)获得的特异性。尽管灵敏度降低是不利的,但是降低灵敏度要求使sLPS具有优越的性能。来自实验感染的结果表明,不同抗原的特异性取决于与交叉反应生物如小肠结肠炎耶尔森氏菌O:9的感染点的接近程度,取样。

[0284] 因此,不仅仅是仅1,2-连接的三糖(结构XII)、二糖(结构XI)和单糖(结构II)对布鲁氏菌病具有出乎意料的高灵敏度诊断敏感性抗原,而且它们还具有出乎意料的高诊断特异性。

[0285] 在本实施例中,对取自感染动物的样品进行血清学检测,其中感染了布鲁氏菌生物变种是A-显性菌株。预计这种感染会产生更大比例的对仅1,2-连接的perosamines(4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-吡喃甘露糖基)的序列反应的抗体,而不会产生含有1,3个连接的perosamines的序列的抗体。上文或先前(WO2014/170681)已经显示了仅1,2连接的三糖(结构XII)和特异性M-抗原四糖(结构VI)抗原检测由这种感染诱导的抗OPS抗体的能力。这些抗原在单独使用时可能是有用的,但是如上所述,这些抗原一起使用时可能效果更佳。

[0286] 当发生M-显性菌株的感染时,诱导的抗体可能转向针对含有1,3个链的过量胺的序列的更高比例的抗体。在这种情况下,特异性M-抗原四糖(结构VI)将是更敏感的诊断。组合使用两种抗原(结构XII或XI与结构VI组合,例如作为混合物施用)在两种情况下表现出最佳灵敏度,这两种情况即感染B.abortus、B.melitensis和B.suis的A-显性或M-显性菌株。

[0287] 总之,本文描述的工作提供抗原组合,这种抗原组合是通用抗原,其是敏感的,DIVA相容的,比天然抗原更具特异性的,例如OIE推荐的抗原B.abortus S99 sLPS,并且与更长的合成“通用”抗原相比,这种通用抗原生产成本更低且使用更便宜。

[0288] 用于实施例8的方法

[0289] 所用的血清学方法和样品与实施例5所述相同,并加入假阳性血清学反应器样品(FPSR)。这些血清是在1996年至1999年间从英国境内收集的,即自宣布其正式无布鲁氏菌病状态以来的10多年。这些血清在由OIE批准的牛布鲁氏菌病、CFT、SAT、cELISA或iELISA的四种常规血清学诊断测定中的至少一种中均为阳性。除血清学外,没有该病的文化或流行病学证据。

[0290] 附录:多糖合成方法

[0291] 七糖的合成

[0292] 该合成使用三个关键构建块,已知的受保护的甲基糖苷S12。使用两个糖基供体11和13(下文)来延伸1,2连接的寡糖、供体11和带有系链的封端残基13以与蛋白质缀合。化合物11允许链一次延伸一个残基,并且O-2处的临时乙酸酯保护基团允许容易除去,显示羟基以进一步扩链。具有附着的系链13的预制的封端残基由已知的甲基2,3,-O-异亚丙基-6-脱

氧- α -D-吡喃甘露糖苷S5和受保护的系链12制备,该系链12又由市售的苄基(5-羟基戊基)氨基甲酸酯制备,该两步步骤转化为S13然后转化为12(方案4S)。一系列转化允许S5与12反应,然后进一步反应提供硫代糖苷13。

[0293] 这些中间体的详细构造如下所述进行

[0294] 硫代糖苷供体11的合成:

[0295] 甲基4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(S11)。

[0296] 标题化合物的分析数据基本上与先前描述的相同(Bundle等人(1988) Carbohydr Res 174:239-251)。

[0297] 1,2-二-O-乙酰基-4-叠氮基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖(S12)。

[0298] 将S11(5g,17.05mmol)的乙酸酐/乙酸/硫酸(50:20:0.5,50mL)溶液在21°C下搅拌3小时,然后倒入冰冷的1M K_2C_3 溶液中(80mL)。然后用 CH_2Cl_2 (约100mL)稀释该混合物,并用水(2 \times 30mL)、饱和 $NaHCO_3$ (35mL)和盐水(15mL)洗涤该混合物。分离有机相,用 $MgSO_4$ 干燥并真空浓缩有机相。残留物通过硅胶柱色谱纯化(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱),得到标题化合物S12(5.6g,91%),为粘稠液体。S12的分析数据: $R_f=0.35$ (乙酸乙酯/己烷,1/4,v/v); $[\alpha]_D^{21}=+30.71$ ($c=1.51,CHCl_3$); ^{13}C NMR(176MHz, $CDCl_3$): δ :169.8,168.3,136.9,128.5,128.3,128.1,91.0,75.7,71.8,69.3,66.3,63.5,20.8(x2),18.5ppm;HRMS(ESI): m/z $C_{17}H_{21}N_3O_6Na$ [M+Na]⁺计算值:386.1323,实测值:386.1322。

[0299] 对甲苯基2-O-乙酰基-4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧-1-硫代- α -D-吡喃甘露糖苷(11)。

[0300] 在0°C下向搅拌的S12(0.78g,2.15mmol)和对甲苯硫醇(0.4g,3.22mmol)的无水 CH_2Cl_2 (15mL)溶液中逐滴加入 $BF_3 \cdot Et_2O$ (0.32mL,2.57mmol)。当TLC显示反应完成时,然后用 CH_2Cl_2 (约50mL)稀释该混合物,并用水(2 \times 10mL)、饱和 $NaHCO_3$ (15mL)和盐水(10mL)洗涤该混合物。分离有机相,用 $MgSO_4$ 干燥并真空浓缩有机相。通过快速柱色谱法(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱)纯化残余物,得到粘稠液体11(0.854g,92.9%)。S11的分析数据: $R_f=0.7$ (乙酸乙酯/己烷,1/3,v/v); $[\alpha]_D^{21}=+135.5$ ($c=2.25,CHCl_3$); ^{13}C NMR(176MHz, $CDCl_3$): δ :170.0,138.1,137.0,132.4,132.3,129.9,129.8,129.6,128.5,128.5,128.4,128.1,86.4,76.4,71.7,69.1,68.2,64.2,21.1,21.0,18.4ppm;HRMS(ESI): m/z $C_{22}H_{25}N_3O_4SNa$ [M+Na]⁺计算值:450.1458,实测值:450.1465。

[0301] 连接体溴代烷烃12的合成:

[0302] 5-(N-苄基((苄氧基)羰基)氨基)戊醇苯甲酸酯(S13)。

[0303] 在0°C下,将苯甲酰氯(0.88mL,7.59mmol)滴加到含有 Et_3N (1.76mL,1.26mmol)的无水 CH_2Cl_2 (15mL)的苄基(5-羟基戊基)氨基甲酸酯(市售)(1.5g,6.32mmol)的搅拌溶液中。1分钟后,将DMAP(1.7g,13.9mmol)的无水 CH_2Cl_2 (10mL)滴加到反应混合物中并在室温下搅拌过夜。然后用 CH_2Cl_2 (约30mL)稀释所得混合物,并用水HCl(1M,1 \times 10mL)、水(60mL)、饱和 $NaHCO_3$ (30mL)和盐水(30mL)洗涤该混合物。分离有机相,用 $MgSO_4$ 干燥并真空浓缩有机相。

[0304] 在硅胶(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱)上快速滤出残余物,得到几乎纯的化合物,为油状物。该粗物质直接用于苄基化。

[0305] 在0°C下,向溶解在无水DMF(10mL)中的苯甲酰基保护的化合物(0.9g,2.63mmol)的溶液中加入NaH(0.12g,2.89mmol)。将混合物在0°C下搅拌45分钟,然后加入BnBr

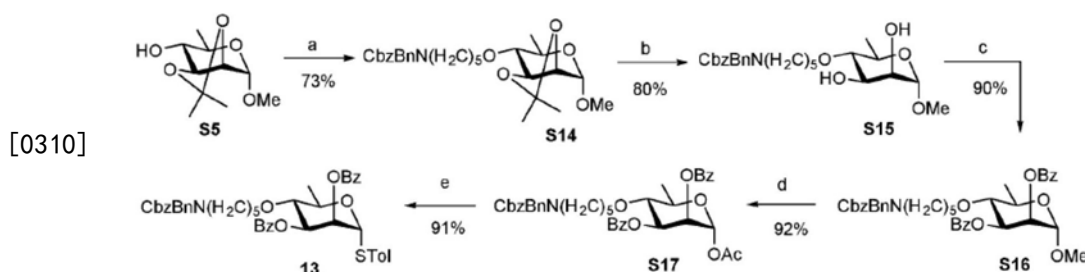
(0.37mL, 3.16mmol)。再搅拌12小时,当TLC显示反应完成时,将其在0°C用H₂O淬灭,并将混合物用EtOAc稀释。用EtOAc (5×25mL) 萃取水层,合并并用Na₂SO₄干燥有机相。通过快速柱色谱(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱)得到所需产物S13 (1.093g, 96.1%)。S13的分析数据:R_f=0.6 (乙酸乙酯/己烷, 1/3.5, v/v)¹³C NMR (176MHz, CDCl₃): δ: 166.6, 156.7, 156.2, 137.9, 136.8, 132.8, 130.4, 129.5, 128.5, 128.4, 128.3, 127.8, 127.3, 127.2, 67.2, 64.8, 64.7, 50.5, 50.2, 47.0, 46.0, 28.4, 27.8, 27.4, 23.3ppm; HRMS (ESI): m/z C₂₇H₂₉NO₄Na [M+Na]⁺ + 计算值: 454.1989, 实测值: 454.1986。

[0306] 苄基-N-苄基(5-溴戊基)氨基甲酸酯(12)。

[0307] 将甲醇钠(~0.8mL, 0.5M溶液)加入到S13 (1.0g, 2.32mmol)的CH₃OH (15mL)溶液中直至pH约为9,并将所得混合物在氩气下在21°C下搅拌6小时。之后,用Amberlite IR 120 (H+)离子交换树脂中和反应混合物,滤出树脂并依次用CH₃OH冲洗。将合并的滤液真空浓缩,将该粗产物直接用于溴化。

[0308] 在0°C下,向溶解在无水CH₂Cl₂ (15mL)中的脱保护化合物(0.96g, 2.92mmol)溶液中加入CBr₄ (1.85g, 5.55mmol)和PPh₃ (1.54g, 5.86mmol)。使反应升温至室温并再搅拌3小时。当TLC显示反应完成时,将其在0°C用H₂O淬灭,然后用CH₂Cl₂ (约50mL)稀释该混合物,并用水(2×10mL)、饱和NaHCO₃ (15mL)和盐水(15mL)洗涤该混合物。分离有机相,用MgSO₄干燥并真空浓缩有机相。残留物通过硅胶(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱)柱色谱纯化,得到标题化合物12 (1.085g, 94.8%),为液体。S12的分析数据:R_f=0.85 (乙酸乙酯/己烷, 1/4, v/v); ¹³C NMR (176MHz, CDCl₃): δ: 156.7, 156.2, 137.8, 136.7, 128.5 (x2), 128.4, 128.0, 127.9, 127.4, 127.3, 127.2, 67.3, 67.2, 50.6, 50.3, 46.9, 46.0, 33.6, 33.4, 32.3 (x2), 27.2, 26.8, 25.3ppm; HRMS (ESI): m/z C₂₀H₂₄NO₂BrNa [M+Na]⁺ + 计算值: 412.0883, 实测值: 412.0878。

