

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年11月25日(25.11.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/134225 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/569 (2006.01) A61K 39/095 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/069532
- (22) 国際出願日: 2009年11月18日(18.11.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-122595 2009年5月20日(20.05.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人鳥取大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOTTORI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6808550 鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地 Tottori (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山崎 良平 (YAMASAKI, Ryohei) [JP/JP]; 〒6808550 鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地 国立大学法人鳥取大学内 Tottori (JP).
- (74) 代理人: 田中 光雄, 外(TANAKA, Mitsuo et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号IMPビル 青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

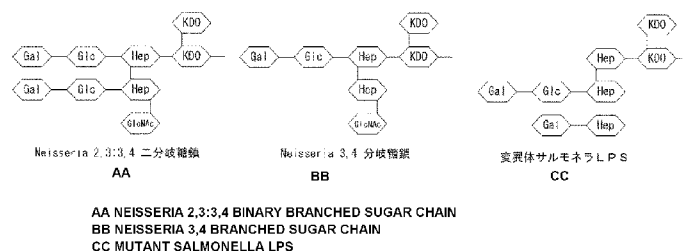
- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR DETECTION OF INFECTION BY PATHOGENIC NEISSERIA BACTERIA USING PARTIAL SUGAR CHAIN EPITOPE, AND VACCINE AGAINST THE BACTERIA

(54) 発明の名称: 部分糖鎖エピトープを用いた、病原性ナイセリア属細菌感染の検出方法およびそれら細菌に対するワクチン

[図1]



(57) Abstract: An attention is focused on a branched structure of a core sugar chain of LOS produced by meningitis-inducing bacteria (*Neisseria* bacteria), and a tool which enables the diagnosis of meningitis by utilizing not the entire structure of the sugar chain but a partial structure of the core sugar chain is provided. In deacylated LOS, a functional group such as a phosphate group and an acetyl group expressed in the core sugar chain is also removed, and therefore deacylated LOS cannot be utilized for detecting a bacterium capable of producing the core sugar chain containing such a functional group. Thus, also provided is a diagnosis tool which is free of the concerns for those constraints. Further disclosed is a vaccine against meningitis-inducing bacteria (*Neisseria* bacteria), which is prepared utilizing a partial structure of the core sugar chain without carrying out deacylation. The vaccine utilizes at least one (e.g., several) partial sugar chain containing the core sugar chain, and is a vaccine which is developed based on an innovative idea so as to deal with the mutation of meningitis-inducing bacteria (*Neisseria* bacteria).

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2010/134225 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

本発明は、髄膜炎起炎菌が産生するLOSの全ての糖鎖構造を利用するのではなく、コア糖鎖の分岐構造に着目し、コア糖鎖の部分構造を利用した髄膜炎の診断を可能とするツールを提供することを目的とする。また、本発明は、上記の脱アシル化したLOSでは、コア糖鎖内に発現するリン酸基、アセチル基等の官能基も除去することになり、このような官能基を含んだコア糖鎖を産生する細菌を検出できないため、このような制約を受けない診断ツールを提供することも目的とする。本発明の別の目的は、脱アシル化せずにコア糖鎖の部分構造を利用した髄膜炎起炎菌に対するワクチンを提供することである。コア糖鎖を含む部分糖鎖を1種以上、例えば数種使用することにより、髄膜炎起炎菌の変異に対応した、新しい発想に基づくワクチンを開発できる。

明 細 書

発明の名称：

部分糖鎖エピトープを用いた、病原性ナイセリア属細菌感染の検出方法およびそれら細菌に対するワクチン

技術分野

[0001] 本願は平成21年5月20日出願の日本国特許願（特願2009-122595）に基づく優先権を主張する。当該出願の全内容は引用により本明細書の一部をなす。

[0002] 本発明は、ナイセリア属細菌への感染を検出するためのツールとして、ナイセリア属細菌産生糖鎖部分構造を利用する方法およびバイオチップならびに該糖鎖部分構造を含むナイセリア属細菌に対するワクチンを提供する。

背景技術

[0003] インフルエンザb型細菌、淋菌または髄膜炎菌のような細菌感染によって引き起こされる細菌性髄膜炎は、その診断および治療が遅れると、致死率が増大し、治癒したとしても深刻な後遺症を伴う場合が多い。免疫力の低い乳幼児や子供をこのような細菌感染から守るために、欧米では1980年代からワクチン開発が行われてきている。しかしながら、髄膜炎菌の血清B型には、未だに有効なワクチンが存在しない。さらに、これらの細菌性髄膜炎の診断には酵素免疫法（EIA法）、液相ハイブリダイゼーション法、PCR法、LCR法等が用いられるが、いずれの方法も時間がかかる（例えば数日）ため、簡便で迅速な診断ツールの開発が求められている。

[0004] これまでは髄膜炎菌のワクチン開発は、これら細菌が産生する細胞外膜の糖質抗原であるカプセル多糖を用いて行われてきたが、近年、別の糖質抗原であるリポオリゴ糖(lipooligosaccharide、以下LOSと略)を用いた開発研究が行われている。LOSは、オリゴ糖とリピッドAと呼ばれる脂質が結合した複合糖脂質であり、宿主に対し免疫原性を有することから、これらの細菌への感染予防のためのワクチンの有望な標的と期待されて、その免疫化学

および構造研究が行われてきている。これらの研究によって、オリゴ糖鎖は変異の少ない属特有のコア糖鎖と可変糖鎖からなり、このような糖鎖構造がLOSの抗原性を支配することが見出されている。コア糖鎖に結合している可変糖鎖は、宿主の糖脂質の部分構造と同一であり、このことから、細菌は宿主の糖鎖構造を模倣して宿主の免疫監視機構をくぐり抜けるのではないかと示唆されている。

[0005] しかしながら、本発明者や他の研究者により、宿主と同一の糖鎖が存在してもLOSのコア糖鎖に結合する殺菌性抗体が存在することが明らかにされており、このコア糖鎖を標的としたワクチン開発の可能性が大きく浮かび上がってきている。これまでに、髄膜炎菌のLOSを標的としたワクチンとしては、タンパクと脱アシル化したLOSを結合したコンジュゲートとするアプローチ等が知られている。

特許文献1：特開2001-11096号公報

特許文献2：特開2000-9733号公報

特許文献3：特開2007-256214号公報

非特許文献1：山崎良平著、「細菌感染と糖鎖 病原性細菌の糖鎖抗原、リポオリゴ糖の構造との病原性における役割」、化学と生物、Vol. 41, No. 1, 2003, 15-21

非特許文献2：Yamasaki, R. Etc. J. Biol. Chem. 269, 30345-30351 (1994)

非特許文献3：Yamasaki, R. Etc. Biochemistry 30, 10566-10575 (1991)

非特許文献4：Mandrell, R. E. Etc. J. Exp. Med. 171, 1649-1664 (1990)

非特許文献5：Mandrell, R. E. Etc. Immunobiolo. 187, 382-402 (1993)

