

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035556**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.07.07**

**(51)** Int. Cl. **A61K 47/48** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201692546**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.07.24**

---

**(54) ГЛИКОКОНЬЮГАТНЫЕ ВАКЦИНЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ОСНОВНЫЕ СТРУКТУРНЫЕ ЕДИНИЦЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ КОНСТРУКЦИИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ВСТРОЕННЫЕ МНОЖЕСТВЕННЫЕ ЭПИТОПЫ, ДЛЯ СОСТАВЛЕНИЯ ВАКЦИНЫ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ЭНТЕРОПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ**

---

**(31)** **MI2014A001361**

**(32)** **2014.07.25**

**(33)** **IT**

**(43)** **2017.08.31**

**(86)** **PCT/EP2015/066988**

**(87)** **WO 2016/012587 2016.01.28**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**БИОСИНЗ С.Р.Л. (IT)**

**(72)** Изобретатель:  
**Порро Массимо (IT)**

**(74)** Представитель:  
**Носырева Е.Л. (RU)**

**(56)** PAVLIAKOVA D. ET AL.: "Clostridium difficile recombinant toxin A repeating units as a carrier protein for conjugate vaccines: studies of pneumococcal type 14, Escherichia coli K1, Shigella flexneri Type 2a polysaccharides in mice", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 68, no. 4, 1 April 2000 (2000-04-01), pages 2161-2166, XP002144779, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.68.4.2161-2166.2000 abstract page 2161, column 2, last paragraph

US-A-4711779  
EP-A1-1501542

MARIA ROMANO ET AL.: "Recombinant Clostridium difficile Toxin Fragments as Carrier Protein for PSII Surface Polysaccharide Preserve Their Neutralizing Activity", TOXINS, vol. 6, no. 4, 22 April 2014 (2014-04-22), pages 1385-1396, XP055179535, ISSN: 2072-6651, DOI: 10.3390/toxins6041385 abstract

PORRO M. ET AL.: "A molecular model of artificial glycoprotein with predetermined multiple immunodeterminants for gram-positive and gram-negative encapsulated bacteria", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 23, no. 4, 1 April 1986 (1986-04-01), pages 385-391, XP023682553, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/0161-5890(86)90136-7 [retrieved on 1986-04-01]

WO-A1-2014118201

---

**(57)** Изобретение относится к новым гликоконъюгатным антигенам, экспрессирующим встроенные множественные эпитопы, и к поливалентным гликоконъюгатным вакцинам, предназначенным для защиты млекопитающих и, в частности, для защиты популяции людей от энтеропатогенных бактерий, таких как грамположительная анаэробная бактерия Clostridium difficile и грамотрицательные бактерии Salmonella typhi, Escherichia coli, Vibrio cholerae, Shigella flexneri, Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis, Salmonella paratyphi A, Shigella sonnei, Shigella dysenteriae, Salmonella choleraesuis, Klebsiella, Enterobacter, Pseudomonas aeruginosa, и/или от вирусных инфекций желудочно-кишечного тракта, вызванных норовирусами человека.

---

**B1**

**035556**

**035556 B1**

Настоящее изобретение относится к новым гликоконъюгатным антигенам, экспрессирующим встроенные множественные эпитопы, и к поливалентным гликоконъюгатным вакцинам, предназначенным для защиты млекопитающих и, в частности, для защиты популяции людей от энтеропатогенных бактерий, таких как грамположительная анаэробная бактерия *Clostridium difficile* и грамотрицательные бактерии *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi A*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella choleraesuis*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, и/или от вирусных инфекций желудочно-кишечного тракта, вызванных норовирусами человека.

*Clostridium difficile* представляет собой спорообразующую грамположительную бациллу, продуцирующую два экзотоксина (энтеротоксин А и цитотоксин В), которые являются патогенными для людей.

*C. difficile* является основной причиной инфекционной диареи, связанной с приемом антибиотиков, у госпитализированных пациентов пожилого возраста в развитых странах (Simor et al., 2002). Симптомы связанных с *C. difficile* заболеваний (CDAD) варьируют от диареи до тяжелой формы колита, токсического мегаколona, сепсиса и летального исхода. За последние годы повышение частоты возникновения, тяжести и рецидивов заболеваний в значительной степени вызвано появлением гипервирулентных штаммов, связанных с эпидемическими вспышками в больницах, в сочетании с повышением устойчивости к широко используемым антибиотикам (Rupnik et al., 2009).

Сообщается, что профилактическая вакцина, способная нейтрализовывать энтеротоксин А и цитотоксин В *C. difficile*, два токсина данного патогена, является представляющим интерес примером вакцины в рамках промышленной разработки (Donald R. et al., 2013).

Токсины А и В представляют собой очень большие белки размером 308 и 270 кДа соответственно, которые являются структурно родственными, имеют общие гомологичные функциональные домены, которые опосредуют внутриклеточный захват и доставку цитотоксической гликозилтрансферазы.

Токсин А (энтеротоксин) состоит из 2710 АА и демонстрирует в своей последовательности 223 остатка Lys (катионность 8,22%); токсин В (цитотоксин) состоит из 2366 АА и демонстрирует в своей последовательности 156 остатков Lys (катионность 6,59%) (для информации см. веб-сайты

<http://www.uniprot.org/uniprot/P16154> и <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AGG91548.1>).

Хотя эти два токсина, взятых по отдельности, отличаются по своей активности и эффектам в моделях "in vivo", предыдущие исследования на животных моделях дают основание предполагать, что они оба способствуют возникновению заболевания при возникающих в естественных условиях инфекциях (Lyerly et al., 1985). Кроме того, вакцинация как токсином А, так и токсином В, но не каждым по отдельности, обеспечивала защиту в модели инфекции на хомяке (Libby J.M. et al., 1982).

Выявление способности гуморального иммунного ответа контролировать CDAD послужило причиной успешного применения пассивной иммунотерапии объединенным иммуноглобулином человека, содержащим антитела к токсинам А и В, для лечения тяжелого CDAD (Salcedo J. et al., 1997). Кроме того, уменьшения частоты рецидивов CDAD достигали в фазе I клинического испытания с моноклональными антителами к токсинам А и В в комбинации со стандартной антибиотикотерапией (Lowy I. et al., 2010).

Кроме того, в небольшом исследовании с тремя пациентами с хронической рецидивирующей CDAD экспериментальная вакцина с применением инактивированных формалином антигенов в виде токсидов А и В предупреждала рецидивирование CDAD (Sougioultzis S. et al., 2005).

В совокупности эти наблюдения обеспечивают подтверждение эффективности вакцин на основе токсина А и токсина В *C. difficile* для предупреждения CDAD и способствуют их дальнейшей разработке. Как упоминалось выше, в настоящее время существуют две кандидатные вакцины в клинических испытаниях, которые основаны на двух рекомбинантных/обработанных формалином белках-токсоидах А и В.

Стратегии разработки вакцин на основе отдельных специфичностей токсидов *C. difficile* (инактивированных либо путем обработки формалином, либо с помощью технологии рекомбинантной ДНК) хорошо описаны, что упомянуто выше. Данные исследования также хорошо описаны для рекомбинантного энтеротоксина А (*rARU C. difficile*) в качестве белка-носителя для каждого из капсульных Ps *S. flexneri* типа 2a, *E. coli* K1 и *Pneumococcus* типа 14 (Pavliakova D. et al., 2000), полученных в виде отдельных конъюгатов. Очевидно, что одновременное введение трех отдельных конъюгатов неизбежно приводит к перегрузке иммунной системы хозяина в связи с общим, за исключением неоднородного, количеством вводимого белка-носителя, а именно рекомбинантной повторяющейся структурной единицы энтеротоксина А *Clostridium difficile* (соответственно 1,29, 3,9 и 8,08 мкг *rARU* для каждого конъюгата Pn14-*rARU*, SF-*rARU* и K1-*rARU*).

Совсем недавно структурные части двух токсинов применяли в качестве нетоксичных носителей для Ps II антигена *C. difficile* (Romano M. et al., 2014). Несмотря на то, что *C. difficile* также продуцирует три разных капсульных Ps, данные указывают на использование двух токсинов в качестве мишеней для эффективной борьбы с патологией, как в предшествующих случаях с дифтерийной и столбнячной инфекциями.

Однако ни в одной из приведенных работ не сообщалось о возможности получения вакцины широкого спектра действия против кишечных инфекций для индуцирования иммунитета против нескольких углеводных антигенов из антибиотикоустойчивых энтеропатогенных бактерий (со множественной спе-

цифичностью) у хозяина-человека, в частности у ребенка, в то же время с применением минимального количества белков-носителей для уменьшения антигенной нагрузки вакцины(вакцин) на иммунную систему хозяина, с поддержанием при этом специфичной иммуногенной активности и защиты *in vivo*, качественно достигаемой путем введения моновалентных конъюгатов. Однако животные модели не позволяют сделать выводы о количественных аспектах индуцированных титров антител при использовании множественных антигенов по настоящему изобретению по сравнению с моновалентными, поскольку специалистам в данной области хорошо известно, что только младенцы человека могут достоверно различать отличающуюся в конечном итоге зависимую от присутствия Т-хелперов активность разных моделей конъюгатных структурных единиц.

Автор настоящего изобретения получил молекулярные конструкции с множественными эпитопами в качестве основных структурных единиц для получения гликоконъюгатной вакцины со множественными эпитопами для применения в качестве вакцины широкого спектра действия против кишечных инфекций для защиты популяции людей от энтеропатогенных бактерий. В действительности автор настоящего изобретения делает акцент на актуальной в настоящее время проблеме, относящейся к нескольким кишечным патогенным микроорганизмам, которые приобрели устойчивость к антибиотикам: грамположительной анаэробной бактерии *Clostridium difficile* и грамотрицательным бактериям *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi A*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella choleraesuis*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*. В связи с возросшей их устойчивостью к антибиотикам, кишечные инфекции, вызванные данной группой бактерий, зачастую могут приводить к сепсису с последующим летальным исходом хозяина.

Следовательно, объектом настоящего изобретения является антигенная мультивалентная молекулярная конструкция, включающая в себя основные структурные единицы, содержащие зависимые от присутствия Т-хелперов инактивированные белки-носители, выбранные из энтеротоксоида А и цитотоксоида В из *Clostridium difficile*, ковалентно связанные с не менее тремя углеводными структурами из энтеропатогенных бактерий, выбранных из бактериальных полисахаридов или инактивированных липополисахаридов (таких как SAEP-инактивированный LPS или эндотоксоиды) с разной серологической специфичностью, где каждая углеводная структура содержит по меньшей мере один из повторяющихся основных эпитопов, включающих в себя не менее пяти-двенадцати моносахаридных остатков (предпочтительно не менее восьми-двенадцати моносахаридных остатков), где по меньшей мере один моль белка-носителя ковалентно связан по меньшей мере с одним молекул типоспецифических или группоспецифических углеводных структур или с общим количеством углеводных структур, рассматриваемых как сумма по меньшей мере трех типоспецифических или группоспецифических углеводов. Предпочтительно указанные сахаридные остатки оценивают путем определения молекулярной массы и ЯМР-спектроскопии, при этом оценивают антигенность указанных повторяющихся основных эпитопов по реакционной способности с типоспецифическими или группоспецифическими поликлональными или моноклональными антителами посредством определения их соответствующих значений MIC50 в ингибировании их эталонной системы гомологичный полисахарид-антитело.

