

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202191393 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.10.12(22) Дата подачи заявки  
2019.11.22(51) Int. Cl. C07H 17/04 (2006.01)  
A61K 31/702 (2006.01)  
A61K 31/08 (2006.01)  
A61K 31/40 (2006.01)  
A61P 31/04 (2006.01)

## (54) СТАБИЛЬНАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ CLOSTRIDIUM DIFFICILE

(31) 18207920.2

(32) 2018.11.22

(33) EP

(86) PCT/EP2019/082331

(87) WO 2020/104697 2020.05.28

(71) Заявитель:  
ИДОРСИЯ ФАРМАСЬЮТИКЛЗ ЛТД  
(CH)

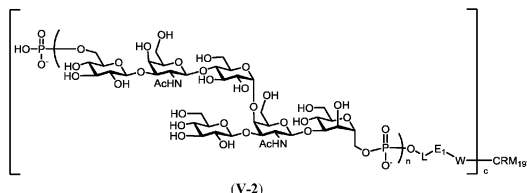
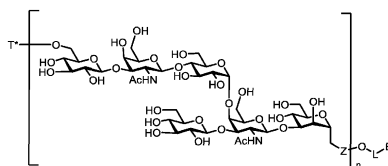
(72) Изобретатель:

Эммади Мадху, Лисбоа Марильда П,  
Кноп Даниэль, Моннанда Бопанна  
(DE), Фон Бонин Арне (CH), Перейра  
Клейни Лебев (DE)

(74) Представитель:

Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,  
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов  
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,  
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к синтетическому сахариду общей формулы (I), который относится к полисахариду клеточной поверхности PS-II Clostridium difficile и его конъюгату. Указанный синтетический сахарид, указанный конъюгат и фармацевтическая композиция, содержащая указанный синтетический сахарид или указанный конъюгат, являются применимыми для профилактики и/или лечения заболеваний, связанных с Clostridium difficile. Кроме того, синтетический сахарид общей формулы (I) является применимым в качестве маркера в иммунологических анализах для обнаружения антител к бактериям Clostridium difficile.



A1

202191393

202191393

A1

СТАБИЛЬНАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*5 **Область техники изобретения**

Настоящее изобретение относится к синтетическому сахариду общей формулы (I), который относится к полисахариду клеточной поверхности PS-II *Clostridium difficile* и его конъюгату. Указанный синтетический сахарид, указанный конъюгат и фармацевтическая композиция, содержащая указанный синтетический сахарид или указанный конъюгат, являются устойчивыми к гидролизу, длительно стабильными, термостабильными и являются применимыми для предотвращения и/или лечения заболеваний, связанных с *Clostridium difficile*, на данный момент называемыми *Clostridioides difficile*. Кроме того, синтетический сахарид общей формулы (I) является применимым в качестве маркера в иммунологических анализах для обнаружения антител к бактериям *Clostridium difficile*.

15 **Предпосылки создания изобретения**

*Clostridioides difficile*, в прошлом известная как *Clostridium difficile*, представляет собой грамположительную спорообразующую анаэробную бактерию, которая считается наиболее важной определяемой причиной нозокомиальной диареи. Термины *Clostridioides difficile* и *Clostridium difficile* используются в данном документе как синонимы, и оба они сокращены до *C. difficile*. Она поселяется в кишечнике человека, таким образом приводя к инфекциям *Clostridium difficile* (CDI). CDI также стала наиболее часто диагностируемой причиной госпитальной диареи, особенно в группах риска, которые включают пожилых пациентов и пациентов с иммунодефицитом, а также пациентов, получающих лечение антибиотиками. Инфекции, вызываемые *C. difficile*, становятся серьезной проблемой из-за быстрого роста заболеваемости CDI за последние десять лет, что в основном связано с появлением гипервирулентного и ныне преобладающего штамма риботипа 027, вызывающего эпидемические вспышки с повышенной заболеваемостью, смертностью и высоким уровнем рецидивов. Стоимость лечения значительно возрастает, особенно в случае рецидива CDI. Таким образом, профилактика инфекций, вызываемых *Clostridium difficile*, весьма желательна, а вакцинация групп риска является наиболее экономичным и мощным средством. Однако вакцина против *Clostridium difficile* еще не разработана.

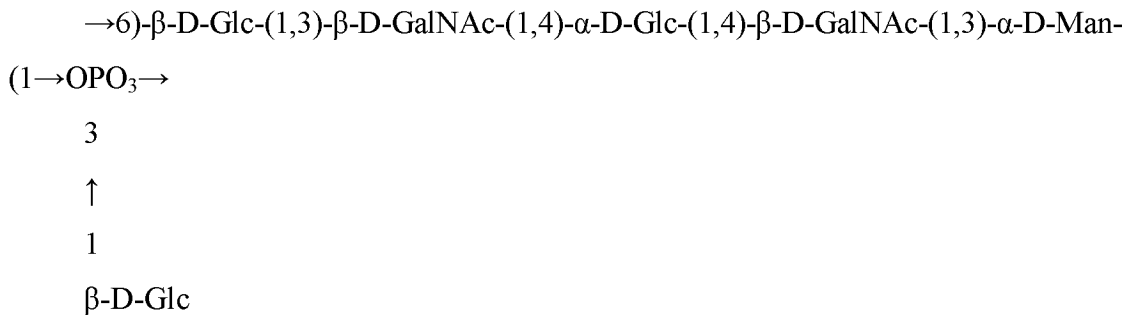
Углеводы, попадающие на поверхность клеток бактерий, часто являются иммуногенными и представляют собой потенциальных кандидатов для разработки

вакцины. По сравнению с белками, углеводы являются эволюционно более стабильными, и когда они ковалентно соединены с белком-носителем, олигосахаридные антигены могут вызывать длительную, зависимую от Т-клеток защиту.

5 Были идентифицированы три различные структуры полисахаридов клеточной стенки, которые экспрессируются клетками *C. difficile*, названные PS-I, PS-II и PS-III (*Expert Rev. Vaccines* **2013**, 12, 421). Хотя выражение сахарид PS-I может быть более ограниченным, например: экспрессируемый в риботипе 027, сахарид PS-II был обнаружен во всех исследованных риботипах *C. difficile*, что указывает на то, что

10 сахарид PS-II может быть консервативным антигеном клеточной поверхности.

Повторяющаяся единица сахариды PS-II *C. difficile* состоит из:



15 Сахарид PS-II *C. difficile* гидролизуется в воде из-за химической лабильности (1 → 6) фосфодиэфирной связи, соединяющей PS-II повторяющуюся единицу в аномерном положении маннозы, тем самым затрудняя экстрагирование из клеток обычно используемой горячей уксусной кислотой или водой/фенолом. Расщепление фосфодиэфирной связи O1-C1 следует удалению группы сложных фосфоэфиров, что приводит к образованию гексасахаридной единицы PS-II. Расщепление

20 фосфодиэфирной связи сахариды PS-II повышается в присутствии кислот, оснований или ионов металлов. Из-за нестабильности сахарид PS-II *C. difficile* в растворе, сахарид или его конъюгат, при использовании в качестве вакцины, необходимо соответствующим образом буферизовать в жидком составе или лиофилизировать в виде твердого состава, который необходимо восстанавливать перед использованием. Однако лиофилизация и холодное хранение вакцин приводят к удорожанию

25 производства и сложности доставки вакцины, поскольку требуется работающая система холодовой цепи, обеспечивающая оптимальные температуры во время транспортировки, хранения и обработки. Нестабильность сахариды PS-II *C. difficile* хорошо задокументирована в уровне техники. Таким образом, требуется новая стабильная вакцина против *C. difficile* в форме жидкого состава.

30

Международная патентная заявка WO 2009/033268 A1 раскрывает выделение PS-I и PS-II-сахарида клеточной поверхности *C. difficile* из бактерий *C. difficile* штаммов риботипа 027, МОН900 и МОН718. Синтетический подход к сахариду клеточной поверхности PS-II *C. difficile* был использован Danieli et al. (Org. Let. 2011, 13, 378–381), Costantino et al. (WO 2012/085668 A2), Seeberger (WO 2012/119769 A1) и Oberli et al. (Chemistry & Biology 2011, 18, 580). У Monteiro (Meth Mol. Biol. 2016, 397–408) указано о выделении водорастворимых PS-I и PS-II, а также водо- и фенолрастворимых полисахаридов PS-III из биомассы *C. difficile* обработкой горячей водой - фенолом.

Задача настоящего изобретения состоит в обеспечении четко определенного синтетического сахара общей формулы (I), который является метаболически стабильным, устойчивым к гидролизу и стабильным при хранении в жидких составах и который вырабатывает антитела, защищающие от заболеваний, вызываемых *C. difficile*. Указанный сахарид может быть конъюгированным с иммуногенным носителем, с обеспечением его конъюгата и фармацевтической композиции, которые пригодны для предотвращения и/или лечения заболеваний, связанных с *C. difficile*. Кроме того, синтетический сахарид общей формулы (I) является пригодным в качестве маркера в иммунологических анализах для обнаружения антител к бактериям *C. difficile*.

Задача настоящего изобретения решается путем изучения независимых пунктов формулы. Дополнительные полезные особенности, аспекты и подробности настоящего изобретения очевидны из зависимых пунктов формулы изобретения, описания, фигур и примеров настоящей заявки.

### **Описание изобретения**

#### **Определения**

Термин «линкер», используемый в данном документе, охватывает молекулярные фрагменты, способные соединять восстанавливающий конец моносахарида сахара с иммуногенным носителем или твердой подложкой, необязательно путем связывания по меньшей мере с одной соединяющей молекулой. Таким образом, функция линкера *per se* или вместе с соединяющей молекулой состоит в том, чтобы устанавливать, поддерживать и/или соединять мостиком определенное расстояние между восстанавливающим концом моносахаридом и иммуногенным носителем или твердой подложкой. Сохраняя определенное расстояние между сахаридом и иммуногенным носителем, можно избежать защиты иммуногенных сахаридов эпитопов структурой иммуногенного носителя (например, вторичная структура белка-носителя). Кроме того, линкер обеспечивает более высокую эффективность сопряжения с сахарами за счет

уменьшения стерических затруднений реактивных групп (Methods in Molecular Medicine 2003, 87, 153-174). Более конкретно, один конец линкера соединен с экзоциклическим атомом кислорода в аномерном центре восстанавливающего конца моносахарида, а другой конец соединен через атом азота с соединяющей молекулой или с иммуногенным носителем или твёрдой подложкой.

Любой линкер для сахаридных конъюгатов (например, сахаридный конъюгат белок-носитель, конъюгат антитело-медикамент), известный в данной области техники, может быть использован в рамках настоящего изобретения. Из большого количества публикаций, направленных на сахаридные конъюгаты белки-носители, специалист в данной области может легко представить себе пригодные линкеры, поскольку в данном документе раскрываются сахариды и конъюгаты (см. "Antimicrobial glycoconjugate vaccines: an overview of classic and modern approaches for protein modification" в Chem Soc Rev 2018, Advance Article, DOI: 10.1039/C8CS00495A; в также Acc Chem Res 2017, 50, 1270-1279), поскольку используемый линкер, т.е. его длина и тип связи не оказывает существенного влияния на иммуногенность сахаридного конъюгата (см. PLoS ONE 2017, 12 (12): e0189100; J. Immun. Meth. 1996, 191, 1-10). Такие пригодные линкеры безвредны (т.е. нетоксичны) и неиммуногенны (т.е. не приводят к образованию незащищающих антител при иммунизации конъюгатом) и включают, но не ограничиваются ими, коммерчески доступный бифункциональный полиэтиленгликоль (Journal of Controlled Release 2013, 172, 382-389; J. Immun. Meth. 1996, 191, 1-10), производные глутаровой кислоты (J. Org. Chem. 2005, 70 (18), 7123-7132), производные адипиновой кислоты, скваратные производные, алкины, N-гидроксисукцинимиды, такие как коммерчески доступные MFCO-NHS (сложный эфир монофторзамещенного циклооктин N-гидроксисукцинимиды), малеимиды (как описано в Acc. Chem. Res. 2017, 50, 1270- 1279), или гидрофильные алкилфосфинаты и сульфонила (как описано в WO2014080251A1).

Используемый в данном документе термин «соединяющая молекула» относится к бифункциональной молекуле, содержащей функциональную группу X и функциональную группу Y, где функциональная группа X способна входить в реакцию с концевой аминогруппой на линкере L и функциональная группа Y способна входить в реакцию с функциональной группой, присутствующей на иммуногенном носителе или на твёрдой подложке. На Фигуре 3 показаны примеры коммерчески доступных соединяющих молекул, но они не ограничивают соединяющие молекулы, которые могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, примерами,

представленными в данном документе. Следует понимать, что соединяющая молекула не является частью линкера или иммуногенного носителя или твёрдой подложки.

Используемый в данном документе термин «адъювант» относится к иммунологическому адъюванту, т.е. веществу, используемому в композиции вакцины, которая модифицирует или усиливает эффект каждой вакцина путем усиления иммунного ответа на данный антиген, содержащийся в вакцине, не будучи антигенно связанным с ним. Для специалиста в данной области классически знакомые примеры адъювантов включают:

- композиции, содержащие минералы, включая соли кальция и соли алюминия (или их смеси). Соли кальция включают фосфат кальция. Соли алюминия включают гидроксиды, фосфаты, сульфаты и т. д., причем соли принимают любую пригодную форму (например, гель, кристаллическую, аморфную и т. д.). Адсорбция для этих солей является предпочтительной. Композиция, содержащая минерал, также может быть приготовлена в виде частицы соли металла. Также могут использоваться адъюванты, известные как гидроксид алюминия и фосфат алюминия. В изобретении можно использовать любой из «гидроксидных» или «фосфатных» адъювантов, которые обычно используются в качестве адъювантов. Адъюванты, известные как «гидроксид алюминия», обычно представляют собой соли оксигидроксида алюминия, которые, как правило, являются по меньшей мере частично кристаллическими. Адъюванты, известные как «фосфат алюминия», обычно представляют собой гидроксифосфаты алюминия, часто также содержащие небольшое количество сульфата (например, сульфат гидроксифосфата алюминия). Их можно получить путем осаждения, причем условия реакции и концентрации во время осаждения влияют на степень замещения фосфата гидроксидом в соли. Смеси как гидроксида алюминия, так и фосфата алюминия могут быть использованы в составах в соответствии с настоящим изобретением;

- сапонины, которые представляют собой гетерологичную группу стероловых гликозидов и тритерпеноидных гликозидов, которые содержатся в коре, листьях, стеблях, корнях и даже цветках многих видов растений. Сапонины из коры *Quillaja saponaria*, дерева Molina широко изучены как адъюванты. Сапонины также могут быть коммерчески получены из *Smilax ornata* (сарсапарилла), *Gypsophilla paniculata* (перекати поле) и *Saponaria officinalis* (мыльный корень). Составы адъювантов сапонины включают очищенные составы, такие как QS21, а также липидные составы, такие как ISCOM. Сапониновые композиции были очищены с помощью ВЭЖХ и ОФ-

ВЭЖХ. Были определены конкретные очищенные фракции с использованием этих методик, в том числе QS 7, QS 17, QS 18, QS21, QH-A, QH-B и QH-C. Сапониновые составы могут также включать стерол, например холестерин. Комбинации сапонинов и холестеринов могут быть использованы для образования уникальных частиц, называемых иммуностимулирующими комплексами (ISCOM). ISCOM обычно включают фосфолипид, такой как фосфатидилэтаноламин или фосфатидилхолин. В ISCOM можно использовать любой известный сапонин. Предпочтительно, ISCOM включает один или несколько QuilA, QHA и QHC;

5  
10  
15  
- микрочастицы (т.е. частицы диаметром от 100 нм до 150 мкм, более предпочтительно диаметром от 200 нм до 30 мкм или от 500 нм до 10 мкм в диаметре), сформированные из веществ, которые являются биоразлагаемыми и нетоксичными. Такие нетоксичные и биоразлагаемые вещества включают, но не ограничиваются ими, поли ( $\alpha$ -гидроксикислоту), полигидроксимасляную кислоту, сложный полиортоэфир, полиангидрид, поликапролактон;

15  
- Лиганды CD1d, такие как  $\alpha$ -гликозилцерамид, фитосфингозин-содержащие  $\alpha$ -гликозилцерамиды, OCH, KRN7000 [(2S, 3S, 4R)-1-O-( $\alpha$ -D-галактопиранозил)-2-(N-гексакозаноиламино)-1,3,4-октадеканетриол], CRONY-101, 3 "-сульфо-галактозил-церамид;

20  
- иммуностимулирующие олигонуклеотиды, такие как содержащие мотив CpG (динуклеотидная последовательность, содержащая неметилованный остаток цитозина, связанный фосфатной связью с остатком гуанозина), или содержащие мотив CpI (последовательность динуклеотида, содержащая присоединенный к инозину цитозин), или двухцепочечный РНК, или олигонуклеотид, содержащий палиндромную последовательность, или олигонуклеотид, содержащий последовательность поли (dG).

25  
Иммуностимулирующие олигонуклеотиды могут включать модификации/аналоги нуклеотидов, такие как модификации фосфоротиоатов, и могут быть двухцепочечными или (кроме РНК) одноцепочечными;

- соединения, содержащие липиды, присоединенный к фосфатсодержащему ациклическому остову, такие как MPLA или TLR4 антагонист E5564;

30  
- масляные эмульсии (например, адъювант Фрейнда).

Теоретически каждую молекулу или вещество, способное способствовать или усиливать конкретную ситуацию в каскаде иммунологических событий, что в конечном итоге приводит к более выраженному иммунологическому ответу, можно определить как адъювант.

В принципе, используя адъюванты в вакцинах, можно:

- направлять и оптимизировать иммунные ответы, подходящие или желательные для вакцины;
- обеспечить доставку вакцины через слизистые оболочки, т.е. введение, которое приводит к контакту вакцины с поверхностью слизистой оболочки, такой как буккальный эпителий или эпителий желудка или легких и ассоциированная лимфоидная ткань;
- способствовать клеточно-опосредованным иммунным ответам;
- повышать иммуногенность более слабых иммуногенов, таких как высокоочищенные или рекомбинантные антигены;
- уменьшить количество антигена или частоту иммунизации, необходимую для обеспечения защитного иммунитета; и
- повысить эффективность вакцинации у индивидуумов со сниженным или ослабленным иммунным ответом, таких как новорожденные, пожилые люди и получатели вакцины с ослабленным иммунитетом.

Хотя мало что известно об их механизме действия, в настоящее время считается, что адъюванты усиливают иммунные ответы с помощью одного из следующих механизмов:

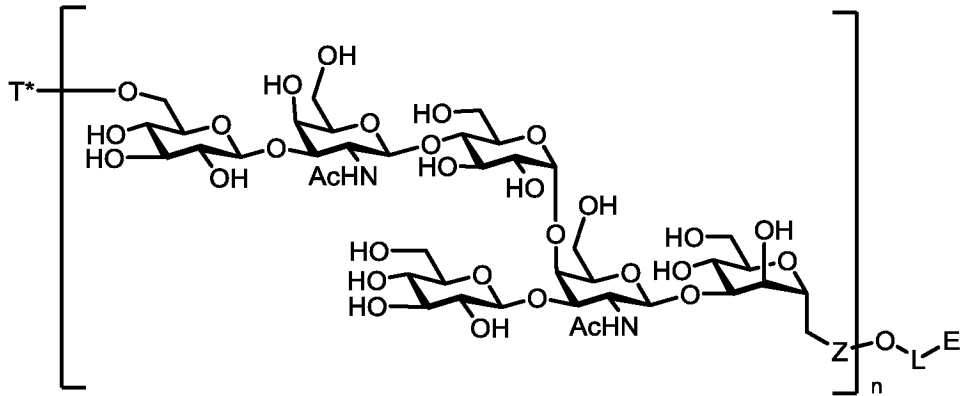
- увеличение биологического или иммунологического периода полужизни антигенов;
- улучшение доставки антигена к антиген-представляющим клеткам (АРС), а также процессинга и презентации антигена АРС, например, путем обеспечения возможности антигену пересекать эндосомные мембраны в цитозоль после приема антиген-адъювантных комплексов АРС;
- имитация сигналов, вызывающих опасность, от стрессированных или поврежденных клеток, которые служат для инициирования иммунного ответа;
- индуцирование продуцирования иммуномодулирующих цитокинов;
- смещение иммунного ответа в сторону определенного подмножества иммунной системы; и
- блокирование быстрого рассеивания антиген-провокации.

Сахариды известны специалистам в данной области как антигены TI-2 (независимые от Т-клеток типа 2) и слабые иммуногены. Следовательно, для производства вакцина на основе сахаридов, указанные сахариды являются конъюгированными с иммуногенным носителем, с обеспечением конъюгата, который



представляет повышенную иммуногенность по сравнению с сахаридом. В этом контексте термин «иммуногенный носитель» определяется как структура, которая конъюгирована с сахаридом, с образованием конъюгата, который представляет повышенный иммунитет по сравнению с сахаридом *per se*. Таким образом, конъюгирование сахаридов с иммуногенным носителем, предпочтительно белком-носителем, имеет в качестве эффекта стимуляцию иммунного ответа против данного сахараида, не вызывая иммунного ответа против иммуногенного носителя.