非特許文献6：Noda, K. Etc. FEMS Microbiol Lett. 2001 Dec 18; 205 (2) : 349-54

非特許文献7：Yamasaki, R. Etc. J. Carbohydr. Chem. 20, 171-180, 2001

非特許文献8：Leavell, M. D. Etc. J Am Soc Mass Spectrom. 2002 May; 13 (5) : 571-6

非特許文献9：Ishii, K. Etc. Carbohydr Res. 2002 Jan 7; 337(1) : 11-20

非特許文献10 : Kubo, H. Etc. Eur. J. Org. Chem. 1202-1213, 2004

非特許文献11 : Ishii, K. Etc. Eur. J. Org. Chem. 1214-1227, 2004

非特許文献12 : Yamasaki, R. Etc. J Biochem (Tokyo) 137, 487-94, 2005

非特許文献13 : Ichiyangi, T. Etc. Carbohydr Res. 2005 Dec 12; 340(17)
: 2682-7. Epub 2005 Sep 29

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] したがって本発明は、上記のような髄膜炎起炎菌が産生するLOSの全ての糖鎖構造を利用するのではなく、コア糖鎖の分岐構造に着目し、コア糖鎖の部分構造を利用した髄膜炎の診断を可能とするツールを提供することを目的とする。また、本発明は、上記の脱アシル化したLOSでは、コア糖鎖内に発現するリン酸基、アセチル基等の官能基も除去することになり、このような官能基を含んだコア糖鎖を産生する細菌を検出できないため、このような制約を受けない診断ツールを提供することも目的とする。

[0007] 本発明の別の目的は、脱アシル化せずにコア糖鎖の部分構造を利用した髄膜炎起炎菌に対するワクチンを提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 驚くべきことに、本発明者は、抗LOSヒトIgGが構造の異なるLOSおよびLPSに結合するが、これは単一の抗体が共通のエピトープを認識するのではなく、少なくとも三つのエピトープを認識する抗体の混合物、すなわちオリゴクローナル抗体がLOSおよびLPSに結合するという知見を得た。

[0009] すなわち本発明者は、まず髄膜炎起炎菌であるナイセリア属細菌、淋菌15235株 (Yamasaki, R. ら、J. Biol. Chem. 269, 30345-30351 (1994)) のLOSをリガンドとして淋菌感染ヒト血清についてアフィニティークロマトグラフィーを行って抗15235LOS IgGを得た。次に、この抗15235LOS IgGはそれぞれ構造が異なる淋菌JW31R株 (Yamasaki, R. ら、J. Biol. Chem. 269, 30345-30351 (1994))、淋菌WG株 (Yama

ki, R. ら、Eleventh international pathogenic Neisseria conference, 29 8. (1988))、淋菌PID-2株 (Schneider, H. ら、J. Exp. Med. 174, 160 1-1605 (1991))、淋菌MS 1 1 m k A株 (Kerwood, D. E. ら、Biochemistry 31, 12760-12768 (1992)) のLOSにも結合するが、淋菌の24-1株 (Gulati, S., ら、J. Infecti. Dis. 174, 1223-1237 (1996)) には結合しないことを見出した。

[0010] そして上記の抗15235 LOS IgGを15235 LOS、MS 1 1 m k A LOSおよびサルモネラミネソタRe 595 LPS吸着の前後で、JW31R LOS、MS 1 1 m k A LOS、PID-2 LOS、サルモネラミネソタRe 595 LPS、サルモネラミネソタRb LPSと接触させてそれぞれPAGE/ウェスタンブロットを実施した。その結果、サルモネラミネソタRe 595 LPS吸着後では、サルモネラミネソタRb LPSとサルモネラミネソタRe 595 LPSへの結合は検出できなかったが、15253 LOS、PID-2 LOS、MS 1 1 m k A LOS、JW31R LOSへの結合能は吸着前と比較して低下しないことを見出した。また、15253 LOSを用いて吸着した後では、15253 IgGは、JW31R LOS以外の、ナイセリア属LOSには結合しなかった。しかし、サルモネラ変異体LPS (RbとRe LPS)には結合した。この15253 LOS吸着実験と殆ど同一の結果が、MS 1 1 m k A LOSで吸着した場合で得られた。これらの吸着実験の結果より、IgG 2はオリゴクローナル抗体で少なくとも以下の三つのエピトープに結合することを見出した。1) JW31R LOS以外の、3, 4分岐LOSと2, 3:3, 4-二分岐LOSの糖鎖間に存在する交叉エピトープ、2) JW31R LOSの非還元末端部分に特異的に発現するエピトープ、3) KDO-KDO二糖の糖鎖エピトープ。更に、この抗体は、ナイセリア属とサルモネラ変異体のLOS・LPSだけでなく、ヘモフィルス属のLOSにも結合した。これらのエピトープは、3, 4分岐LOSと2, 3:3, 4-二分岐LOSの糖鎖全体でなく、コア糖鎖構造の一部、あるいは、可変部糖鎖の

一部を含む部分糖鎖構造である。本発明は、このような、宿主の抗体がLOSの可変部糖鎖を含むコア糖鎖の部分構造を認識する、という知見に基づいてなしたものである。

[0011] 上記知見に従って、本発明者は、次の糖鎖配列が免疫源糖鎖のヒト抗体に対するエピトープであることを見出した：

(1) Hep - (α 1 - 3) - Hep - (α 1 - 5) - Kdo - (α 2 - 4) - Kdo ;

(2) Glc - (β 1 - 4) - Hep - (α 1 - 3) - Hep - (3 - 1 α) - Glc - (4 - 1 β) - Gal ;

(3) GlcNAc - (α 1 - 2) - Hep - (α 1 - 3) - Hep ;

(4) Hep - (α 1 - 2) - Hep - (α 1 - 3) - Hep ;