Энтеропатогенные бактерии по настоящему изобретению являются такими кишечными патогенами, которые приобрели устойчивость к антибиотикам, таким как грамположительная анаэробная бактерия *Clostridium difficile* и грамотрицательные бактерии *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi A*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella choleraesuis*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения белки-токсоиды энтеротоксоид А и цитотоксоид В из *Clostridium difficile* инактивированы химическим способом, таким как обработка формалином, которая издавна известна для токсидов дифтерии и столбняка, или с помощью технологии рекомбинантной ДНК.

В молекулярных конструкциях по настоящему изобретению каждый из двух белков-токсоидов может служить носителем для не менее трех полисахаридов с разной антигенностью (таких как олигосахариды или полисахариды, получаемые из бактериальных капсульных полисахаридов) или не менее трех инактивированных липополисахаридов (или LPS, эндотоксин) с разной антигенностью.

Молекулярные конструкции, полученные таким способом с LPS, тем не менее, в результате являются токсичными, поскольку фрагмент липида А LPS активно присутствует в молекулярной структуре и может активировать посредством взаимодействия с CD14 и TLR4-подобными рецепторами провоспалительный цитокиновый каскад, что характерно для LPS. Для того, чтобы стремиться к достижению и достигнуть безопасного применения конъюгатной структурной единицы токсид-LPS, структуру LPS, таким образом, необходимо подвергнуть инактивации.

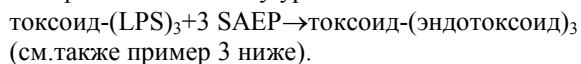
Этого можно достигнуть путем:

- 1) отщепления фрагмента липида А или
- 2) насыщения липид А-связывающего сайта с помощью специальной стратегии с использованием эндотоксинсвязывающих синтетических пептидов (SAEP) для того, чтобы получить эндотоксоиды (альтернативно называемые SAEP-инактивированный LPS, SAEP-инактивированный эндотоксин), которые

сохраняют свой полный надмолекулярный антигенный репертуар в форме мицеллоподобных структур (WO 2004/052394 A1).

Последний указанный способ инактивации представляет собой предпочтительный вариант осуществления в контексте настоящего изобретения. Более конкретно эндотоксоид, происходящий от указанного видоспецифического (иммунофенотипированного) эндотоксина (липополисахарида), получают в соответствии с научной идеей, изложенной в публикации Rustici et al. (Science 259: 361-365, 1993) и в подробностях на молекулярном уровне, ранее раскрытых в патенте США № 6951652 и в патенте США № 7507718.

Таким образом, эндотоксоид представляет собой молекулярную структурную единицу, включающую в себя эквимольный комплекс SAEP, эндотоксинсвязывающие синтетические пептиды и LPS (эндотоксин), которая в форме конъюгата с множественными эпитопами с токсидом *C. difficile* (A или B) удовлетворяет химическому уравнению:



В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления молекулярных конструкций по настоящему изобретению антигены капсульных полисахаридов могут быть выбраны из группы, включающей *Escherichia coli* типа K (1,2,5,12,13), *Salmonella typhi* (антиген Vi), *Vibrio cholerae* 0139 и *Clostridium difficile*.

*Clostridium difficile* в качестве грамположительной бактерии также характеризуется углеводной капсулой, содержащей по меньшей мере три разные структуры Ps (PsI, PsII и PsIII).

В соответствии с альтернативным вариантом осуществления молекулярной конструкции по настоящему изобретению два белка-токсоида служат в качестве зависящих от присутствия Т-хелперов носителей для гликоконъюгатов инактивированных липополисахаридов (предпочтительно SAEP-инактивированных LPS или эндотоксоида), специфичных для *Shigella flexneri* 2a, *Vibrio cholerae* 01, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli* 0157/101/111, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi* A, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* типа 1 и *Salmonella choleraesuis*.

Молекулярные конструкции по настоящему изобретению индуцируют серологическую специфичность в отношении двух белков-носителей (энтеротоксоида A и цитотоксоида B *C. difficile*) и каждой по меньшей мере из трех переносимых углеводных структур (в сокращенной форме обозначаемых либо Ps, либо LPS/эндотоксоид), связанных с каждым из двух белков-носителей, так что соответствующие специфичные антитела проявляют нейтрализующую активность в отношении гомологичных естественных токсинов (энтеротоксина A и цитотоксина B) *Clostridium difficile*, а также бактерицидную активность в отношении *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi* A, *Shigella dysenteriae* (других предпочтительных углеводных антигенов, происходящих из *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella sonnei* и из *C. difficile* как таковых).

В соответствии с изложенным выше и в качестве ряда неограничивающих примеров автором были получены следующие молекулярные конструкции:

энтеротоксоид A, ковалентно связанный с Ps *S. typhi* (Vi), *V. cholerae* (0139) и *E. coli* (K1);

цитотоксоид B, ковалентно связанный с теми же тремя Ps *S. typhi* (Vi), *V. cholerae* (0139) и *E. coli* (K1);

энтеротоксоид A, ковалентно связанный с LPS/эндотоксоидами *S. enteritidis*, *S. paratyphi* A и *S. dysenteriae*;

цитотоксоид B, ковалентно связанный с теми же тремя LPS/эндотоксоидами *S. enteritidis*, *S. paratyphi* A и *S. dysenteriae*.

Настоящее изобретение дополнительно относится к указанной выше антигенной мультивалентной молекулярной конструкции для применения в вакцине для защиты субъекта от инфекций, вызванных по меньшей мере одной из энтеропатогенных бактерий, выбранных из *Clostridium difficile*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi* A, *Salmonella dysenteriae*, *Salmonella choleraesuis* или их комбинации.

В предпочтительном варианте осуществления либо отдельную конструкцию, либо комбинацию различных антигенных мультивалентных молекулярных конструкций можно применять для получения вакцины.

Следующим объектом настоящего изобретения является вакцинный состав, содержащий по меньшей мере одну антигенную мультивалентную молекулярную конструкцию, указанную выше, в физиологически приемлемой среде, необязательно вместе с фармацевтически приемлемыми адъювантом или наполнителями.

Антигенные молекулярные конструкции могут иметь однородную или смешанную конфигурацию антигена-носителя и переносимых антигенов. Термин "антиген-носитель" относится к белкам-токсоидам энтеротоксоиду A или цитотоксоиду B из *C. difficile*; термин "переносимые антигены" относится к углеводным структурам (в сокращенной форме обозначаемым как либо капсульный Ps, либо LPS/эндотоксоид), связанным с каждым из двух белков-носителей. Термин однородный или смешанный относится к источнику переносимых антигенов применительно к носителю-антигену (т.е. всем носите-

лям и переносимым антигенам, происходящим из *C. difficile*; переносимым антигенам, происходящим из одного и того же или разных кишечных патогенных микроорганизмов).

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления вакцинного состава по настоящему изобретению доза каждого антигена-носителя и/или переносимых антигенов находится в диапазоне от 0,1 до 100 мкг, при этом предпочтительно составляет 1-10 мкг.

Предпочтительно указанные вакцинные составы дополнительно содержат неорганический, или химически синтезированный, или биологический адъювант. Неорганические, или химически синтезированные, или биологические адъюванты можно применять с молекулярной конструкцией, раскрытой в данной заявке, с целью получения пользы от любого иммунологического усиления, которое может быть эффективным в понижении оптимальной иммуногенной дозы у людей, с последующим уменьшением общего количества белка-носителя. В частности, предпочтительные неорганические адъюванты в вакцинных составах по настоящему изобретению для применения у людей выбраны из фосфата алюминия (AlPO<sub>4</sub>) и гидроксида алюминия; предпочтительные органические адъюванты выбраны из адъювантов на основе сквалена, таких как MF59, QF 21, Addavax; предпочтительные биологические антигены выбраны из бактериальных антигенов монофосфорил-липида А, дикориномиколата трегалозы (адъювант Рибн).

В вакцинных составах для применения в области ветеринарии предпочтительным является адъювант Фрейнда (полный или неполный). Доза адъюванта может варьировать в диапазоне 0,1-1 мг/доза, при этом предпочтительно составляет 0,5 мг/доза.

Более предпочтительно такой состав является подходящим для введения подкожным, или внутримышечным, или внутрикожным, или чрескожным путем. В целях удобства такое введение можно осуществлять посредством обычной инъекции с помощью шприца или безыгольных устройств.

Вакцинные составы по настоящему изобретению можно вводить в соответствии с протоколом, который требует одного или нескольких введений, в соответствии с указаниями врача, педиатра или ветеринара.

Настоящее изобретение дополнительно относится к поливалентным вакцинным составам широкого спектра действия, определенным выше, для применения в области медицины человека или ветеринарной медицины для защиты субъекта от инфекций, вызванных по меньшей мере одним энтеробактериальным патогенным микроорганизмом, выбранным из *Clostridium difficile*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella dysenteriae*, *Salmonella choleraesuis* или их комбинации. Предпочтительно указанный субъект, подвергаемый лечению, принадлежит к популяции детей и к популяции людей пожилого возраста.

Фактический состав такой вакцины (например, видоспецифичные грамтрицательные кишечные бактерии, из которых получают Ps и LPS) может зависеть от региональной эпидемиологии, так что каждая триада антигенных конъюгатов, несмотря на использование всегда одного или обоих из двух белков-носителей энтеротоксоида А и цитотоксоида В из *C. difficile*, целенаправленно будет нести специфические антигены Ps или LPS/эндотоксид в соответствии с выбранной региональной эпидемиологией.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения вакцинный состав содержит по меньшей мере две разные антигенные молекулярные конструкции, при этом каждый из двух белков энтеротоксоида А и цитотоксоида В из *C. difficile* может служить в качестве белка-носителя для трех полисахаридов (PsI, PsII и PsIII) *C. difficile*, так что две объединенные триады конъюгированных антигенов будут представлять собой специфичную вакцину, ограниченную инфекциями *C. difficile*, где антигенная активность, индуцированная двумя белками-токсоидами, может быть аналогичной местной и системной антикапсульной активностям, приводящим к клиренсу бактерии иммунной системой хозяина.

Такие однотриадные молекулярные конструкции также составляли как объединенные мультивалентные композиции, содержащие оба вида антигенных молекулярных моделей, для достижения наиболее широкого антигенного спектра, такие как

энтеротоксид А, ковалентно связанный с Ps *S. typhi* (Vi), *V. cholerae* (0139) и *E. coli* (K1), объединенный с цитотоксидом В, ковалентно связанным с теми же тремя Ps-антигенами;

энтеротоксид А или цитотоксид В, ковалентно связанный с Ps *S. typhi* (Vi), *V. cholerae* (0139) и *E. coli* (K1), объединенный с цитотоксидом В или энтеротоксидом А, ковалентно связанным с тремя антигенами в виде эндотоксидов *S. enteritidis*, *S. paratyphi A* и *S. dysenteriae*.