[0309] p-甲基硫代糖苷供体13的合成:



[0311] 方案4S条件:a) CbzBnN(CH₂)₅Br, NaH, DMF, 0°C to rt, 18h; b) TFA/H₂O (9:1), CH₂Cl₂, rt, 10分钟; c) BzCl, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C to rt, 12h; d) Ac₂O, AcOH, H₂SO₄, rt, 4h; e) BF₃:Et₂O, 对甲硫酚, CH₂Cl₂, 0°C to rt, 10h。

[0312] 甲基2,3-O-异亚丙基-6-脱氧-α-D-吡喃甘露糖苷(S5)。

[0313] 标题化合物的分析数据基本上与先前描述的相同(Eis & Ganem (1988) Carbohydrate Research 176:316-323)。

[0314] 甲基4-O-(5'-N-苄基-5'-N-羧基苄基-戊烷基)2,3-O-异亚丙基-6-脱氧-α-D-吡喃甘露糖苷(S14)。

[0315] 在0°C下,向溶解在无水DMF (15mL)中的S5 (2.0g, 9.17mmol)溶液中加入NaH (0.4g, 10.08mmol)。将混合物在0°C下搅拌45分钟,然后加入CbzBnN(CH₂)₅Br (4.5g, 11.01mmol)。再搅拌12小时,当TLC显示反应完成时,将其在0°C用H₂O淬灭,并将混合物用EtOAc稀释。用

EtOAc (5×25mL) 萃取水层, 合并有机相, 用Na₂SO₄干燥有机相。通过快速柱色谱(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱) 得到所需产物S14 (3.26g, 73.2%) 以及消除的烯烃和少量未反应的原料S5 (0.16g)。S14的分析数据: Rf=0.6 (乙酸乙酯/己烷, 1/4, v/v); [α]_D²¹=+20.48 (c=2.11, CHCl₃); ¹³C NMR (176MHz, CDCl₃): δ: 156.7, 156.1, 137.9, 136.9, 136.8, 128.5, 128.4, 127.9, 127.8, 127.3, 127.2, 109.0, 98.0, 82.0, 78.5, 75.9, 71.3, 67.1, 64.5, 54.7, 50.4, 50.1, 47.1, 46.1, 29.8, 28.0, 27.9, 27.5, 26.3, 23.4, 17.7 ppm; HRMS (ESI): m/z C₃₀H₄₁N₀₇Na [M+Na]⁺ 计算值: 550.2775, 实测值: 550.2785。

[0316] 甲基4-O-(5'-N-苄基-5'-N-羧基苄基-戊酰基)-6-脱氧-α-D-吡喃甘露糖苷(S15)。

[0317] 将S14 (1.0g, 1.89mmol) 的TFA:H₂O (9:1, 10mL) 溶液在21℃下搅拌30分钟, 然后倒入冰冷的1M K₂CO₃溶液 (50mL) 中。然后用CH₂Cl₂ (约50mL) 稀释该混合物, 并用水 (2×30mL)、饱和NaHCO₃ (25mL) 和盐水 (15mL) 洗涤该混合物。分离有机相, 用MgSO₄干燥并真空浓缩有机相。残留物通过硅胶(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱) 柱色谱纯化, 得到标题化合物S15 (0.742g, 80.3%), 为油状物。S15的分析数据: Rf=0.4 (乙酸乙酯/己烷, 1/1, v/v); [α]_D²¹=+38.31 (c=1.27, CHCl₃); ¹³C NMR (176MHz, CDCl₃): δ: 156.7, 156.3, 137.8, 136.6, 129.6, 128.5, 128.4, 127.9, 127.8, 127.3, 127.2, 100.3, 81.7, 71.4, 71.3, 71.2, 67.2, 67.1, 54.8, 50.5, 50.3, 47.1, 46.1, 30.0, 29.8, 27.9, 27.2, 23.2, 17.9 ppm; HRMS (ESI): m/z C₂₇H₃₇N₀₇Na [M+Na]⁺ 计算值: 510.2462, 实测值: 510.2462。

[0318] 甲基2,3-二-O-苯甲酰基-4-O-(5'-N-苄基-5'-N-羧基苄基-戊烷基)-6-脱氧-α-D-吡喃甘露糖苷(S16)。

[0319] 在0℃下, 将苯甲酰氯 (0.23mL, 1.97mmol) 滴加到搅拌的S15 (0.4g, 0.82mmol) 的含有Et₃N (0.46mL, 3.28mmol) 的无水CH₂Cl₂ (10mL) 溶液中。2分钟后, 将无水CH₂Cl₂ (5mL) 溶液的DMAP (0.451g, 3.69mmol) 滴加到反应混合物中并在室温下搅拌过夜。然后用CH₂Cl₂ (约20mL) 稀释得到的混合物, 并用水HCl (1M, 2×5mL)、水 (20mL)、饱和NaHCO₃ (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤该混合物。分离有机相, 用MgSO₄干燥并真空浓缩有机相。残留物通过硅胶(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱) 柱色谱纯化, 得到标题化合物S16 (0.513g, 90%), 为油状物。S16的分析数据: Rf=0.7 (乙酸乙酯/己烷, 1/3.5, v/v); [α]_D²¹=-70.58 (c=1.71, CHCl₃); ¹³C NMR (176MHz, CDCl₃): δ: 165.5, 165.2, 156.7, 156.3, 137.9, 133.3, 133.0, 129.9, 129.8, 129.8, 129.6, 128.5, 128.4, 128.3, 127.9, 127.8, 127.1, 98.5, 79.5, 73.1, 72.9, 72.1, 71.1, 67.6, 67.1, 55.0, 50.4, 50.1, 47.0, 46.0, 29.9, 27.8, 27.4, 23.3, 18.0 ppm; HRMS (ESI): m/z C₄₁H₄₅N₀₉Na [M+Na]⁺ 计算值: 718.2987, 实测值: 718.298。

[0320] 1-O-乙酰基-2,3-二-O-苯甲酰基-4-O-(5'-N-苄基-5'-N-羧基苄基-戊烷基)-6-脱氧-α-D-吡喃甘露糖 (S17)。

[0321] 将S16 (0.5g, 0.716mmol) 的乙酸酐/乙酸/硫酸 (50:20:0.5, 10mL) 溶液在21℃下搅拌3小时, 然后倒入冰冷的1M K₂CO₃溶液中 (50mL)。然后用CH₂Cl₂ (约20mL) 稀释该混合物, 并用水 (2×30mL)、饱和NaHCO₃ (15mL) 和盐水 (10mL) 洗涤该混合物。分离有机相, 用MgSO₄干燥并真空浓缩有机相。残留物通过硅胶(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱) 柱色谱纯化, 得到标题化合物S17 (0.485g, 92.2%), 为液体。S17的分析数据: Rf=0.55 (乙酸乙酯/己烷, 1/4, v/v); [α]_D²¹=-48.86 (c=1.51, CHCl₃); ¹³C NMR (176MHz, CDCl₃): δ: 168.6, 165.4, 165.2, 137.8, 136.7, 133.5, 133.2, 129.8, 129.6, 129.4, 129.0, 128.5, 128.5, 128.4, 128.2, 127.9,

127.8, 127.2, 127.1, 90.8, 79.1, 73.4, 71.8, 70.1, 69.9, 67.1, 50.4, 50.1, 46.9, 45.9, 29.9, 27.8, 27.4, 23.3, 21.0, 18.1, ppm; HRMS (ESI) : m/z C₄₂H₄₅NO₁₀Na [M+Na]⁺ 计算值: 746.2936, 实测值: 746.2931。

[0322] 对甲基基2,3-二-O-苯甲酰基-4-O-(5'-N-苄基-5'-N-羧基苄基-戊烷基)-6-脱氧-1-硫代- α -D-吡喃甘露糖苷(13)。

[0323] 在0℃下,向搅拌的S17(1.2g,1.66mmol)和对甲苯硫醇(0.312g,2.48mmol)的无水CH₂Cl₂(20mL)溶液中逐滴加入BF₃·Et₂O(0.25mL,1.99mmol)。当TLC显示反应完成时,然后用CH₂Cl₂(约30mL)稀释该混合物,并用水(2×10mL)、饱和NaHCO₃(10mL)和盐水(20mL)洗涤该混合物。分离有机相,用MgSO₄干燥并真空浓缩有机相。通过快速柱色谱法(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱)纯化残余物,得到13,为白色固体(1.18g,90.7%)。S13的分析数据:Rf=0.65(乙酸乙酯/己烷,1/4,v/v); $[\alpha]_D^{21}=-1.02$ (c=0.9,CHCl₃);¹³C NMR(176MHz,CDCl₃): δ : 165.4,165.3,156.7,156.1,138.1,137.9,136.9,136.8,133.4,133.2,132.7,132.3,130.0,129.9(x2),129.8,129.7(x2),129.6,128.5(x2),128.4(x2),127.9,127.8,127.3(x2),127.2,86.2,79.7,73.3,73.1,72.6,72.4(x2),69.2,67.1,50.5,50.2,47.0,46.0,30.0,27.9,27.4,23.3,21.2,18.0ppm;HRMS(ESI):m/z C₄₇H₄₉NO₈SNa [M+Na]⁺ 计算值: 810.3071, 实测值: 810.3069。

[0324] 甲基4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷。

[0325] 标题化合物的分析数据基本上与先前描述的相同(Bundle等人(1988) Carbohydr Res 174:239-251), (Eis&Ganem(1988) Carbohydrate Research 176:316-323)。

[0326] 七糖的组装

[0327] 通过活化的硫代糖苷11对甲基糖苷进行糖基化反应,得到二糖14。进行酯交换反应,除去乙酸酯,得到羟基基团,进行糖基化和酯交换的重复序列。将其再重复4次,依次为三糖16和17,四糖18和19,五糖21和22,以及六糖22和23。然后在最终的链扩增反应中,带有系链的封端残基通过使12与23反应,产生七糖24和除去苯甲酸酯后的部分脱保护的醇25。脱保护是通过一系列步骤实现的,包括将叠氮基还原为胺,然后进行N-甲酰化,然后进行氢解步骤以除去苄基醚和氨基保护基团(Ganesh等人(2014) Journal of the American Chemical Society 136:16260-16269)。然后通过用双琥珀酰亚胺酯(DSG)或二丁基二乙酸酯选择性活化系链氨基,将化合物8与蛋白质缀合,得到活化的中间体S26和S27。S26与破伤风类毒素反应以提供疫苗糖缀合物9,并且S27与BSA反应以提供筛选抗原10。

[0328] 甲基4-叠氮基-2-O-乙酰基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃葡萄糖基(1→2)4-叠氮基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃葡萄糖苷(14)。

[0329] 将糖基受体化合物S11(1.42g,4.84mmol)和糖基供体化合物11(2.27g,5.33mmol)合并,与无水甲苯(5mL)共沸两次,并在高真空下放置2小时。然后将混合物溶解在CH₂Cl₂(20mL)中,用新鲜活化的4Å分子筛(1.5g)处理,在室温下在Ar气氛下搅拌1小时。向混合物中加入NIS(2.4g,9.71mmol)。冷却至-10℃后,加入TMSOTf(0.19mL,0.971mmol),使反应升温至室温。当TLC显示反应完成时,然后加入饱和NaHCO₃水溶液(15mL)和CH₂Cl₂,并使所得混合物通过硅藻土以除去分子筛。将合并的滤液用Na₂S₂O₃水溶液(20%)和水洗涤。用CH₂Cl₂(3×15)萃取水层后,将合并的有机相用Na₂SO₄干燥,真空浓缩,并通过硅胶柱色谱法(乙酸乙酯/己烷梯度洗脱)纯化有机相,得到二糖14(2.66g,92.1%),为粘稠液体。S14的分析数据:

Rf=0.5 (乙酸乙酯/己烷, 1/4, v/v); $[\alpha]_D^{21} = +36.24^\circ$ (c=1.92, CHCl₃); ¹³C NMR (176MHz, CDCl₃): δ: 169.7, 137.6, 137.1, 128.5 (x2), 128.4, 128.0, 127.9, 127.8, 99.7, 99.4, 77.7, 75.4, 73.7, 72.0, 71.6, 67.6, 67.2, 66.9, 64.1, 63.8, 54.9, 20.9, 18.5 (x2) ppm; HRMS (ESI): m/z C₂₉H₃₆N₆O₈Na [M+Na]⁺ 计算值: 619.2487, 实测值: 619.2481。

[0330] 甲基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-吡喃甘露糖苷(15)。

[0331] 将甲醇钠(~1.2mL, 0.5M溶液)加入到14(2.6g, 4.36mmol)在CH₃OH:THF[4:2](20mL)中的溶液中直至pH约为9并将所得混合物在氩气下搅拌21℃下6小时。之后,用Amberlite IR 120(H⁺)离子交换树脂中和反应混合物,滤出树脂并依次用CH₃OH冲洗。将合并的滤液真空浓缩,并通过硅胶(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱)柱色谱法纯化,得到脱保护的二糖化合物15(2.3g, 95.4%),为白色泡沫。S15的分析数据:Rf=0.4(乙酸乙酯/己烷, 1/4.5, v/v); $[\alpha]_D^{21} = +28.71$ (c=1.56, CHCl₃); ¹³C NMR (176MHz, CDCl₃): δ: 137.5, 137.1, 128.6, 128.5, 128.3, 128.2 (x2), 128.0, 100.8, 99.9, 77.8, 77.6, 73.6, 72.1 (x2), 67.3, 67.2, 66.9, 64.3, 63.8, 54.9, 18.6, 18.4 ppm; HRMS (ESI): m/z C₂₇H₃₄N₆O₇Na [M+Na]⁺ 计算值: 577.2381, 实测值: 577.2381。

[0332] 甲基2-0-乙酰基-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)4-叠氨基-3-0-苄基-4,6-二脱氧-α-D-吡喃甘露糖苷(16)。

[0333] 将糖基受体化合物15(2.25g, 4.06mmol)和糖基供体化合物11(1.90g, 4.46mmol)合并,与无水甲苯(5mL)共沸两次,并在高真空下放置2小时。然后将混合物溶解在CH₂Cl₂(25mL)中,用新鲜活化的4Å分子筛(1.6g)处理,在室温下Ar气氛下搅拌1小时。向混合物中加入NIS(1.83g, 8.111mmol)。冷却至-10℃后,加入TMSOTf(0.16mL, 0.893mmol),使反应升温至室温。当TLC显示反应完成时,然后加入饱和NaHCO₃水溶液(15mL)和CH₂Cl₂,并使所得混合物通过硅藻土以除去分子筛。将合并的滤液用Na₂S₂O₃水溶液(20%)【30mL】和水(20mL)洗涤。用CH₂Cl₂(3×15)萃取水层后,将合并的有机相用Na₂SO₄干燥,真空浓缩,并通过硅胶柱色谱法(乙酸乙酯/己烷梯度洗脱)纯化有机相,得到三糖16(3.09g, 88.9%),为粘稠液体。S16的分析数据:Rf=0.65(乙酸乙酯/己烷, 1/5, v/v); ¹³C NMR (176MHz, CDCl₃): δ: 169.7, 137.4, 137.3, 137.1, 128.5 (x2), 128.4, 128.1, 128.0 (x3), 100.3, 99.8, 99.1, 77.5, 76.8, 75.4, 73.5, 72.1, 72.0, 71.5, 67.8, 67.6, 67.1, 67.0, 64.4, 64.0, 63.8, 54.9, 21.0, 18.6 (x2), 18.3 ppm; HRMS (ESI): m/z C₄₂H₅₁N₉O₁₁Na [M+Na]⁺ 计算值: 880.36, 实测值: 880.3607。

[0334] 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)4-叠氨基-3-0-苄基-4,6-二脱氧-α-D-甘露吡喃糖苷(17)。

[0335] 将甲醇钠(~1.5mL, 0.5M溶液)加入到16(3.0g, 3.5mmol)在CH₃OH:THF[4:2](20mL)中的溶液中直至pH约为9并将所得混合物在21℃下在氩气下搅拌6小时。之后,用Amberlite IR 120(H⁺)离子交换树脂中和反应混合物,滤出树脂并依次用CH₃OH冲洗。将合并的滤液真空浓缩,并通过硅胶(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱)柱色谱法纯化,得到脱保护的三糖化合物17(2.6g, 91.2%),为白色固体泡沫。S17的分析数据:Rf=0.45(乙酸乙酯/己烷, 1/5, v/v); ¹³C NMR (176MHz, CDCl₃): δ: 137.3 (x2), 137.2, 128.6 (x3), 128.5, 128.3, 128.3,

128.2 (x2), 128.1 (x2), 128.0, 100.5, 100.4, 99.8, 77.6, 77.5, 76.8, 73.6, 73.3, 72.2, 72.1 (x2), 67.8, 67.3, 67.1, 67.0, 64.4, 64.2, 63.8, 54.9, 18.6 (x2), 18.3 ppm; HRMS (ESI) : m/z $C_{40}H_{49}N_9O_{10}Na [M+Na]^+$ 计算值: 383.3495, 实测值: 838.3501。

[0336] 2-O-乙酰基-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 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-吡喃甘露糖基(18)。

[0337] 将糖基受体化合物17 (2.05g, 2.51mmol) 和糖基供体化合物11 (1.18g, 2.76mmol) 合并, 用无水甲苯 (5mL) 共沸两次, 并在高真空下放置2小时。然后将混合物溶解在 CH_2Cl_2 (20mL) 中, 用新鲜活化的 $4A^\circ$ 分子筛 (1.2g) 处理, 在室温下在Ar气氛下搅拌1小时。向混合物中加入NIS (1.13g, 5.02mmol)。冷却至 $-10^\circ C$ 后, 加入TMSOTf (0.1mL, 0.553mmol), 使反应升温至室温。当TLC显示反应完成时, 然后加入饱和NaHCO₃水溶液 (10mL) 和 CH_2Cl_2 , 并使所得混合物通过硅藻土以除去分子筛。将合并的滤液用Na₂S₂O₃水溶液 (20%) 和水洗涤。用 CH_2Cl_2 (3 \times 10) 萃取水层后, 将合并的有机相用Na₂SO₄干燥, 真空浓缩有机相, 并通过硅胶柱色谱法 (乙酸乙酯/己烷梯度洗脱) 纯化有机相, 得到四糖18 (2.49g, 87.8%), 为糖浆。18的分析数据: Rf=0.5 (乙酸乙酯/己烷, 1/4, v/v); ¹³C NMR (176MHz, CDCl₃): δ : 169.8, 137.4, 137.3, 137.1 (x2), 128.6 (x2), 128.5 (x2), 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0 (x3), 100.3, 100.1, 99.7, 99.1, 77.4, 76.6, 75.4, 73.6, 73.4 (x2), 72.2, 72.1, 72.0, 71.5, 67.8, 67.6, 67.1, 66.9, 64.3, 64.2, 64.0, 63.8, 54.9, 21.0, 18.6 (x2), 18.5, 18.4 ppm; HRMS (ESI) : m/z $C_{55}H_{66}N_{12}O_{14}Na [M+Na]^+$ 计算值: 1141.4714, 实测值: 1141.473。

[0338] 甲基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 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-吡喃甘露糖基(19)。

[0339] 将甲醇钠 (~1.2mL, 0.5M溶液) 加入到18 (2.2g, 1.95mmol) 在CH₃OH:THF [4:2] (15mL) 中的溶液中直至pH约为9并将所得混合物在21 $^\circ C$ 下在氩气下搅拌6小时。之后, 用Amberlite IR 120 (H+) 离子交换树脂中和反应混合物, 滤出树脂并依次用CH₃OH冲洗。将合并的滤液真空浓缩, 并通过硅胶 (乙酸乙酯-己烷梯度洗脱) 柱色谱法纯化, 得到标题化合物19 (1.86g, 88.7%), 为白色固体。S19的分析数据: Rf=0.4 (乙酸乙酯/己烷, 1/4, v/v); ¹³C NMR (176MHz, CDCl₃): δ : 137.3 (x2), 137.1, 128.6 (x2), 128.5, 128.4, 128.3 (x2), 128.2 (x3), 128.1, 128.0, 100.4, 100.3, 100.2, 99.7, 77.7, 77.4, 76.6, 73.6, 73.5, 73.2, 72.2, 72.1 (x3), 67.8, 67.3, 67.1, 66.9, 64.3, 64.2 (x2), 63.8, 54.9, 18.6 (x2), 18.5, 18.3 ppm; HRMS (ESI) : m/z $C_{53}H_{64}N_{12}O_{13}Na [M+Na]^+$ 计算值: 1099.4608, 实测值: 1099.4625。

[0340] 甲基2-O-乙酰基-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 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(20)。

[0341] 将糖基受体化合物19 (1.63g, 1.51mmol) 和糖基供体化合物11 (0.712g, 1.66mmol) 合并, 与无水甲苯 (5mL) 共沸两次, 并在高真空下放置2小时。然后将混合物溶解在 CH_2Cl_2 (15mL) 中, 用新鲜活化的 $4A^\circ$ 分子筛 (1g) 处理, 在室温下在Ar气氛下搅拌1小时。向混合物中加入NIS (0.681g, 3.03mmol)。冷却至 $-10^\circ C$ 后, 加入TMSOTf (0.06mL, 0.33mmol), 使反应升温

(12.2mg)。MALDI-TOF质谱分析表明缀合物10具有每BSA平均10.27个七糖。

[0363] 仅1,2-连接的三糖的合成

[0364] 乙基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(1 \rightarrow 2)4-叠氨基-3-O-苄基-4,6-二脱氧-1-硫代乙基- α -D-甘露吡喃糖苷(S18)。

[0365] 标题化合物的分析数据基本上与先前描述的相同(Bundle等人(1988) Carbohydr.Res.174,239-251)。

[0366] 5'-甲氧基羰基戊基-4-叠氨基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(S19)。

[0367] 标题化合物的分析数据基本上与先前描述的相同(Ganesh等人(2014) J.Amer.Chem.Soc.136,16260-16269)。

[0368] 5'-甲氧基羰基戊基-4-叠氨基-2,3-O-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-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-甘露吡喃糖基(1 \rightarrow 2)4-叠氨基-3-O-苄基-4,6-二脱氧- α -D-吡喃甘露糖苷(S20)。