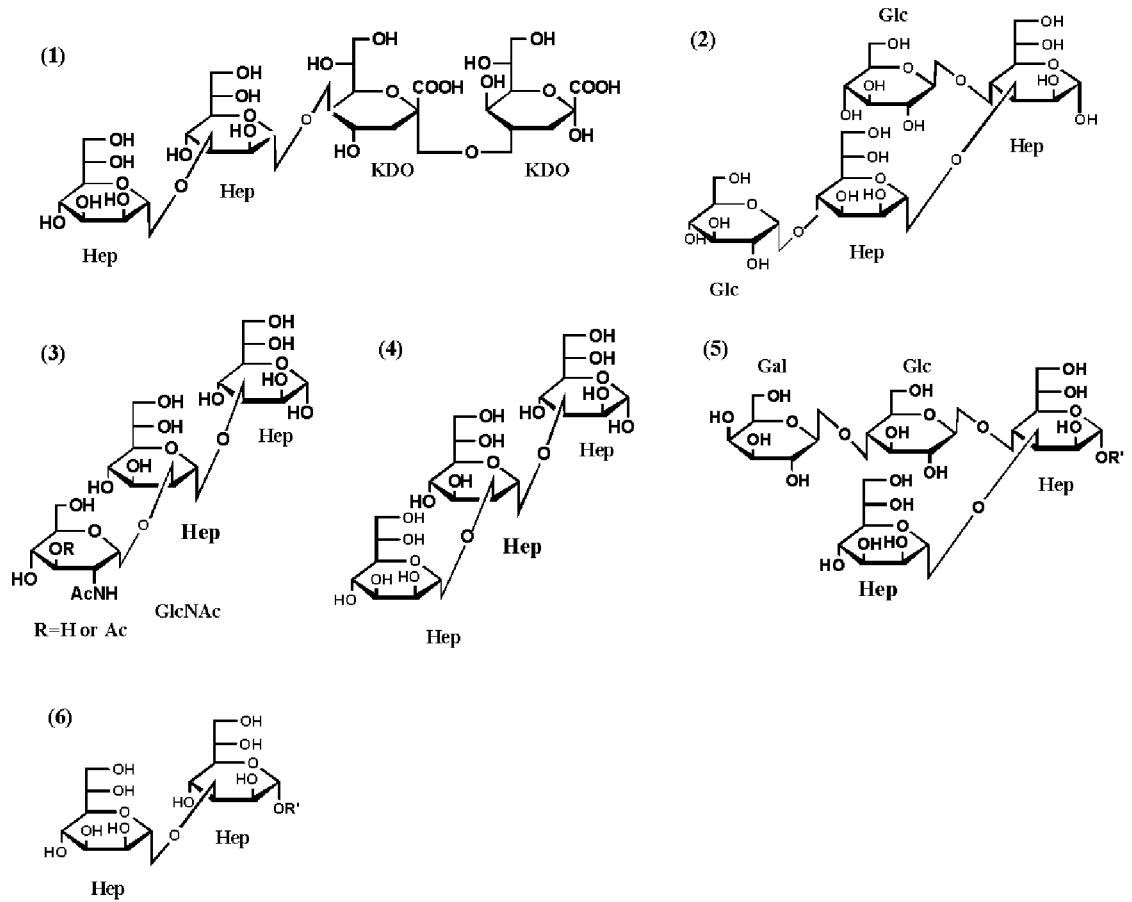
(5) Gal - (β 1 - 4) - Glc - (β 1 - 4) - Hep [I] - (3 - 1 α) - Hep [II] ; および

(6) Hep - (α 1 - 3) - Hep。

ここで、糖鎖(4)はヘモフィルス属細菌のLOSに由来し、それ以外の糖鎖、すなわち糖鎖(1)～(3)、(5)および(6)はナイセリア属細菌のLOSに由来する。

[0012] 上記(1)～(6)の配列を有する単離糖鎖分子の構造は、それぞれ次の通りである：

[化1]



発明の効果

[0013] このアプローチにより、特定の細菌固有な糖鎖部分構造、あるいは、共通の糖鎖構造を利用したツールの開発が可能となる。これら1種以上、例えば2～5種の部分糖鎖構造を用いることにより、可変糖鎖構造の変化に帰結する細菌の変異に対応したツール、例えば検出ツールまたはワクチンを提供することができる。すなわち、複数の糖鎖を用いて淋菌と髄膜炎菌の区別、あるいは髄膜炎菌の血清型を特定することができる。また、このアプローチでは、官能基を含んだ合成糖鎖を構築することにより、官能基を含んだコア糖鎖を産生する細菌に対応したツールを提供することができる。

[0014] 特に本発明は、上記した特定の細菌固有な糖鎖部分構造をマイクロチップ上にアレー化した診断ツールを提供する。このアレー化糖鎖チップを用いて宿主が細菌感染後産生する抗体を検出することによって、宿主の細菌感染を

迅速かつ正確に診断することができる。このツールには、幼児からの採血も考えて、微量の血液での検出を狙い、フェムトモルレベルの糖鎖を検出するツールとして開発する。

図面の簡単な説明

[0015] [図1] ナイセリア 2, 3 : 3, 4-二分岐 LOS、ナイセリア 3, 4 分岐 LOS と変異体サルモネラ LPS の構造。

[図2] ヒト血清中の抗 LOS-抗体 (IgG) とマイクロアレー化した LOS の結合、A : ヒト血清 25 倍希釈、B : ヒト血清 50 倍希釈。

[図3] MALDI-MS 分析 (positive mode), A : ヒト血清アルブミン (HSA) と B : 四糖-HSA コンジュゲート。ジヒドロキシ安息香酸をマトリックスとして使用。

[図4] 免疫プロット分析、A : 15253 LOS (1 : 250 pg、2 : 500 pg、3 : 750 pg、4 : 1 ng)、B : 四糖コンジュゲート (1 : 10 ng、2 : 100 ng、3 : 1 μg、4 : 5 μg)、C : 二糖コンジュゲート (1 : 250 ng、2 : 1 μg、3 : 5 μg、4 : 25 μg)。

発明を実施するための最良の形態

[0016] 第 1 の態様において、本発明は、対象がナイセリア属細菌および/またはヘモフィルス属細菌に感染していることを評価するための方法であって、対象から得られた試料と以下の糖鎖配列からなる糖鎖分子：

(1) Hep - (α 1-3) - Hep - (α 1-5) - Kdo - (α 2-4) - Kdo ;

(2) Glc - (β 1-4) - Hep - (α 1-3) - Hep - (3-1 α) - Glc - (4-1 β) - Gal ;

(3) GlcNAc - (α 1-2) - Hep - (α 1-3) - Hep ;

(4) Hep - (α 1-2) - Hep - (α 1-3) - Hep ;

(5) Gal - (β 1-4) - Glc - (β 1-4) - Hep [I] - (3-1 α) - Hep [II] ; および

(6) Hep - (α 1-3) - Hep

の1種または複数（以下、本発明の糖鎖と略）を接触させ、糖鎖-抗体結合体の存在を検出することを含む方法を提供する。

[0017] 別の態様において、本発明は、対象がナイセリア属細菌および/またはヘモフィルス属細菌に感染していることを評価するためのチップであって、固相支持体と、該固相支持体に結合した本発明の糖鎖を含むチップを提供する。

[0018] 上記糖鎖配列において使用している略語「H e p」、「K d o」、「G l c」、「G l c N A c」および「G a l」は、それぞれヘプトース、2-ケトデオキシオクトン酸、グルコース、N-アセチルグルコサミンおよびガラクトースを意味する。糖間のギリシャ文字及び数字は、糖間の結合部位および結合様式を示す。例えばH e p - (α 1 - 3) - H e p は、ヘプトースとヘプトースが1位と3位で α 結合していることを意味している。

[0019] 本明細書において測定される細菌は好ましくはナイセリア属細菌であり、ナイセリア属細菌は、淋菌 (*N. gonorrhoeae*) と髄膜炎菌 (*N. meningitidis*)、特に髄膜炎菌を意味するが、これらに限定されない。ヘモフィルス属細菌は、典型的にはインフルエンザb型細菌を含むが、これに限定されない。