Недавно сообщали об экспериментальных данных, что норовирусы человека и мыши инфицируют В-клетки *in vitro*, и, вероятно, *in vivo*, за счет вовлечения кишечных бактерий, выступающих в качестве стимулирующего фактора инфекции норовирусами. Предполагалось, что этот биологический синергизм является основным механизмом, с помощью которого норовирусы могут становиться способными к инфицированию и приводить к развитию эпидемического и спорадического гастроэнтерита у людей (Jones M.K. et al., Science, 346: 755-759, 2014).

Наряду с данными наблюдениями хозяева-мыши, подвергаемые лечению антибиотиками с целью истощения кишечной микробиоты, показали значительное уменьшение репликации норовируса мышей в экспериментах, о которых сообщали авторы.

На основании данных результатов автор настоящей заявки получил принцип целенаправленного воздействия на постоянно расширяющееся множество антибиотикоустойчивых энтеропатогенных бакте-

рий с помощью вакцинных композиций, раскрытых в данном документе, с целью возможного ограничения одновременно с кишечными бактериальными инфекциями репликации норовирусов, ответственных за возникновение острого гастроэнтерита.

Норовирусный гастроэнтерит является широко распространенным и потенциально тяжелым заболеванием, характеризующимся острым началом с тошнотой, рвотой, абдоминальными коликами, диареей и в редких случаях лихорадкой. Норовирусы являются высоковирулентными и легко передаются от человека к человеку или через зараженные окружающие среды. Эпидемические вспышки встречаются в общественных местах, в частности в больницах, отелях, школах, детских садах и частных клиниках, с повышением социально-экономических расходов для семей, системы здравоохранения и бизнеса. Военные подразделения значительно страдают от поражения вирусом, так как последствия вспышек влияют на боевую готовность. О тяжелых клинических исходах сообщают у пожилых людей, детей и лиц с ослабленным иммунитетом, у которых инфекция может приводить к последующим осложнениям и может даже приводить к летальному исходу. По оценкам во всем мире норовирусы являются причиной одного из пяти случаев вирусного гастроэнтерита. По оценкам каждый год 300 миллионов случаев норовирусной инфекции приводит к примерно 260000 летальных исходов, в среднем в странах с низким уровнем дохода. Норовирусы разделяют по меньшей мере на 5 геногрупп и по меньшей мере на 40 генотипов; недавно проводили оценку их распределения по выбранным географическим областям у детей и пожилых людей с частотой 1475 случаев/100000 людей/год у маленьких детей ( $\leq 5$  лет) и 585 случаев/100000 людей/год у пожилых людей ( $\geq 65$  лет)(Chan M. et al., Scientific Reports, 2015). Со временем норовирусы уклоняются от врожденного иммунитета по причине антигенного дрефта, который позволяет им ускользать от антител, продуцированных в ответ на более ранние инфекции.

Следовательно, другим аспектом настоящего изобретения является обеспечение поливалентного вакцинного состава широкого спектра действия для применения в предупреждении и/или лечении энтеропатогенных бактерий, который также может одновременно обеспечивать целенаправленное воздействие на вирусные инфекции желудочно-кишечного тракта, вызванные норовирусами человека.

Недавние попытки в разработке вакцины против норовируса фокусировались на вирусоподобных частицах (VLP), построенных из молекул капсида вируса (внешней оболочки). В фазе I клинического испытания одна мультивалентная вакцина на основе VLP вызывала образование антител, но не обеспечивала возникновения иммунитета на испытуемый штамм вируса. Однако в более недавнем исследовании Lindesmith и коллеги (2015) охарактеризовали образцы сыворотки от десяти участников клинического испытания мультивалентной вакцины на основе VLP на наличие антител к VLP вакцины, а также к VLP, представляющим собой вирусы, которые не содержались в вакцине. Исследователи обнаружили, что вакцина на основе VLP может быстро вызывать антителообразование в отношении широкого спектра действия вакцинных и невакцинных VLP, включая две VLP, представляющие собой норовирусы человека, с которыми они не сталкивались ранее. В целом, антитела к штаммам норовируса, которым участники исследования подвергались ранее, преобладали в иммунном ответе. Данные результаты могут способствовать разработке вакцины на основе норовируса при условии, что данный подход может преодолеть способность норовирусов уклоняться от иммунитета вследствие антигенного дрефта. В любом случае это была бы стратегия, направленная на конечное содержание вируса в ходе фазы инфицирования, в которой вирусные частицы распространяются из бактериальных клеток, которые они населяют, а не на блокирование репликации вируса на начальном уровне, поскольку он все еще находится внутри энтеропатогенных бактерий, которые защищают его, как предлагает автор настоящей заявки за счет использования вакцины широкого спектра действия, целенаправленно воздействующей на энтеропатогенные бактерии. В конечном счете одновременное и/или параллельное применение данных двух стратегий (например, применение двух вакцин, целенаправленно воздействующих на норовирус, а также его бактерио-хозяина) может представлять собой мощный инструмент для получения противовирусной защиты широкого спектра для хозяина-человека.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу конъюгирования для получения антигенной мультивалентной молекулярной конструкции по настоящему изобретению (в которой применяют тот же химический механизм, который раскрыт в патенте EP 1501542), где каждую по меньшей мере из трех углеводных структур выбирают из

капсульных полисахаридов *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile* и *Escherichia coli* или

липополисахаридов из *Clostridium difficile*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella dysenteriae*, *Salmonella choleraesuis*,

химически активированной с обеспечением монофункциональности или полифункциональности путем отщепления водорода от О посредством окисления и восстановительного аминирования с образованием восстановленных иминовых связей с алкилдиаминовым спейсером с последующей дериватизацией до активных сложных эфиров, причем такие углеводные структуры на основе производных сложных эфиров в конечном итоге одновременно связываются с аминокетонами полифункционального белка-носителя цитохромоксида В или цитохромоксида А из *C. difficile* посредством образования амидных связей;

где по меньшей мере один моль белка-носителя вводят в реакцию по меньшей мере с одним моле углеводных структур, принимая такое общее количество за одну структурную единицу, составленную из молярной суммы каждой по меньшей мере из трех типоспецифических или группоспецифических углеводных структур. Предпочтительно указанные углеводные структуры химически активированы в их соответствующих производных диаминомасляной кислоты, а активные сложные эфиры представляют собой сукцинимидильные сложные эфиры.

В качестве примера химическую активацию триады полисахаридов из капсул *S. typhi*, *E. coli* и *V. cholerae* с их гомологичным Ps-DAB (производное диаминомасляной кислоты) выполняли в соответствии со способом, раскрытым заявителем в п.1 формулы изобретения EP 1501542, в то время как полифункциональными белками-носителями являлись энтеротоксоид А и цитотоксоид В из *C. difficile*.

Альтернативно способ конъюгирования для получения антигенных мультивалентных молекулярных конструкций по настоящему изобретению включает химический механизм, раскрытый в п.8 формулы изобретения EP 1501542, охватывающем одновременное связывание (или постадийное связывание) аминокрупп полифункциональных белков-носителей цитотоксоида В или энтеротоксоида А из *C. difficile* по меньшей мере с тремя разными углеводными структурами, выбранными из

капсульных полисахаридов *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile* и *Escherichia coli* или

липополисахаридов из *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella dysenteriae*, *Salmonella choleraesuis*,

посредством восстановительного аминирования с образованием восстановленной иминовой связи, причем такие углеводные структуры предварительно активируют с обеспечением монофункциональности или полифункциональности, со спейсерами или без них, путем отщепления водорода от О посредством окисления;

где по меньшей мере один моль белка-носителя вводят в реакцию по меньшей мере с одним моле углеводных структур, принимая такое общее количество за одну структурную единицу, составленную из молярной суммы каждой по меньшей мере из трех типоспецифических или группоспецифических углеводных структур.

В соответствии с настоящим изобретением термин "моль" относится как к белку-носителю, так и к специфическим углеводным антигенам, охватывает общую единицу измерения (моль) или ее долю (т.е. микромоль, или наномоль, или пикомоль, все из которых представляют ее часть).

Если в способе конъюгирования по настоящему изобретению предусматривают липополисахариды, они должны быть инактивированными. Следовательно, способ конъюгирования дополнительно включает дополнительную стадию инактивации указанных липополисахаридов альтернативно путем а) отщепления фрагмента липида А до или после осуществления реакции связывания или б) насыщения липид А-связывающего сайта посредством специфической стратегии, в которой применяют эндотоксинсвязывающие синтетические пептиды (SAEP, такой как SAEP2, см. Rustici et al., Science 259: 361-365, 1993) до или после выполнения реакции связывания.

Предпочтительно такие инактивированные липополисахариды получают посредством последней процедуры, раскрытой тем же автором в патенте США № 6951652 (см. с. 16 и п.1 формулы изобретения) и в патенте США № 7507718 (см. с. 33-34 и п.17 формулы изобретения), с целью получения соответствующих эндотоксоидов, сохраняющих оптимальные антигенные свойства надмолекулярной мицеллоподобной структуры LPS(структур LPS) для оптимальной экспрессии связанных иммуногенных свойств.

В дополнение к изложенным выше способам инактивации можно применять другие способы для данной цели и, среди прочих, можно принимать во внимание инактивацию LPS путем генетической инженерии посредством модификации ферментативного пути, приводящего к синтезу липида А, а также инактивации с помощью ферментативного или химического гидролиза связанных со сложным эфиром цепей жирных кислот, присутствующих в структуре липида А.

Кроме того, в предпочтительном варианте осуществления способа конъюгирования по настоящему изобретению углеводные структуры из стадии а) содержат по меньшей мере один из повторяющихся основных эпитопов, включающих в себя не менее пяти-двенадцати моносахаридных остатков, что оценивают путем определения молекулярной массы и ЯМР-спектроскопии, при этом оценивают антигенность указанных повторяющихся основных эпитопов по реакционной способности с типоспецифическими или группоспецифическими поликлональными или моноклональными антителами посредством определения их соответствующих значений MIC50 при ингибировании их эталонной системы гомологичный полисахарид-антитело.

Последним объектом настоящего изобретения является антигенная мультивалентная молекулярная конструкция, получаемая с помощью способа конъюгирования, описанного выше.

Как можно предположить, раскрытую выше молекулярную модель можно дополнительно разрабатывать для того, чтобы она содержала более трех (например, четыре или пять) различных углеводных структур на один моль (или его доли) белка-носителя, при этом данная возможность зависит от трех основных параметров молекулярной конструкции:

а) физико-химических свойств белка-носителя, структура которого должна характеризовать наи-

большее возможное количество остатков лизина (источника реакционноспособных групп  $-\text{NH}_2$ );

б) "специальной" выбранной полидисперсной MW различных углеводных структур, характеризующихся оптимальной скоростью активации при ограничении отрицательных эффектов явлений стерического несоответствия в реакции связывания; и

в) эффективности химического механизма, используемого для активации разных углеводных структур и для синтеза молекулярной конструкции (предпочтительным химическим механизмом для высокоэффективной оптимальной активации углеводных структур является отщепление водорода от О посредством окисления, со спейсером или без него, в то время как такой механизм для высокой эффективности реакции конъюгирования происходит посредством образования амидной связи с помощью активных сложных эфиров между углеводными структурами и белком-носителем; также предпочтительным для реакции конъюгирования является химический механизм, при котором используется образование восстановленной иминовой связи между окисленными углеводными структурами посредством отщепления водорода от О, со спейсерами или без них, и белком-носителем посредством прямого восстановительно-аминирования).