Следовательно, настоящее изобретение направлено на сахарид общей формулы (I)



10 (I)

где

$n$  представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

$T^*$ — представляет собой  $H^-$  или фосфатную группу;

$Z$  представляет собой  $--O-\overset{\overset{O}{\parallel}}{P}--$  или  $---\overset{\overset{O}{\parallel}}{P}---$  ;

15  $L$  представляет собой линкер; и

$E$  представляет собой  $-NH_2$ ,  $-N_3$ ,  $-CN$ ,  $-O-NH_2$ ,  $-CH=CH_2$ ,  $-C\equiv CH$ ,  $-Br$ ,  $-Cl$ ,  $-I$ ,  $-CO_2R'$ ,  $-CONH-NH_2$ ,  $-SH$ ,  $-OH$  или  $-SAc$ ;

$R'$  представляет собой  $-H$ ,  $-Me$ ,  $-Et$ , 4-нитрофенил, пентафторфенил, или *N*-сукцинимидил;

20 или его диастереоизомер или фармацевтически приемлемую соль.

Во всех общих формулах (I), (II), (III), а также всех общих подформулах  $n$  представляет собой предпочтительно целое число от 1 до 8, более предпочтительно целое число от 1 до 6, и представляет собой еще более предпочтительно 1, 2, 3, 4, или 5, еще

более предпочтительно 1, 2, 3, или 4, еще более предпочтительно 1, 2, или 3, еще более предпочтительно 1 или 2, и еще более предпочтительно 1.

5 Линкер L предпочтительно содержит между 2 и 40 атомов углерода (включая атомы углерода необязательных боковых цепей), более предпочтительно между 2 и 30, более предпочтительно между 2 и 20, более предпочтительно между 2 и 14, более предпочтительно между 2 и 12, и еще более предпочтительно между 2 и 10 атомов углерода.

10 Самая короткая цепь атомов между атомом кислорода (т.е. кислород  $-O-L-NH_2$ ) и  $NH_2$ -группой предпочтительно состоит из 2 - 14 атомов, более предпочтительно из 2 - 12 атомов, более предпочтительно из 2 - 10 атомов, более предпочтительно из 2 - 8 атомов. В случае, когда самая короткая цепь (которая является самой короткой возможной связью между кислородом в аномерном центре и  $NH_2$ -группой) состоит из 2 - 6 атомов, то это предпочтительно атомы углерода. В случае, когда самая короткая цепь состоит из 4 - 8 атомов, цепь может содержать 1 или 2 гетероатомов, выбранных из O, N и S. В случае, когда самая короткая цепь состоит из 9 - 14 атомов, цепь может содержать 1, 2, 3, или 4 гетероатомов, выбранных из O, N и S.

20 Также предпочтительно, когда линкер  $-L-$ , или самая короткая цепь полностью или частично фторированы. Линкер  $-L-$  может содержать 3-членный или 4-членный или 5-членный или 6-членный насыщенный карбоцикл, или 5-членный частично ненасыщенный (и неароматический) карбоцикл, или 4-членный или 5-членный или 6-членный насыщенный кислородный гетероцикл, или 4-членный или 5-членный или 6-членный насыщенный азотный гетероцикл, или 6-членный ароматический карбоцикл.

25 Линкер  $-L-$  может также содержать амидный ( $-NH-CO-$ ,  $-CO-NH-$ ) и/или мочевиный ( $-NH-CO-NH-$ ) остаток, и предпочтительно только один амидный или мочевиный остаток. Линкер может также содержать заместители и предпочтительно два заместителя, такие как  $R^{10}$  и  $R^{11}$  или четыре заместителя, такие как  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{15}$  и  $R^{14}$ , которые имеют значения, указанные в данном документе, и которые предпочтительно выбраны из:  $-F$ ,  $-Cl$ ,  $-CH_3$ ,  $-C_2H_5$ ,  $-C_3H_7$ ,  $-C_5H_9$ ,  $-C_6H_{13}$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OC_2H_5$ ,  $-CH_2F$ ,  $-CHF_2$ ,  $-CF_3$ ,  $-C(O)-NH_2$ ,  $-SCH_3$ ,  $-SC_2H_5$ ,  $-NHC(O)CH_3$ ,  $-N(CH_3)_2$ , и  $-N(C_2H_5)_2$ .

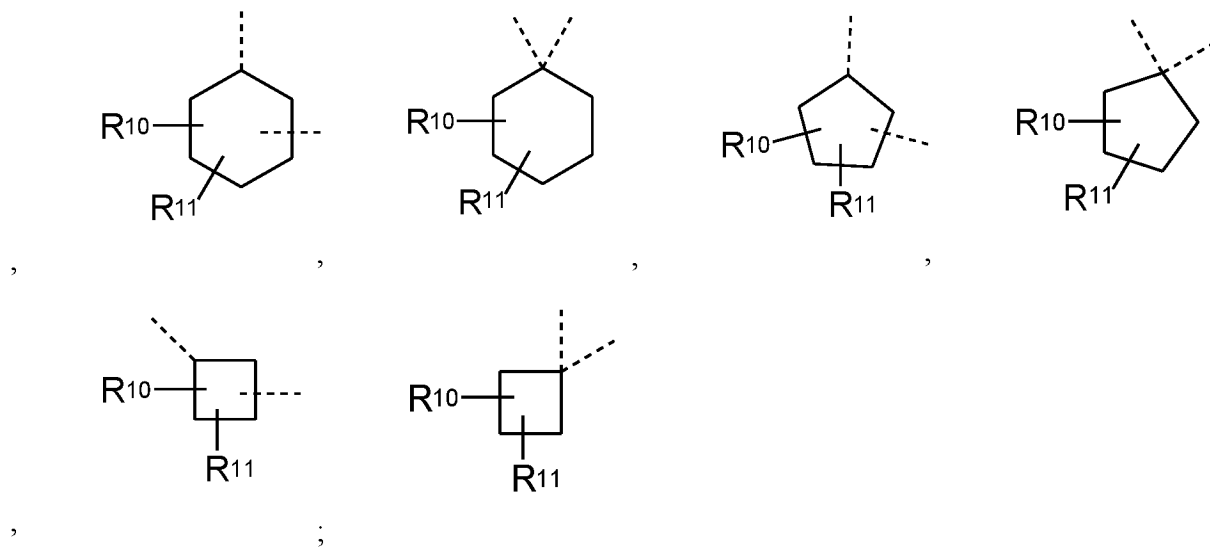
30 В случае, когда линкер  $-L-$  фторирован, более двух заместителей  $-F$  являются предпочтительными.

Предпочтительно линкер  $-L-$  выбран из:  $-CH_2-$ ,  $-(CH_2)_2-$ ,  $-(CH_2)_3-$ ,  $-(CH_2)_4-$ ,  $-(CH_2)_5-$ ,  $-(CH_2)_6-$ ,  $-(CH_2)_7-$ ,  $-(CH_2)_8-$ ,  $-(CH_2)_9-$ ,  $-(CH_2)_{10}-$ ,  $-CF_2-$ ,  $-(CF_2)_2-$ ,  $-(CF_2)_3-$ ,  $-$

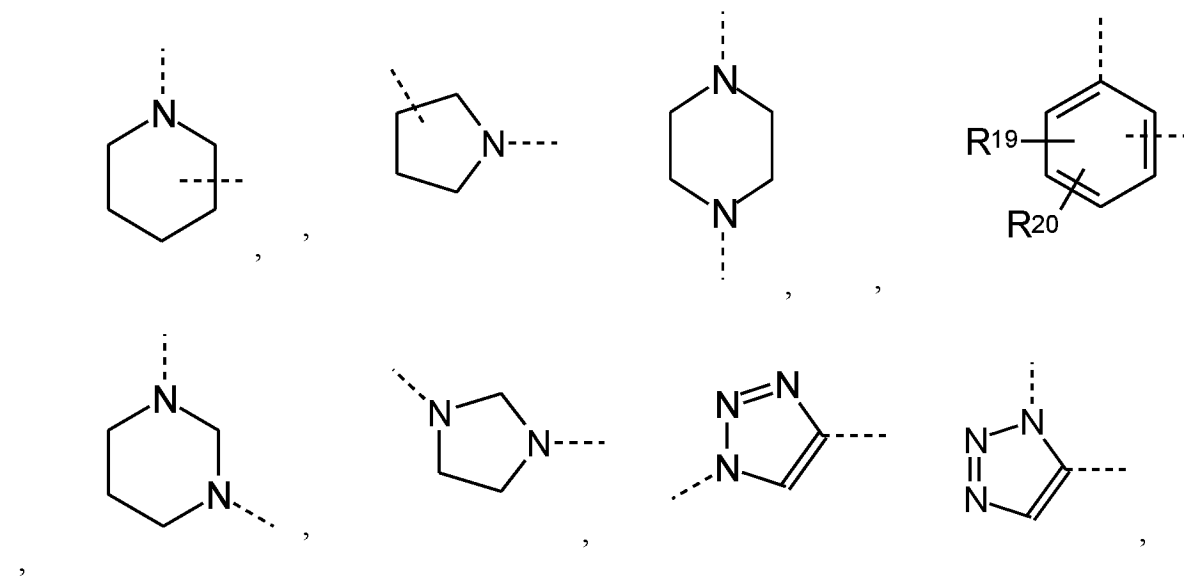
$(CF_2)_4-$ ,  $-(CF_2)_5-$ ,  $-(CF_2)_6-$ ,  $-(CF_2)_7-$ ,  $-(CF_2)_8-$ ,  $-(CF_2)_9-$ ,  $-(CF_2)_{10}-$ ,  $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ ,  $CH_2-O-(CH_2)_3-$ ,  $-(CH_2)_3-O-CH_2-$ ,  $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ ,  $-(CH_2)_2-O-CH_2-$ ,  $-(CH_2)_3-O-(CH_2)_2-$ ,  $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ ,  $-(CH_2)_4-O-CH_2-$ ,  $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_4-$ ,  $-L^a-$ ,  $-L^a-L^e-$ ,  $-L^a-L^b-L^e-$ ,  $-L^a-L^b-L^d-L^c-L^e-$ ,  $-L^a-L^d-L^e-$ ;

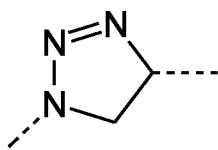
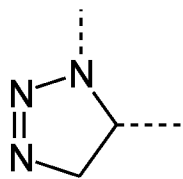
5 где

$-L^a-$  выбран из:  $-(CH_2)_6-$ ,  $-(CF_2)_6-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_0-C_2H_4-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_6-CH_2-$ ,  $-(CR^{10}R^{11})_6-$ ,

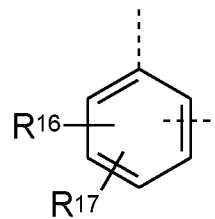


10  $-L^b-$  и  $-L^c-$  независимо друг от друга выбраны из:  $-O-$ ,  $-NH-C(O)-NH-$ ,  $-NH-C(S)-NH-$ ,  $-NH-C(O)-$ ,  $-C(O)-NH-$ ,  $-NH-C(O)-O-$ ,  $-NR^9-$ ,  $-NR^{18}-$ ,  $-SO_2-$ ,

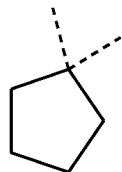
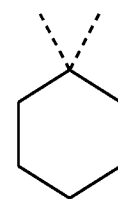
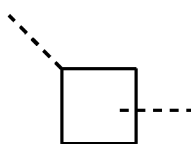
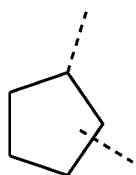
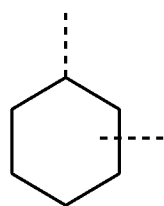




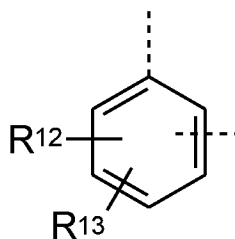
и



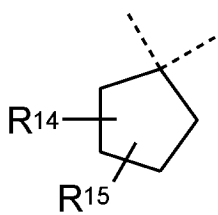
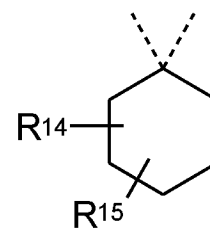
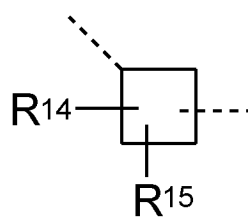
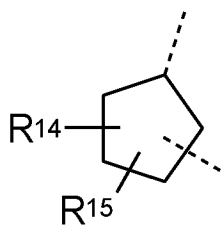
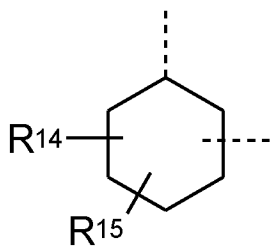
$-L^d-$  представляет собой  $-(CH_2)_q-$ ,  $-(CF_2)_q-$ ,  $-(CR^{12}R^{13})_q-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_q-C_2H_4-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_q-CH_2-$ ,



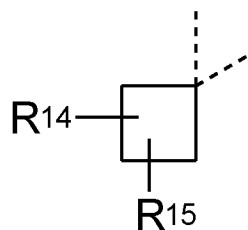
и



5  $-L^e-$  выбран из:  $-(CH_2)_{p1}-$ ,  $-(CF_2)_{p1}-$ ,  $-C_2H_4-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$ ,  $-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$ ,  $-(CH_2)_{p1}-O-(CH_2)_{p2}-$ ,  $-(CR^{14}R^{15})_{p1}-$ ,  $-(CR^{14}R^{15})_{p1}-O-(CR^{21}R^{22})_{p2}-$ ,



и



$R^9$  и  $R^{18}$  независимо друг от друга выбраны из:  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $-\text{C}_3\text{H}_7$  и  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ ;  
 $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$ ,  $R^{16}$ ,  $R^{17}$ ,  $R^{19}$ ,  $R^{20}$ ,  $R^{21}$  и  $R^{22}$  независимо друг от друга  
 5 выбраны из:  $-\text{H}$ ,  $-\text{F}$ ,  $-\text{Cl}$ ,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $-\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $-\text{C}_5\text{H}_9$ ,  $-\text{C}_6\text{H}_{13}$ ,  $-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{OC}_2\text{H}_5$ ,  $-\text{CH}_2\text{F}$ ,  $-\text{CHF}_2$ ,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SCH}_3$ ,  $-\text{SC}_2\text{H}_5$ ,  $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$  и  $-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ ;

$o$ ,  $q$ ,  $p_1$  и  $p_2$  представляют собой независимо друг от друга целое число,  
 выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, и 10.

Более предпочтительно,  $-\text{L}-$  представляет собой  $-\text{L}^a-$ ,  $-\text{L}^a-\text{L}^e-$ ,  $-\text{L}^a-\text{L}^b-\text{L}^e-$ , или  $-\text{L}^a-\text{L}^d-\text{L}^e-$ ;

10  $-\text{L}^a-$  представляет собой  $-(\text{CH}_2)_o-$ ,  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_o-\text{C}_2\text{H}_4-$ , или  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_o-\text{CH}_2-$ ;

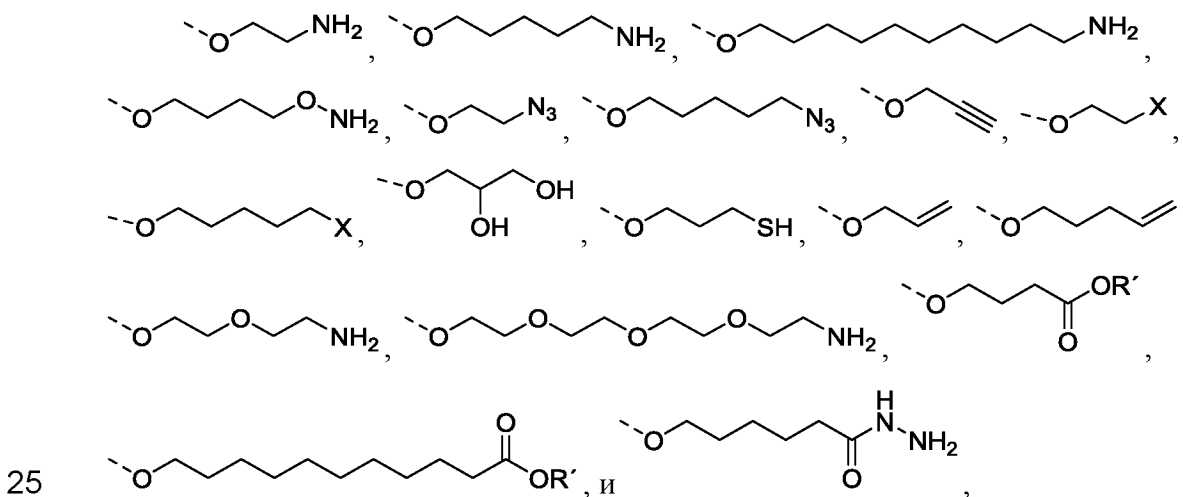
$-\text{L}^b-$  представляет собой  $-\text{O}-$ ;

$-\text{L}^d-$  представляет собой  $-(\text{CH}_2)_q-$ ,  $-(\text{CH}(\text{OH}))_q-$ ,  $-(\text{CF}_2)_q-$ ,  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_q-\text{C}_2\text{H}_4-$ ,  
 или  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_q-\text{CH}_2-$ ;

15  $-\text{L}^e-$  представляет собой  $-(\text{CH}_2)_{p_1}-$ ,  $-(\text{CF}_2)_{p_1}-$ ,  $-\text{C}_2\text{H}_4-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{p_1}-$ ,  
 $-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{p_1}-$  или  $-(\text{CH}_2)_{p_1}-\text{O}-(\text{CH}_2)_{p_2}-$ ; и

$o$ ,  $q$ ,  $p_1$  и  $p_2$  представляют собой независимо друг от друга целое число, выбранное  
 из 1, 2, 3, 4, 5, и 6.