[0369] 将糖基受体化合物S19(0.2g,0.491mmol)和糖基供体化合物S18(0.414g,0.589mmol)合并,与无水甲苯(5mL)共沸两次,并在高真空下放置2小时。然后将混合物溶解在CH₂Cl₂(15mL)中,用新鲜活化的4A分子筛(1g)处理,在室温下在Ar气氛下搅拌1小时。向混合物中加入NIS(0.221g,0.982mmol)。冷却至-10°C后,加入TMSOTf(19.5 μ L,0.108mmol),使反应升温至室温。当TLC显示反应完成时,然后加入饱和NaHCO₃水溶液(5mL)和CH₂Cl₂,并使所得混合物通过硅藻土以除去分子筛。将合并的滤液用Na₂S₂O₃水溶液(20%)和水洗涤。用CH₂Cl₂(3 \times 5)萃取水层后,合并的有机相用Na₂SO₄干燥,真空浓缩,并通过硅胶柱色谱法(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱)纯化,得到二糖S20(0.418g,81.3%),为粘稠液体。S20的分析数据:Rf=0.7(乙酸乙酯/己烷,1:4.5,v/v); $[\alpha]_D^{21}=-14.49^\circ$ (c=1.79,CHCl₃);

[0370] ¹H NMR(500MHz,CDC13): δ 8.02-8.05(m,2H,ArH),7.95-7.97(m,2H,ArH),7.64-7.68(m,1H,ArH),7.50-7.57(m,3H,ArH),7.33-7.41(m,8H,ArH),7.22-7.26(m,3H,ArH),7.13-7.17(m,1H,ArH),5.71(dd,J=3.3,1.5Hz,1H,H-2c),5.59(dd,J=10.3,3.3Hz,1H,H-3c),5.06(d,J=1.8Hz,1H,H-1B),5.02(d,J=1.8Hz,1H,H-1c),4.76(d,J=11.7Hz,1H,CHPh),4.62-4.69(m,4H,3 CHPh,H-1A),3.95(dd,J=2.2,0.7Hz,1H,H-2B),3.90(dd,J=2.2,0.7Hz,1H,H-2A),3.76-3.81(m,2H,H-3B,H-5B),3.74(dd,J=9.9,2.9Hz,1H,H-3A),3.71(s,3H),3.69(t,J=9.9Hz,1H,H-4c),3.55-3.65(m,3H,H-4B,H-5c,-O-CH₂b),3.43-3.49(m,1H,H-5A),3.38(dt,J=9.7,6.4Hz,1H,-O-CH₂a),3.27(t,J=9.9Hz,1H,H-4A),2.33-2.39(m,2H,-CH₂f),1.64-1.72(m,2H,-CH₂e),1.56-1.64(m,2H,-CH₂c),1.35-1.42(m,2H,-CH₂d),1.38(d,J=5.6Hz,3H,H-6c),1.32(d,J=5.9Hz,3H,H-6B),1.29(d,J=5.9Hz,3H,H-6A);¹³C NMR(126MHz,CDC13): δ 174.0,165.2,164.9,137.5,137.3,133.4,133.3,129.8(x2),129.6,129.3,128.5(x2),128.4,128.2,128.1(x2),128.0,100.3,99.0,98.8,77.9,73.9,73.5,72.3(x2),70.9,69.5,68.0,67.5,67.2,64.5,63.9,63.5,51.5,34.0,29.1,25.7,24.7,18.6(x2),18.4ppm;HRMS(ESI):m/z C₅₃H₆₁N₉O₁₄Na[M+Na]⁺:计算值1070.423,实测值:1070.4248。

[0371] 5'-甲氧基羰基戊基-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-吡喃甘露糖苷(S21)。

[0372] 将甲醇钠 (~0.3mL, 0.5M溶液) 加入到S20 (0.39g, 0.372mmol) 在CH₃OH:THF [4:2] (12mL) 中的溶液中直至pH约为9并将所得混合物在21℃下在氩气下搅拌6小时。之后, 用Amberlite IR 120 (H+) 离子交换树脂中和反应混合物, 滤出树脂并依次用CH₃OH冲洗。将合并的滤液真空浓缩, 并通过硅胶(乙酸乙酯-己烷梯度洗脱) 柱色谱纯化, 得到标题化合物S21 (0.299g, 95.6%), 为白色固体。21的分析数据: R_f=0.3 (乙酸乙酯/己烷, 1:1.5, v/v); [α]_D²¹=+84.18 (c=1.55, CHCl₃); ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): δ7.30-7.44 (m, 10H, ArH), 5.00 (d, J=1.8Hz, 1H, H-1_B), 4.90 (d, J=1.5Hz, 1H, H-1_C), 4.72 (d, J=11.4Hz, 1H, CHPh), 4.61-4.67 (m, 4H, 3 CHPh, H-1_A), 3.93-3.97 (m, 2H, H-2_B, H-2_C), 3.81-3.87 (m, 2H, H-2_A, H-3_A), 3.76 (dd, J=9.9, 2.9Hz, 1H, H-3_B), 3.73 (dd, J=10.0, 2.9Hz, 1H, H-3_C), 3.70 (s, 3H), 3.51-3.64 (m, 3H, H-5_B, H-5_C, -O-CH₂b), 3.43-3.49 (m, 1H, H-5_A), 3.40 (t, J=9.9Hz, 1H, H-4_C), 3.36 (dt, J=9.7, 6.4Hz, 1H, -O-CH₂a), 3.27 (t, J=9.9Hz, 1H, H-4_B), 3.40 (t, J=10.2Hz, 1H, H-4_A), 2.49 (d, J=6.9Hz, 10H_{3c}), 2.34 (t, J=7.4Hz, 2H, -CH₂f), 2.18 (d, J=3.9Hz, 10H_{2c}), 1.63-1.70 (m, 2H, -CH₂e), 1.54-1.61 (m, 2H, -CH₂c), 1.33-1.40 (m, 2H, -CH₂d), 1.30 (d, J=6.2Hz, 6H, H-6_B, H-6_C), 1.20 (d, J=6.2Hz, 3H, H-6_A); ¹³C NMR (126MHz, CDCl₃): δ174.0, 137.4 (x2), 128.6 (x2), 128.3, 128.2 (x2), 128.1, 100.7, 100.4, 98.7, 77.7, 77.2, 77.2, 73.8, 73.2, 72.3, 72.2, 70.2, 69.9, 67.8, 67.5, 67.4, 67.1, 65.8, 64.4, 64.2, 51.6, 33.9, 29.1, 25.7, 24.7, 18.6 (x2), 18.2ppm; HRMS (ESI): m/z C₃₉H₅₃N₉O₁₂Na [M+Na]⁺计算值: 862.3706, 实测值: 862.3705。

[0373] 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→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-甲酰胺基-α-D-吡喃甘露糖苷(4)。

[0374] 向搅拌的S21 (0.2g, 0.239mmol) 在吡啶 (5mL) 和水 (2mL) 混合物中的溶液中加入H₂S, 在40℃下将H₂S鼓泡0.5小时, 并继续搅拌16小时。之后, 将氩气鼓泡10分钟, 真空除去溶剂, 并将残余物与甲苯 (3×10mL) 共蒸发并干燥。质谱分析显示与相应的胺化化合物的反应完成, 并且没有由不完全还原产生的产物。

[0375] 该粗物质直接用于甲酰化。在-20℃下, 在CH₃OH (5mL) 中的胺化合物加入新制备的甲酸酐 (5mL, 醚溶液) 并搅拌3小时, 然后缓慢升温至21℃。之后, 蒸发溶剂并将残余物通过硅胶(甲醇-二氯甲烷梯度洗脱) 柱色谱, 得到三糖。高分辨率质谱分析显示甲酰化反应完成。HRMS (ESI): m/z C₄₂H₅₉N₃O₁₅Na [M+Na]⁺计算值: 868.3838, 实测值: 868.3837。

[0376] 将甲酰化化合物溶于CH₃OH/H₂O (2:1, 15mL) 中, 加入碳上的Pd(OH)₂ (20%, 0.090g)。然后将其在21℃的氢气压力下搅拌16小时。通过硅藻土垫过滤并用CH₃OH (3×10mL) 洗涤溶剂后, 真空除去溶剂。通过反相HPLC在C18柱上在梯度水-乙腈中纯化并冻干残余物, 得到标题化合物4 (0.094g, 59.3%, 经3步), 为白色泡沫。4的分析数据: [α]_D²¹=+31.58 (c=1.16, H₂O); ¹H NMR (700MHz, D₂O): δ8.20-8.24 (Z) 和8.03-8.06 07 (E) (m, 3H, NCHO), 5.16-5.22 (m, 1H, H-1_B), 5.05-5.08 (m, 1H, H-1_C), 4.89-4.93 (m, 1H, H-1_A), 4.13-4.19 (m, 1H, H-2_B), 4.06-4.13 (m, 2H, H-2_C, H-3_C), 3.92-4.03 (m, 6H, H-2_A, H-3_A, H-3_B, H-4_C, H-4_B, H-4_A), 3.87-3.92 (m, 2H, H-5_A, H-5_C), 3.80-3.84 (m, 1H, H-5_B), 3.71-3.75 (m, 1H, -O-CH₂b), 3.71 (s, 3H), 3.56 (dt, J=9.9, 5.9Hz, 1H, -O-CH₂a), 2.42 (t, J=7.4Hz, 2H, -CH₂f), 1.60-1.68 (m, 4H, -CH₂e, -CH₂c), 1.40 (dq, J=14.8, 7.3Hz, 2H, -CH₂d), 1.20-1.30 (m, 9H, 3xH-6); ¹³C

NMR (176MHz, D₂O) : δ 178.4, 168.6 (x2), 165.7, 165.7 (x2), 102.9, 102.8, 101.5, 99.1, 78.5, 78.4, 78.2, 78.1, 78.0, 69.8, 69.1, 68.8, 68.7 (x2), 68.6, 68.5 (x2), 68.3 (x2), 67.9, 57.8, 52.9, 52.8, 52.7 (x2), 52.5, 34.4 (x2), 28.9, 25.7, 24.8, 17.8 (x2), 17.7 (x2), 17.6, 17.5 (x2) ppm. HRMS (ESI) : m/z C₂₈H₄₇N₃O₁₅Na [M+Na]⁺ 计算值: 688.2899, 实测值 688.2908.

[0377] (2'-氨基乙酰胺基) 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) 4,6-二脱氧-4-甲酰胺基- α -D-吡喃甘露糖苷(S24)

[0378] 将4 (0.06g, 0.09mmol) 在新蒸馏的1,2-二氨基乙烷(3.0mL) 中的溶液在65 $^{\circ}$ C下搅拌48小时。之后, 真空除去过量的试剂, 将残余物与CH₃OH(3 \times 10mL) 共蒸发并干燥。残余物通过反相HPLC在C18柱上在梯度水-乙腈中纯化并冻干, 得到标题化合物S24(0.052g, 83.15%), 为白色泡沫。S24的分析数据: [α]D²¹ = +37.05 (c = 1.14, H₂O); ¹H NMR (500MHz, D₂O) : δ 8.24-8.33 (Z) 和8.05-8.12 (E) (m, 3H, NCHO), 5.23-5.26 (m, 1H, H-1_B), 5.12 (s, 1H, H-1_C), 4.93-4.97 (m, 1H, H-1_A), 4.19-4.24 (m, 1H, H-2_B), 4.10-4.18 (m, 2H, H-2_C, H-3_C), 3.96-4.08 (m, 6H, H-2_A, H-3_A, H-3_B, H-4_C, H-4_B, H-4_A), 3.91-3.96 (m, 2H, H-5_A, H-5_C), 3.84-3.89 (m, 1H, H-5_B), 3.77 (dt, J = 9.7, 6.8Hz, 1H, -O-CH_{2b}), 3.57-3.63 (m, 1H, -, -O-CH_{2a}), 3.33 (t, J = 6.2Hz, 2H, -CH_{2g}), 2.82 (t, J = 6.2Hz, 2H, -CH_{2h}), 2.33 (t, J = 7.4Hz, 2H, -CH_{2f}), 1.64-1.74 (m, 4H, -CH_{2e}, -CH_{2c}), 1.39-1.49 (m, 2H, -CH_{2d}), 1.25-1.35 (m, 9H, 3x H-6); ¹³C NMR (126MHz, D₂O) : δ 178.3, 168.8 (x2), 165.8 (x2), 103.0, 102.9, 101.6, 99.3, 78.6, 78.3, 78.2, 78.1, 69.9, 69.2, 69.0, 68.9, 68.8 (x2), 68.6 (x2), 68.5, 68.4, 57.7, 53.0, 52.8 (x2), 52.7, 42.1, 42.1, 40.7, 36.7, 29.1, 26.0, 25.9, 17.9 (x2), 17.8 (x2), 17.7 (x2), 17.6ppm; HRMS (ESI) : m/z C₂₉H₅₁N₅O₁₄Na [M+Na]⁺ 计算值: 716.3325, 实测值: 716.333.