Способ конъюгирования, используемый в соответствии с настоящим изобретением, предусматривает многостадийную активацию (по меньшей мере трех) Ps или LPS (которые, следовательно, могут иметь независимо, но однотипно, либо низкую, либо высокую MW) с целью оптимизации показателей связывания с белком-носителем.

Определение стехиометрических характеристик молекулярных конструкций по настоящему изобретению (соотношение вес./вес. для белок/Ps или белок/LPS), которые, в свою очередь, связаны с иммунизирующей дозой молекулярных конструкций, осуществляли с помощью иммунохимического способа, раскрытого в международной заявке на патент № PCT/EP 2014/051670.

Это обеспечило возможность в настоящем изобретении определить количество Ps или LPS, даже если они имеют в значительной степени подобные структуры при присутствии в одной и той же молекулярной конструкции.

И наконец, настоящее изобретение направлено на ограничение количества белка-носителя в вакцинном составе до иммуногенно возможного минимума по отношению к более широкому антигенному репертуару конъюгатных антигенов с целью обеспечения антигенной нагрузки на иммунную систему хозяина молекулярных конструкций, получаемых посредством способов конъюгирования, раскрытых выше. Данная стратегия связана с ограничением клинического явления, известного в настоящее время как "носитель-специфичная иммунная интерференция", которая связана с белком-носителем, применяемым в данной гликоконъюгатной вакциной композиции, при рассмотрении в контексте других вакцин, вводимых в ходе процесса иммунизации хозяина-млекопитающего (Dagan R. et al., 2010; Lee L.H. and Blake M.S., 2012).

В следующем разделе экспериментов настоящее изобретение будет раскрыто более подробно в соответствии с предпочтительными вариантами осуществления. Такие варианты осуществления не следует рассматривать как ограничивающие объем защиты раскрытия настоящего изобретения, а исключительно с иллюстративной целью.

### Примеры

#### Пример 1.

i) синтез тетравалентного конъюгатного антигена, содержащего полисахариды *S. typhi*(Vi), *E. coli* (K1) и *V.cholerae* (0139) и белок-носитель энтеротоксоид А;

ii) синтез тетравалентного конъюгатного антигена, содержащего полисахариды *S. typhi* (Vi), *E. coli* (K1) и *V.cholerae* (0139) и белок-носитель цитотоксоид В.

Химическая активация трех Ps с гомологичным Ps-DAB (производным диаминамасляной кислоты).

Эту стадию проводили в соответствии со способом, раскрытым заявителем в п.1 (в стадии А1) формулы изобретения указанного выше патента EP 1501542. Специфические контроли такой активации, а также полученные характеристики активированных структур Ps анализировали с использованием  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии, описанной в международной заявке № PCT/EP 2014/051670.

$^1\text{H}$ -ЯМР-анализ производных Ps-DAB.

1. Раствор Ps и производных Ps-DAB для ЯМР-анализа.

3-4 мг образца полисахарида (PS) или PS-DAB растворяли в 0,7 мл  $\text{D}_2\text{O}$ -фосфатный буфер и переносили в 5 мм пробирку для ЯМР. Концентрация фосфатного буфера, приготовленного в  $\text{D}_2\text{O}$ , составляла 100 мМ, рН 7. Натриевую соль триметилсилилпропионовой кислоты (TSPA),  $(\text{CH}_3)_3\text{Si}(\text{CD}_2)_2\text{COONa}$ , использовали в качестве внутреннего стандарта. Концентрация TSPA составляла 1 мМ.

2. Оборудование для ЯМР.

Использовали высокочастотный ЯМР-спектрометр (600 МГц). Использовали головку зонда диаметром 5 мм с z-градиентной петлей, способной создавать градиенты в z-направлении (параллельно магнитному полю) с силой по меньшей мере  $55 \text{ гс см}^{-1}$ .

3. Подготовка к проведению экспериментов с использованием ЯМР.

После введения образца внутрь магнита выполняли все стандартные процедуры: настройку и калибровку, регулировку магнитного поля, калибровку 90-градусного импульса. Для подавления остаточ-



ного HDO-сигнала можно использовать предварительное насыщение. Для надлежащего предварительного насыщения центр спектра (O1) необходимо установить точно на HDO-сигнал (приблизительно 4,80 ppm), также желательной является надлежащая регулировка магнитного поля.

После настройки параметров для предварительного насыщения проверяют параметры экспериментов с диффузионными градиентами. Используют последовательность стимулированных эхо-импульсов с помощью биполярных градиентов с задержкой продольных вихревых токов.

4. Фингерпринтинг DAB-активации.

Группа  $-CH_2-NH_2$  при 3,08 ppm.

Группа  $-CP_2-TP-CP_2-$  при 3,17 ppm.

5. % DAB-активации в отношении Ps.

% DAB-активации в диапазоне значений 0,5-5,0% моль DAB/моль BRU (основной повторяющейся структурной единицы группоспецифического Ps) при оптимальном молярном диапазоне 1,5-3,0%.

Дериватизация Ps Vi, Ps 0139, Ps K1 с их гомологичными активными сложными эфирами в качестве производных Ps-DAB-MSE.

Эту стадию проводили в соответствии со способом, раскрытым заявителем в п.8 формулы изобретения европейского патента EP 1501542, включенного в данный документ посредством ссылки.

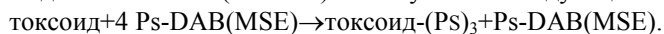
Одновременное связывание трех активированных (полифункциональных) Ps с (полифункциональным) белком-носителем энтеротоксоидом А или цитотоксоидом В.

Химический синтез конъюгата, также известный как реакция связывания, проводили в соответствии со способом, раскрытым заявителем в п.8 формулы изобретения европейского патента EP 1501542. Процедуру, однако, можно рассматривать в данном документе как инновационную, поскольку три реакции связывания проходят одновременно, а не предшествуют одной из реакций связывания за этот период времени (или в виде постадийного процесса).

Данная процедура может быть предпочтительной по отношению к постадийному связыванию каждого Ps-активированного антигена лишь по причине сокращения времени реакции, улучшая таким образом эффективность реакции, при условии, что три активированных Ps находятся в надлежащем состоянии для сравнительного конкурирования при равновесном состоянии реакции связывания (эта характеристика включает сопоставимую среднюю MW, сопоставимый диапазон активации Ps-DAB и сопоставимые стехиометрические соотношения реакционноспособных групп белка и таких групп активированных Ps).

Соответствующая стехиометрия реакции сохраняет принцип общего количества сукцинимидильных сложных эфиров по отношению к трем активированным Ps-антигенам и аминогруппам доступного белка-носителя. Предпочтительно стехиометрию определяют так, чтобы учитывать реакционную способность не более 20-25% аминогрупп, имеющихся в структуре энтеротоксоида А или цитотоксоида В (как пример), для того, чтобы белок оптимально сохранял свой антигенный репертуар.

Реакция связывания энтеротоксоида А или цитотоксоида В (кратко обозначаемых как токсид) с производными Ps-DAB (Ps-DAB) согласуется со следующей стехиометрией:



В случае всей структурной единицы Ps-DAB(MSE) производные относятся к общему количеству равных частей каждой из трех типоспецифических структур Ps в реакции, что приводит к образованию конъюгата, равного в среднем 1 моль белка на 3 моль всех переносимых типоспецифических Ps, совместно с соответствующим избытком производных Ps-DAB(MSE), определенным с помощью константы равновесия

$$K_{eq} = \frac{[\text{токсид-(Ps)}_3][\text{Ps-DAB(MSE)}]}{[\text{токсид}][\text{Ps-DAB(MSE)}]^4} = \frac{[\text{токсид-(Ps)}_3]}{[\text{токсид}][\text{Ps-DAB(MSE)}]^3}$$

Данное уравнение относится к общей концентрации активных сложных эфиров (MSE), полученных из суммы равных частей DAB-активированных Ps-антигенов, которые, в свою очередь, сравнимы с количеством DAB-линкера, количественного определенного с помощью  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии, присутствующего в каждом активированном Ps-антигене (показатель превращения Ps-DAB в Ps-DAB(MSE)  $\geq 98\%$  в молярном отношении).

Химическое уравнение свидетельствует в пользу полного гликозилирования белка-носителя в виде токсоида. Уравнение также показывает, что реакция конъюгирования зависит от концентраций обоих реагентов, нуклеофила (токсид посредством групп  $\epsilon\text{-NH}_2$  его остатков Lys) и электрофила (карбонильного фрагмента сложноэфирных групп Ps-производных), поэтому она определена как реакция  $S_N2$ .

Приведенные выше рассуждения согласуются с экспериментальным наблюдением того, что наибольший выход реакции гликозилирования, полученный при использовании токсоида в качестве белка-носителя, составил 100% белка-носителя и приблизительно 80% (вес./вес.) производных Ps-DAB, присутствующих в реакции, при этом оставшаяся их часть представляет небольшое количество несвязанных Ps-производных, необходимых для сдвига к правой стороне равновесия.

В этом типе реакций растворитель влияет на скорость реакции, поскольку растворители могут ок-

ружать или могут не окружать нуклеофил, препятствуя или не препятствуя таким образом его приближению к атому углерода. Полярные апротонные растворители, как правило, являются более подходящими растворителями для этой реакции, чем полярные протонные растворители, поскольку полярные протонные растворители будут сольватироваться с помощью водородной связи растворителя для нуклеофила и, таким образом, препятствовать его атаке на углерод с покидающей группой. Полярный апротонный растворитель с низкой диэлектрической константой или заблокированным дипольным концом будет способствовать прохождению реакции нуклеофильного замещения  $S_N2$  (предпочтительными примерами являются DMSO, DMF, тетрагидрофуран и т.д.).

Температура реакционной смеси, которая влияет на  $K_{eq}$ , является наиболее низкой температурой, совместимой с используемым выбранным растворителем, с учетом того, что реакция является спонтанной (соответственно экзотермической) и соответственно проходит, как правило, при температуре от 4 до 20°C.

Кроме подробно представленного выше химического механизма конъюгирования, другие химические механизмы можно использовать для осуществления синтеза поливалентного конъюгатного антигена; среди которых непосредственное связывание белка (посредством восстановительного аминирования) с окисленным Ps (посредством отщепления водорода от O) или использование гетерологичных или химически комплементарных линкеров, которые могут служить для активации Ps и белка.

Также, кроме стратегии использования химических механизмов, приводящих к получению мультивалентных сшитых конъюгатов белок-Ps за счет полифункциональных групп белка и таких групп в Ps-компонентах, можно рассмотреть синтез раскрываемой в данном документе антигенной мультивалентной молекулярной конструкции на основе олигосахаридов, полученных из капсулярного Ps, или из олигосахаридов LPS, полученных из белка A, активированных в их концевой восстанавливающей группе для последующего связывания с белком-носителем, как было показано заявителем ранее на примере другой модели конъюгатного антигена в упомянутой выше работе Porro M. et al. в *Molecular Immunology*, 23: 385-391, 1986.