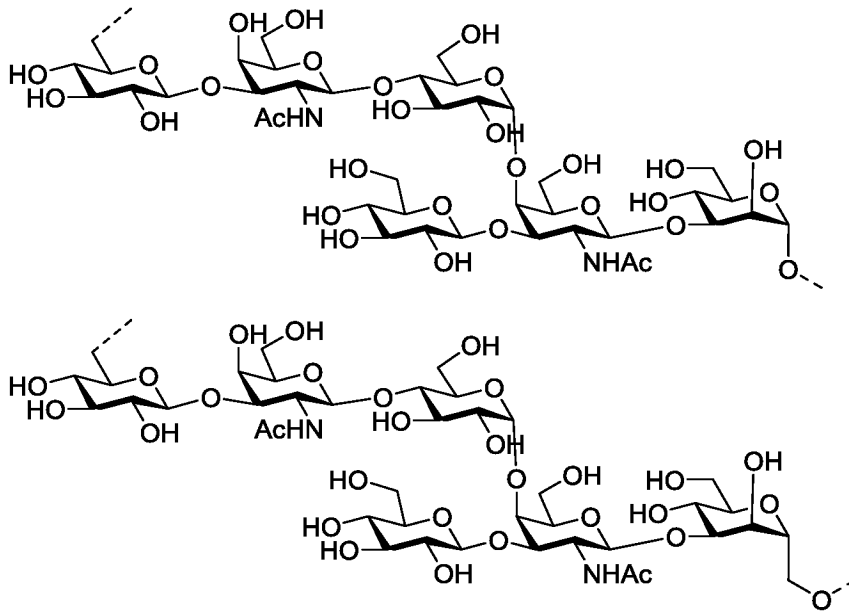
20 Наиболее предпочтительно, сахарид формулы (I) имеет группу  $-\text{O}-\text{L}-\text{E}$ , выбранную  
 из группы, которая состоит из:



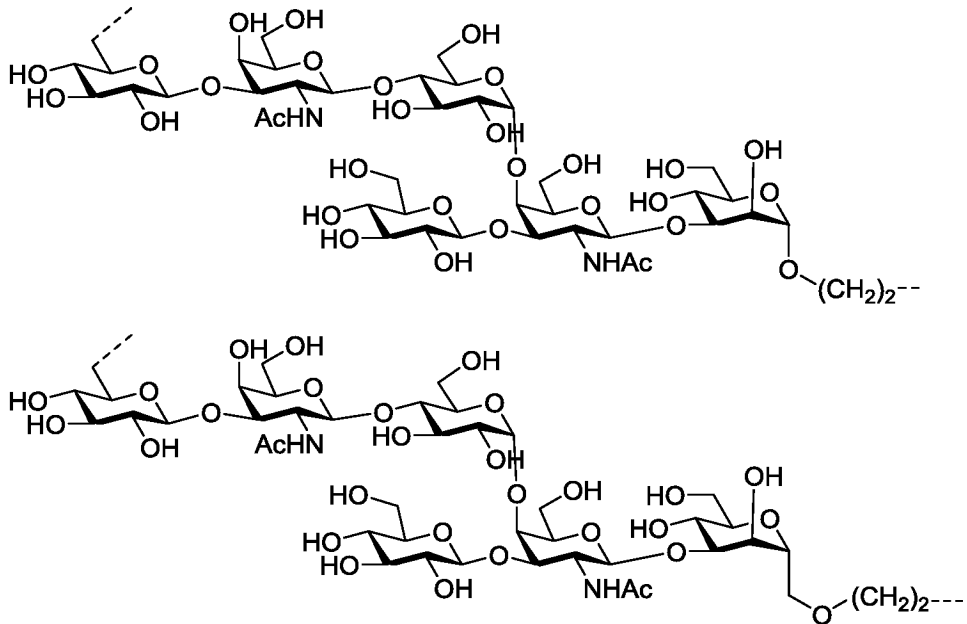
где  $R'$  представляет собой  $-\text{H}$ ,  $-\text{Me}$ ,  $-\text{Et}$ , 4-нитрофенил, пентафторфенил, или  
 $N$ -сукцинимидил;

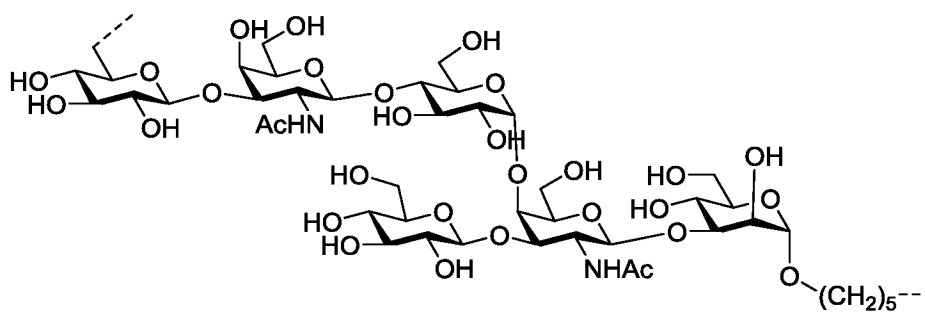
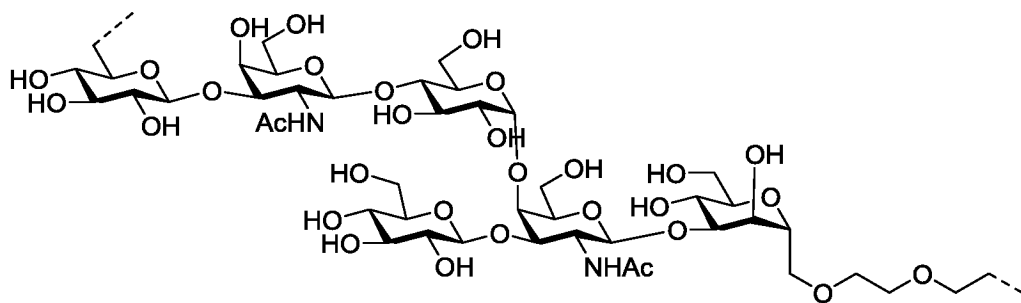
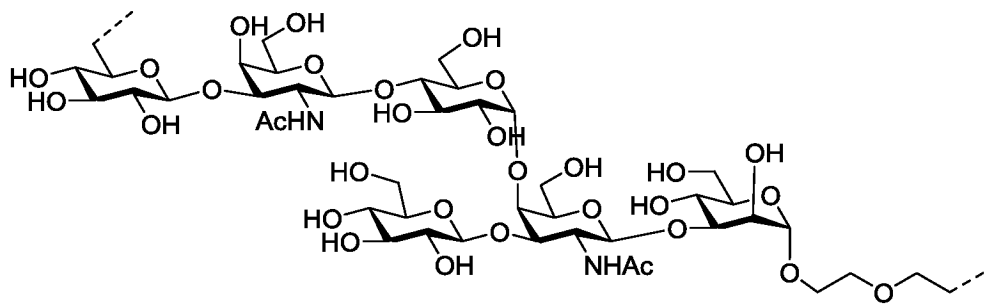
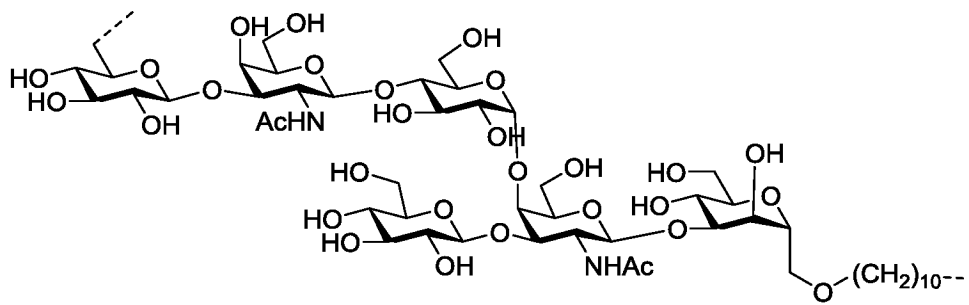
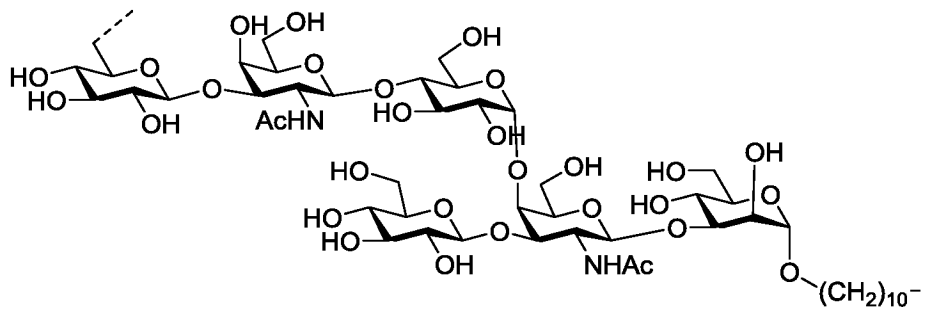
$X$  представляет собой  $-\text{Br}$ ,  $-\text{Cl}$ ,  $-\text{I}$ ,  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{NO}_2$  или  $-\text{SAc}$ .

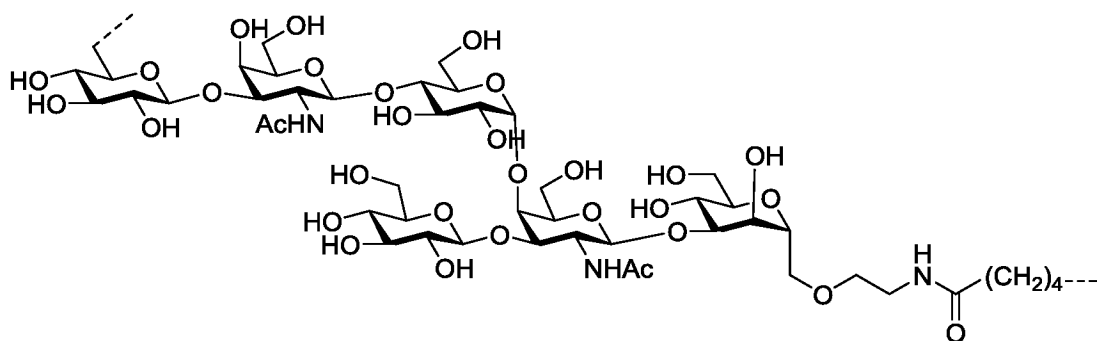
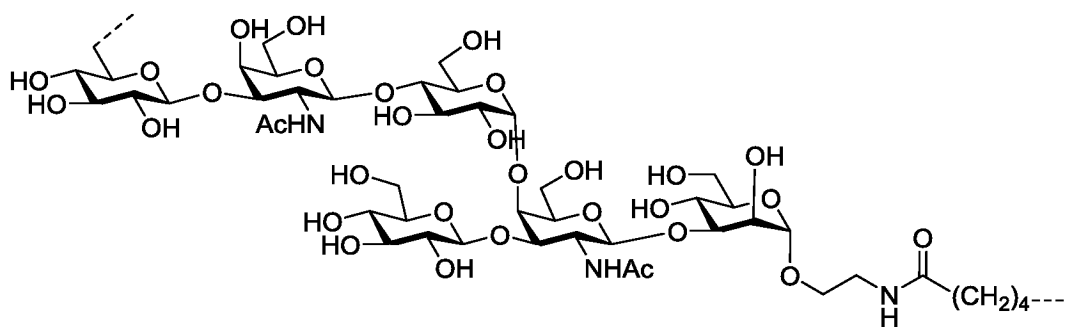
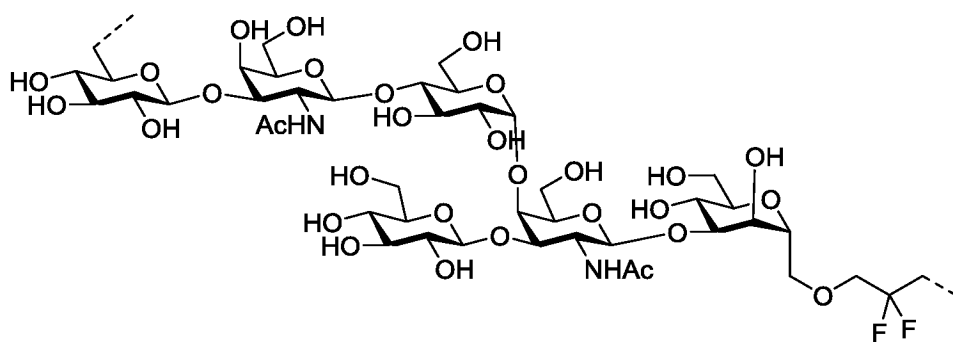
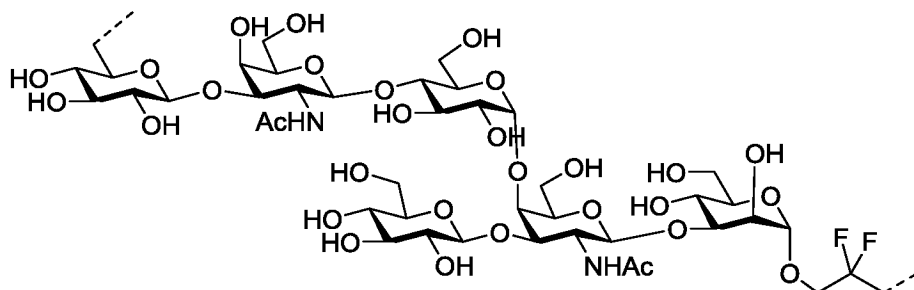
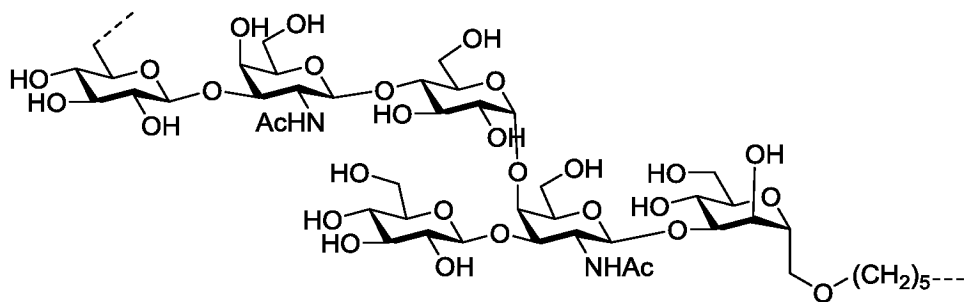
Линкер L может также включать повторяющуюся единицу сахара PS-II C. *difficile* или его фрагментов:



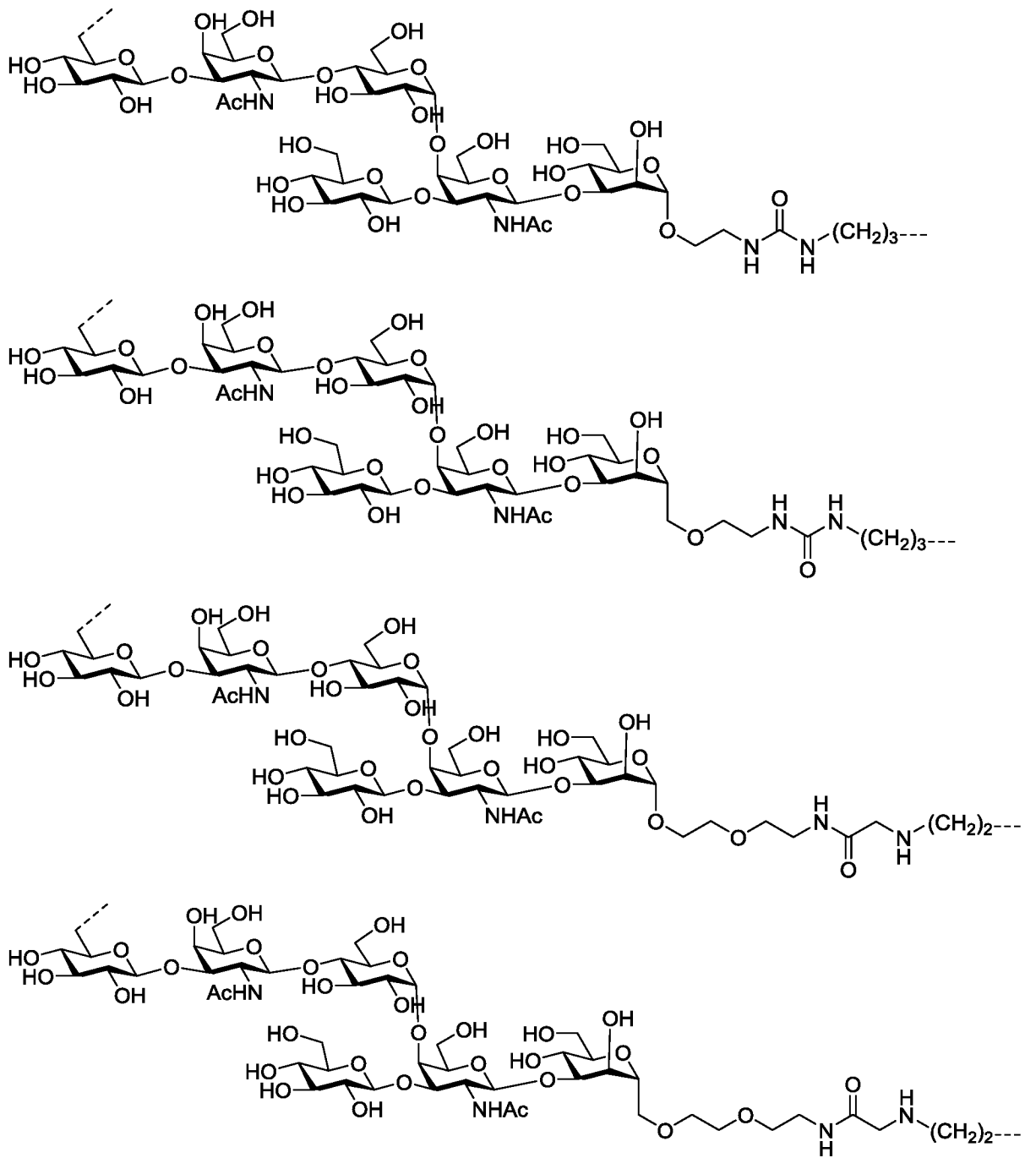
5 Таким образом, линкер L предпочтительно выбран из одной из следующих структур:



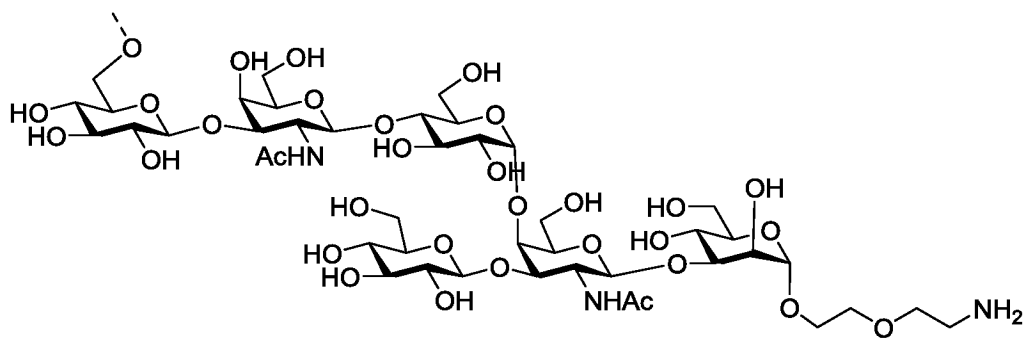
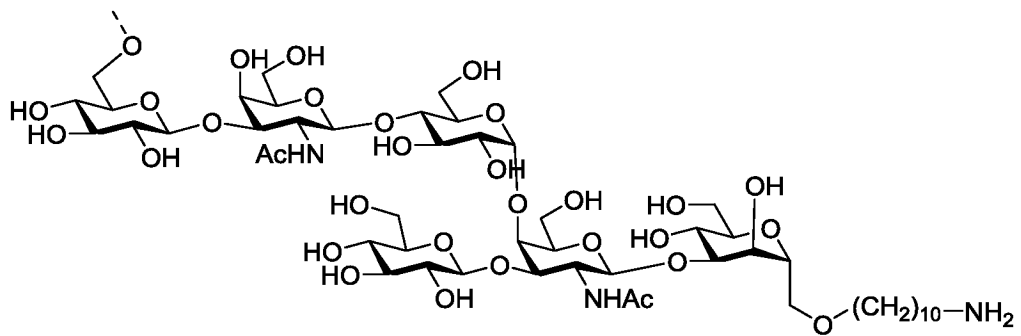
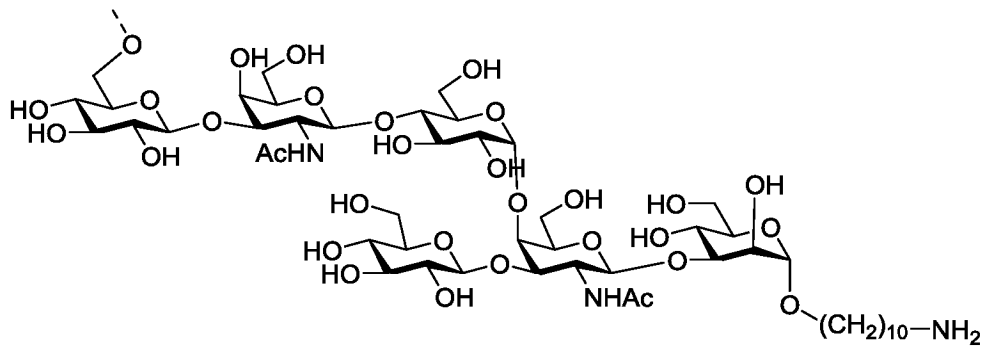
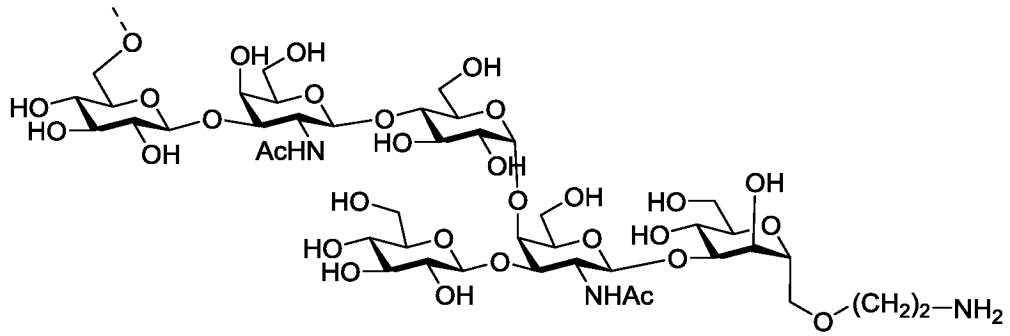
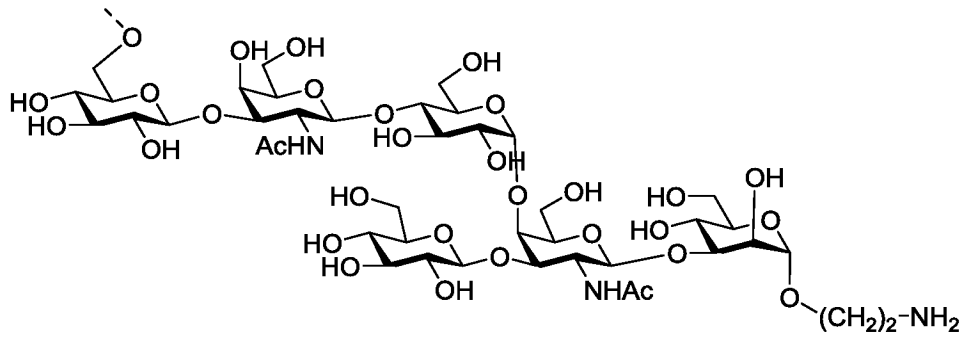