[0379] 1-[(2'-氨基乙基氨基) 羧基戊烷基-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(S25)。

[0380] 向搅拌的S24(0.015g, 0.022mmol) 在水(0.5mL) 和EtOH(0.5mL) 中的溶液中加入3,4-二丁氧基-3-环丁烯-1,2-二酮(20%在乙醇中, 70 μ L) 溶液, 并通过小心加入NaHCO₃(1%) 水溶液将pH调节至8.1小时后, 质谱显示反应完成; 用CH₃COOH(10%) 中和反应混合物并真空浓缩反应混合物。通过反相HPLC在C18柱上在梯度水-乙腈中纯化并冻干残余物, 得到标题化合物S25(0.0133g, 73.2%), 为白色泡沫。S25的分析数据: ¹H NMR (700MHz, D₂O) : δ 8.21-8.23 (Z) 和8.05 (E) (m, 3H, NCHO), 5.19 (s, 1H, H-1_B), 5.07 (s, 1H, H-1_C), 4.90-4.92 (m, 1H, H-1_A), 4.68-4.75 (m, 2H, -CH_{2i}), 4.14-4.19 (m, 1H, H-2_B), 4.07-4.13 (m, 2H, H-2_C, H-3_C), 3.92-4.02 (m, 6H, H-2_A, H-3_A, H-3_B, H-4_C, H-4_B, H-4_A), 3.89 (m, 2H, H-5_A, H-5_C), 3.79-3.85 (m, 1H, H-5_B), 3.73 (t, J = 5.0Hz, 1H, -CH_{2g}), 3.65-3.71 (m, 1H, -O-CH_{2b}), 3.62 (t, J = 5.0Hz, 1H, -CH_{2g}), 3.51 (dd, J = 9.6, 6.5Hz, 1H, -O-CH_{2a}), 3.40-3.45 (m, 2H, -CH_{2h}), 2.19-2.27 (m, 2H, -CH_{2f}), 1.77-1.84 (m, 2H, -CH_{2j}), 1.51-1.64 (m, 4H, -CH_{2e}, -CH_{2c}), 1.46 (dt, J = 15.5, 7.9Hz, 2H, -CH_{2k}), 1.30-1.36 (m, 2H, -CH_{2d}), 1.20-1.30 (m, 9H, 3xH-6), 0.94-0.98 (m, 3H, -CH_{2l}); ¹³C NMR (176MHz, D₂O) : δ 189.7, 184.1, 178.4, 177.8, 174.5, 168.6, 165.7, 165.7, 102.8, 101.5, 99.1, 98.9, 78.4, 78.1, 75.2, 75.1, 69.8, 69.1, 68.8, 68.7, 68.6, 68.4, 68.3 (x2), 57.8, 52.9, 52.7, 52.5, 45.0, 44.9, 40.2, 40.0, 36.6, 32.3, 29.1, 26.0, 25.9, 25.8, 25.7, 19.0,

18.9, 17.8 (x2), 17.7 (x2), 17.6, 17.5, 13.8 ppm; HRMS (ESI) : m/z $C_{37}H_{59}N_{5}O_{17}Na [M+Na]^+$ 计算值: 868.3798, 实测值: 868.3808。

[0381] BSA缀合物5的制备: 将BSA (15mg) 三糖squarate S25 (3.8mg, 6.77 μ mol) 溶于0.1M PBS缓冲液 (pH9) (600 μ L) 中, 并在21 $^{\circ}$ C下缓慢搅拌3天。然后将反应混合物用Milli-Q水稀释, 通过微孔过滤管 (10,000MWC0, 4 \times 10mL) 过滤, 冻干, 得到BSA-缀合物5, 为白色泡沫 (17.6mg)。MALDI-TOF质谱分析表明缀合物5每BSA平均具有16.2个二糖。