И наконец, полагают, что раскрытая молекулярная конструкция может быть получена путем ферментативного гликозилирования в бактериальных или дрожжевых клетках или других разработанных генно-инженерным путем живых клетках с использованием "специальных" методик рекомбинантных ДНК.

Пример 2.

iii) синтез тетравалентного конъюгатного антигена, содержащего LPS (липополисахариды) *S. enteritidis*, *S. paratyphi A* и *S. dysenteriae* с белком-носителем цитотоксоидом B;

iv) синтез тетравалентного конъюгатного антигена, содержащего LPS (липополисахариды) *S. enteritidis*, *S. paratyphi A* и *S. dysenteriae* с белком-носителем энтеротоксоидом A.

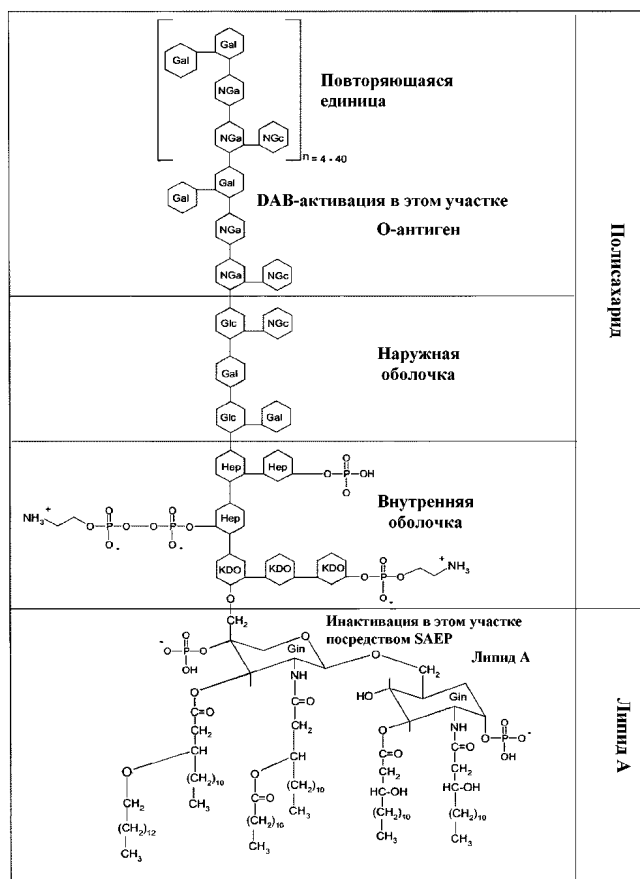
Химическая активация трех LPS с гомологичными производными LPS-DAB (производным диаминамасляной кислоты).

Три LPS химическим путем дериватизировали в их углеводном фрагменте O-антигена соответствующими производными -DAB (смотри ниже схему, показывающую DAB-активированный участок в углеводном фрагменте O-антигена, представляющем собой наиболее гидрофильную часть молекулы LPS). "Сердцевинную" структуру сложно активировать, поскольку она расположена близко к гидрофобному участку (липид A), который представляет собой достаточно защищенную структуру, ответственную за мицеллоподобную структуру LPS, которая также ответственна за биологическую токсичность LPS (например, местное и системное воспаление, опосредованное TNF и IL6, с последующей пирогенной реакцией), а также за оптимальную выраженность антигенности и иммуногенности. В предпочтительном варианте осуществления настоящей заявки биологическую токсичность LPS затем селективно блокируют посредством высокоаффинного связывания с SAEP, что сохраняет оптимальные характеристики LPS, связанные с его надмолекулярной мицеллоподобной структурой.

Стадию DAB-активации проводили в соответствии со способом, раскрытым заявителем в п.1 (в стадии A1) формулы изобретения указанного выше патента EP 1501542. Специфические контроли такой активации, а также полученные характеристики активированных структур Ps анализировали с использованием  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии, описанной в международной патентной заявке № PCT/EP 2014/051670.

$^1\text{H}$ -ЯМР-анализ производных - DAB проводили как описано выше в примере 1.

На следующей схеме представлена общая структура LPS энтеробактерий с выявленными сайтами DAB-активации (необходимой для конъюгирования с белком-носителем) и обязательная биологическая инактивация, проводимая предпочтительно с помощью SAEP (эндотоксинсвязывающего синтетического пептида), что позволяет достигнуть инактивации LPS, сохраняя его надмолекулярную мицеллоподобную антигенную структуру)



Дериватизация LPS *S. enteritidis*, *S. paratyphi A* и *S. dysenteriae* с их активными сложноэфирными гомологами в виде производных LPS-DAB-MSE.

Эту стадию проводили в соответствии со способом, раскрытым заявителем в п.8 формулы изобретения европейского патента EP 1501542.

Одновременное связывание трех активированных (полифункциональных) LPS с (полифункциональным) белком-носителем, энтеротоксином А.

Химическое уравнение, приведенное выше в примере 1, также применимо к конъюгатам токсинов и производных LPS:



То есть

$$K_{eq} = \frac{[\text{токсид}-(\text{LPS})_3][\text{LPS-DAB(MSE)}]^4}{[\text{токсид}][\text{LPS-DAB(MSE)}]^4} = \frac{[\text{токсид}-(\text{LPS})_3]}{[\text{токсид}][\text{LPS-DAB(MSE)}]^3}.$$

Данное уравнение относится к общей концентрации активных сложных эфиров (MSE), полученных из суммы равных частей DAB-активированных LPS-антигенов, которые, в свою очередь, сравнимы с количеством DAB-линкера, количественно определенного с помощью <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии, присутствующего в каждом активированном LPS-антигене (показатель превращения Ps-DAB в Ps-DAB(MSE) ≥ 98% в молярном отношении).

Химический синтез конъюгата, также известный как реакция связывания, проводили в соответствии со способом, раскрытым заявителем в п.8 формулы изобретения европейского патента EP 1501542. Процедуру, однако, можно рассматривать в данном документе как инновационную, поскольку три реакции связывания проходят одновременно, а не предшествуют одной из реакций связывания за этот период времени (или в виде поэтапного процесса). Данная процедура может быть предпочтительной по отношению к поэтапному связыванию каждого Ps-активированного антигена лишь по причине сокращения времени реакции, улучшая таким образом эффективность реакции, при условии, что три активированных Ps находятся в надлежащем состоянии для сравнительного конкурирования при равновесном состоянии реакции связывания (эта характеристика включает сопоставимую среднюю MW, сопоставимый диапазон активации LPS-DAB и сопоставимые стехиометрические соотношения реакционноспособных групп белка и таких групп активированных LPS). Молекулярные конструкции, полученные посредством данного способа, являются, однако, токсичными, поскольку фрагмент липида А LPS активно присутствует в молекулярной структуре. Для того чтобы стремиться к достижению и достигнуть безопасного применения конъюгатной структурной единицы токсид-LPS, структуру LPS необходимо подвергнуть инактивации, в качестве альтернативы, посредством отщепления фрагмента липида А или посредством насыщения

липид А-связывающего сайта с помощью специальной стратегии с использованием эндотоксинсвязывающих синтетических пептидов (SAEP). Последнее представляет собой предпочтительный вариант осуществления в контексте настоящего изобретения (далее см. пример 3).

Пример 3. Получение конъюгатов энтеротоксоид А-эндотоксоид и цитотоксоид В-эндотоксоид из их гомологичных конъюгатов энтеротоксоид А-LPS (эндотоксин)/цитотоксоид В-LPS (эндотоксин).

Эндотоксоиды представляют собой нетоксичные антигены, способные индуцировать специфическую иммунологическую активность против их гомологичных LPS, которые представляют собой нативные основные токсичные антигены, находящиеся на поверхности грам(-) бактерий.

Подробным имеющимся в открытом доступе пособием, которое является исчерпывающим по многим научным аспектам антигенов-эндотоксинов, происходящих из грамотрицательных бактерий "Endotoxins", является Kevin L. Williams, Editor, Informa Health Care USA Inc., publisher, New York (2007).

Эндотоксоид представляет собой молекулярную структурную единицу, включающую в себя эквивалентный комплекс SAEP, эндотоксинсвязывающих синтетических пептидов, с фрагментом липида А LPS (эндотоксинам):

токсоид-(LPS)<sub>3</sub>+3SAEP→токсоид-(эндотоксоид)<sub>3</sub>.

Эндотоксоид, происходящий от указанного видоспецифического (иммунофенотипированного) эндотоксина (липополисахарида), получают в соответствии с научной идеей, изложенной в публикации Rustici et al. (Science 259: 361-365, 1993), и в подробностях на молекулярном уровне, ранее раскрытых в патенте США № 6951652 и в патенте США № 7507718.

Иммунологическая активность эндотоксоида включает образование поликлональных антител IgG (в основном) и изотипов IgM, оказывающих биологическое действие (бактерицидный эффект) посредством механизма, который известен в иммунологии под названием опсонофагоцитоз (OP или антителоопосредованное поглощение бактерий макрофагами и РМС), и прямого бактерицидного механизма (DB, антителоопосредованный лизис бактериальной клеточной стенки), причем оба механизма опосредованы путем активации комплемента.

Эндотоксоиды представляют собой антигены, зависимые от присутствия Т-хелперов в моделях животных, но данный эффект не наблюдается у младенцев человека, у которых иммунная система является не полностью развитой до достижения возраста более 2 лет. По этой причине конъюгирование с белками-носителями, зависимыми от присутствия Т-хелперов, подобное белкам-токсоидам *C. difficile*, о которых упоминалось выше, используется в настоящей заявке для получения требуемого вакцинного продукта.

Таким образом, конъюгаты энтеротоксоида А или цитотоксоида В с выбранным видоспецифическим LPS (эндотоксином) вводили в реакцию с SAEP2 (Rustici et al., Science 259: 361-365, 1993) в условиях, которые в целом описывали в патенте США № 7507718 (см. с. 33, 34 и п.17 формулы изобретения), для достижения инактивации токсидконъюгированного LPS с тем, чтобы образовывались относительно гомологичные токсидконъюгированные эндотоксоиды.

Получали следующие токсидконъюгированные эндотоксоиды:

энтеротоксоид А ковалентно конъюгировали с эндотоксоидами *S.paratyphi A*, *S.dysenteriae*, *S.enteritidis*;

цитотоксоид В ковалентно конъюгировали с эндотоксоидами *S.paratyphi A*, *S.dysenteriae*, *S.enteritidis*;

CRM197 ковалентно конъюгировали с эндотоксоидами *S.paratyphi A*, *S.dysenteriae*, *S.enteritidis*, а также полученный белок-носитель, зависимый от присутствия Т-хелперов, использовали для контроля в экспериментах с иммунизацией на животных моделях.

Пример 4. Комбинация тетравалентного конъюгатного антигена, содержащего полисахариды *S.typhi* (Vi), *E.coli* (K1) и *V.cholerae* (0139), конъюгированного с белком-носителем энтеротоксоидом А, с тетравалентным конъюгатным антигеном, содержащим LPS/эндотоксоиды *S.enteritidis*, *S.paratyphi A* и *S.dysenteriae*, конъюгированным с белком-носителем цитотоксоидом В.