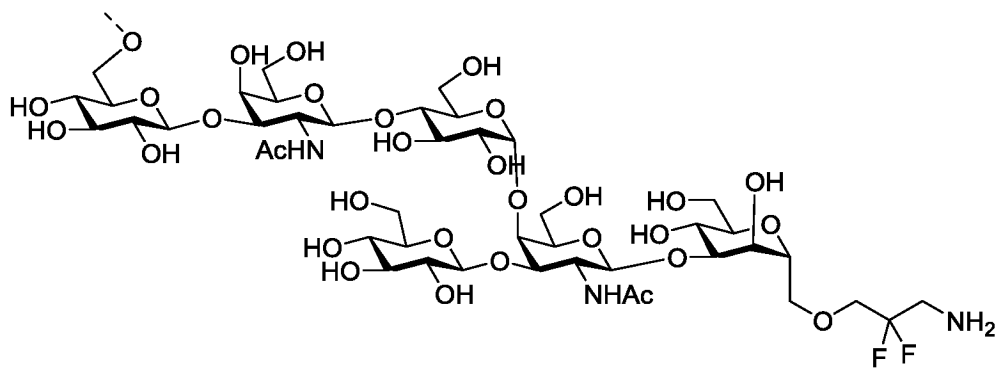
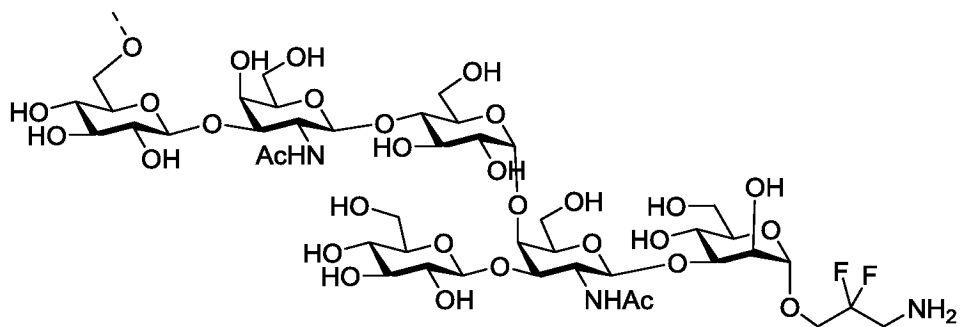
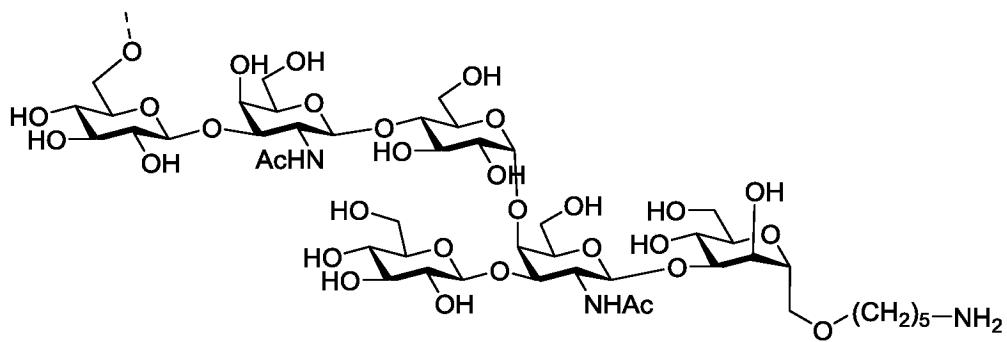
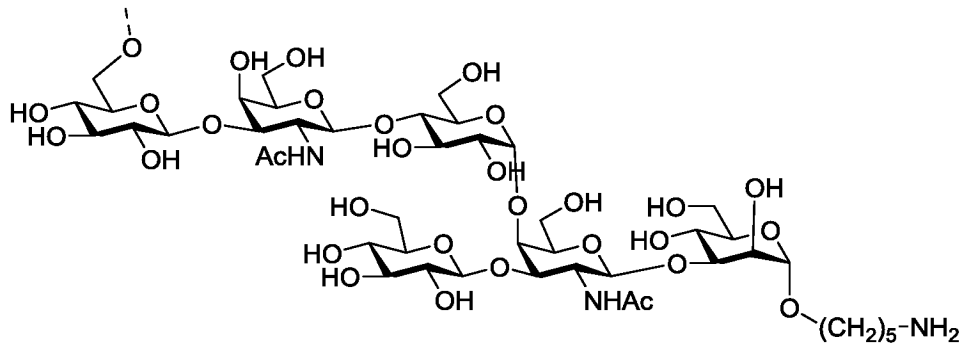
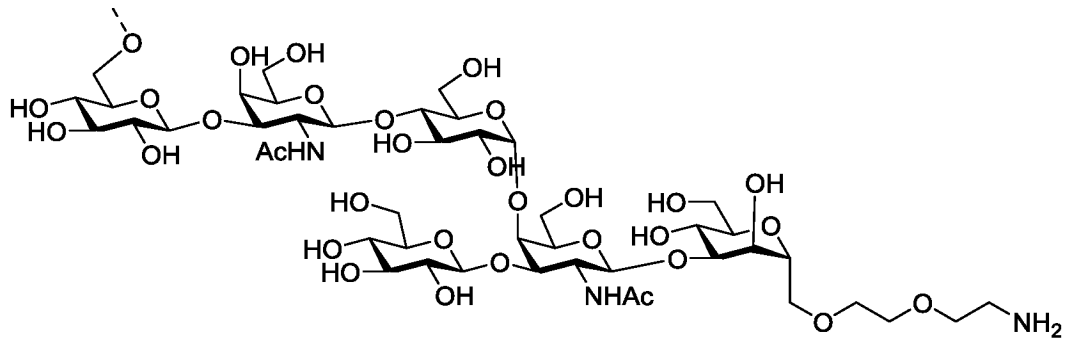


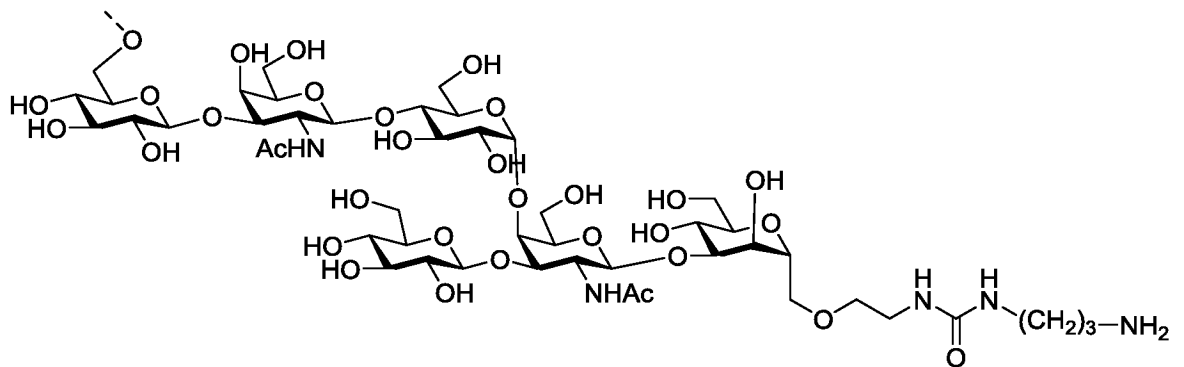
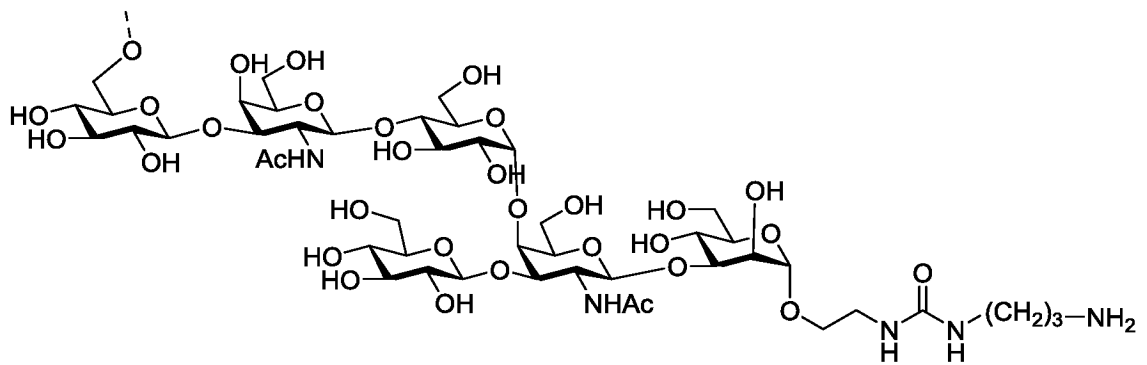
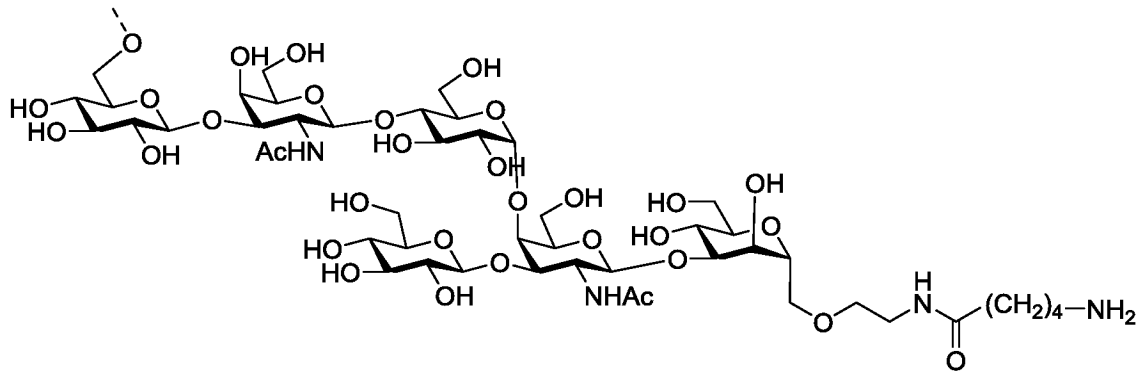
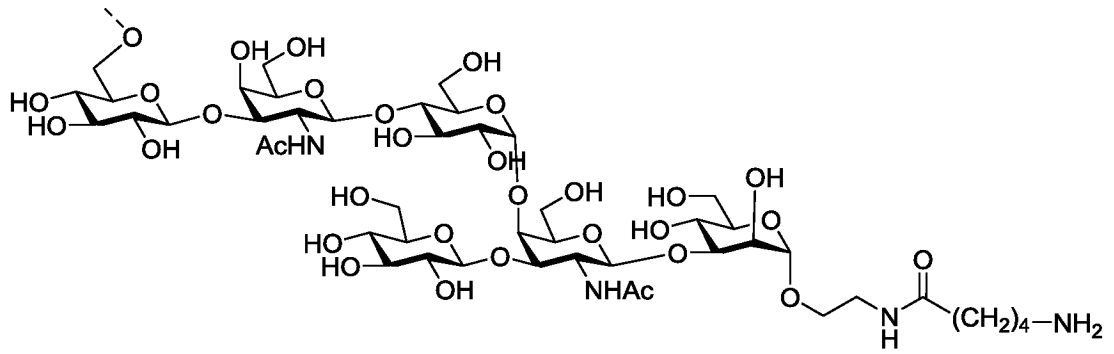


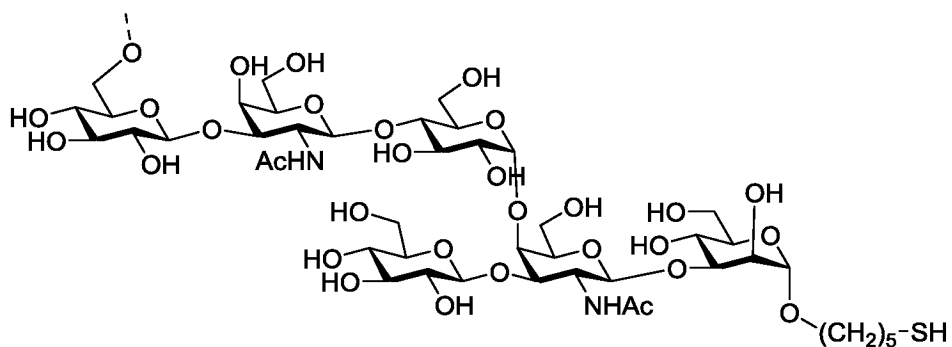
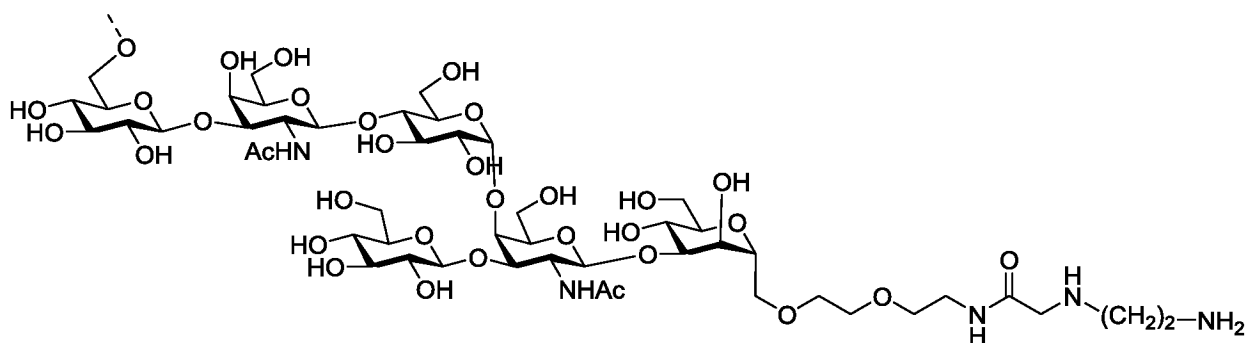
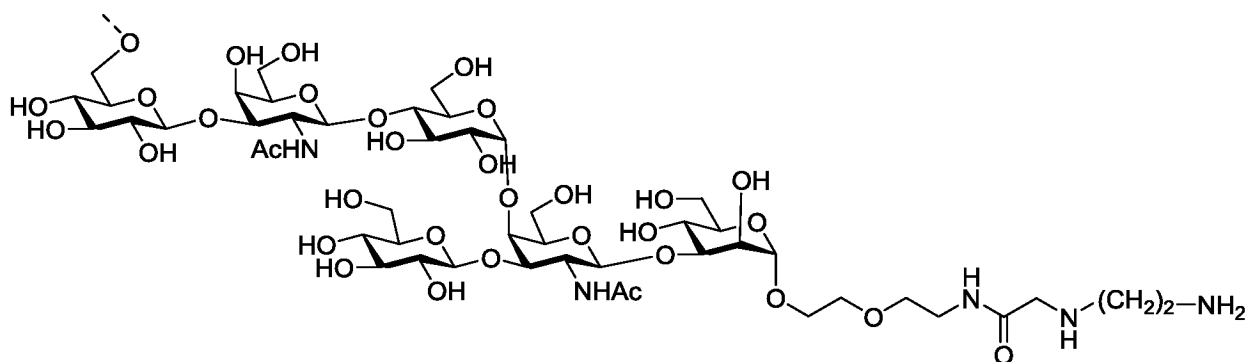


Следовательно, предпочтительным является также сахарид формулы (I), который имеет группу  $\text{-O-L-E}$ , выбранную из группы, которая состоит из следующих:

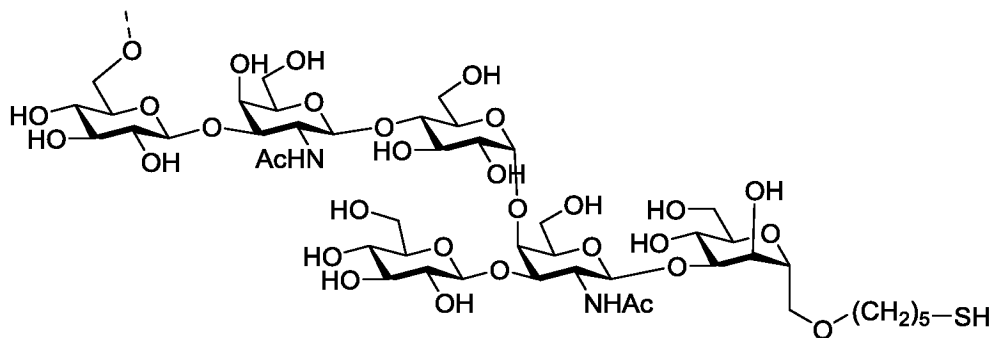




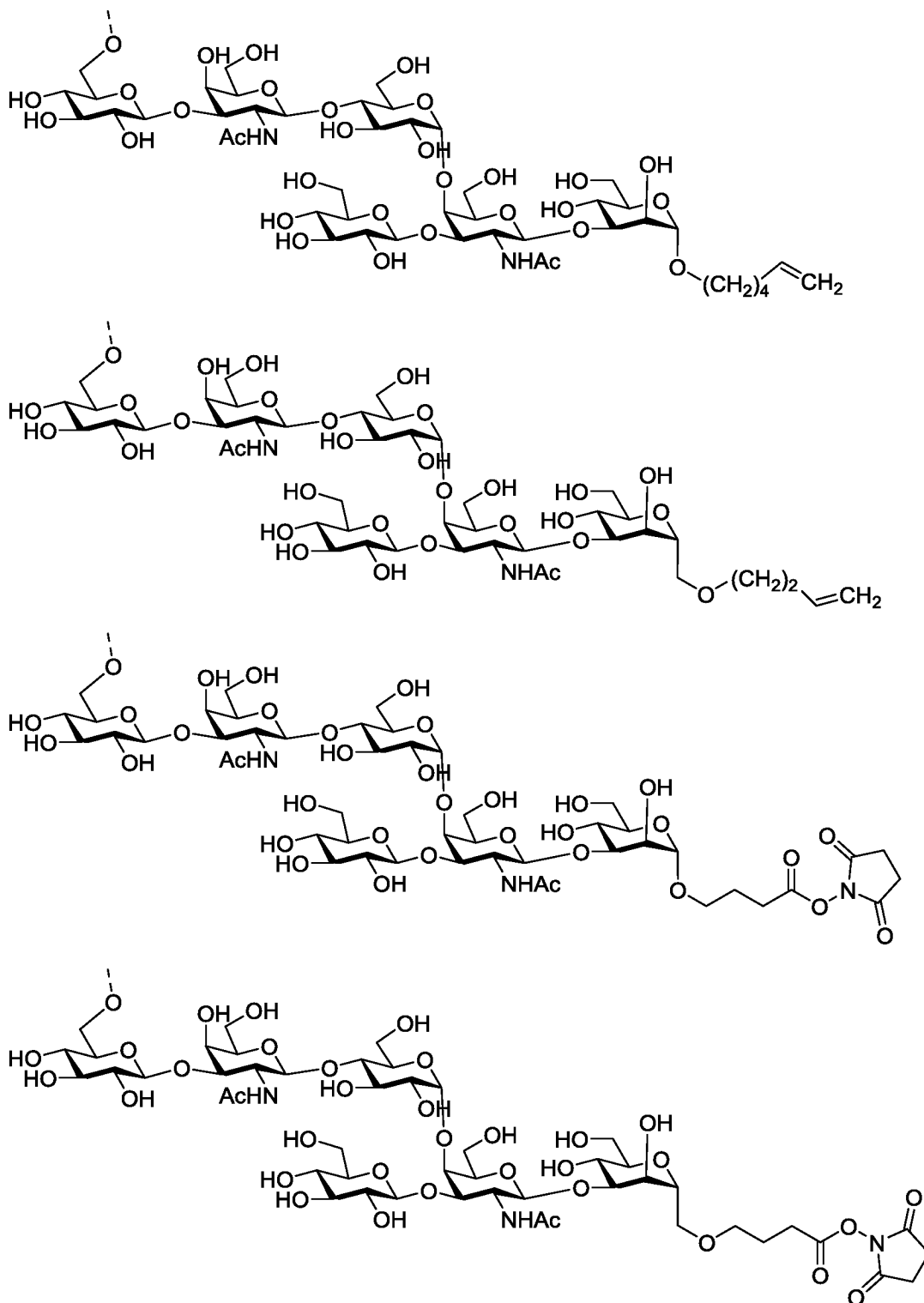




или предпочтительно дисульфид этого фрагмента



или предпочтительно дисульфид этого фрагмента



Сахариды в соответствии с настоящим изобретением могут быть гигроскопичными и таким образом могут образовывать их различные гидраты.

Предпочтительно, молярное соотношение молекулы воды к сахариду находится в

5 диапазоне от 1 до 20, более предпочтительно, от 1 до 10, наиболее предпочтительно, от 5 до 10.

Сахариды в соответствии с настоящим изобретением несут основные и/или кислотные заместители, и они могут образовывать соли с органическими или неорганическими кислотами или основаниями.