本明細書において、対象は、ナイセリア属細菌に感染しているか、感染した疑いがあるか、または感染する可能性のある対象、特にヒトを意味する。対象から得られた試料は、対象の血液、血清、血漿、唾液、涙液、尿、糞便、脳脊髄液を含むが、これらに限定されない。好ましい対象から得られた試料は、採取の簡便さと抗体含有量から、血液または血清である。

[0020] 従ってより好ましい態様において、本発明は、対象がナイセリア属細菌に感染していることを評価するための方法であって、対象から得られた試料と以下の糖鎖配列からなる糖鎖分子：

(1) H e p - (α 1 - 3) - H e p - (α 1 - 5) - K d o - (α 2 - 4) - K d o ;

(2) G l c - (β 1 - 4) - H e p - (α 1 - 3) - H e p - (3 - 1 α) - G l c - (4 - 1 β) - G a l ;

(3) GlcNAc - (α 1-2) - Hep - (α 1-3) - Hep ;

(5) Gal - (β 1-4) - Glc - (β 1-4) - Hep [I] - (3-1 α) - Hep [II] ; および

(6) Hep - (α 1-3) - Hep

の1種または複数を接触させ、糖鎖-抗体結合体の存在を検出することを含む方法を提供する。

[0021] 糖鎖-抗体結合体は、本発明の糖鎖を免疫特異的に認識する抗体が本発明の糖鎖と結合することによって形成される結合体である。抗体と糖鎖を接触させると抗原-抗体反応によって結合体が生じる。結合体形成のための条件は、使用する抗原糖鎖の種類、抗体の濃度、使用する媒体等の多様な要因によって決定することができるが、典型的には、0~40℃、例えば15~37℃で短時間、例えば1分~3時間、好ましくは1.5時間以下、静置乃至ゆるやかな攪拌下で、例えば流動床インキュベーターを用いて、抗体と糖鎖を接触させて結合体を形成させることができる。

[0022] 糖鎖-抗体結合体の検出は、当該技術分野において既知の何れかの方法を用いて行うことができる。かかる検出方法は、例えばドットブロット法、化学発光法、2次抗体を用いたイムノアッセイ、表面プラズモン共鳴、質量分析等を含むが、これらに限定されない。また、本発明の評価方法において、1種の糖鎖のみならず、複数種の糖鎖を用いるか、そして/または本発明の糖鎖以外の多糖、例えばインフルエンザb型細菌または髄膜炎菌の感染について評価することができると知られているインフルエンザb型細菌または髄膜炎菌のカプセル多糖を用いた評価を組み合わせてもよい。かかる組合せ評価によって、より信頼性の高い評価を行うことができる。

[0023] より具体的な態様において、糖鎖-抗体結合体は、当業者に周知のイムノアッセイ法により検出することができる。イムノアッセイ法では、特異的に結合した抗体分子を認識する2次抗体、好ましくは本発明の糖鎖が認識した部位と異なる部位で結合する2次抗体を用いる。そのようなイムノアッセイ法では、抗体を蛍光標識するか、またはすべての免疫グロブリンに結合する

蛍光標識プロテインAと本発明の糖鎖またはそれを含むチップを接触させることにより、結合抗体そのものを検出することができる。あるいは、2次抗体は蛍光標識されていてもよく、またはそれらはレポーター酵素に結合しており、この酵素が検出可能な化合物の産生を仲介してもよい。当技術分野で既知のイムノアッセイのあらゆる変法を本発明に使用できる。

[0024] 他の態様においては、当業者に周知の競合アッセイ法により糖鎖-抗体結合体を検出することができる。本発明の糖鎖またはチップに結合した糖鎖と対象から得られた試料を接触させた後、各ターゲット抗体を所定の量で含有する溶液を添加する。これらのターゲット抗体は、それらを検出できるように、当技術分野で既知の任意の方法で蛍光標識されている。標識した抗体分子は、糖鎖への結合に対し競合する。平衡成立時の標識分子の量を用いて、対象から得られた試料に含有されていた抗体分子の量を計算する。

[0025] より好ましい態様において、本発明の糖鎖は、糖以外の担体分子、例えばタンパク質または脂質とのコンジュゲートとしてもよい。本発明の糖鎖末端を当該技術分野において既知の方法でスペーサー化し、当該スペーサー部分を介して担体分子と複合化してもよい。使用することができる担体分子としては、例えばヒト血清アルブミン（HSA）、ウシ血清アルブミン（BSA）、カルボシラン、セラミド、アシルオキシ脂肪酸誘導体等の脂質等が含まれるが、これらに限定されない。担体分子に結合する糖鎖は1個以上、例えば1~3個であってよく、さらに複数のコンジュゲートが dendrimer を形成してもよい。複数個の糖鎖のコンジュゲートとすることによって、抗体との結合能を向上させ、したがって抗体感度を向上させ、あるいはそのようなワクチンとすることによって優れた抗体提示能を与えることができる。

[0026] 本明細書において、スペーサーは、例えばアルキル鎖、エーテル鎖およびペプチド鎖であり得るが、これらに限定されない。典型的なスペーサーは、3~50個、例えば5~20個、好ましくは7~15個の炭素原子を有するアルキル鎖またはエーテル鎖である。スペーサー構造は、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、ヒドロキシ、 C_{1-6} アルコキシ、ヒドロ

キシC₁₋₆アルキル、オキシ(=O)、カルボキシ、C₁₋₆アルキル-カルボキシ、アミノ、C₁₋₆アルキル-アミノ等を含むがこれらに限定されない置換基で置換されていてもよい。

[0027] 本発明の糖鎖は、当該技術分野において既知の方法によって、それ自体標識化されていてもよい。例えば、本発明の糖鎖は、当該技術分野において周知の方法によって検出可能な物質、例えば蛍光色素分子、放射性同位体等を含んでいてもよい。

[0028] 本発明の糖鎖は、当該技術分野において既知の化学合成、半合成または発酵によって製造することができる。使用する反応条件等は、目的とする最終生成物、使用する出発物質、製造スケールなどによって、適宜選択することができる。半合成によって本発明の糖鎖を得る方法として、例えばナイセリア属細菌から糖脂質を単離し、目的とする糖鎖が得られるように当該糖脂質を酵素的に切断することによって、本発明の糖鎖を製造することができる。あるいは化学合成によって本発明の糖鎖を得るための方法として、例えば本明細書の実施例に記載の方法によって、HSAとのコンジュゲートとした本発明の糖鎖(4)を製造することができる。

[0029] 本発明においてチップは、本発明の糖鎖を固体支持体表面にアレーしたチップである。固体支持体にはラングミュアープロジェクト膜、機能性ガラス、ゲルマニウム、シリコン、PTFE、ポリスチレン、ヒ化ガリウム、金および銀が含まれるが、これらに限定されない。アミノ、カルボキシ、チオール、またはヒドロキシなどの官能基を固体支持体表面に取り込ませてもよい、当該技術分野で既知の何れかの他の材料も使用できる。固体支持体の形状にも何ら制限はなく、プレート状、ウエル状、ビーズ状、繊維状、棒状、粉末状などであってよい。また、表面プラズモン共鳴装置のキュベットなど周知の測定装置の部品に直接組み込むこともできる。