Комбинацию получали путем связывания двух видов молекулярных моделей в дозе, которая подходит для иммуногенных исследований на животных моделях, описанных ниже в примере 8.

Пример 5. Физико-химический анализ антигенной мультивалентной молекулярной конструкции, содержащей полисахариды *S.typhi* (Vi), *E.coli* (K1) и *V.cholerae* (0139), конъюгированные с белком-носителем энтеротоксоидом А или цитотоксоидом В.

GPC-анализ (гель-проникающую хроматографию) на сефарозе 4В-CL использовали для проведения физического анализа антигенной мультивалентной молекулярной конструкции из примера 1. Очистку высокомолекулярного мультивалентного антигена (HMW) проводили путем простого отбора и объединения в пул элюированных фракций со значениями Kd от 0,00 до 0,30.

Полимеры основной структурной единицы молекулярной конструкции получали в виде сшитых молекулярных структурных единиц в связи с полифункциональностью Ps-антигенов (приблизительно 2% от DAB-активации в молярном отношении, что показано с помощью <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии) и полифункциональностью белка-носителя (ок. 104 реакционноспособных аминогрупп/моль токсоида А, что определено с помощью реакции TNBS, доступных в виде нативных 223 остатков Lys токсина А+1 амино-

концевой АА в структуре, охватывающей все 2710 АА последовательности; ок. 85 реакционноспособных аминокрупп/моль токсоида В, что определено с помощью реакций TNBS, доступных в виде нативных 156 остатков Lys токсина В+1 аминок-концевой АА в структуре, охватывающей все 2366 АА последовательности).

Учитывая изложенное, конъюгат при анализе имеет вид полидисперсной, от мономерной до полимерной, молекулярной структурной единицы, которая содержит основную структурную единицу молекулярной конструкции, изложенную в химическом уравнении, с НМВ, которая получена из основной полимеризованной структурной единицы, охватывающей энтеротоксид А ( $MW=3,08 \times 10^5$ ) или цитотоксид В ( $MW=2,70 \times 10^5$ ), и средней  $MW=10^5$  для каждого из трех Ps/LPS-антигенов (или в общей сложности ок.  $3,0 \times 10^5$ ), с получением в результате точного среднего значения  $MW 6,10 \times 10^5$  на основную структурную единицу; соответственно несколько сшитых структурных единиц таких основных структур достигает нескольких миллионов и главным образом элюируется при  $V_0$  в сефарозной колонке 4В-CL.

Соотношение вес./вес. белка-носителя и каждого из трех типоспецифических Ps составляет ок. 3,6 (табл. 1 ниже); причем данное соотношение вес./вес. дает среднее молярное соотношение (R) белок/типоспецифический Ps, составляющее ок. 1,0, которое соответствует среднему соотношению один моль белка/моль типоспецифического Ps, что выражено в химическом уравнении. Таким образом, полученная экспериментальным путем сшитая молекулярная структурная единица соответствует молекулярной модели, образованной несколькими полимерными структурными единицами, включающими в себя основную структурную единицу, которая включают в себя только один моль белка-носителя, несущего всего три моля типоспецифического Ps (один моль для каждого типоспецифического Ps).

Пример 6. Иммунохимический анализ антигенной мультивалентной молекулярной конструкции энтеротоксид А-PsVi, PsK1, Ps0139 или цитотоксид В-PsVi, PsK1, Ps0139.

Очищенную с помощью GPC молекулярную конструкцию анализировали при помощи ингибиторного ИФА для определения серологической специфичности четырех разных сывороточных поликлональных антител (PAb) и для количественного и качественного определения присутствия каждого антигена конструкции, как раскрыто в международной заявке на патент PCT/EP 2014/051670.

Сравнение химического титрования и иммунохимического титрования углеводных антигенов для исследования их количественной эквивалентности проводили с использованием ингибиторного ИФА путем экспериментально определенного параметра  $MIC_{50}$  (минимальной ингибиторной концентрации выбранного углеводного антигена, выступающего в качестве ингибитора реакции гомоличный эталонный Ps-Ab) с целью оценки и установления корреляции иммунохимического способа по отношению к химическому способу в аналитическом контроле такого типа молекулярной конструкции.

Пример 7. Определение концентрации углеводного антигена либо в активированной форме, либо в форме мультивалентного конъюгата: сравнение химического титрования с иммунохимическим титрованием.

Иммунохимические титры получали в соответствии со способом, изложенным выше, в связи с ингибиторным ИФА, в сравнении с химическими титрами, полученными в соответствии со способами, изложенными в конкретном разделе международной заявки на патент PCT/EP 2014/051670; иммунохимические титры неизвестных образцов каждого из трех углеводспецифических антигенов, либо в активированной, либо в конъюгированной форме, определяли путем интерполяции линейной части кривой референтного образца, построенной при помощи ингибиторного ИФА с использованием известного количества химически титрованного углеводного антигена.

Такую же методологию, описанную для количественного и качественного иммунохимического анализа каждой приведенной выше молекулярной конструкции, затем использовали для получения характеристик конечного состава поливалентной вакцины, содержащей комплекс из молекулярных конструкций, каждая из которых образована триадой Ps/LPS (эндотоксид) конъюгатов двух токсидов *S. difficile*, используемых в качестве белков-носителей, для получения полной характеристики иллюстративной 4-валентной или 8-валентной вакцины.

Пример 8. Вакцинный состав по отношению к стехиометрии мультивалентных молекулярных конструкций.

Составы широкого спектра действия такого типа для вакцин против кишечных инфекций можно безопасно получить путем использования молекулярных конструкций по настоящему изобретению, что позволяет использование в уменьшенном количестве белка-носителя для переноса конкретного количества конъюгированных Ps и LPS (эндотоксидов) антигенов. Как конкретно упоминается в иллюстративном составе вакцины против кишечных инфекций, содержащей 8-валентный состав, который включает наиболее распространенные эпидемиологически значимые специфические Ps и LPS/(эндотоксиды), следующие молекулярные конструкции (табл. 1) синтезировали и проанализировали в качестве расширенного примера предпочтительных вариантов осуществления в соответствии со способами, изложенными выше в разных примерах, содержащих подробную информацию о молекулярных конструкциях на основе энтеротоксидов А и цитотоксидов В, несущих цитотоксид PS/LPS (эндотоксиды), а также их комбинацию.

Общее количество двух белков-носителей в виде токсоеидов, представленных в качестве примера в этой 8-валентной вакцине против кишечных инфекций, полученной и составленной в соответствии с процедурами, изложенными в данной заявке и определенными посредством стехиометрии полученных в результате молекулярных конструкций, каждая из которых экспрессирует встроенные множественные эпитопы, согласуется со следующим молярным составом относительно дозы каждой молекулярной конструкции, содержащей ок. 1 мкг каждого из двух белков-носителей в виде токсоеидов (MW=308K и 270K соответственно) и ок. 0,3 мкг каждого из трех выбранных DAB-активированных, типоспецифических Ps/LPS (эндотоксоеидов) антигенов (средняя MW=100K, исходя из двух разных критериев анализа, то есть оценки средней величины путем молекулярной фильтрации на калиброванных мембранных фильтрах и оценки средней величины при помощи GPC, используя во всех случаях референтные молекулы углеводов, таких как декстраны с разной MW).

Таблица 1

Молекулярная конструкция	Соотношение среднего веса токсоеид/Ps	Соотношение среднего веса токсоеид/Ps
Энтеротоксоеид А для:		
Ps E coli	3,30	1,08
Ps S typhi	3,80	1,24
Ps V cholerae	4,05	1,33
Цитотоксоеид В для:		
Эндотоксоеид S enteritidis	3,65	1,36
Эндотоксоеид S paratyphi A	3,01	1,12
Эндотоксоеид S dysenteriae	3,90	1,45

В иллюстративных молекулярных конструкциях среднее значение (вес./вес.) соотношения белка и Ps/LPS составляет  $3,61 \pm 0,39$  (10,8%), что соответствует среднему (моль/моль) соотношению  $1,26 \pm 0,14$  (11,1%).

Концепция расчета и сравнения характеристик конъюгатных антигенов на молярной основе является основополагающей, поскольку иммунная система реагирует на антиген на молярной основе, такой как в природе осуществляются каждая химическая или биохимическая реакция превращения вещества, поэтому эта концепция ссылается на MW антигена.

Соответственно в зависимости от средней MW каждого типоспецифического Ps/LPS-антигена и молекулярного веса белков-носителей в виде токсоеидов молярные соотношения конъюгатных антигенов можно изменять путем подбора их антигенных компонентов. Наиболее предпочтительно, чтобы молярные соотношения белка-носителя и каждого типоспецифического Ps-антигена равнялись или составляли больше 1,0 для вероятной оптимальной экспрессии Т-хелперной зависимости. Кроме этого молярного параметра также важно учитывать среднее количество ковалентных связей, расположенных между белком и каждым типоспецифическим углеводным антигеном, что соответствует скорости активации типоспецифического полисахарида, поскольку этот гибридный молекулярный участок представляет собой такой участок, который, как было экспериментально доказано, является ответственным за приобретенные свойства зависимости конъюгатной молекулы от Т-хелперов (Arndt and Porro, 1991).

Однако возможным является синтез молекулярных конструкций в соответствии с разной стехиометрией синтеза, что подробно изложено в международной заявке на патент PCT/EP 2014/051670, учитывая количество реагентов, принимающих участие в равновесии химической реакции, изложенной в химическом уравнении выше, результатом которой может являться молекулярная конструкция с различной стехиометрией, где количество зависимо от присутствия Т-хелперов белка-носителя в молекулярной конструкции можно оптимально выбрать в соответствии с оптимальной экспрессией иммуногенности таких молекулярных конструкций в разных возрастных группах популяции людей. В обоих иллюстративных от 4-валентных до 8-валентных составах, содержащих от одной до двух молекулярных конструкций, каждая из которых переносит три типоспецифических Ps/LPS, общее количество каждого белка-носителя в виде токсоеида составляет ок. 1 мкг, тогда как количество конъюгированных типоспецифических Ps/LPS (эндотоксоеидов) составляет ок. 0,3 мкг соответственно.

Соответственно целью изложенных выше вариантов осуществления является предоставление доказательства того факта, что раскрытую мультивалентную молекулярную конструкцию со встроенными эпитопами можно синтезировать в широком спектре стехиометрических параметров с тем, чтобы затем правильно определить, у хозяев-млекопитающих, в частности у людей, оптимальную дозу конструкции, особенно с учетом разных возрастных групп (от младенцев до пожилых людей), подлежащих иммунизации такими вакцинными составами широкого спектра действия.

В табл. 2 ниже показаны разные молекулярные модели, полученные для изложенной выше концепции, путем использования той же самой химической реакции синтеза, хотя и с использованием разных "специальных" выбранных стехиометрий для реагентов, принимающих участие в поддержании равновесия.