5 Примерами подходящих кислот для образования таких кислотно-аддитивных солей являются хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, фосфорная кислота, уксусная кислота, лимонная кислота, щавелевая кислота, малоновая кислота, салициловая кислота, п-аминосалициловая кислота, яблочная кислота, фумаровая кислота, янтарная кислота, аскорбиновая кислота, малеиновая кислота, сульфоновая кислота, фосфоновая кислота, хлорная кислота, азотная кислота, 10 муравьиная кислота, пропионовая кислота, глюконовая кислота, молочная кислота, винная кислота, гидроксималеиновая кислота, пировиноградная кислота, фенилуксусная кислота, бензойная кислота, п-аминобензойная кислота, п-гидроксibenзойная кислота, метансульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, азотистая кислота, гидроксиэтансульфоновая кислота, этиленсульфоновая кислота, п-толуолсульфоновая кислота, нафтилсульфоновая кислота, сульфаниловая кислота, камфорсульфоновая кислота, китайская кислота, миндальная кислота, о-метилминдальная кислота, гидробензолсульфоновая кислота, пикриновая кислота, адипиновая кислота, д-о-толилвинная кислота, тартроновая кислота, (о, м, п)-толуиловая кислота, нафтиламинсульфоновая кислота, и другие минеральные или 20 карбоновые кислоты, хорошо известные специалистам в данной области. Соли получают путем введения в контакт формы свободного основания с достаточным количеством желаемой кислоты для получения соли обычным способом.

25 Примерами подходящих неорганических или органических оснований являются, например, NaOH, KOH, NH<sub>4</sub>OH, гидроксид тетраалкиламмония, лизин или аргинин и т.п. Соли можно получить обычным способом с использованием способов, хорошо известных в данной области, например, путем обработки соединения общей формулы (I) раствором основания, выбранного из группы, указанной выше.

30 Для квалифицированного специалиста в области химии углеводов очевидно, что сахариды общей формулы (I) не содержат связей –O – O– и или фрагментов сахаров, соединенных или связанных друг с другом через свои аномерные или C-1 углеродные атомы.

Неожиданно было обнаружено, что сахарид общей формулы (I) содержит иммуногенный защитный эпитоп и способен индуцировать защитный иммунный ответ против бактерий *Clostridium difficile* у человека- и/или животного-хозяина. Сахарид

общей формулы (I) выявляет антитела, которые при перекрестном введении в реакцию с природным сахаридом поверхности клеток PS-II *Clostridium difficile*, специфически распознают бактерии *Clostridium difficile* и опсонизируют их для уничтожения фагоцитами, таким образом обеспечивая защиту от бактерий *Clostridium difficile*.

5 Неожиданно было обнаружено, что сахариды общей формулы (I) являются стабильными в кислых водных средах, основных водных средах, а также в суспензиях, содержащих фосфат алюминия или гидроксид алюминия, таких как обычно применяемый адъювант Алгидрогель. В то время как природный сахарид PS-II *Clostridium difficile* гидролизуетеся в течение одного дня в кислых водных средах, в  
10 основных водных средах или в присутствии солей алюминия, сахариды общей формулы (I), а также их конъюгаты являются стабильными в течение нескольких дней даже при повышенных температурах. Повышенная стабильность особенно выгодна для их использования в вакцинах против *Clostridium difficile*. Таким образом, сахариды общей формулы (I), а также их конъюгаты особенно пригодны для стабильных при  
15 хранении жидких вакцинных составов против *Clostridium difficile*, которые могут храниться при температуре окружающей среды.

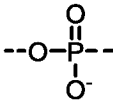
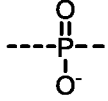
Сахариды в соответствии с настоящим изобретением преодолевают все проблемы, связанные с сахаридами, полученными из источников бактерий, и их конъюгатами с точки зрения чистоты и простоты производства. Во-первых,  
20 производство сахаридов клеточной стенки требует оптимизации условий роста. Во-вторых, необходимо найти условия деполимеризации, при которых сохраняется структурная целостность составляющих моносахаридов. Наконец, необходимо определить условия очистки, позволяющие выделить чистый сахарид определенной длины и структуры. Помимо обычных примесей, таких как клеточные полисахариды,  
25 нуклеиновые кислоты, липиды и белки, также должны быть исключены нежелательные сахариды, полученные в процессе деполимеризации. Таким образом, получение чистых сахаридов определенной структуры и длины из бактериальных источников является утомительным, почти невозможным процессом.

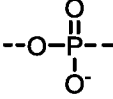
Предпочтительными являются синтетические сахариды формулы (I) или (II) или  
30 (III), где T\*– представляет собой фосфатную группу ( $-P(=O)(OH)_2$  или  $-P(=O)(O^-)(OH)$  или  $-PO_3^{2-}$ ). Таким образом, настоящее изобретение также направлено на сахарид общей формулы (I) или (II) или (III), где

n представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;



$T^*$ – представляет собой фосфатную группу, т.е.  $T^*$ – представляет собой – $P(=O)(OH)_2$  или  $-P(=O)(O^-)(OH)$  или  $-PO_3^{2-}$ ;

$Z$  представляет собой  или  ;

предпочтительно  $Z$  представляет собой  ;

5  $L$  представляет собой линкер и предпочтительно линкер, описанный в данном документе;

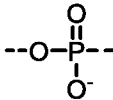
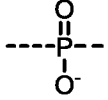
Также другие заместители имеют значения, указанные в данном документе.

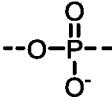
10 Предпочтительными являются синтетические сахараиды формулы (I), где  $T^*$ – представляет собой водород или фосфатную группу ( $-P(=O)(OH)_2$  или  $-P(=O)(O^-)(OH)$  или  $-PO_3^{2-}$ ). Таким образом, настоящее изобретение также направлено на сахарид общей формулы (I) или (II) или (III), где

$n$  представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

$T^*$ – представляет собой –H или фосфатную группу, т.е.  $T^*$ – представляет собой –H или  $-P(=O)(OH)_2$  или  $-P(=O)(O^-)(OH)$  или  $-PO_3^{2-}$ ;

15

$Z$  представляет собой  или  ;

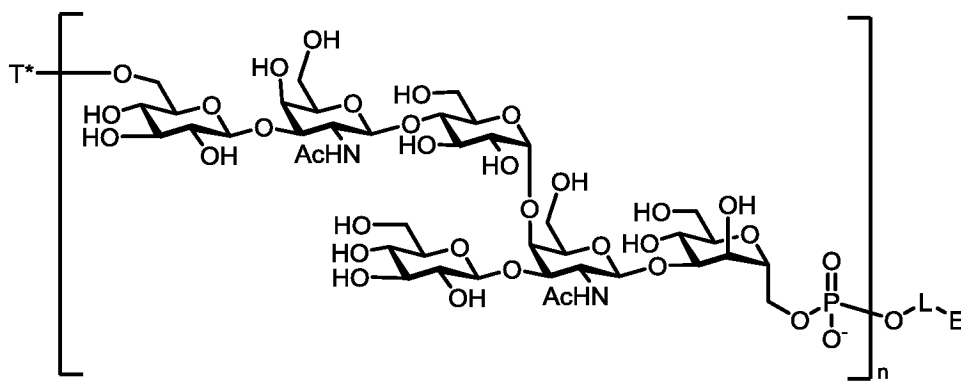
предпочтительно  $Z$  представляет собой  ;

$L$  представляет собой линкер; и

$E$  представляет собой  $-NH_2$ ,  $-N_3$ ,  $-CN$ ,  $-O-NH_2$ ,  $-CH=CH_2$ ,  $-C\equiv CH$ ,  $-Br$ ,  $-Cl$ ,  $-I$ ,  $-CO_2R'$ ,  $-CONH-NH_2$ ,  $-SH$ ,  $-OH$  или  $-SAc$ ;

20  $R'$  представляет собой  $-H$ ,  $-Me$ ,  $-Et$ , 4-нитрофенил, пентафторфенил, или *N*-сукцинимидил.

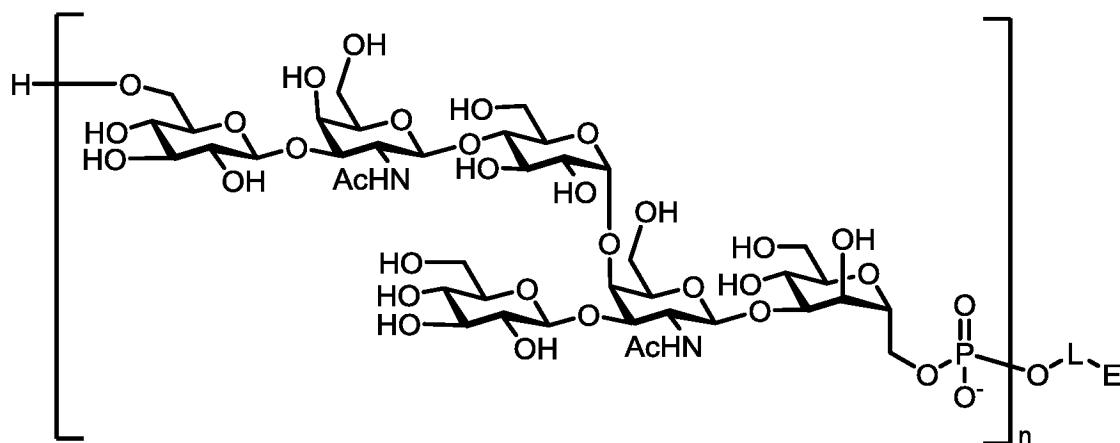
Предпочтительными являются синтетические сахараиды общей формулы (II)



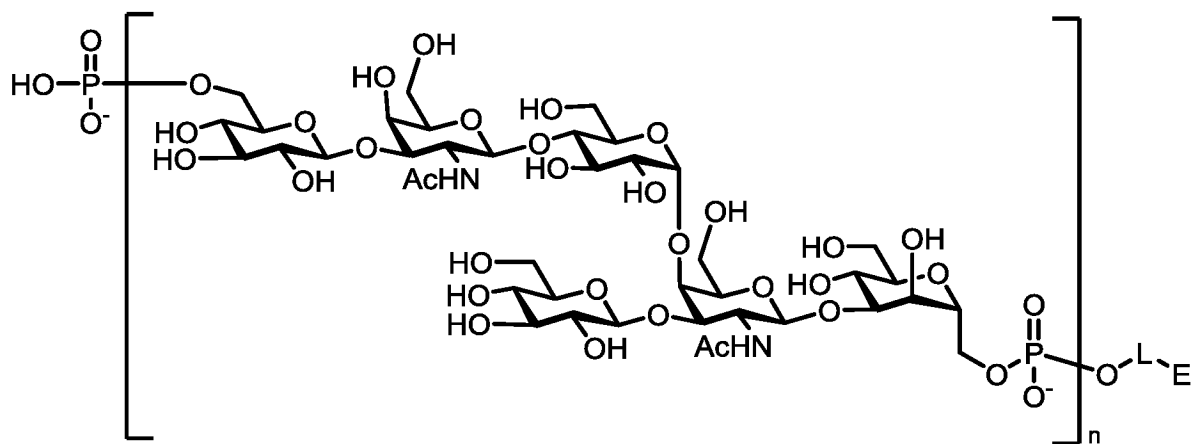
(II)

где  $n$ ,  $L$ ,  $E$  и  $T^*$  имеют значения, указанные в данном документе.

- 5 Таким образом, сахарид общей формулы (II-a) или (II-b), где  $n$ ,  $L$ , и  $E$  имеют значения, указанные в данном документе, является особенно предпочтительным.

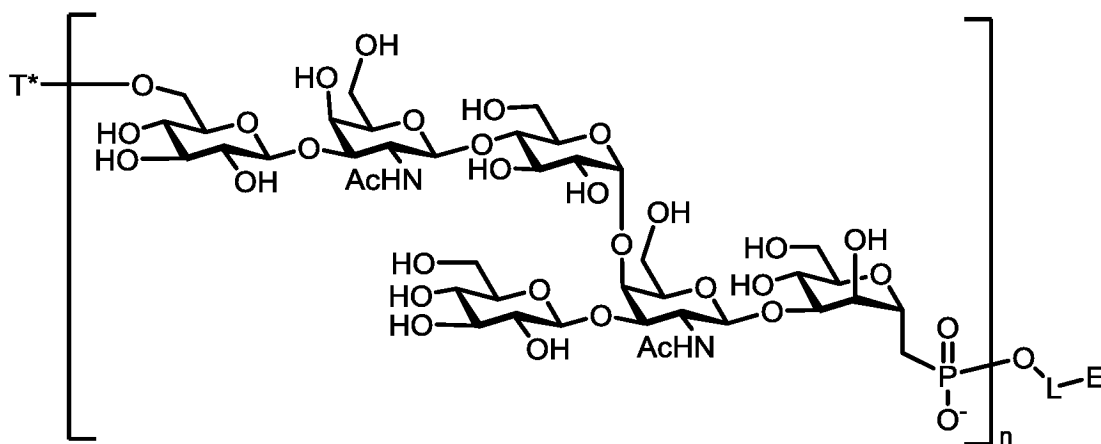


(II-a)



(II-b)

Также предпочтительными являются синтетические сахарады общей формулы (III)



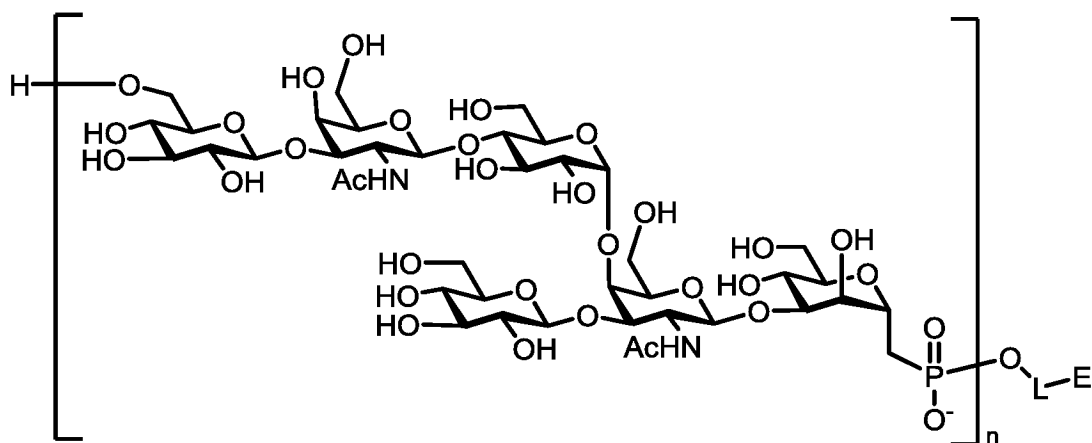
5

(III)

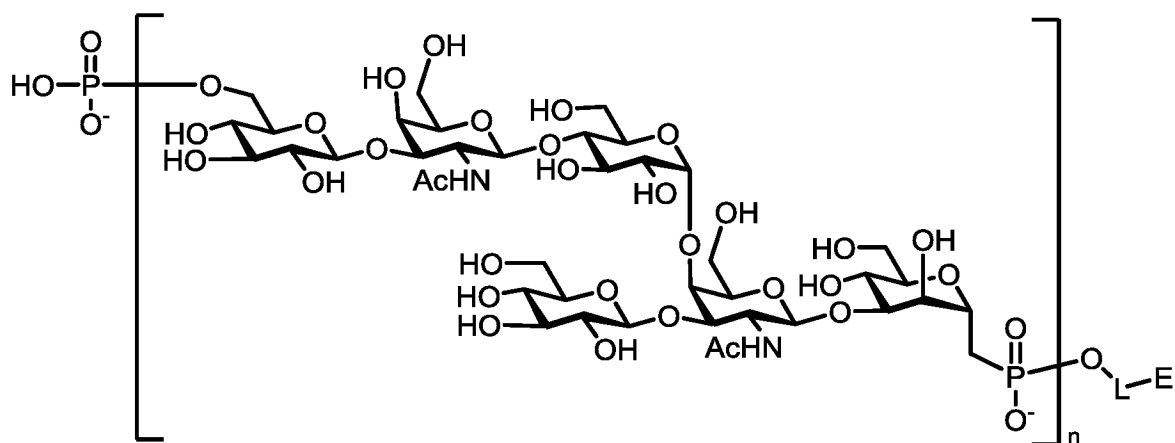
где n, L, E и T\* имеют значения, указанные в данном документе.

Таким образом, сахарид общей формулы (III-a) или (III-b), где n, L, и E имеют значения, указанные в данном документе, является особенно предпочтительным.

10



(III-a)



(III-b)

Предпочтительно,  $n$  представляет собой целое число, выбранное из 1 - 10, более предпочтительно 1 - 6, более предпочтительно 1 - 3 и еще более предпочтительно 1 - 2. Следовательно, сахарид общей формулы (I), (II), (II-a), (II-b), (III), (III-a) или (III-b), где  $n$  представляет собой целое число, выбранное из 1 - 2 является особенно предпочтительным.

Предпочтительно линкер  $-L-$  представляет собой  $-L^a-$ ,  $-L^a-L^e-$ ,  $-L^a-L^b-L^e-$ , или  $-L^a-L^d-L^e-$ ;

$-L^a-$  представляет собой  $-(CH_2)_o-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_o-C_2H_4-$ , или  $-(CH_2-CH_2-O)_o-CH_2-$ ;

$-L^b-$  представляет собой  $-O-$ ;

$-L^d-$  представляет собой  $-(CH_2)_q-$ ,  $-(CH(OH))_q-$ ,  $-(CF_2)_q-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_q-C_2H_4-$ , или  $-(CH_2-CH_2-O)_q-CH_2-$ ;

$-L^e-$  представляет собой  $-(CH_2)_{p1}-$ ,  $-(CF_2)_{p1}-$ ,  $-C_2H_4-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$ ,  $-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$  или  $-(CH_2)_{p1}-O-(CH_2)_{p2}-$ ; и

$o$ ,  $q$ ,  $p1$  и  $p2$  представляют собой независимо друг от друга целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, и 6.

Следовательно, сахарид любой из общих формул (I), (II), (II-a), (II-b), (III), (III-a) или (III-b), где

$-L-$  представляет собой  $-L^a-$ ,  $-L^a-L^e-$ ,  $-L^a-L^b-L^e-$ , или  $-L^a-L^d-L^e-$ ;

$-L^a-$  представляет собой  $-(CH_2)_o-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_o-C_2H_4-$ , или  $-(CH_2-CH_2-O)_o-CH_2-$ ;

$-L^b-$  представляет собой  $-O-$ ;

$-L^d$  представляет собой  $-(CH_2)_q-$ ,  $-(CH(OH))_q-$ ,  $-(CF_2)_q-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_q-C_2H_4-$ , или  $-(CH_2-CH_2-O)_q-CH_2-$ ;

$-L^e$  представляет собой  $-(CH_2)_{p1}-$ ,  $-(CF_2)_{p1}-$ ,  $-C_2H_4-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$ ,  $-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$  или  $-(CH_2)_{p1}-O-(CH_2)_{p2}-$ ; и

5 **о, q, p1 и p2** представляют собой независимо друг от друга целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, и 6 является особенно предпочтительным.

Сахарид любой из общих формул (I), (II), (II-a), (II-b), (III), (III-a) или (III-b), где

$-L-$  выбран из:  $-L^a-$ ,  $-L^a-L^e-$ ,  $-L^a-L^b-L^e-$ , и  $-L^a-L^d-L^e-$ ;

$-L^a-$  выбран из:  $-(CH_2)_o-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_o-C_2H_4-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_o-CH_2-$ ;

10  $-L^b$  представляет собой  $-O-$ ;

$-L^d$  выбран из:  $-(CH_2)_q-$ ,  $-(CF_2)_q-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_q-C_2H_4-$ , и  $-(CH_2-CH_2-O)_q-CH_2-$ ;

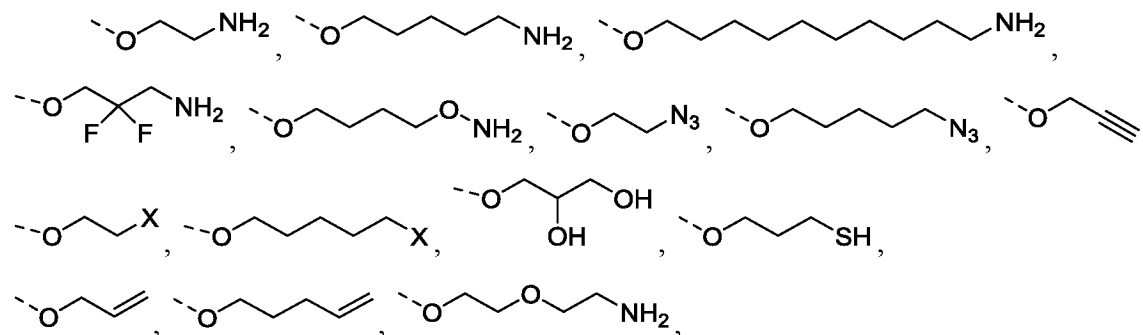
$-L^e$  выбран из:  $-(CH_2)_{p1}-$ ,  $-(CF_2)_{p1}-$ ,  $-C_2H_4-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$ ,  $-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$  и  $-(CH_2)_{p1}-O-(CH_2)_{p2}-$ ;

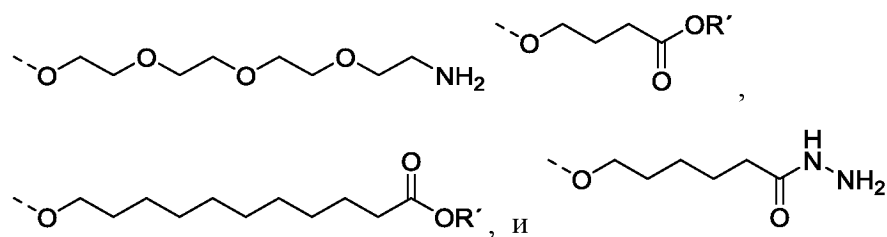
15 **о, q, p1 и p2** представляют собой независимо друг от друга целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, и 6; и **n** представляет собой 1, является также предпочтительным.