[0030] 本発明の糖鎖は、当該技術分野において既知の何れかの方法によって固体支持体に固定することができる。かかる方法には、フォトリソグラフィ、光活性化可能なビオチン誘導体を用いてアビジン結合を空間的に配置する方

法、鋳型スタンピングおよびインクジェット法等が含まれるが、これらに限定されない。あるいは、エチレングリコールオリゴマー、ジアミンおよびアミノ酸のような架橋基を用いて本発明の糖鎖を固体支持体に固定してもよい。複数の糖鎖を1つの固体支持体に固定するとき、固体支持体の表面領域を適切なサイズに区切って、区分領域毎に特定の1種の糖鎖を固定化してもよい。

[0031] 本発明の方法またはチップによって、対象から得られた試料中の標的抗体を例えばフェムトモルオーダー、例えば10フェムトモルオーダーで検出することができる。

[0032] 本発明の別の態様において、ナイセリア属細菌および/またはヘモフィルス属細菌、好ましくはナイセリア属細菌に対する免疫を獲得させるためのワクチンであって、本発明の糖鎖の1種または複数を含むワクチンを提供する。本発明のワクチンは、他の抗原および免疫調節剤、例えば免疫グロブリン、サイトカイン、リンホカインおよびケモカインを含んでいてもよい。

[0033] ワクチンは、一般に、1種以上の薬学的に許容される賦形剤またはビヒクル、例えば、水、生理食塩水、グリセロール、エタノール等を含む。さらに、補助物質、例えば湿潤剤乳化剤またはpH緩衝化物質等を含んでいてもよい。

[0034] さらに本発明のワクチンは、その有効性を増強するためのアジュバントを含んでいてもよい。アジュバントは、ワクチン組成物に直接添加され得るか、または別に（ワクチン投与と同時または直後のいずれかで）投与され得る。このようなアジュバントとしては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：（1）アルミニウム塩（ミョウバン）例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなど；（2）水中油型エマルジョン処方物、例えばMF59（国際公開第WO 90/14837号）、SAFおよびRib i アジュバントシステム（RAS）（Ribilmunochem、Hamilton、MT）；（3）サポニンアジュバント（例えば、Stimulon（商標）（CambridgeBioscience、Worcester、MA）またはISCOM（免疫刺激複合体））；（4）完全

フロイントアジュバント（CFA）および不完全フロイントアジュバント（IFA）；（5）サイトカイン（例えば、インターロイキン（IL-1、IL-2など）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、腫瘍壊死因子（TNF）など；ならびに（6）免疫刺激剤として作用して組成物の有効性を増強し得る他の物質。

[0035] 典型的には、ワクチンは、注射溶液または懸濁液の形態であり、あるいは注射の直前に液体ビヒクルと混合して溶液または懸濁液とするのに適切な凍結乾燥形態であってもよい。ワクチンはまた、リポソーム中に乳化またはカプセル化されていてもよい。かかる本発明のワクチンは、1回または複数回の投与レジメンで、非経口（例えば、注射により、静脈内、皮下、または筋肉内）投与することができる。投与するワクチンの量は、対象の体重、年齢、一般的な健康状態、性別、動物種等に基づいて臨床医、医師または獣医が適切に決定することができる。

[0036] 以下、本発明を実施例によりさらに説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。実施例の方法のあらゆる変法は当業者に容易に理解され、したがってこれらの態様も本発明の一部を成す。

実施例 1

[0037] LOSのフェムトモルレベルでの分析

ヒト血清と15253 LOSを用いて、マイクロアレー化したLOSの検出限界を確認した。25~100 pgのLOSをマイクロドット（3 nl）して、それぞれ、10~50倍の希釈でヒト抗体の結合を確認できるかどうかの試験をした。ニトロセルロース膜に25~100 pgのLOSをドットし、1% PBS中カゼインでブロック後、希釈したヒト血清で一時間インキュベートし、抗ヒトIgG（1:3000、アルカリホスファターゼコンジュゲート）で更に一時間インキュベート後、ウェスタンブルーで染色した。実験結果の一部を、図2に示す。このスクリーニングの結果、50倍希釈の血清を用いた場合でも250 pg（50フェムトモル）のLOSを検出できた。25倍希釈の血清では、25 pg（5フェムトモル）のLOSへのヒト

I g Gの結合を確認できた。100倍希釈の血清では、500 pg (100フェムトモル) のLOSへの結合を確認出来た。かかる結果は、フェムトモルレベルのLOSのヒト血清の検出が可能であると同時に、LOSは抗ヒトI g Gで行っているために、このフェムトレベルのLOSに結合する抗体の検出も可能であることを示す。すなわち、微量の細菌糖質抗原と共にその抗体の検出も可能であることを意味し、微量の血液サンプルで分析が必要な乳幼児の診断ツールとしても使用可能であることを示す。

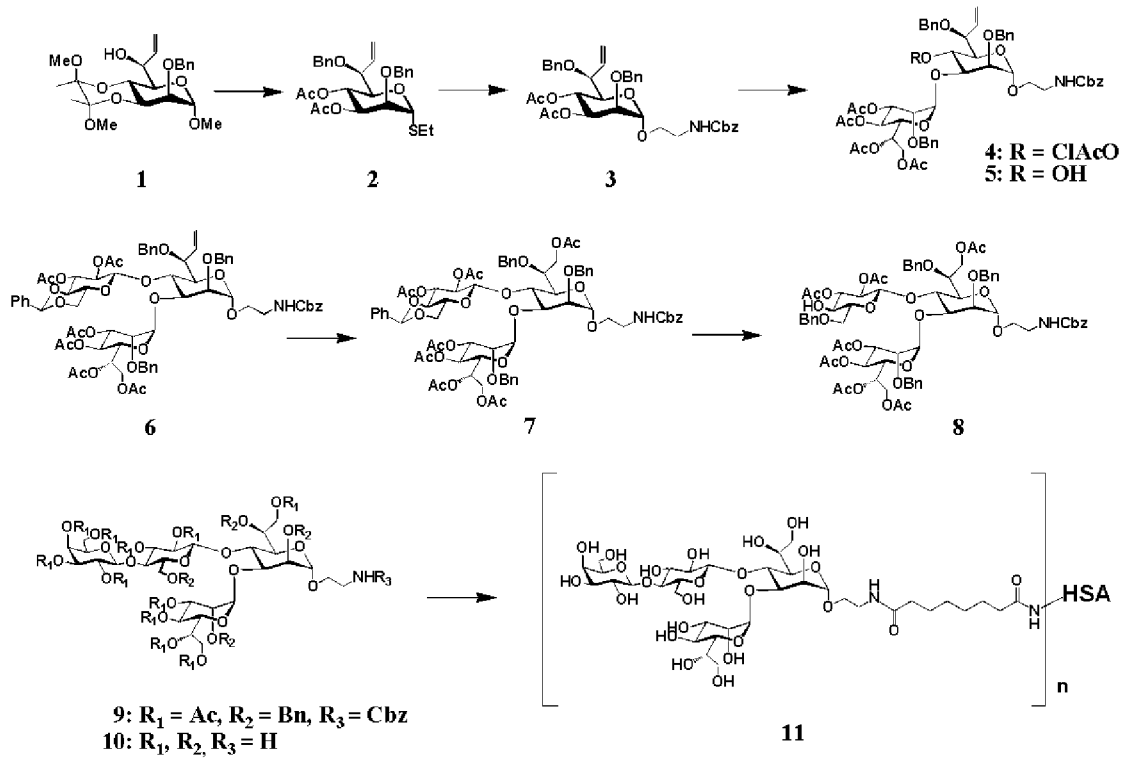
[0038] 四糖コンジュゲートGal (β 1-4)Glc (β 1-4)Hep {3-1 α Hep} - スペーサー-ヒト血清アルブミン (HSA) の合成