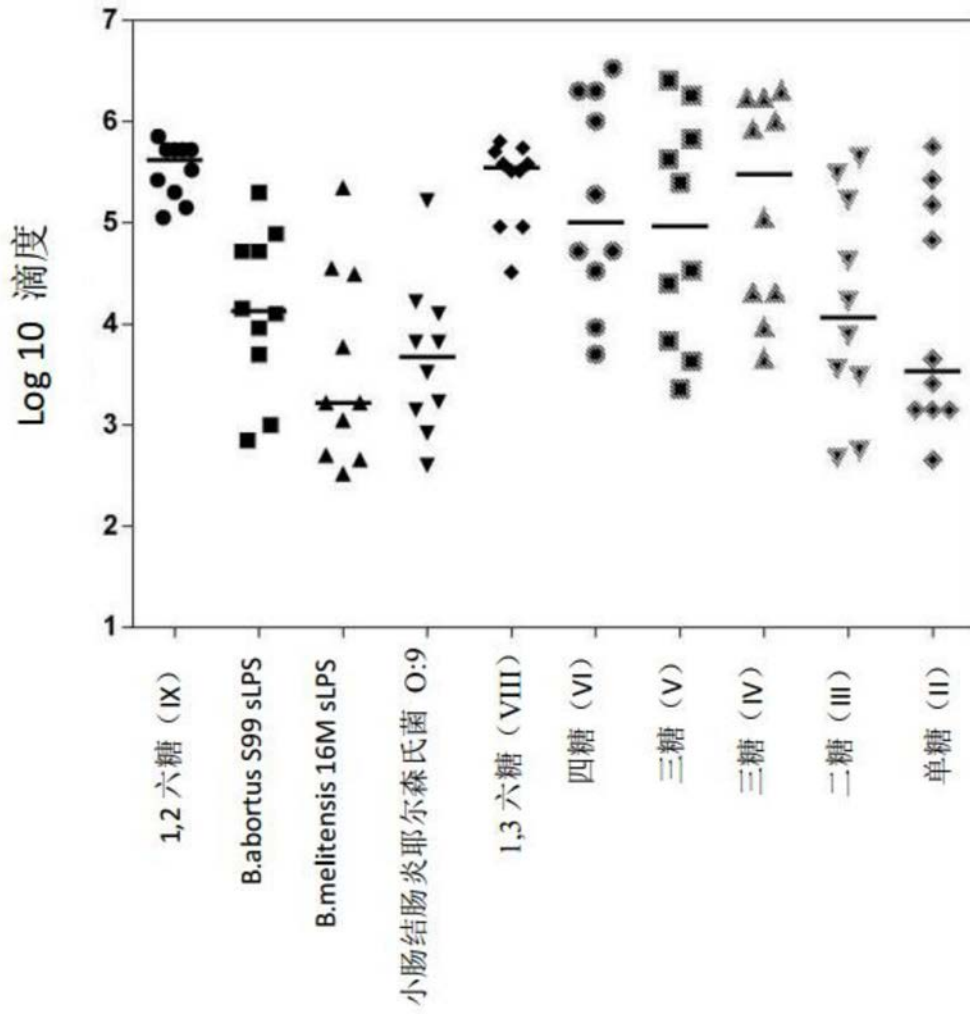


图1

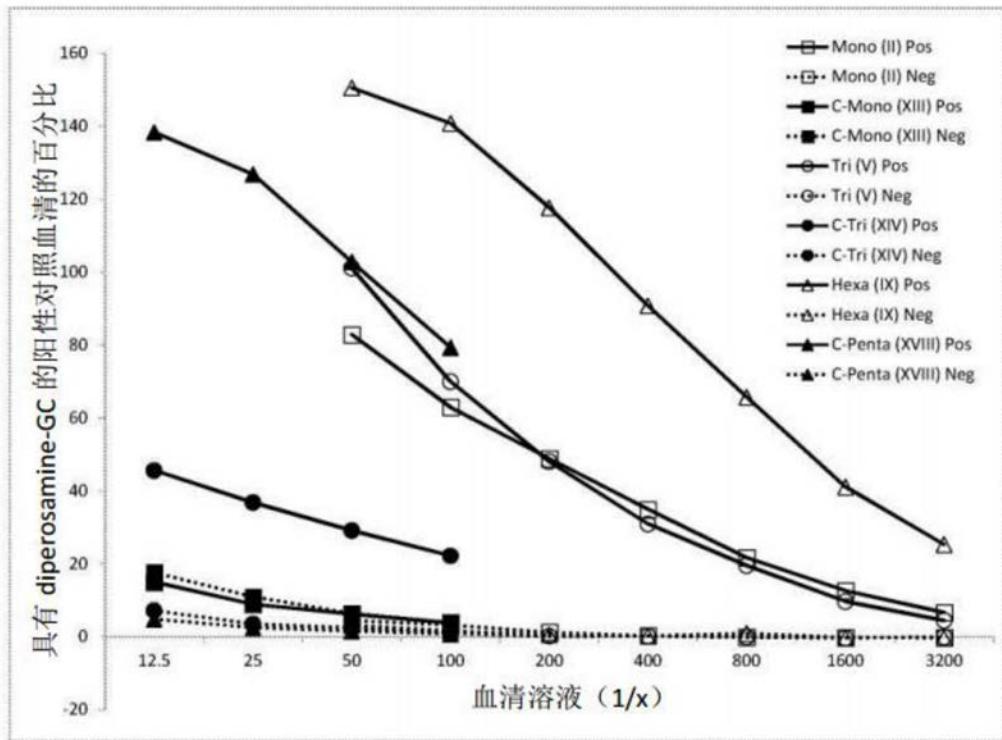


图2

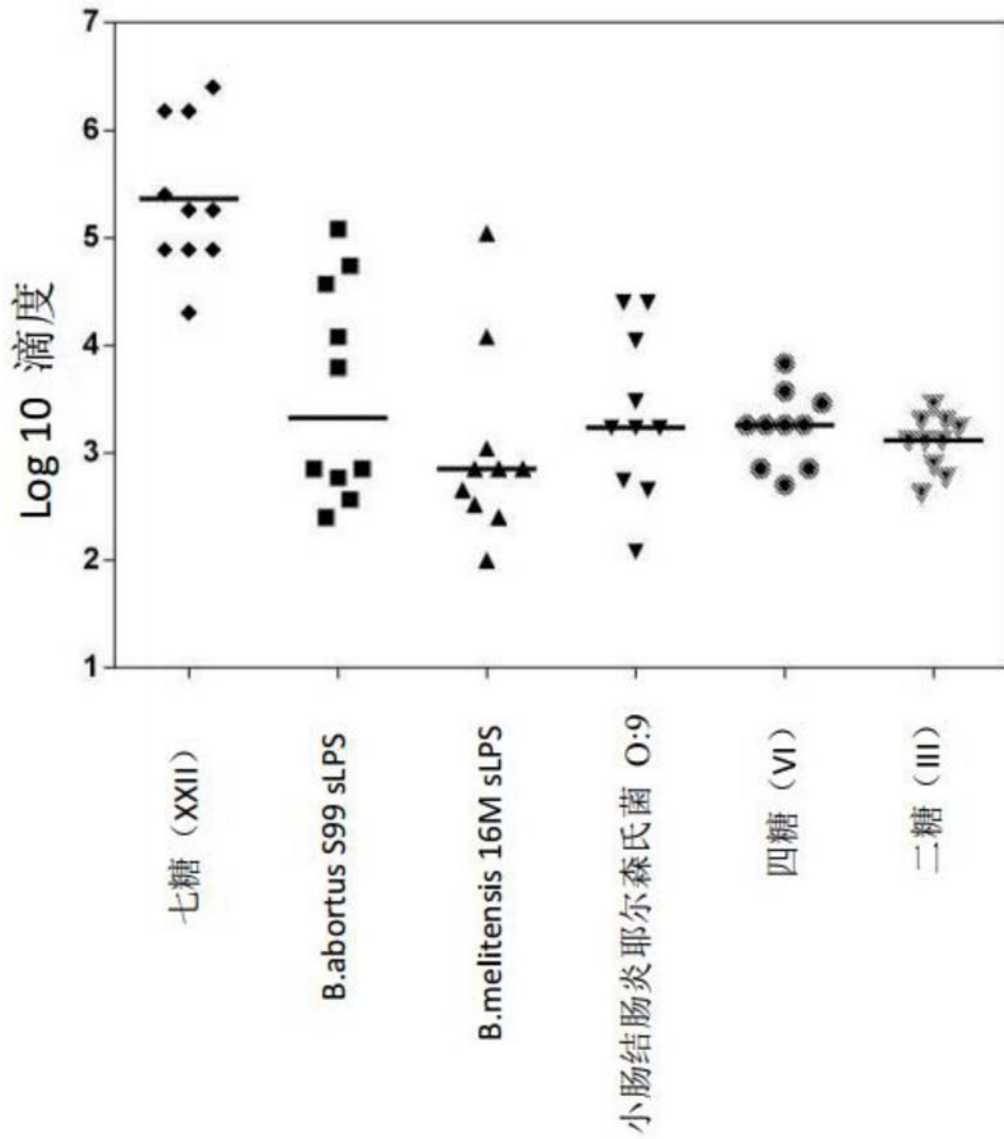


图3

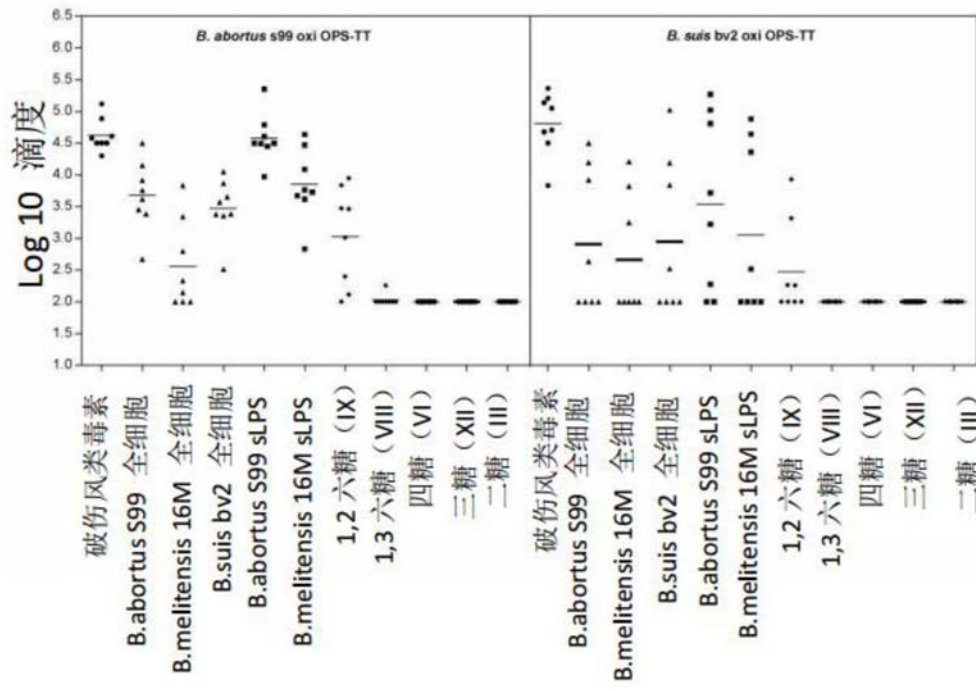


图4

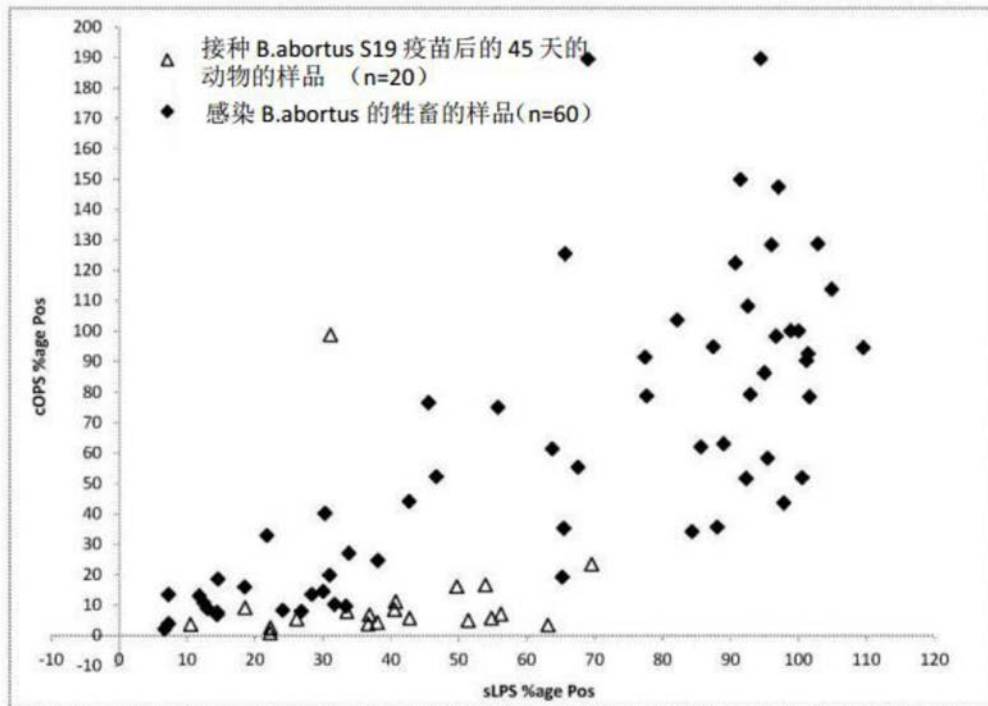


图5

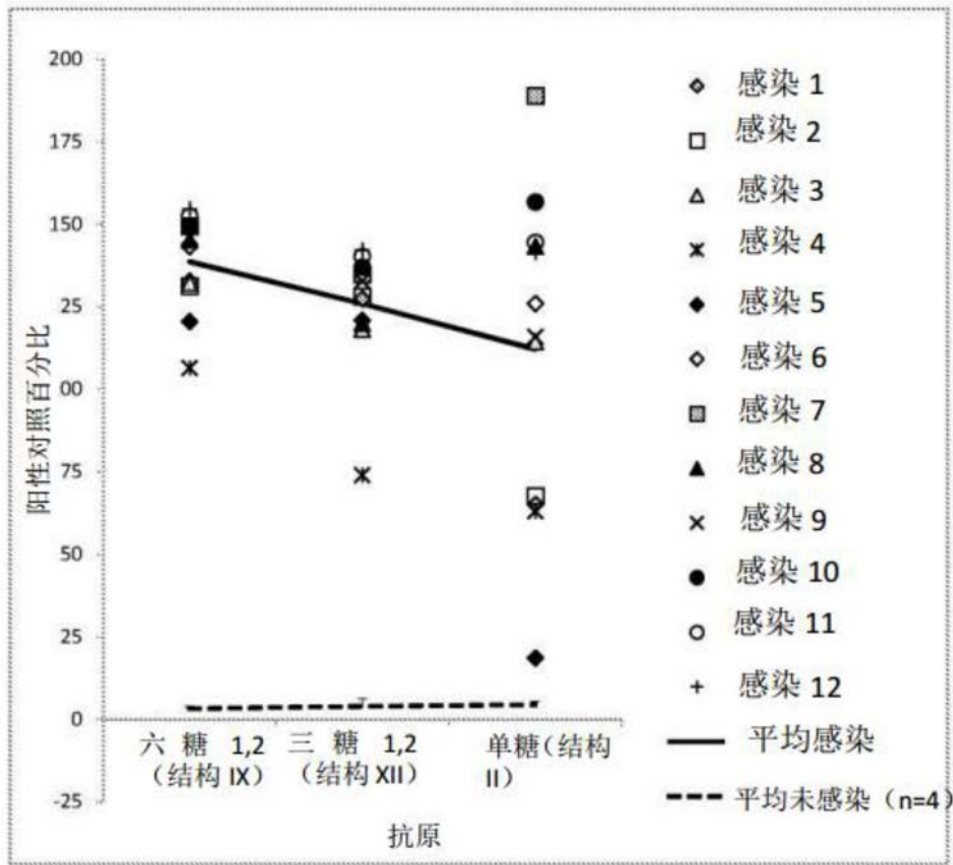


图6

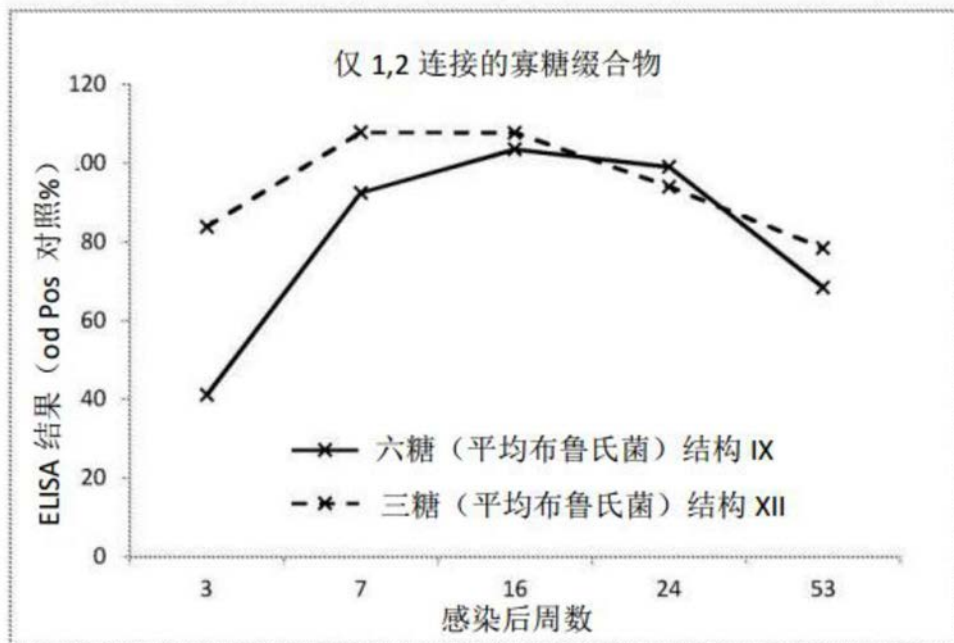


图7

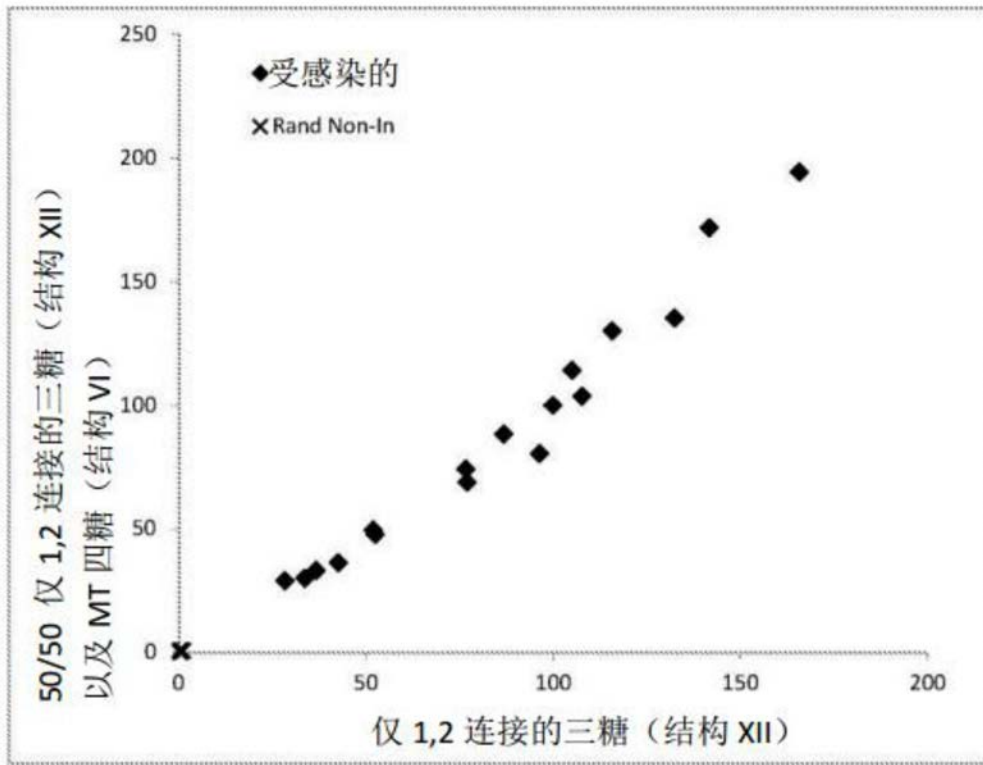


图8

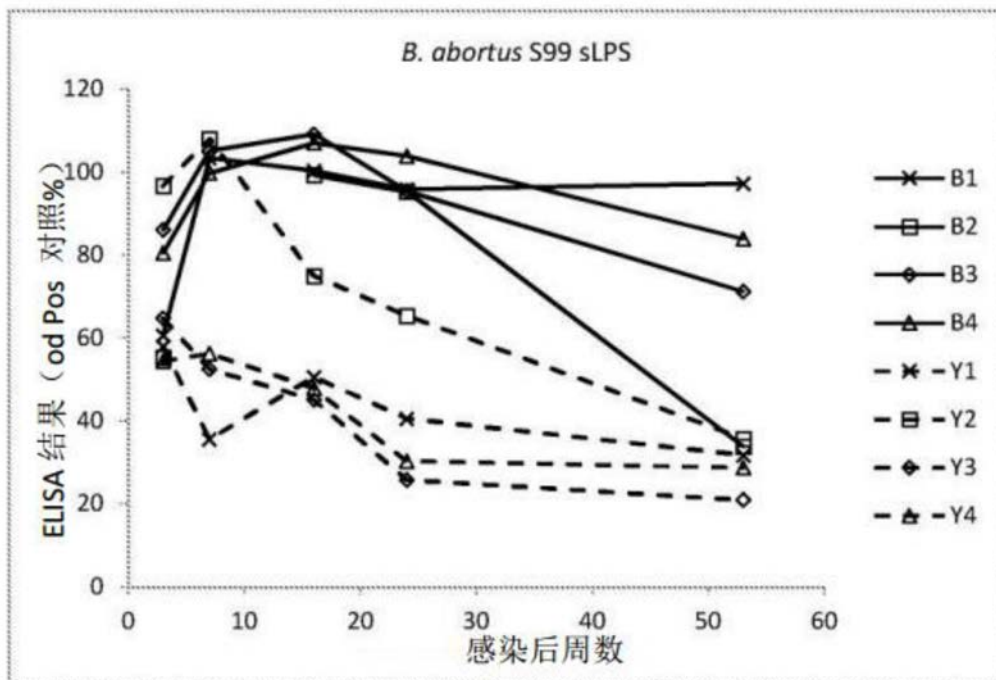


图9

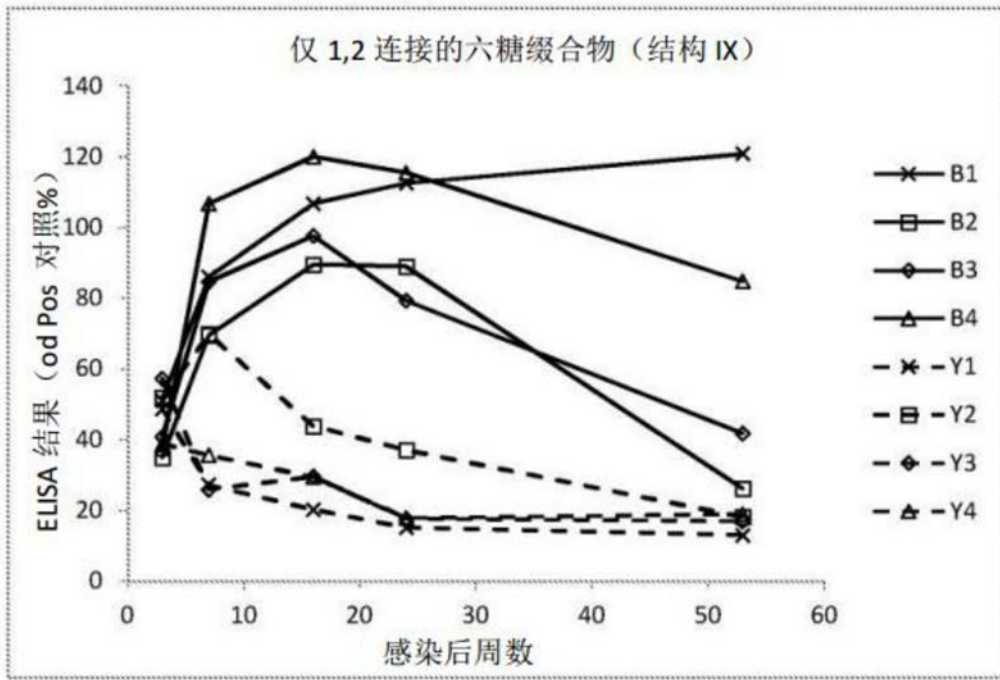