Еще более предпочтительным является сахарид общей формулы (I), (II), (II-a), (II-b), (III), (III-a) или (III-b), где  $-L-$  представляет собой  $-(CH_2)_o-$  и **о** представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

Также предпочтительным является сахарид общей формулы (I), (II), (II-a), (II-b), (III), (III-a) или (III-b), где  $-L-$  представляет собой  $-(CH_2)_o-$ , **о** представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5 и 6, и **n** представляет собой целое число, выбранное из 1 - 2.

25 В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения, группа  $-O-L-E$  выбрана из группы, которая состоит из:



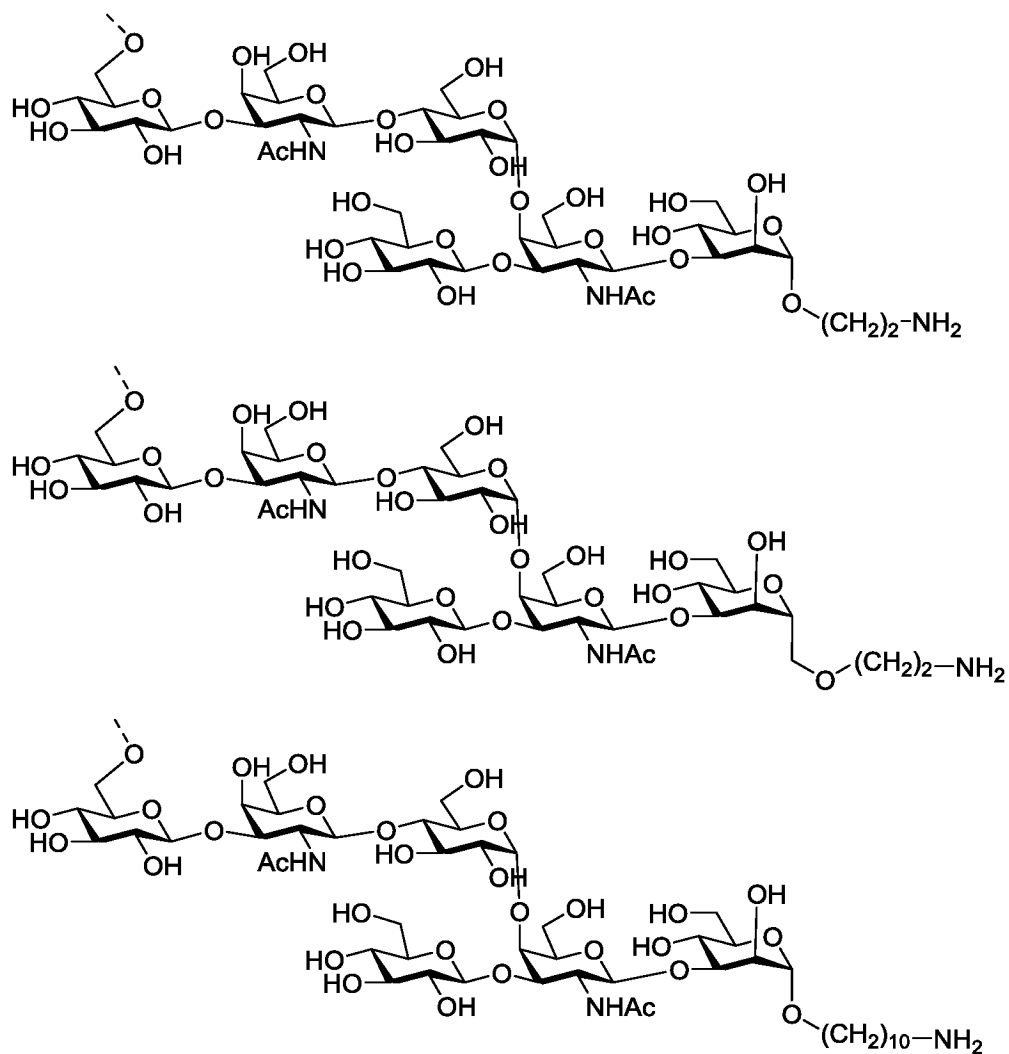


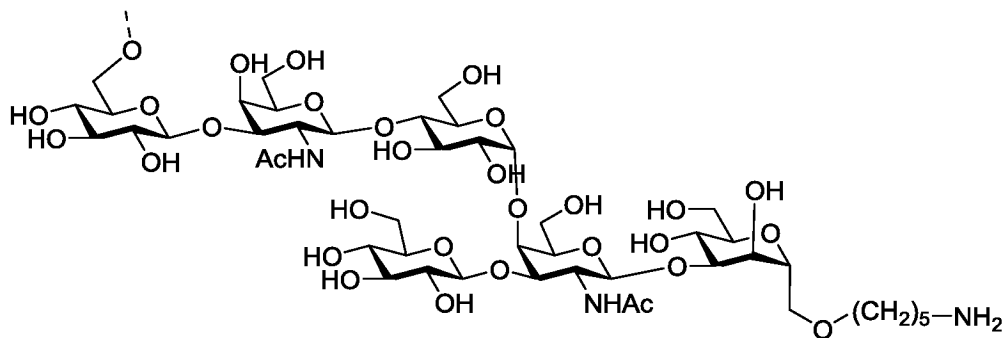
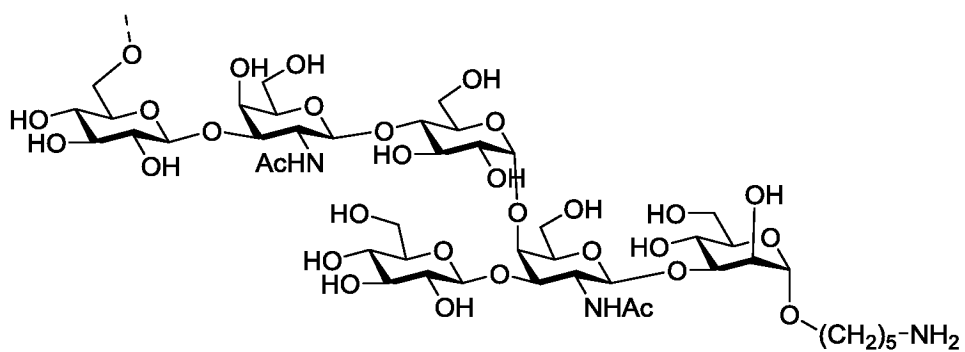
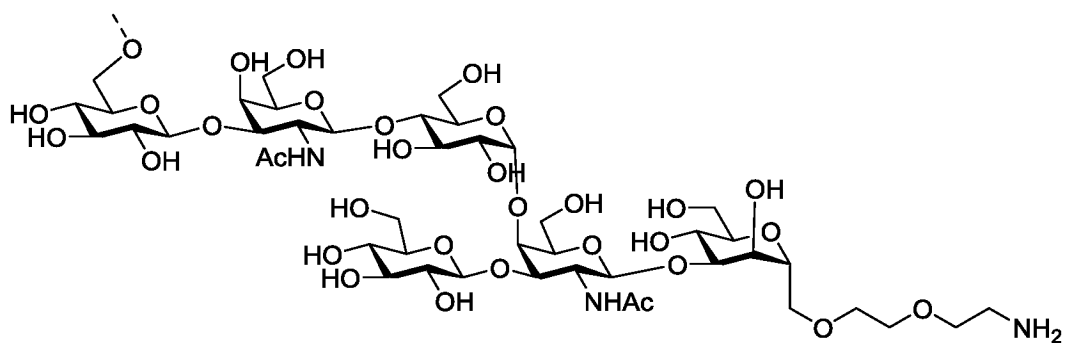
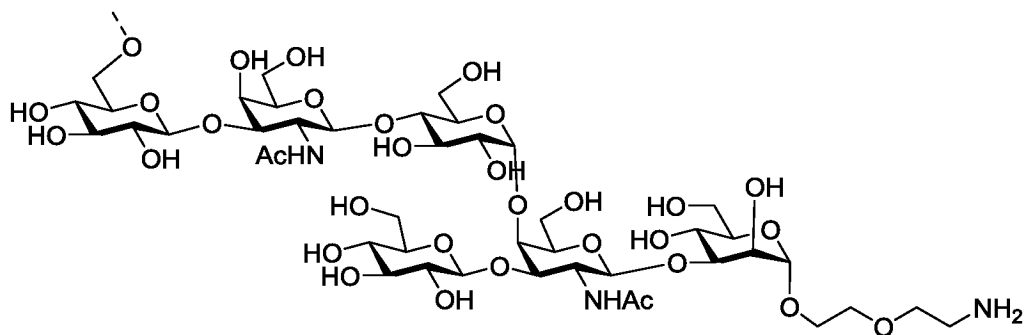
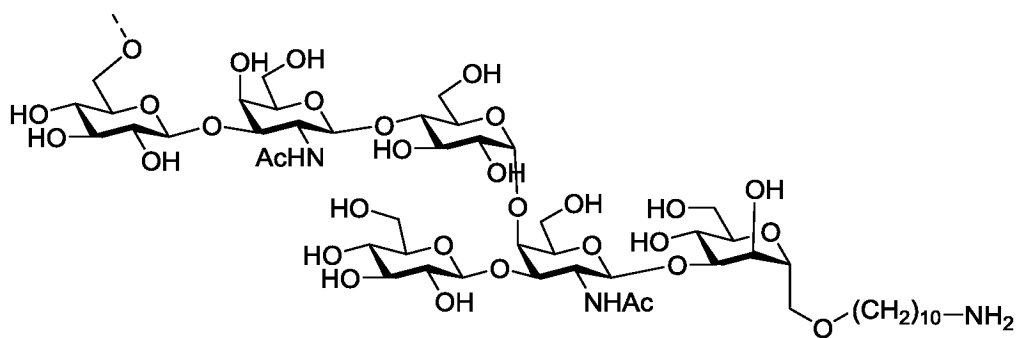
5 где R' представляет собой -H, -Me, -Et, 4-нитрофенил, пентафторфенил, или N-сукцинимидил;

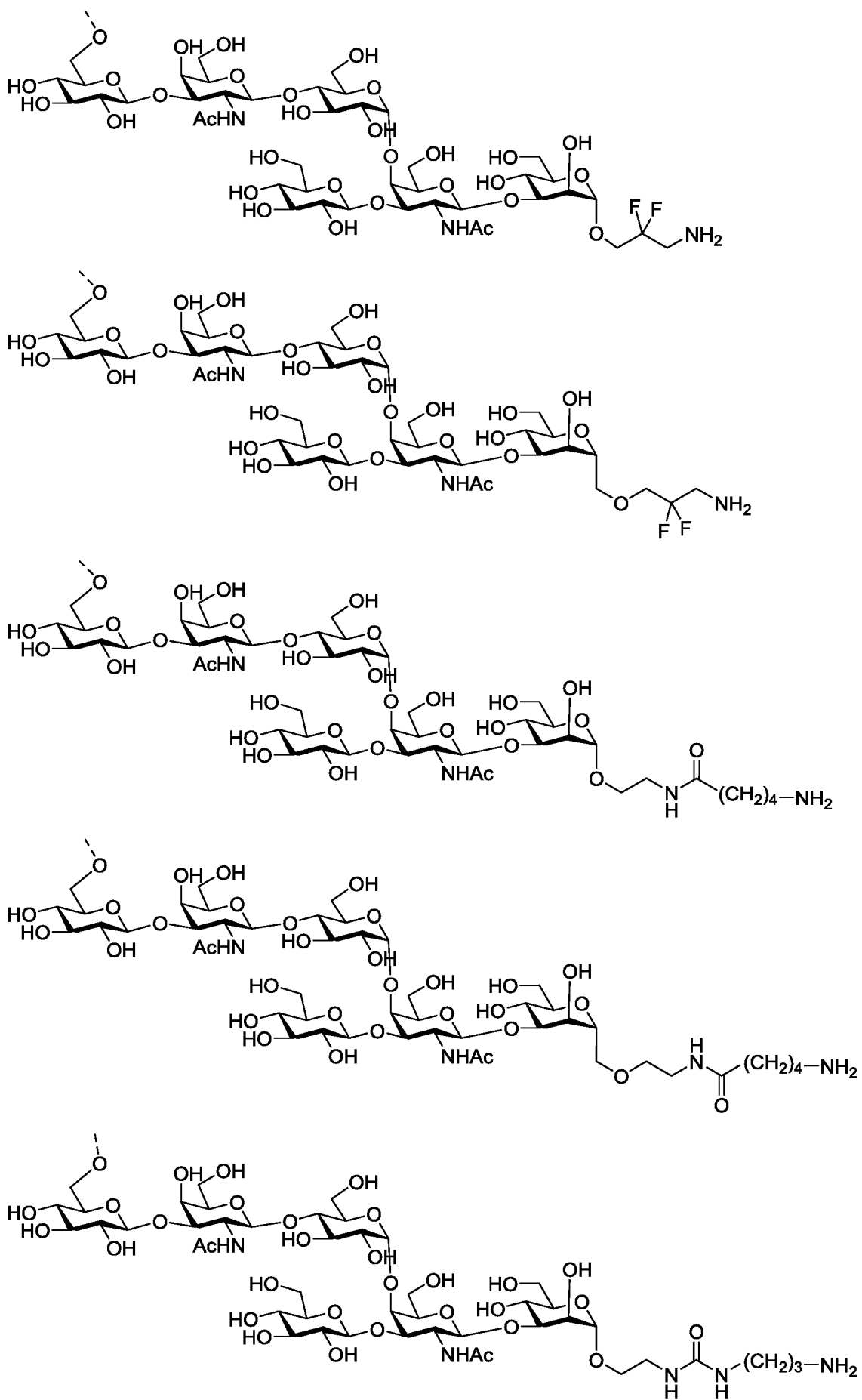
X представляет собой -Br, -Cl, -I, -CO<sub>2</sub>H, -CN, -NO<sub>2</sub> или -SAc.

Также предпочтительным является сахарид общей формулы (I), (II), (II-a), (II-b), (III), (III-a) или (III-b), где группа -O-L-E выбрана из группы, которая состоит из следующих:

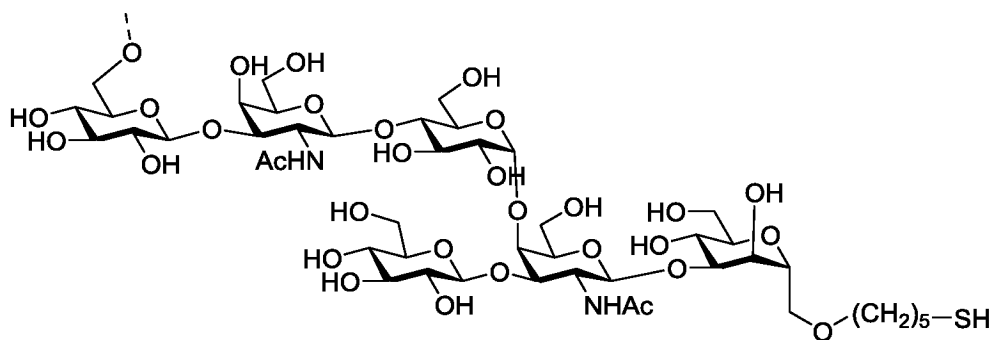
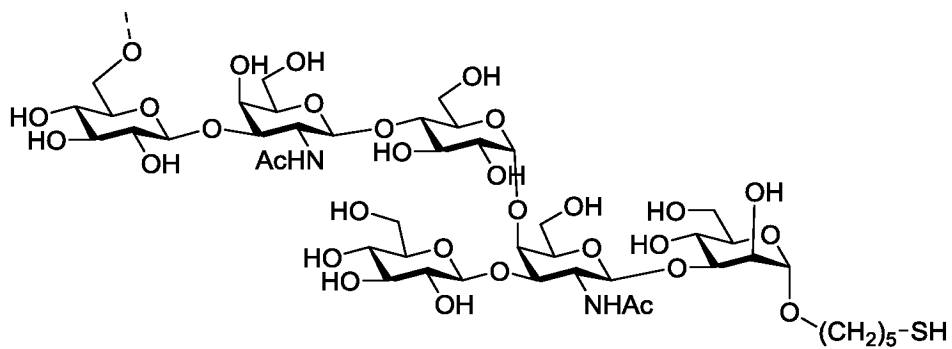
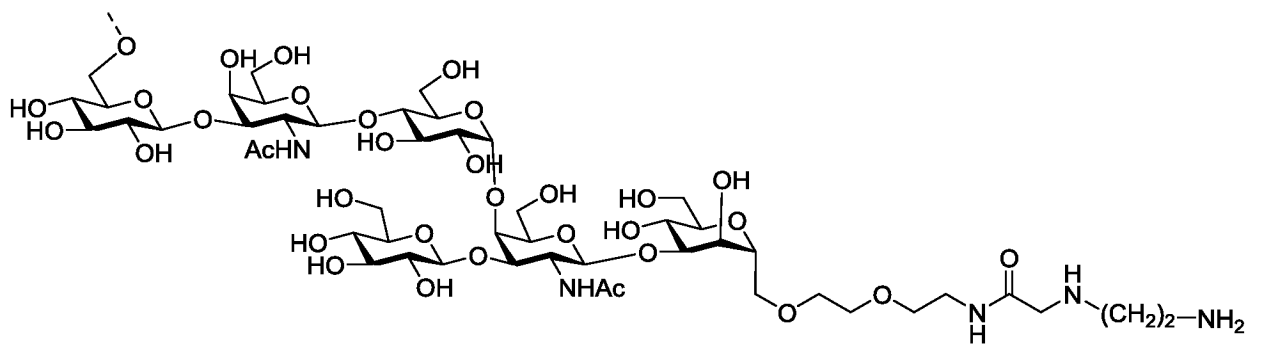
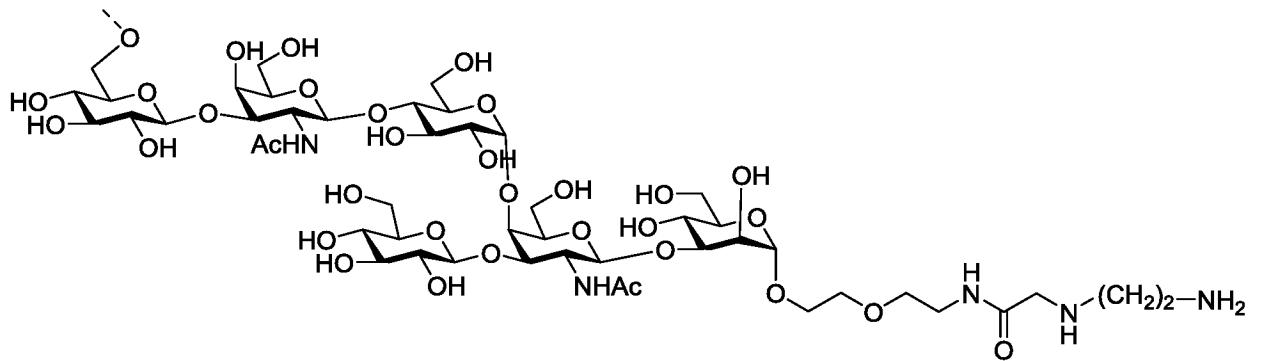
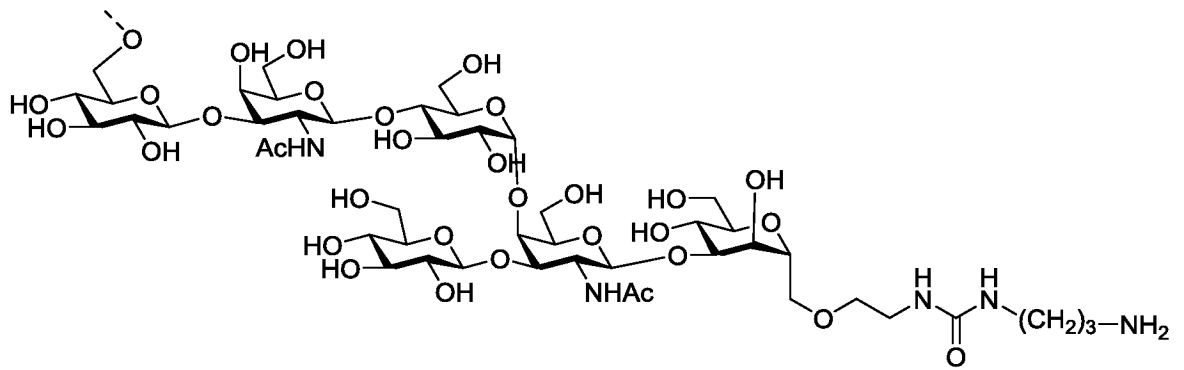
10