この糖鎖部分の構築は、オリゴ糖鎖を構築後スペーサー化するのではなく、還元末端のヘプトース (Hep) をスペーサー化後、3, 4分岐糖鎖を合成した。下記スキームに示すように、まず、還元末端のスペーサー化は、Hep合成中間体であるoctaenopyranoside 1をベンジル化 (DMF中BnBr/NaH, 88%)、脱アセタール化 (90% TFA, 88%)、アセチル化 (ピリジン/Ac₂O, 95%)、アセトリシス (83%) 後、エチルチオ配糖体2に変換し (EtSH: 15当量, BF₃/Et₂O: 5当量, CH₂Cl₂: Et₂O = 3: 2, 30°C, 3h, 93%)、グリコシル化反応 (アクセプター: 5当量, NIS: 2当量, TfOH: 0.02当量, CH₂Cl₂: Et₂O = 1: 1, -20°C, 45min, 92%) によりスペーサーを導入したoctaenopyranoside 3を合成した。この化合物3を脱アセチル化 (NaOMe/MeOH, 97%) し、3位をエチルシリル化 (TESCl/ピリジン, r.t., 1.5h, 87%) 後、クロロアセチル化 (CH₂Cl₂中ClCH₂COCl: ピリジン = 15: 1, 0°C, 9h, 80%) し、脱シリル化 (90% TFA, 90%) することにより、3-OH受容体を合成した。この受容体とヘプトース供与体とのグリコシル化反応 (ヘプトシルドナー: 3当量, TMSOTf: 0.01当量, CH₂Cl₂, -15°C, 10min) により、 α (1-3)結合したHep-Oct誘導体4を88%の収率で合成した。この4を脱クロロアセチル化 (チオウレア: 3当量, NaHCO₃: 1.1当量

, 70°C, 12 h, 85%) し、分岐糖鎖合成の受容体5を合成した。この5とエチル-2,3-ジ-O-アセチル-4,6-O-ベンジリデン-1-チオ-グルコシルピラノシドを反応(グリコシルドナー:4当量, NIS:2当量, TfOH:0.02当量, CH₂Cl₂, -72~18°C, 1.5h)させ、目的とする3糖6を68%で得た。この6をオスミレーション、NaIO₄酸化、NaBH₄還元し還元末端をHep(7)に変換(2段階, 92%)した。4,6-O-ベンジリデンを選択的に解裂(TES:3当量, TfOH:1.5当量, CH₂Cl₂, -78°C, 1h, 88%)し、4-OH受容体8に変換した。この8をテトラ-O-アセチル-ガラクトシルブROMAイドと反応(ガラクトシルドナー:2当量, AgOTf:2当量, CH₂Cl₂:トルエン=1:1, -45°C, 9h, 56%)させ、目的とする四糖9を合成した。この9を脱アセチル化(NaOMe/MeOH)後接触還元条件下(10%Pd-C, H₂, MeOH, r.t., 2h)で、全ての保護基を外し、化合物1から18段階を経て、スペーサー化した四糖10を得た([M+Na⁺]理論値:769.2748, 実測値:769.2848)。この化合物10とスベリン酸モノメチルエステルと縮合(スベリン酸:1.5当量, DMT-MM:1.5当量, 1%DMF)後、アシルアジド化法によりPBS中HSAと反応させGal(β1-4)Glc(β1-4)Hep{3-1αHep}-スペーサー-HSA11の合成を達成した。

[0039]

[化2]



[0040] HSAにリンカーを結合させた四糖への導入は、MALDI-MS分析により決定した。図3のパネルAとBを比較すると、四糖-HSAコンジュゲート由来のイオンピークは、HSAに比べて1万以上高分子量に観察された。この分子量シフトにより約10分子の四糖-リンカーがHSAに結合していることを明らかとした。

[0041] 二糖コンジュゲートHep-(α1-3)-Hep-スパーサー-HSAの合成

上記四糖コンジュゲートの合成と同様にして、表題化合物を製造する。

[0042] 部分糖鎖コンジュゲートの免疫原性

合成した部分糖鎖コンジュゲート、Hep-(α1-3)-Hep-スパーサー-HSAとGal(β1-4)Glc(β1-4)Hep{3-1αHep}-スパーサー-HSAが実際にNHS(健常ヒト血清)に存在するIgGによって認識されるかどうかは、ドットプロット分析により確認した。LOSおよびコンジュゲートとの結合の検出には健常ヒト血清(1:10)を用いた。各サンプル(1μl)をニトロセルロース膜にアプライした。

膜を抗ヒト I g G (P O D コンジュゲート) で処理し、次いで Super Signal West Dura で処理して可視化した。結果を図 4 に示す。この実験条件下では、四糖コンジュゲートは、 $1 \mu\text{g}$ で I g G の結合を確認できた (図 4 の B) 。また、二糖コンジュゲートでは、 $25 \mu\text{g}$ で抗体の結合をわずかながら確認出来た (図 4 の C) 。

この実験例の重要なポイントは、四糖コンジュゲートのヒト I g G の認識により、LOS のコア糖鎖を含む部分糖鎖 $\text{Gal} (\beta 1-4) \text{Glc} (\beta 1-4) \text{Hep} [3-1\alpha \text{Hep}]$ も免疫原性を有することを見いだしたことにある。このことにより、LOS の部分オリゴ糖鎖でも、病原性細菌に対するワクチン、あるいは、感染・診断ツールの標的として、使用出来るということを実証した。