Далее ниже приведены некоторые соображения в отношении двух токсоеидов, используемых в настоящей заявке, энтеротоксоеида А и цитотоксоеида В, поскольку они являются (или могут являться) производными, подвергнутыми химической обработке, гомологичных токсинов. Данная известная процедура

ра, использованная для получения важных вакцин, таких как токсин столбняка и токсин дифтерии, является важной для получения токсинов, целенаправленно инактивированных для безопасного применения у людей в качестве иммуногенов. В настоящей заявке полагают, что средняя MW очищенных токсинов сравнима с молекулярной массой токсинов, из которых их получили. Однако, помимо других характеристик, существенная разница между токсинами и токсинами заключается в количестве остаточных первичных аминогрупп из остатков лизина, которые остаются в структурах токсинов после химической инактивации. В среднем от 47 до 54% реакционноспособных аминогрупп выявляют в токсинах по отношению к исходно присутствующим в структуре гомологичным токсинам, которые осуществляют свою функцию в качестве нуклеофильных групп в реакции связывания с активированными Ps/LPS-антигенами. При сравнении структуры двух токсинов с общей структурой известного белка-носителя, такого как CRM197, с точки зрения способности к конкуренции в реакции связывания в качестве нуклеофильного реагента определили, что токсин А имеет ок. 104 аминогрупп/моль ( $MW=3,08 \times 10^5$  для 2,710 AA), тогда как токсин В имеет ок. 85 аминогрупп/моль ( $MW=2,7 \times 10^5$  для 2,366 AA), то есть их молярная плотность (которую мы определили как "молярную нуклеофильную активность") составляет 3,84% в энтеротоксине А и 3,60% в цитотоксине В, два параметра, которые в значительной степени ниже, чем рассчитанные для CRM197 (7,47%), которые не обладают высокой способностью для того, чтобы служить в качестве нуклеофильного реагента в приведенной реакции связывания (что подробно изложено в международной заявке на патент № PCT/EP 2014/051670). Однако принимая во внимание значительную разницу в MW двух белков-токсинов (как правило, фактор=5,3 и 4,7 в их пользу по отношению к CRM197), молярные соотношения белков-носителей для каждого углеводного антигена, выбранного для переноса в молекулярных конструкциях, могут быть предпочтительными для токсинов при желании ограничить количество белка-носителя/доза в поливалентном составе. В действительности при сравниваемых рассчитанных на вес дозах двух белков-токсинов в результате их количество приблизительно в 5,0 раз ниже, чем CRM197 на молярной основе. Соответственно необходимо уделить внимание тому факту, что MW носителя является важным параметром, оказывающим воздействие на физико-химические свойства конъюгатов, и она может ограничивать возможность достижения молярного соотношения токсин/специфический Ps/LPS со значением  $\geq 1,0$  для оптимальной индукции зависимости от присутствия Т-хелперов в иммунной системе хозяина.

В табл. 2 перечислены все молекулярные модели, синтезированные для подробно описанной в настоящей заявке работы, являющиеся репрезентативными для разных стехиометрий, используемых для данной цели, которые зависят от i) MW используемого белка-носителя; ii) молярной нуклеофильной активности таких белков-носителей (экспрессирования количества групп  $-NH_2$ /моль белка); iii) средней MW активированных Ps/LPS-антигенов и iv) соответствующей скорости активации Ps/LPS-антигенов (группы DAB-MSE для последующего вступления в реакцию с группами  $-NH_2$  белка). Иллюстративные молекулярные модели служат доказательством пластичности применяемого химического состава и того факта, что белок-носитель может присутствовать в конъюгатной структурной единице в широком спектре взвешенных и молярных соотношений, составляющих выше 1,0 и ниже 1,0. В частности, молярное соотношение белок/Ps варьирует по меньшей мере от 0,3 до 1,0 по отношению к каждому типоспецифическому или группоспецифическому Ps, присутствующему в гликоконъюгате, и по меньшей мере от 0,3 до 1,0 по отношению ко всем трем Ps, причем каждый Ps составляет приблизительно одну треть от общего количества, присутствующего в итоге в гликоконъюгате.

Таблица 2

Молекулярная конструкция	Соотношение среднего веса токсин/Ps	Соотношение среднего веса токсин/Ps
<b>Энтеротоксин А для:</b>		
Ps E coli	3,30	1,08
Ps S typhi	3,80	1,24
Ps V cholerae	4,05	1,33
Ps E coli	1,05	0,34
Ps S typhi	1,15	0,37
Ps V cholerae	1,03	0,33
Эндотоксин S enteritidis	3,35	1,09
Эндотоксин S paratyphi A	3,00	0,97
Эндотоксин S dysenteriae	3,20	1,04
Эндотоксин S enteritidis	1,13	0,37
Эндотоксин S paratyphi A	1,20	0,39
Эндотоксин S dysenteriae	1,05	0,34
<b>Цитотоксин В для:</b>		
Эндотоксин S enteritidis	3,65	1,36
Эндотоксин S paratyphi A	3,01	1,12
Эндотоксин S dysenteriae	3,90	1,45
Эндотоксин S enteritidis	1,23	0,46
Эндотоксин S paratyphi A	1,02	0,38

ЭНДОТОКСОИД <i>S. dysenteriae</i>	1,15	0,43
Ps <i>E. coli</i>	3,60	1,33
Ps <i>S. typhi</i>	3,45	1,28
Ps <i>V. cholerae</i>	3,85	1,43
Ps <i>E. coli</i>	1,25	0,46
Ps <i>S. typhi</i>	1,10	0,40
Ps <i>V. cholerae</i>	1,43	0,53

Пример 9. Иммунологический анализ в животных моделях антигенных мультивалентных молекулярных конструкций энтеротоксоида А и цитотоксоида В (происходящих от гомологичных токсинов *S. difficile*), несущих полисахариды (*S. typhi*, *V. cholerae*, *E. coli*) или LPS/эндотоксоиды (*S. paratyphi* А, *S. dysenteriae*, *S. enteritidis*).

Проводили испытание двух видов конъюгатов с использованием двух белков-токсоидов из *S. difficile* в животной модели на мышах в экспериментах активной иммунизации. В параллельных экспериментах использовали контрольный иммуноген, зависимый от присутствия Т-хелперов, представляющий собой гомологичные конъюгаты CRM197.

Вакцинный состав для Ps-конъюгатов.

Объединяли конъюгаты энтеротоксоида А и цитотоксоида В с PsVi, Ps0139 и PsK1. Стехиометрические характеристики конъюгатов показали среднее соотношение белок/каждый из типоспецифических Ps, составляющее  $3,61 \pm 0,39$  (вес./вес.), что показано в табл. 1 выше.

Вакцинный состав для конъюгатов LPS/эндотоксоиды.

Объединяли конъюгаты энтеротоксоида А и цитотоксоида В с LPS *S. enteritidis*, *S. dysenteriae* и *S. paratyphi* А. Стехиометрические характеристики конъюгатов показали среднее соотношение белок/каждый из типоспецифических LPS/эндотоксоид, составляющее  $3,61 \pm 0,39$  (вес./вес.), что показано в табл. 1 выше.

Объединенные вакцинные составы широкого спектра действия против кишечных инфекций для Ps-конъюгатов и LPS (эндотоксоид)-конъюгатов с использованием белков-носителей энтеротоксоида А и цитотоксоида В.

Для этой цели объединяли конъюгаты энтеротоксоида А с PsVi, Ps0139 и PsK1 и конъюгаты цитотоксоида В с LPS (эндотоксоиды) *S. enteritidis*, *S. dysenteriae* и *S. paratyphi* А.

Дозы и составы иллюстративных вакцин.

В соответствии со стехиометрией молекулярных конструкций, изложенной в табл. 1, вводимая доза составляет ок. 1,0 мкг для каждого конъюгата Ps/LPS (эндотоксоид), присутствующего в каждой молекулярной конструкции, и для каждого токсоида (ок. 3,0 мкг), содержащегося в вакцинном составе; при этом доза составляет ок. 6,0 мкг от общего количества белка, если вакцинный состав содержит токсиды для одной или разных триад переносимых Ps/LPS (эндотоксоид) антигенов (вакцина широкого спектра действия);  $AlPO_4$  использовали в качестве адьюванта при фиксированной дозе 0,5 мг/доза (эквивалентно ок. 0,120 мг алюминия). Адсорбция каждой мультивалентной молекулярной конструкции минеральным адьювантом составляла  $\geq 80$  вес.%, как оценивали при помощи ингибиторного ИФА.

Животные.

Каждая группа животных, выбранная для каждого из экспериментов с иммунизацией, описанных ниже, содержала 10 самок мышей Balb/c.

Путь введения.

и.п.

Схема иммунизации.

0, 2, 4 недели; отбор крови в 0, 2, 4, 6 неделю.

Контрольную иммунизацию обычными Ps-антигенами исключали на основании литературных данных о том, что высокоочищенные Ps-антигены не являются в значительной степени иммуногенными у млекопитающих и не "бустируют" антитела изотипа IgG после их повторных введений.

Титры ИФА.

Титры выражали в виде конечной точки реакции, показывающей O.D.  $\geq 2,0$  по отношению к контрольным реакциям с каждым типоспецифическим Ps/LPS (эндотоксоид) и двумя белками-токсоидами. Разведения пулов сывороток проводили последовательно, двукратно, начиная с разведения 1/200.

Иммунологические результаты.

Среднее геометрическое титров IgG к конкретным Ps/LPS (эндотоксоид) или к каждому из двух токсидов в смеси сывороток мышей определяли в помощью ИФА. SD находилось в пределах  $\pm 25\%$  описанного среднего геометрического. Если не указано иное, статистическая значимость среди титров сывороток (определили с помощью t-критерия) составляла  $< 0,01$ . Результаты обобщены в следующих табл. 3 и 4.

Нейтрализация гомологичных токсинов *in vitro*.

Проводили согласно изложенном в Porto et al. (1980) для дифтерийного токсина и в Pavliakova et al. (2000) для токсинов *S. difficile*.

В табл. 3 показан иммунный ответ у мышей на молекулярную модель, включающую в себя энтеро-



токсоид А и цитотоксоид В в качестве белка-носителя для Ps-антигенов *E. coli*, *V. cholerae*, *S. typhi*.

Таблица 3

Ps	Энтеротоксоид А				Цитотоксоид В			
	W0	W2	W4	W6	W0	W2	W4	W6
<b>Vi</b>	<200	200	2600	15800	<200	200	2200	18900
<b>K1</b>	<200	200	3200	12400	<200	200	2400	20000
<b>0139</b>	<200	200	1800	11600	<200	200	1200	14800
<b>Токс.</b>	<200	2800	25800	84400	<200	3200	32600	95 400

В табл. 4 показан иммунный ответ у мышей на молекулярную модель, включающую в себя энтеротоксоид А и цитотоксоид В в качестве носителя для антигенов LPS/эндотоксоиды *S. enteritidis*, *S. paratyphi A*, *S. dysenteriae*.