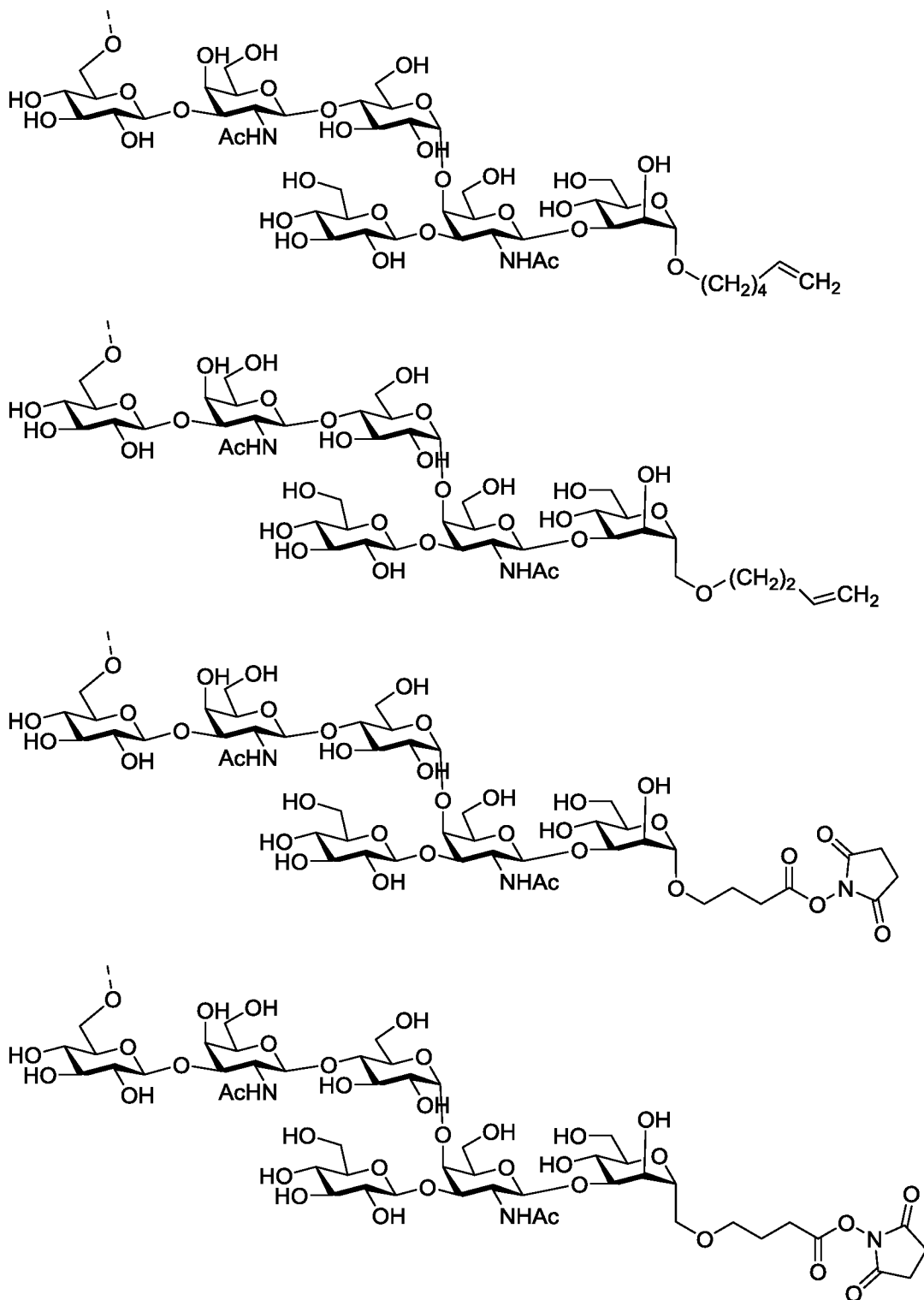












Также предпочтительным является сахарид общей формулы (I), (II), (II-a), (II-b), (III), (III-a) или (III-b), где  $-L-$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$ ,  $n$  представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6, и E представляет собой аминогруппу.

5 Предпочтительным является синтетический сахарид формулы (II-b), где  $n$  представляет собой 1 и E представляет собой аминогруппу. Более предпочтительным

является синтетический сахарид формулы **(II-b)**, где  $n$  представляет собой 1, E представляет собой аминогруппу, и линкер  $-L-$  представляет собой  $-L^a-$ ,  $-L^a-L^e-$ ,  $-L^a-L^b-L^e-$ , или  $-L^a-L^d-L^e-$ ;

5  $-L^a-$  представляет собой  $-(CH_2)_o-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_o-C_2H_4-$ , или  $-(CH_2-CH_2-O)_o-CH_2-$ ;

$-L^b-$  представляет собой  $-O-$ ;

$-L^d-$  представляет собой  $-(CH_2)_q-$ ,  $-(CH(OH))_q-$ ,  $-(CF_2)_q-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_q-C_2H_4-$ , или  $-(CH_2-CH_2-O)_q-CH_2-$ ;

10  $-L^e-$  представляет собой  $-(CH_2)_{p1}-$ ,  $-(CF_2)_{p1}-$ ,  $-C_2H_4-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$ ,  $-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$  или  $-(CH_2)_{p1}-O-(CH_2)_{p2}-$ ; и

$o$ ,  $q$ ,  $p1$  и  $p2$  представляют собой независимо друг от друга целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, и 6.

Особенно предпочтительным является синтетический сахарид формулы **(II-b)**, где  $n$  представляет собой 1, E представляет собой аминогруппу, линкер  $-L-$  представляет собой  $-(CH_2)_o-$  и  $o$  представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

Даже более предпочтительным является синтетический сахарид формулы **(II-b)**, где  $n$  представляет собой 1, E представляет собой аминогруппу, линкер  $-L-$  представляет собой  $-(CH_2)_o-$ , и  $o$  представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, и 6.

20 Предпочтительным является синтетический сахарид формулы **(II-b)**, где  $n$  представляет собой 2, и E представляет собой аминогруппу. Более предпочтительным является синтетический сахарид формулы **(II-b)**, где  $n$  представляет собой 2, E представляет собой аминогруппу, и линкер  $-L-$  представляет собой  $-L^a-$ ,  $-L^a-L^e-$ ,  $-L^a-L^b-L^e-$ , или  $-L^a-L^d-L^e-$ ;

25  $-L^a-$  представляет собой  $-(CH_2)_o-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_o-C_2H_4-$ , или  $-(CH_2-CH_2-O)_o-CH_2-$ ;

$-L^b-$  представляет собой  $-O-$ ;

$-L^d-$  представляет собой  $-(CH_2)_q-$ ,  $-(CH(OH))_q-$ ,  $-(CF_2)_q-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_q-C_2H_4-$ , или  $-(CH_2-CH_2-O)_q-CH_2-$ ;

30  $-L^e-$  представляет собой  $-(CH_2)_{p1}-$ ,  $-(CF_2)_{p1}-$ ,  $-C_2H_4-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$ ,  $-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$  или  $-(CH_2)_{p1}-O-(CH_2)_{p2}-$ ; и

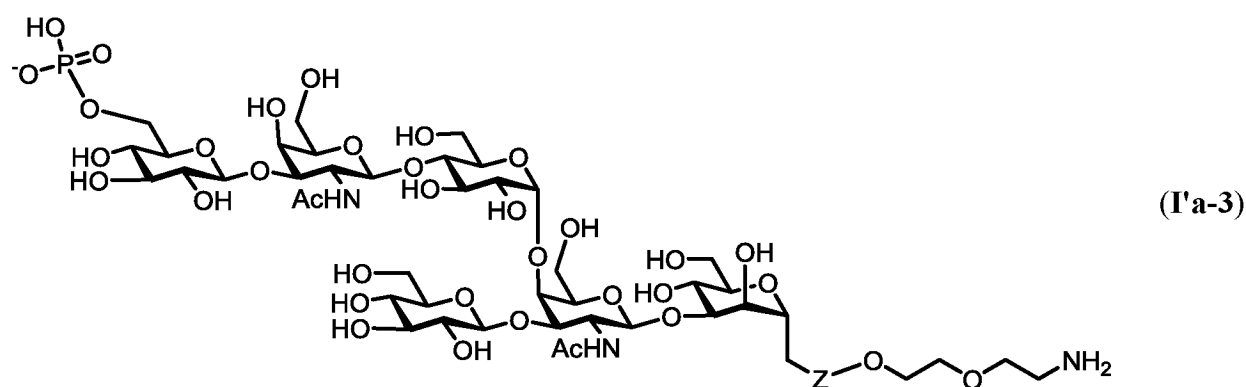
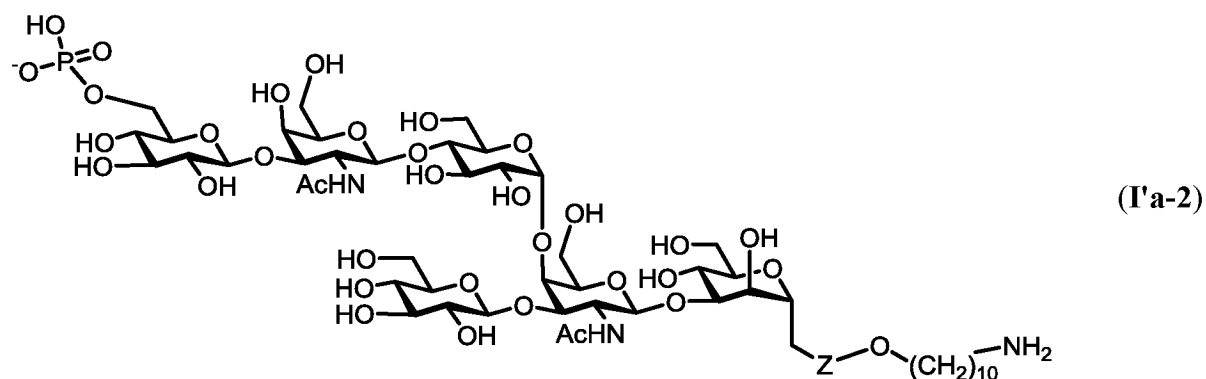
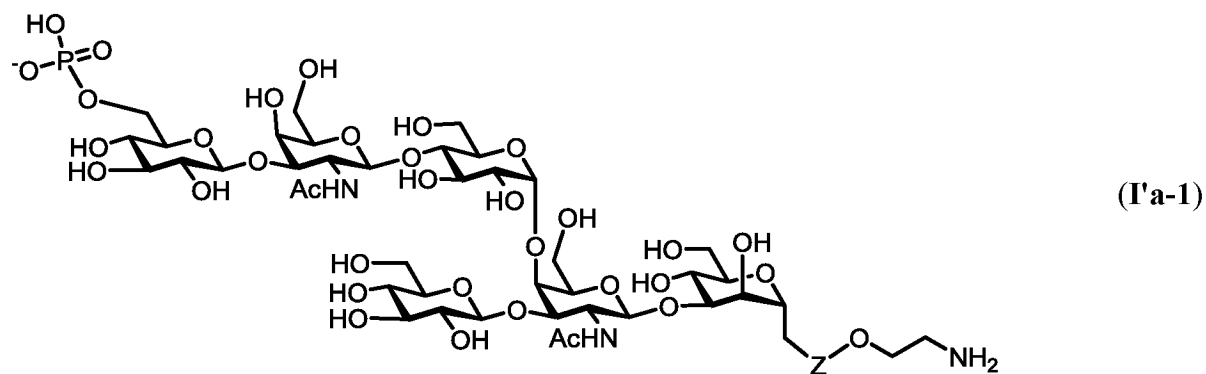
$o$ ,  $q$ ,  $p1$  и  $p2$  представляют собой независимо друг от друга целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, и 6.

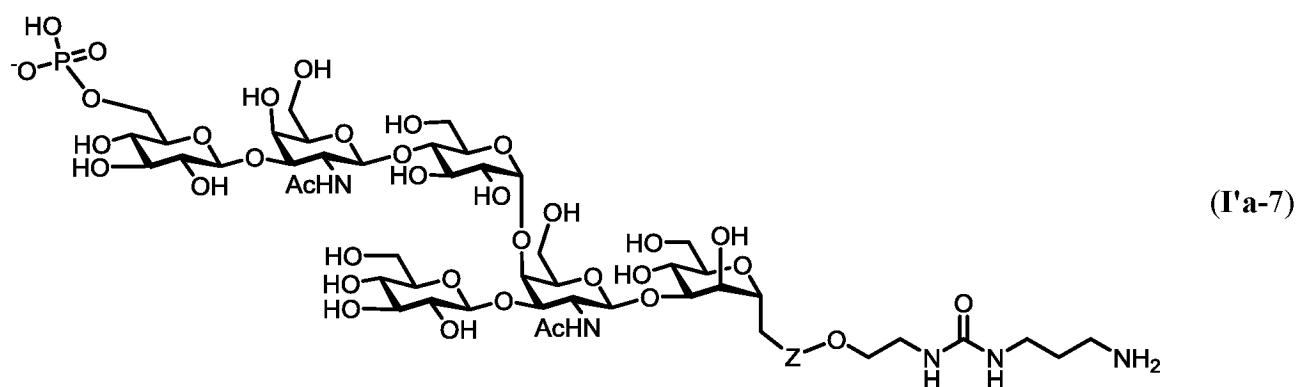
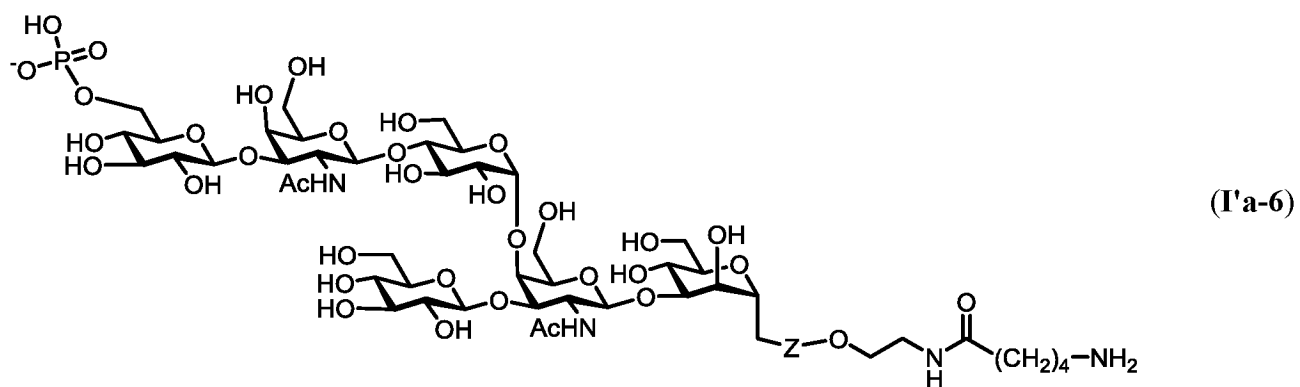
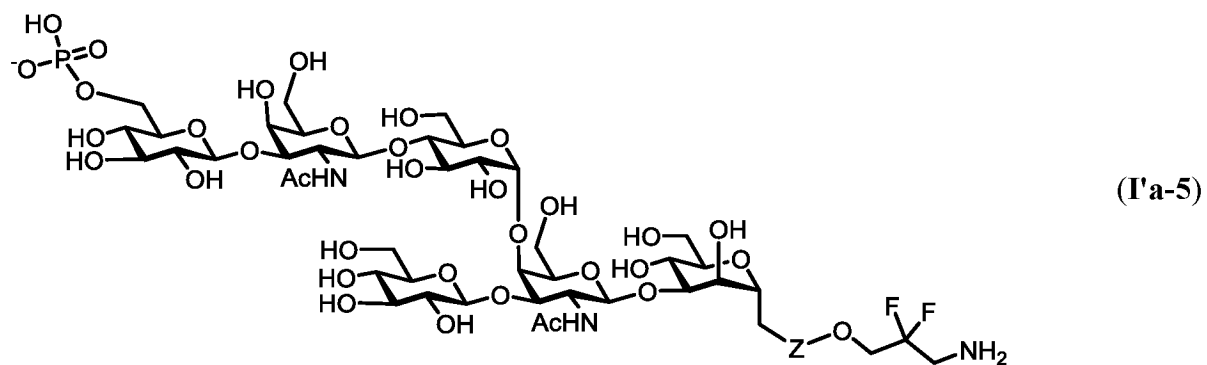
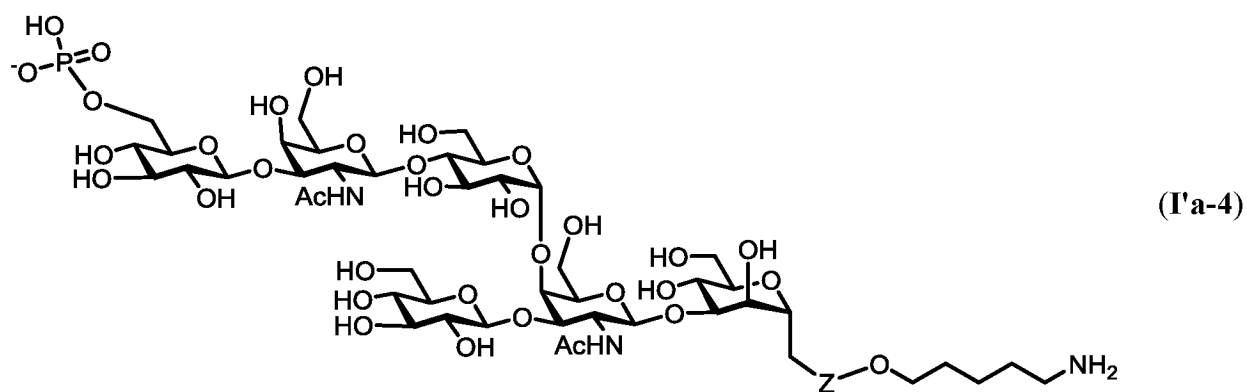
Особенно предпочтительным является синтетический сахарид формулы **(II-b)**, где  $n$  представляет собой 2, E представляет собой аминогруппу, линкер  $-L-$  представляет собой

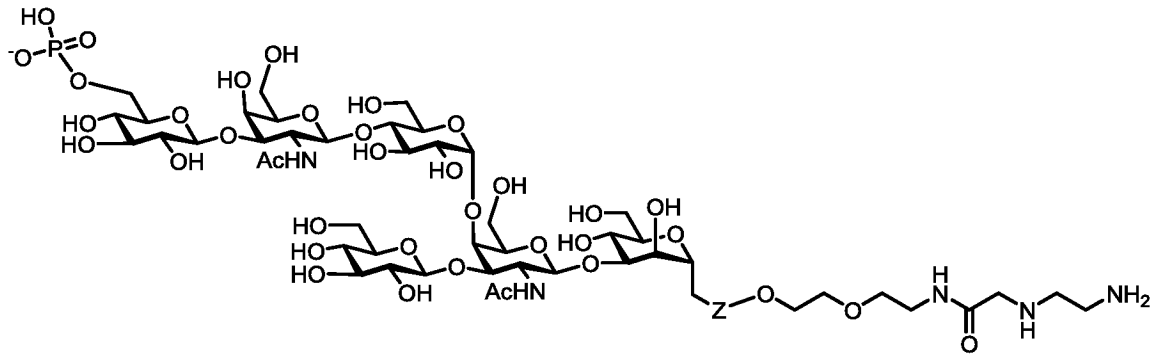
$-(CH_2)_o-$ , и о представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

Даже более предпочтительным является синтетический сахарид формулы (II-b), где n представляет собой 2, E представляет собой аминогруппу, линкер  $-L-$  представляет собой  $-(CH_2)_o-$ , и о представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, и 6.