実験例では、四糖コンジュゲート $1 \mu\text{g}$ の検出感度は、 $\sim 13 \text{pmole}$ で、精製ヒト I g G により認識される 15253 LOS のそれに比べ 100 倍近く劣る。しかし、この実験は、抗 15253 LOS 抗体と精製ヒト I g G とのアフィニティーを検出したものであり、実験例のような実際の血清中の I g G とのアフィニティーとは直接比較できない。また、抗 15253 LOS 抗体は数種の糖鎖エピトープに結合する I g G を含んでいるため、四糖糖鎖に結合した抗体の検出感度と直接的な比較はできない。さらに、実験例では、 $1 \mu\text{l}$ のドットで分析を行ったが、プリンターを使用してドットする ($3 \text{nl} / \text{ドット}$) ことにより、フェムトモルレベルでの検出も可能となる。

請求の範囲

[請求項1] 対象がナイセリア属細菌および／またはヘモフィルス属細菌に感染していることを評価するための方法であって、対象から得られた試料と以下の糖鎖配列からなる糖鎖分子：

(1) Hep - (α 1 - 3) - Hep - (α 1 - 5) - Kdo - (α 2 - 4) - Kdo ;

(2) Glc - (β 1 - 4) - Hep - (α 1 - 3) - Hep - (3 - 1 α) - Glc - (4 - 1 β) - Gal ;

(3) GlcNAc - (α 1 - 2) - Hep - (α 1 - 3) - Hep ;

(4) Hep - (α 1 - 2) - Hep - (α 1 - 3) - Hep ;

(5) Gal - (β 1 - 4) - Glc - (β 1 - 4) - Hep [I] - (3 - 1 α) - Hep [I I] ; および

(6) Hep - (α 1 - 3) - Hep

の1種または複数を接触させ、糖鎖-抗体結合体の存在を検出することを含む方法。

[請求項2] 糖鎖分子が担体分子とコンジュゲートしているものである、請求項1に記載の方法。

[請求項3] 担体分子がヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンである、請求項2に記載の方法。

[請求項4] ナイセリア属細菌に感染していることを評価するための方法である、請求項1～3の何れかに記載の方法。

[請求項5] 対象がナイセリア属細菌および／またはヘモフィルス属細菌に感染していることを評価するためのチップであって、固相支持体と、該固相支持体に結合した以下の糖鎖配列からなる糖鎖分子：

(1) Hep - (α 1 - 3) - Hep - (α 1 - 5) - Kdo - (α 2 - 4) - Kdo ;

(2) Glc - (β 1 - 4) - Hep - (α 1 - 3) - Hep - (

$3-1\alpha) - \text{Glc} - (4-1\beta) - \text{Gal} ;$

(3) $\text{GlcNAc} - (\alpha 1-2) - \text{Hep} - (\alpha 1-3) - \text{Hep} ;$

(4) $\text{Hep} - (\alpha 1-2) - \text{Hep} - (\alpha 1-3) - \text{Hep} ;$

(5) $\text{Gal} - (\beta 1-4) - \text{Glc} - (\beta 1-4) - \text{Hep} [I] - (3-1\alpha) - \text{Hep} [II] ;$ および

(6) $\text{Hep} - (\alpha 1-3) - \text{Hep}$

の1種または複数を含むチップ。

[請求項6] ナイセリア属細菌に感染していることを評価するためのチップである、請求項5に記載のチップ。

[請求項7] 以下の糖鎖配列からなる糖鎖分子：

(1) $\text{Hep} - (\alpha 1-3) - \text{Hep} - (\alpha 1-5) - \text{Kdo} - (\alpha 2-4) - \text{Kdo} ;$

(2) $\text{Glc} - (\beta 1-4) - \text{Hep} - (\alpha 1-3) - \text{Hep} - (3-1\alpha) - \text{Glc} - (4-1\beta) - \text{Gal} ;$

(3) $\text{GlcNAc} - (\alpha 1-2) - \text{Hep} - (\alpha 1-3) - \text{Hep} ;$

(4) $\text{Hep} - (\alpha 1-2) - \text{Hep} - (\alpha 1-3) - \text{Hep} ;$

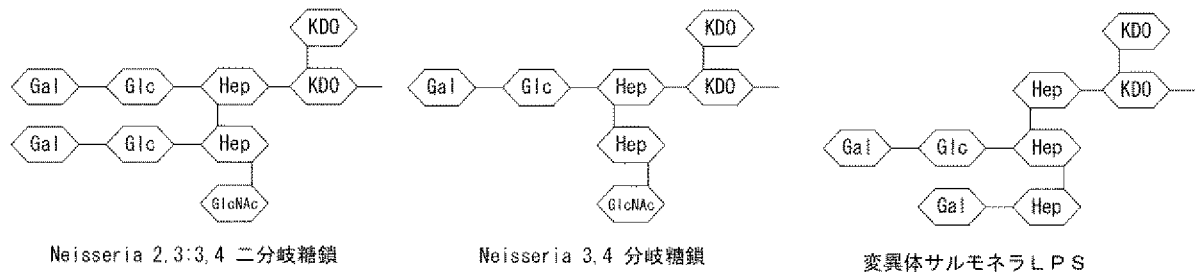
(5) $\text{Gal} - (\beta 1-4) - \text{Glc} - (\beta 1-4) - \text{Hep} [I] - (3-1\alpha) - \text{Hep} [II] ;$ および

(6) $\text{Hep} - (\alpha 1-3) - \text{Hep}$

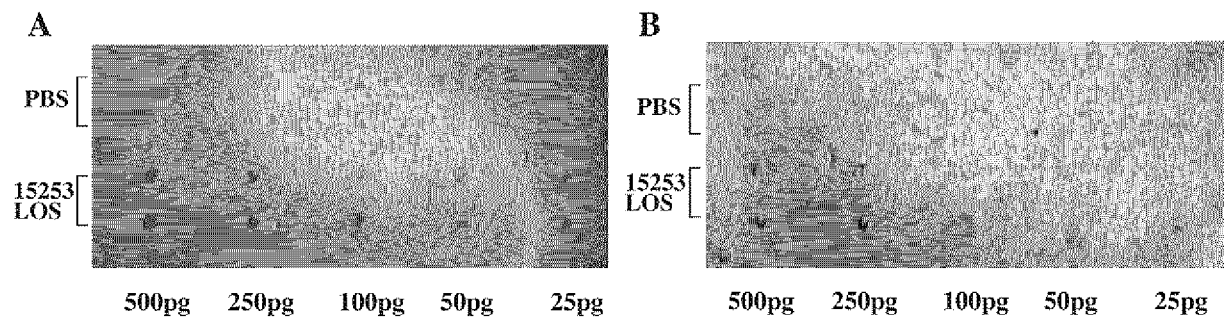
の1種または複数を含む、ナイセリア属細菌および／またはヘモフィルス属細菌に対するワクチン。