图10

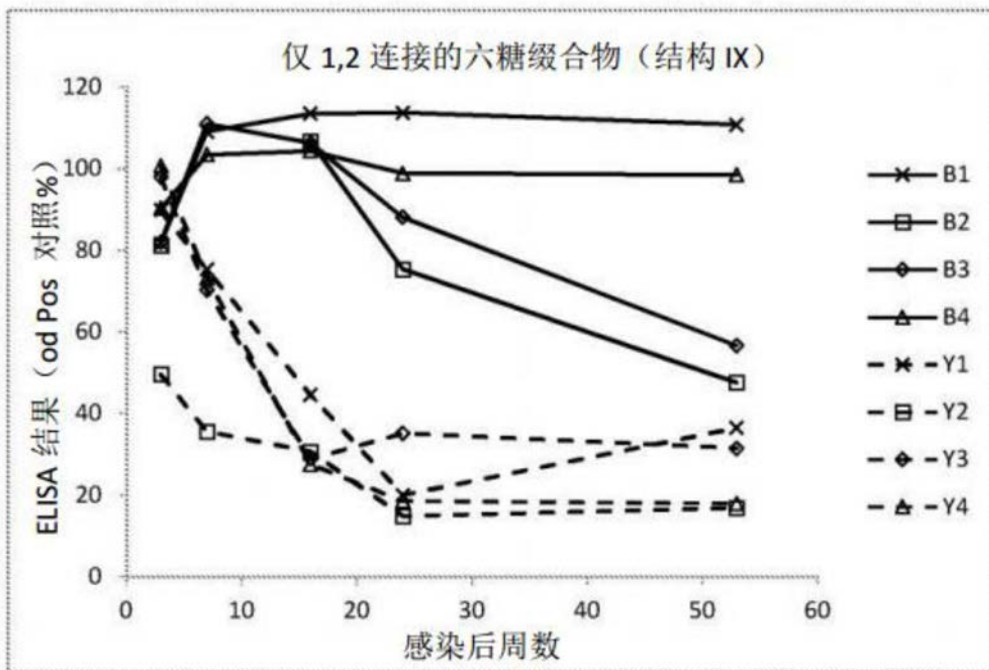


图11

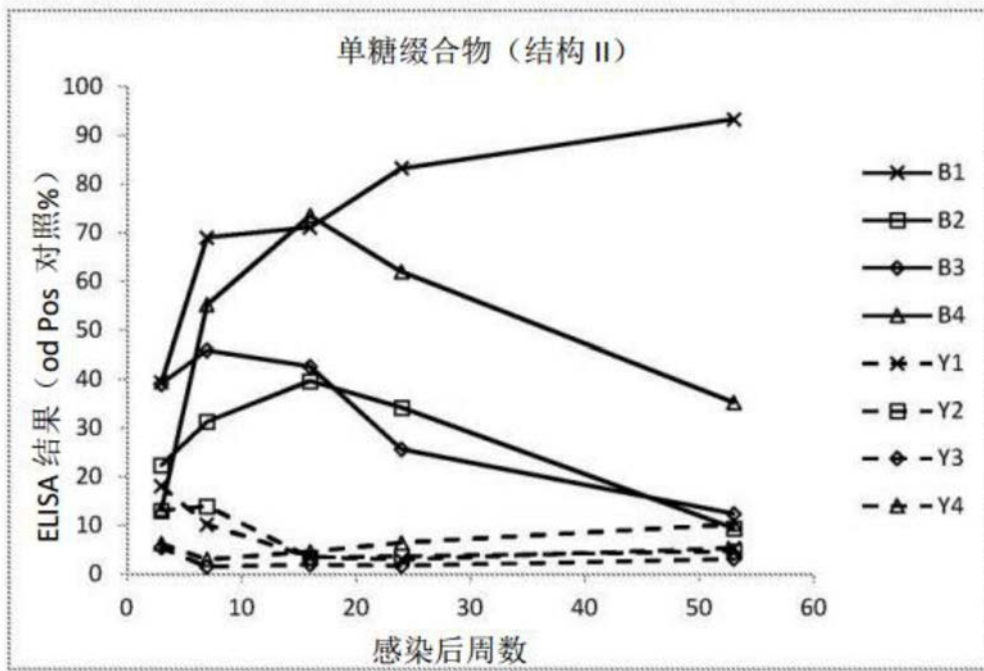


图12

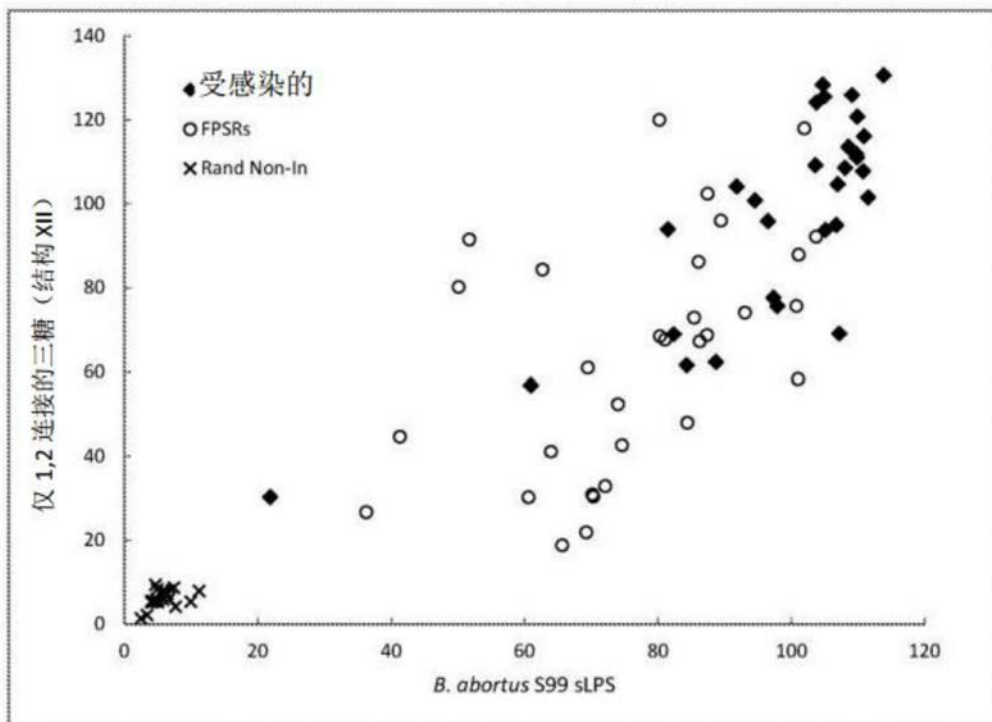


图13

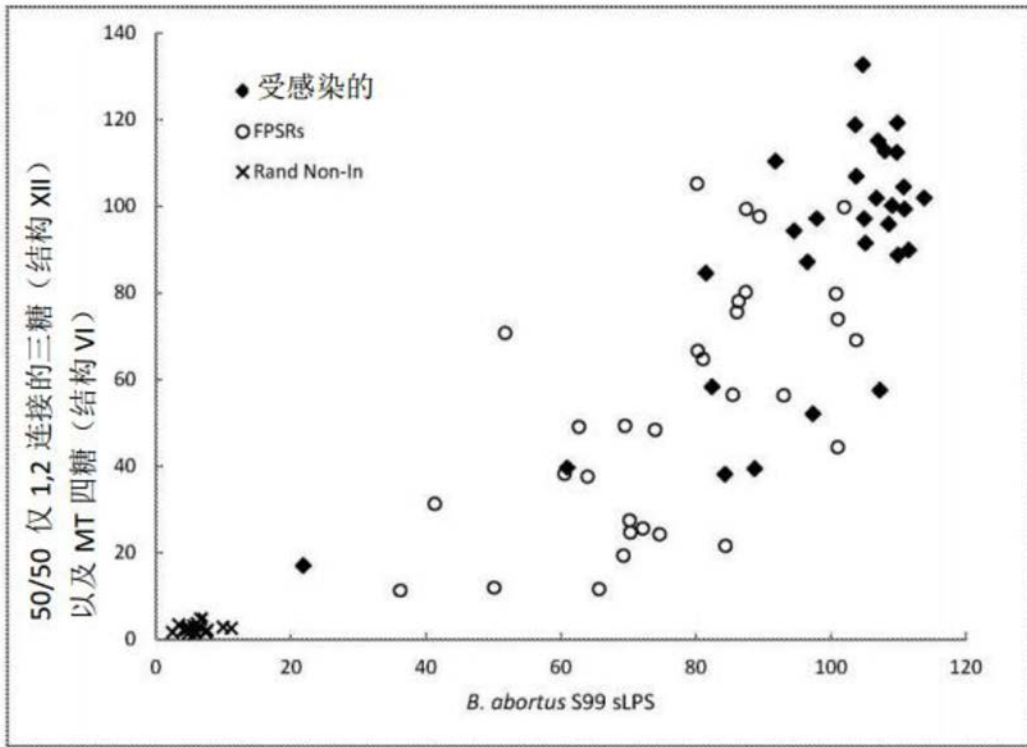


图14

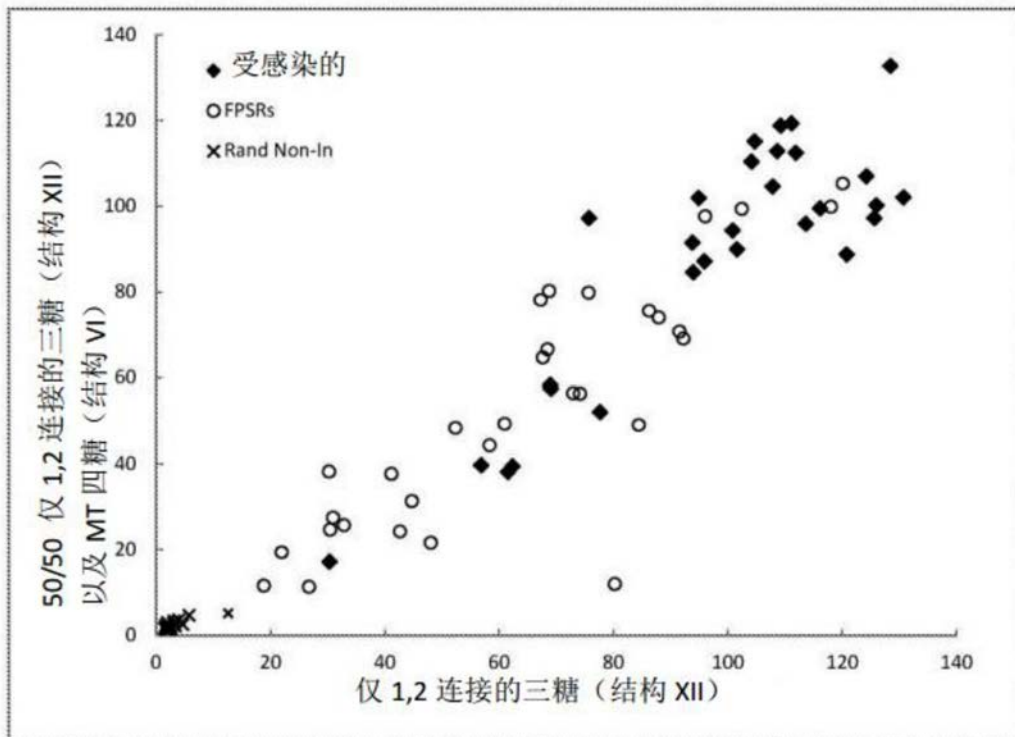


图15

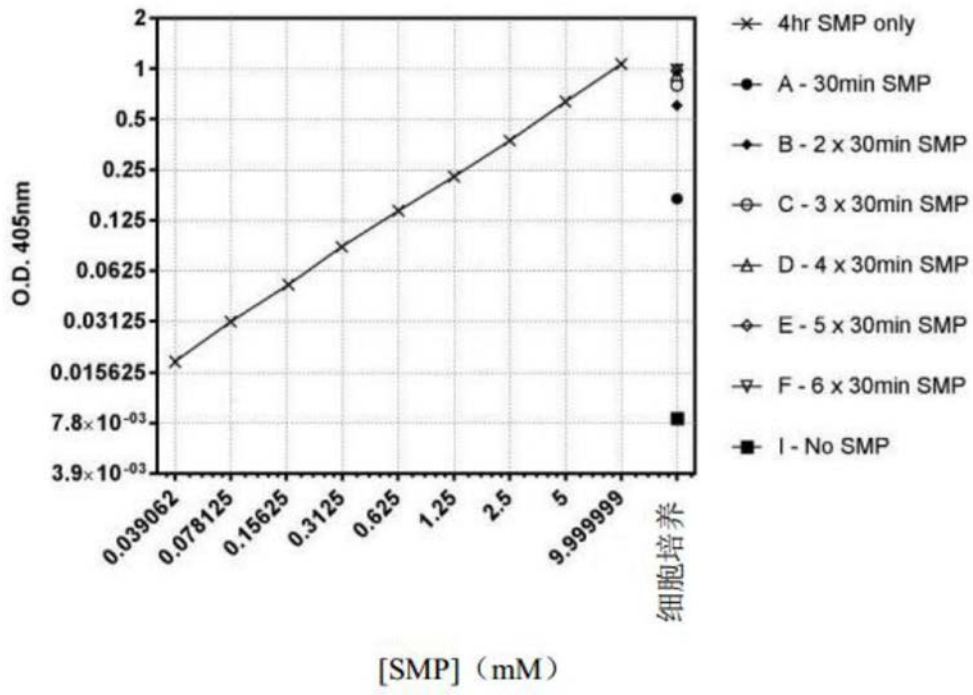
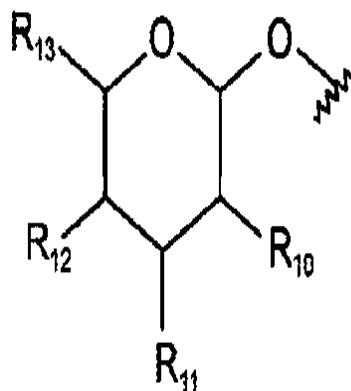


图16

专利名称(译)	包含至少7个单元的4,6-二氧-4-酰胺基- α -吡喃糖的封闭的低聚糖及其结合物作为预防由布鲁氏菌生物引起的感染的疫苗		
公开(公告)号	CN110072872A	公开(公告)日	2019-07-30
申请号	CN201780067550.7	申请日	2017-11-03
[标]发明人	约翰·麦克吉文 劳伦斯·豪厄尔斯 大卫·邦德		
发明人	约翰·麦克吉文 劳伦斯·豪厄尔斯 露西·唐科姆比 大卫·邦德 萨塔德·鲁·谢卡尔·曼达尔 萨斯米塔·萨卡尔		
IPC分类号	C07H5/06 C07H15/18 G01N33/53		
代理人(译)	董科		
优先权	2016018635 2016-11-04 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了一种分子，其包含4,6-二脱氧-4-酰胺基- α -吡喃糖的七个或更多个连续单元的链，每对单元通过C1-C2或C1-C3键连接，所述链具有末端和还原端，其中离还原端最远的链单元中的吡喃糖环与帽结构连接。帽结构不是4,6-二脱氧-4-酰胺基- α -吡喃糖。还提供了包含分子的疫苗组合物和对动物接种疫苗以预防感染布鲁氏菌生物体的方法，该方法包括区分免疫和感染动物。还提供了检测样本中抗布鲁氏菌抗体存在的新型方法。



结构式 2