Таблица 4

LPS(эндотоксоид)	Энтеротоксоид А				Цитотоксоид В			
	W0	W2	W4	W6	W0	W2	W4	W6
<b>S.enteritidis</b>	<200	400	3600	12800	<200	200	1800	10400
<b>S.paratyphi A</b>	<200	200	2400	14800	<200	400	3600	16400
<b>S.dysenteriae</b>	<200	200	2200	16400	<200	400	2800	14200
<b>Токсоид</b>	<200	3400	28200	66400	<200	2400	24800	84200

Результаты, приведенные в табл. 3 и 4 выше, показывают вторичную индукцию биологически функционального изотипа IgG антител для каждого из четырех компонентов двух мультивалентных молекулярных конструкций (мультивалентные конъюгаты токсид-Ps и токсид-эндотоксоид).

В частности, любую бустерирующую активность в отношении иммунной системы, наблюдаемую для белка-носителя, параллельно отмечали для каждого из переносимых Ps-антигенов, что является типичным и хорошо известным поведением для зависимых от Т-хелперов антигенов. Бустерный эффект, полученный в отношении двух токсидов, и биологическая активность индуцированных антител к токсиду также в значительной степени подтверждают тот факт, что мультивалентная молекулярная конструкция обладает потенциалом к функционированию в качестве антигена у людей для предупреждения токсичности, обусловленной гомологичными токсинами. Следующие результаты получали и выражали в виде кратного увеличения по отношению к титрам первичной иммунизации сывороточных GMT, полученных после второй бустерной дозы, и представили в следующей табл. 5 в виде антитоксических титров.

Таблица 5

Токсоид	Антитела к гомологичному токсину (кратность увеличения для нейтрализации токсина <i>in vitro</i> )
Энтеротоксоид А	456
Цитотоксоид В	562
CRM197	824

Приведенные выше подробные результаты, несмотря на то, что они акцентированы на некоторых конкретных примерах, подтверждают получение и применение вакцин широкого спектра действия против кишечных инфекций для индуцирования иммунитета у хозяев-млекопитающих к белкам-носителям энтеротоксоиду А и цитотоксоиду В *S. difficile*, а также к переносимым Ps *E. coli*, *V. cholerae*, *S. typhi* и к переносимым эндотоксоидам *S. paratyphi A*, *S. dysenteriae*, *S. enteritidis*. С учетом изложенного выше капсульный Ps *S. difficile* также можно рассматривать как Ps-антигены, переносимые двумя токсидом гомологичного патогенного микроорганизма, согласно подробному описанию молекулярной конструкции.

Состав на основе вакцины широкого спектра действия, изложенный в примерах 8 и 9, обладает объективными преимуществами вакцинного состава, который учитывает простое и последовательное связывание каждого из шести разных конъюгатов Ps/LPS (эндотоксоид) с каждым из двух белков токсидов:

А) путем использования молекулярной модели со встроенными множественными эпитопами можно в действительности уменьшить количество белка-носителя, присутствующего в составе широкого спектра действия (например, применение лишь двух триад конъюгатов снижает количество белка-носителя

до 1/3 или 33% количества белка-носителя, присутствующего в составе шести связанных конъюгатов);

В) число введений может быть снижено до всего лишь 3 введений при очевидной экономии материалов и ресурсов в дополнение к более низкому стрессированию вовлеченного хозяина-млекопитающего (минимальное количество 3 инъекции, одна примированная доза и две бустерные дозы, для каждой из шести отдельных типоспецифических вакцин в результате даст в целом 18 введений).

Список литературы.

Arndt and Porro, *Immunobiology of Proteins and Peptides*, Edited by M.Z. Atassi, Plenum Press, New York and London, pages 129-148, 1991.

Chan M. et al. *Scientific reports* (www.nature.com), DOI 10.1038/srep11507 of June 17, 2015.

Dagan R. et al. *Vaccine*, 28:5513-5523 (2010)

Donald R. et al. *Microbiology*, 159: 1254-1266, 2013.

Endotoxins. Kevin L. Williams, Editor, Informa Health Care USA Inc., publisher, New York, 2007.

Европейский патент EP 1501542.

Патент США № 6951652.

Патент США № 7507718.

Jones M.K. et al., *Science*, 346: 755-759, 2014.

Lee L.H. and Blake M.S., *Clinical and Vaccine Immunol.*, pg. 551-556 (2012)

Libby J.M. et al., *Infect.Immun.* 36: 822-829, 1982.

Lindesmith LC et al.(2015), *PLoS Med* 12 (3): e1001807.  
doi:10.1371/journal.pmed.1001807

Liverly D.M. et al., *Infect. Immun.* 47:349-352, 1985.

Lowy I. et al. , *New England J. Med.* 362: 197-205, 2010.

Pavliakova D. et al., *Infect. Immun.*, 68:2161-2166,

2000.

Международная заявка на патент WO2004/052394 A1.  
Международная заявка на патент № PCT/EP2014/051670.

Porro M. et al. *Molecular Immunology*, 23: 385-391, 1986.

Porro M. et al. *J. Infect. Dis.*, 142:716-724,1980

Romano M. et al., *Toxins*, 6:1385-1396, 2014.

Rupnick M. et al. *Nat Rev Microbiol.* 7(7):526-536, 2009.

Rustici A. et al., *Science* 259: 361-365, 1993.

Salcedo J. et al., *Gut*, 41:366-370-1997.

Simor A.E. et al. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, Vol. 23, No. 11,696-703, 2002.

Sougioltzis S. et al., *Gastroenterology*, 128: 764 770, 2005.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенная мультивалентная молекулярная конструкция для получения вакцины для защиты субъекта от инфекций, вызванных по меньшей мере одной из энтеропатогенных бактерий, выбранных из *Clostridium difficile*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella dysenteriae*, *Salmonella choleraesuis* или их комбинации, включающая в себя основные структурные единицы, содержащие зависимый от присутствия Т-хелперов инактивированный белок-носитель, выбранный из энтеротоксоида А или цитотоксоида В из

*Clostridium difficile*, ковалентно связанный с тремя углеводными структурами с разной серологической специфичностью, выбранными из капсульных полисахаридов *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* и *Clostridium difficile* или их комбинации, где каждая углеводная структура содержит по меньшей мере один из повторяющихся основных эпитопов, включающих в себя не менее пяти-двенадцати моносахаридных остатков, где по меньшей мере один моль белка-носителя связан по меньшей мере с одним молекул каждой из трех углеводных структур или их молярной суммой.

2. Антигенная мультивалентная молекулярная конструкция по п.1, где указанные энтеротоксоид А или цитотоксоид В, происходящие из *Clostridium difficile*, инактивированы путем обработки формалином или с помощью технологии рекомбинантных ДНК.

3. Антигенная мультивалентная молекулярная конструкция по п.1 или 2, выбранная из энтеротоксоида А, ковалентно связанного с капсульными полисахаридами *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* и *Escherichia coli*;

цитотоксоида В, ковалентно связанного с капсульными полисахаридами *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* и *Escherichia coli*.

4. Применение антигенной мультивалентной молекулярной конструкции по любому из предыдущих пунктов в вакцине для защиты субъекта от инфекций, вызванных по меньшей мере одной из энтеропатогенных бактерий, выбранных из *Clostridium difficile*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella dysenteriae*, *Salmonella choleraesuis* или их комбинации.

5. Вакцинный состав для защиты субъекта от инфекций, вызванных по меньшей мере одной из энтеропатогенных бактерий, выбранных из *Clostridium difficile*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella dysenteriae*, *Salmonella choleraesuis* или их комбинации, содержащий по меньшей мере одну антигенную мультивалентную молекулярную конструкцию по любому из пп.1-3 в физиологически приемлемой среде.

6. Вакцинный состав по п.5, дополнительно содержащий фармацевтически приемлемые адьюванты или наполнители.

7. Вакцинный состав по п.5 или 6, где доза каждого антигена-носителя и/или переносимых антигенов находится в диапазоне от 0,1 до 100 мкг, при этом предпочтительно составляет от 1 до 10 мкг.

8. Вакцинный состав по п.6 или 7, где указанный адьювант выбран из неорганического адьюванта, выбранного из фосфата алюминия, гидроксида алюминия; органического адьюванта, выбранного из адьювантов на основе сквалена, таких как MF59, QF 21, Addavax, и биологического адьюванта, выбранного из монофосфорил-липида А и дикориномиколата трегалозы.

9. Вакцинный состав по любому из пп.6-8, где количество адьюванта находится в диапазоне 0,1-1 мг/доза, при этом предпочтительно составляет 0,5 мг/доза.

10. Вакцинный состав по любому из пп.5-9, причем указанный состав является подходящим для введения подкожным, внутримышечным, внутрикожным или чрескожным путем.

11. Применение вакцинного состава по любому из пп.5-10 в области медицины человека или ветеринарной медицины для защиты субъекта от системной и кишечной инфекций, вызванных по меньшей мере одной из энтеропатогенных бактерий, выбранных из *Clostridium difficile*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella dysenteriae*, *Salmonella choleraesuis*, *Klebsiella*, *Enterobacter* или их комбинации.

12. Применение по п.11, где указанный субъект представляет собой человека.

13. Способ конъюгирования для получения антигенной мультивалентной молекулярной конструкции по любому из пп.1-3, который включает следующие стадии:

а) химической активации трех антигенно отличающихся углеводных структур, выбранных из капсульных полисахаридов *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* и *Clostridium difficile*;

с обеспечением полифункциональности путем отщепления водорода от О посредством окисления и восстановительного аминирования с образованием восстановленных иминовых связей с алкилдиаминовым спейсером с последующей дериватизацией до активных сложных эфиров;

б) одновременного связывания трех углеводных структур на основе производных сложных эфиров с аминокетонами полифункционального белка-носителя энтеротоксоида А или цитотоксоида В из *Clostridium difficile* посредством образования амидных связей;

где по меньшей мере один моль белка-носителя вводят в реакцию по меньшей мере с одним молекул каждой из указанных антигенно отличающихся углеводных структур или их молярной суммой.

14. Способ конъюгирования по п.13, где углеводные структуры являются химически активированными в их соответствующих производных диаминомасляной кислоты, а активные сложные эфиры представляют собой сукцинимидильные сложные эфиры.

15. Способ конъюгирования для получения антигенной мультивалентной молекулярной конструкции по любому из пп.1-3, который включает одновременное связывание аминокетонами полифункционального белка-носителя энтеротоксоида А или цитотоксоида В из *Clostridium difficile* с тремя антигенно отличающимися углеводными структурами, выбранными из капсульных полисахаридов *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* и *Clostridium difficile*;

посредством восстановительного аминирования с образованием восстановленной(восстановленных) иминовой связи(иминовых связей), причем такие углеводные структуры предварительно активируют с обеспечением полифункциональности, с молекулярными спейсерами или без них, путем отщепления водорода от О в смежных гидроксильных группах посредством окисления.

16. Способ конъюгирования по любому из пп.13-15, где углеводные структуры из стадии а) содержат по меньшей мере один из повторяющихся основных эпитопов, включающих в себя не менее пяти-двенадцати моносахаридных остатков, что оценивают путем определения молекулярной массы и ЯМР-спектроскопии, при этом оценивают антигенность указанных повторяющихся основных эпитопов по реакционной способности с типоспецифическими или группоспецифическими поликлональными или моноклональными антителами посредством определения их соответствующих значений  $MI_{C_{50}}$  (минимальной ингибиторной концентрации) при ингибировании их эталонной системы гомологичный полисахарид-антитело.