[請求項8] ナイセリア属細菌に対するワクチンである、請求項7に記載のワクチン。

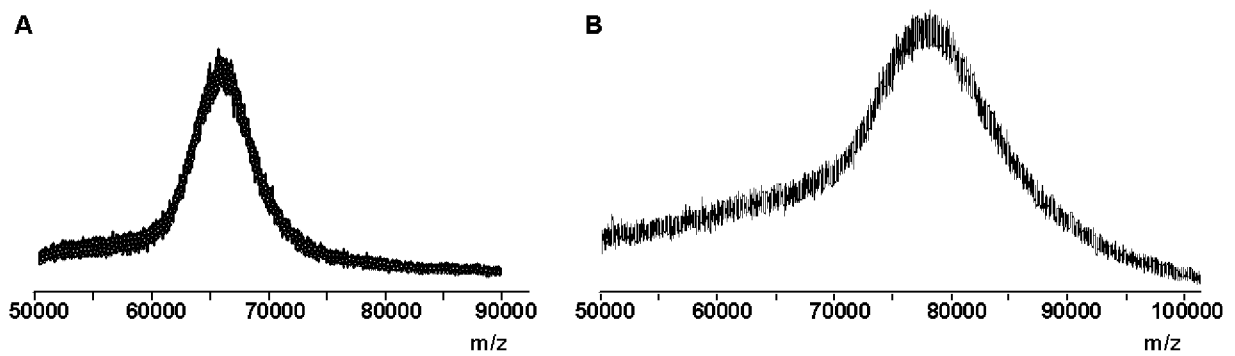
[図1]



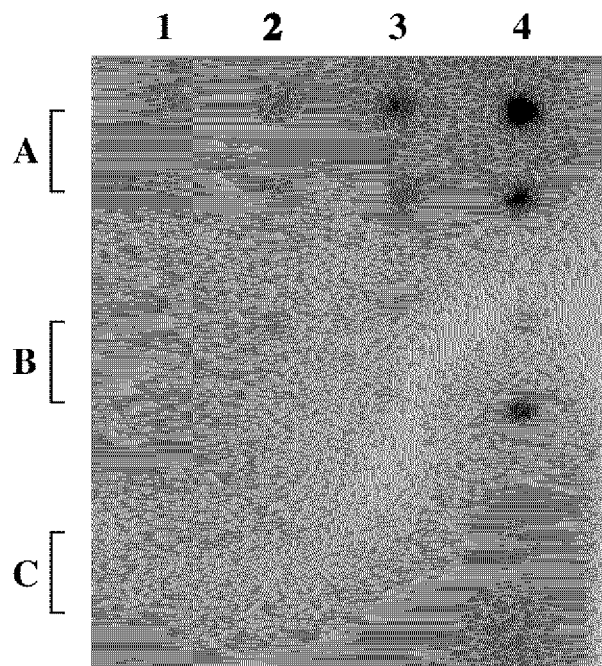
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/069532

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/569(2006.01) i, A61K39/095(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/569, A61K39/095

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JMEDPlus (JDreamII), JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-11096 A (Maruho Kabushiki Kaisha, Ryohei YAMASAKI), 16 January 2001 (16.01.2001), entire text (Family: none)	1-8
A	Ryohei YAMASAKI, "Saikin Kansen to Tosa Byogensei Saikin no Tosa Kogen, Lipooligo-to no Kozo to sono Byogensei ni Okeru Yakuwari", Kagaku to Seibutsu, 2003, vol.41, no.1, 15-21	1-8
A	JP 2000-9733 A (Seikagaku Corp.), 14 January 2000 (14.01.2000), entire text (Family: none)	1-8

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 February, 2010 (16.02.10)

Date of mailing of the international search report
02 March, 2010 (02.03.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/069532

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-168765 A (Meiji Milk Products Co., Ltd.), 17 June 2004 (17.06.2004), entire text (Family: none)	1-8
A	JP 2007-312776 A (The Scripps Research Institute), 06 December 2007 (06.12.2007), entire text & US 2007/0213278 A1 & US 2007/0213297 A1 & EP 1771733 A & EP 1862466 A2 & WO 2006/002382 A2 & CA 2571431 A	1-8
A	Ryohei Yamasaki et al., The Structure of Lipooligosaccharide Produced by Neisseria gonorrhoeae, Strain 15253, Isolated from a Patient with Disseminated Infection, The Journal of Biological Chemistry, 1994.12.02, Vol.269, No.48, 30345-30351	1-8
A	Ryohei Yamasaki et al., Structural Determination of Oligosaccharides Derived from Lipooligosaccharide of Neisseria gonorrhoeae F62 by Chemical, Enzymatic, and Two-Dimensional NMR Methods, Biochemistry, 1991, Vol. 30, 10566-10575	1-8
A	WO 2007/144316 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.), 21 December 2007 (21.12.2007), entire text & JP 2009-539922 A & US 2009/0123499 A & EP 2032160 A & EP 2032161 A & WO 2007/144316 A2 & DE 602007003596 D & CA 2654706 A & AR 61333 A & CA 2654709 A & AT 450271 T	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. G01N33/569(2006.01)i, A61K39/095(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. G01N33/569, A61K39/095

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2010年
 日本国実用新案登録公報 1996-2010年
 日本国登録実用新案公報 1994-2010年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 JMEDPlus(JDreamII), JSTPlus(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2001-11096 A (マルホ株式会社、山崎良平) 2001.01.16, 全文 (ファミリーなし)	1-8
A	山崎良平, 細菌感染と糖鎖 病原性細菌の糖鎖抗原, リポオリゴ糖 の構造とその病原性における役割, 化学と生物, 2003, Vol.41, No.1, 15-21	1-8
A	JP 2000-9733 A (生化学工業株式会社) 2000.01.14, 全文 (ファミリーなし)	1-8

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

<p>* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献</p>
---	---

国際調査を完了した日 16.02.2010	国際調査報告の発送日 02.03.2010
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 浅野 美奈 電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2004-168765 A (明治乳業株式会社) 2004. 06. 17, 全文 (ファミリーなし)	1 - 8
A	JP 2007-312776 A (ザ スクリップス リサーチ インスティテュ ート) 2007. 12. 06, 全文 & US 2007/0213278 A1 & US 2007/0213297 A1 & EP 1771733 A & EP 1862466 A2 & WO 2006/002382 A2 & CA 2571431 A	1 - 8
A	Ryohei Yamasaki et al., The Structure of Lipooligosaccharide Produced by Neisseria gonorrhoeae, Strain 15253, Isolated from a Patient with Disseminated Infection, The Journal of Biological Chemistry, 1994. 12. 02, Vol. 269, No. 48, 30345-30351	1 - 8
A	Ryohei Yamasaki et al., Structural Determination of Oligosaccharides Derived from Lipooligosaccharide of Neisseria gonorrhoeae F62 by Chemical, Enzymatic, and Two-Dimensional NMR Methods, Biochemistry, 1991, Vol. 30, 10566-10575	1 - 8
A	WO 2007/144316 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA) 2007. 12. 21, 全文 & JP 2009-539922 A & US 2009/0123499 A & EP 2032160 A & EP 2032161 A & WO 2007/144316 A2 & DE 602007003596 D & CA 2654706 A & AR 61333 A & CA 2654709 A & AT 450271 T	1 - 8