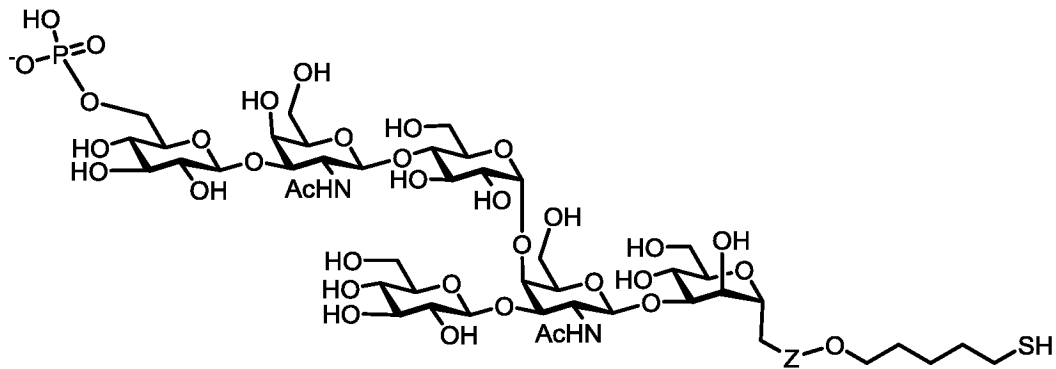
- 5 В еще одном другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, сахарид в соответствии с настоящим изобретением выбран из группы, которая состоит из следующих:



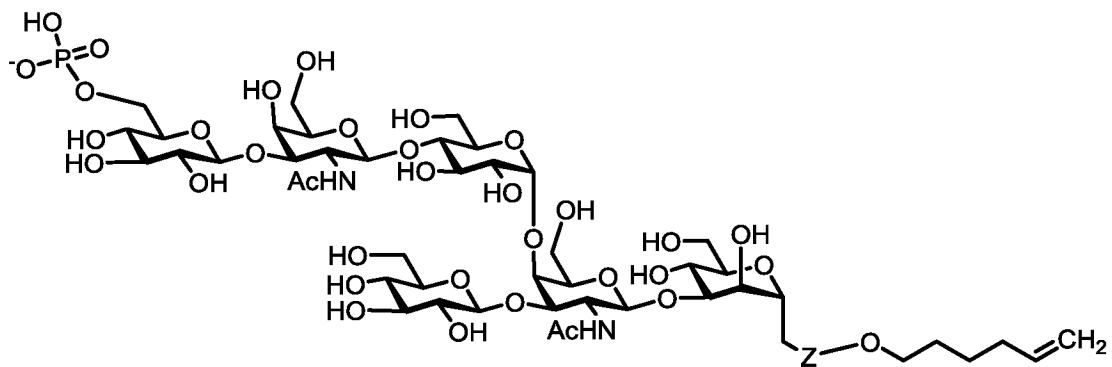




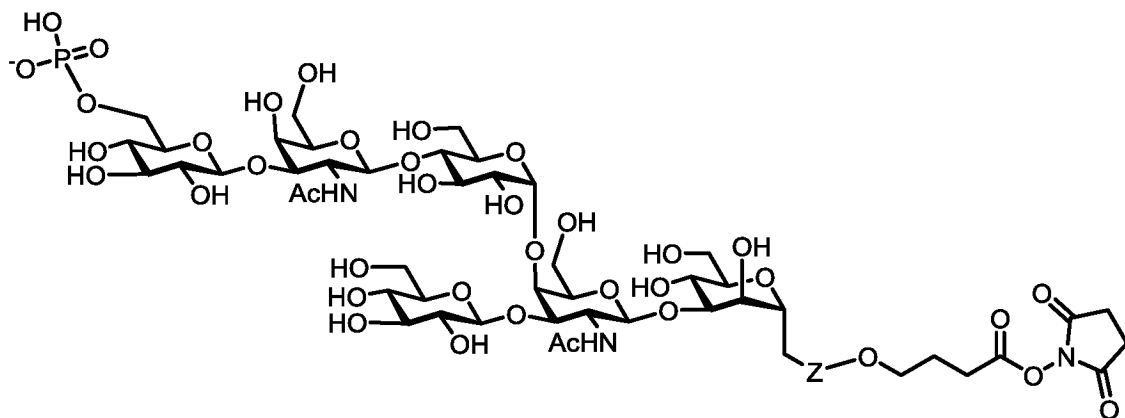
(I'a-8)



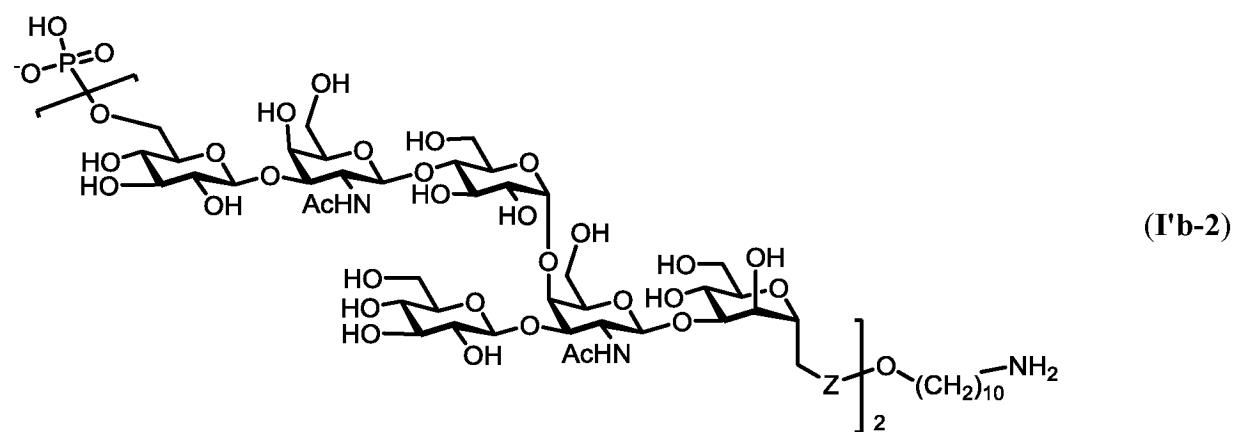
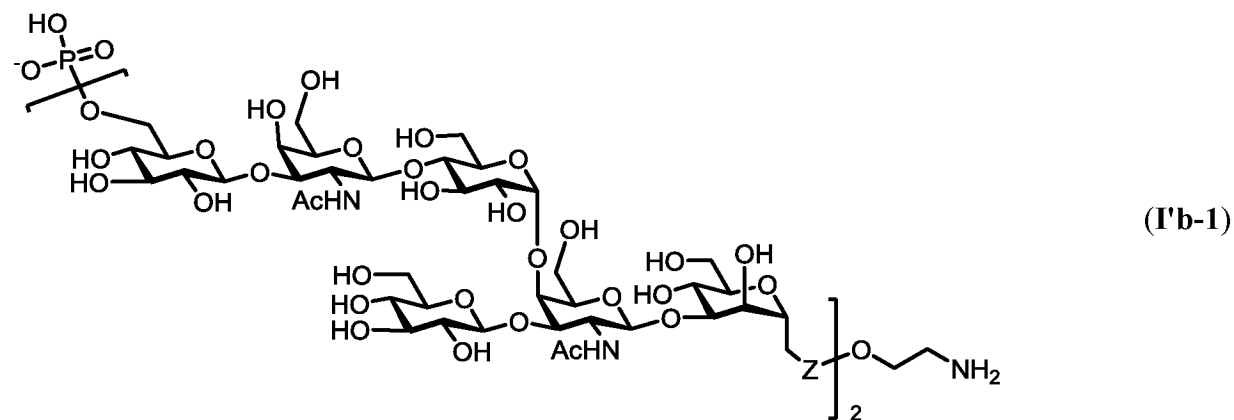
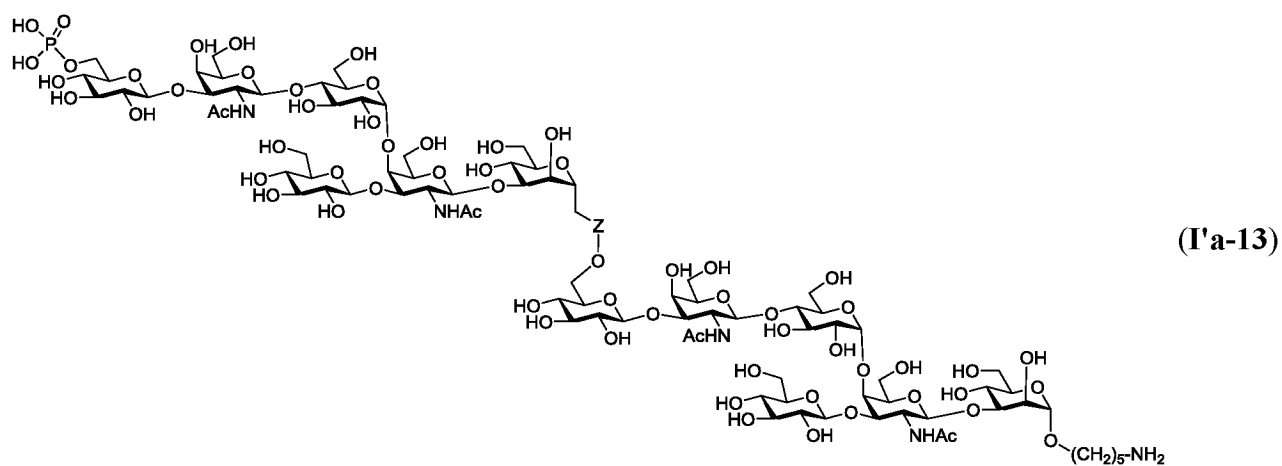
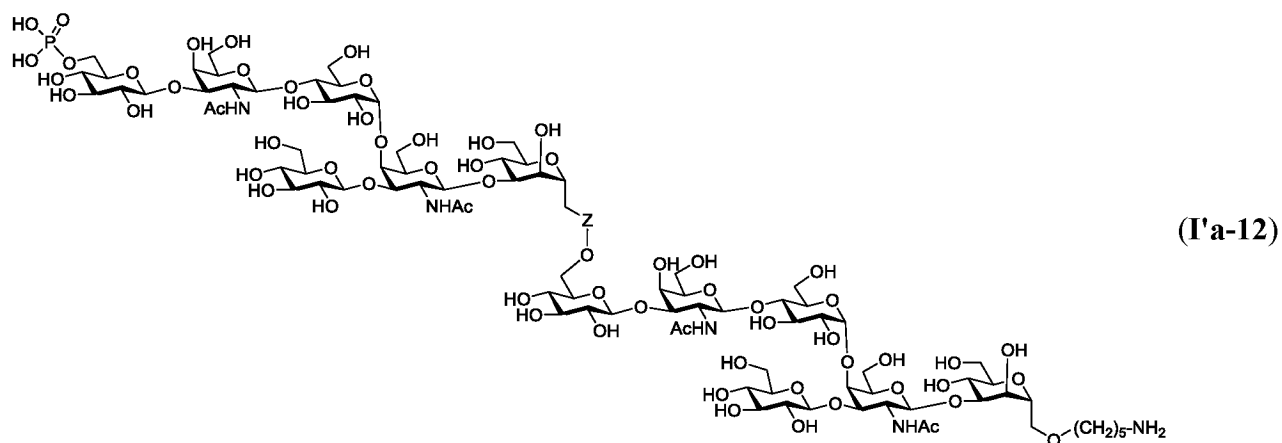
(I'a-9)

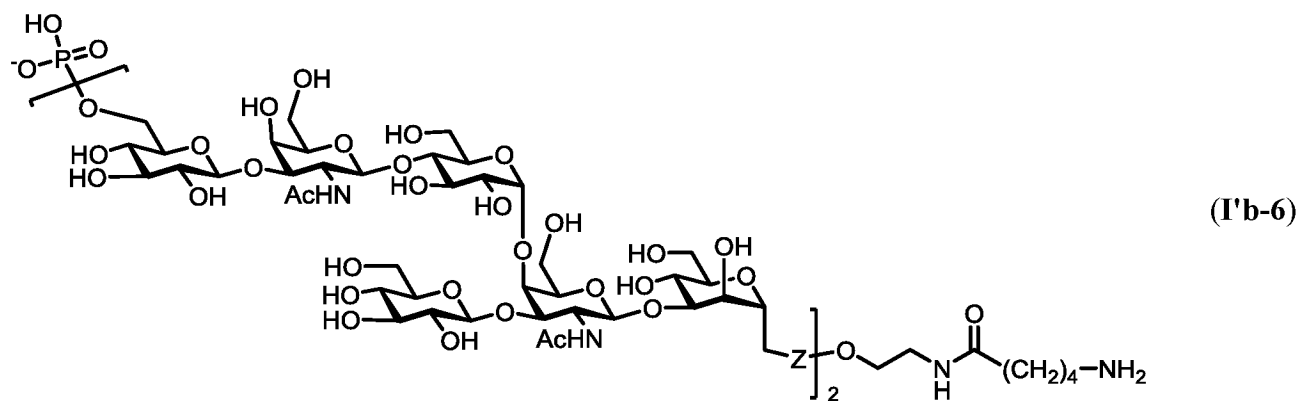
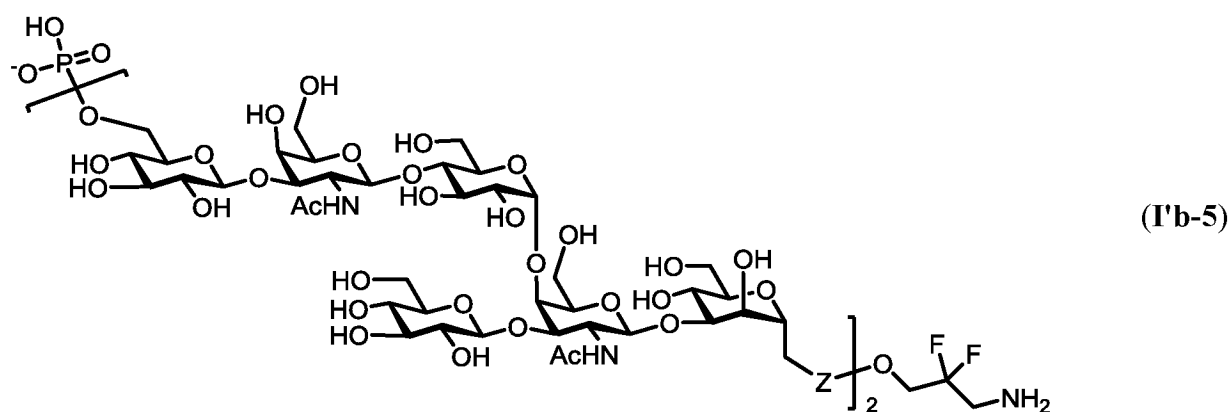
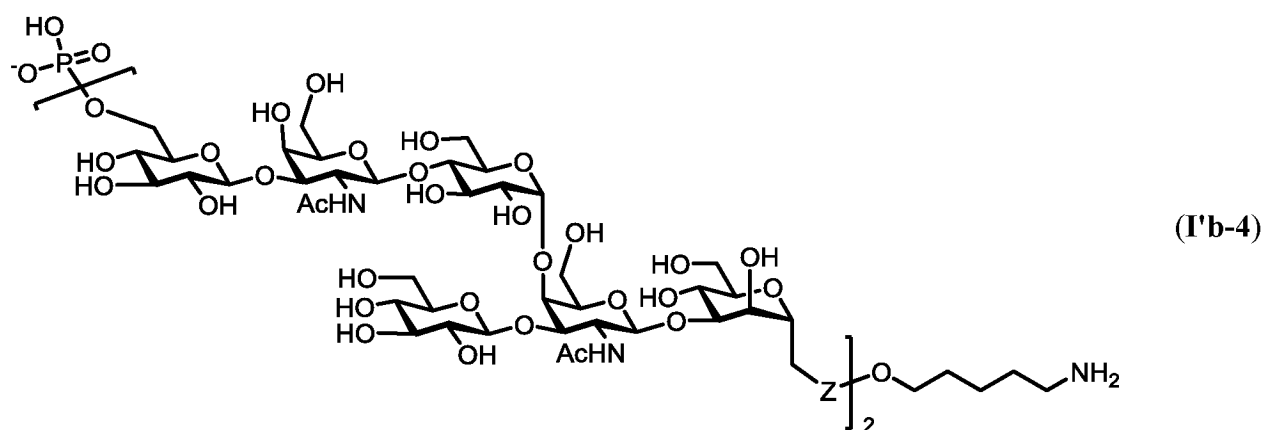
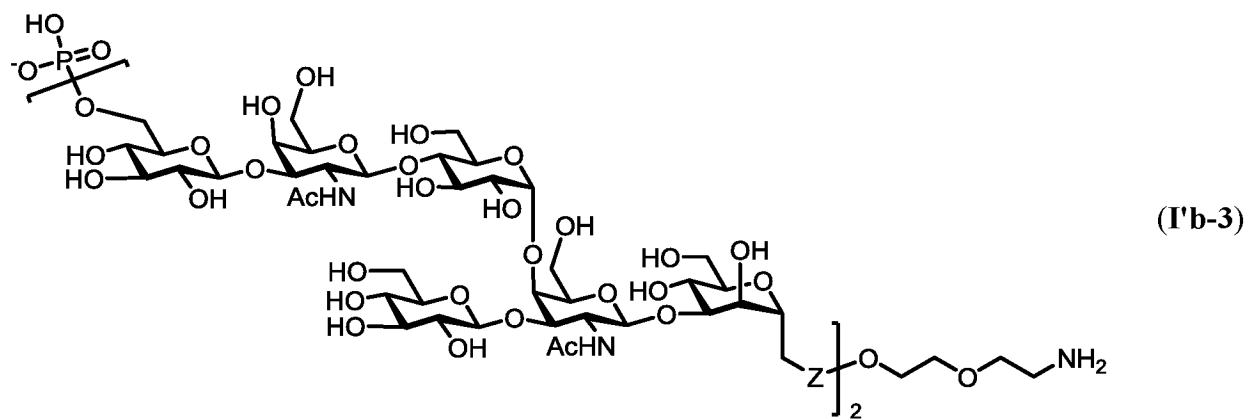


(I'a-10)

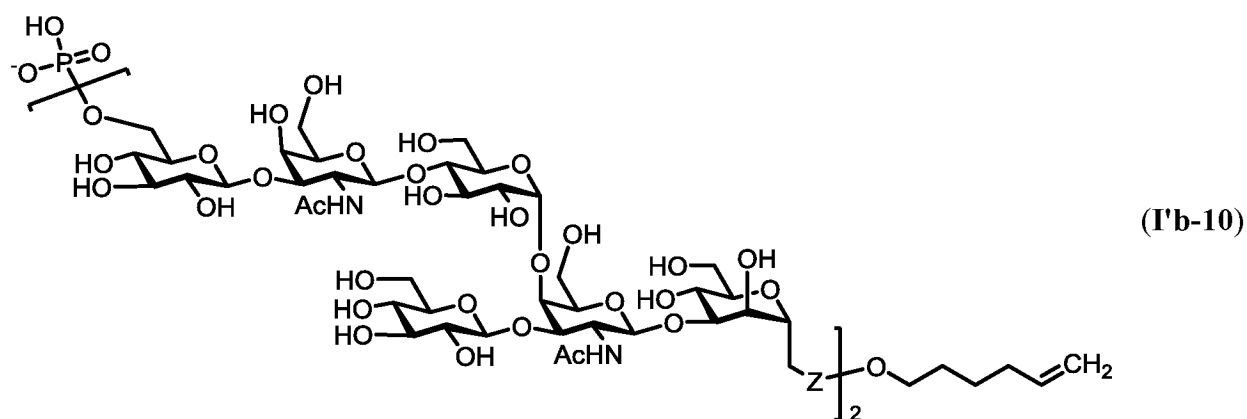
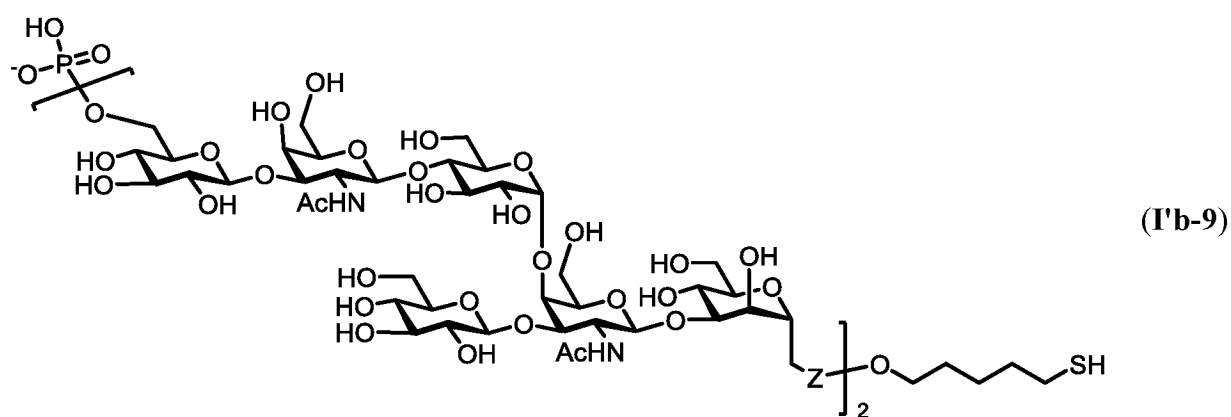
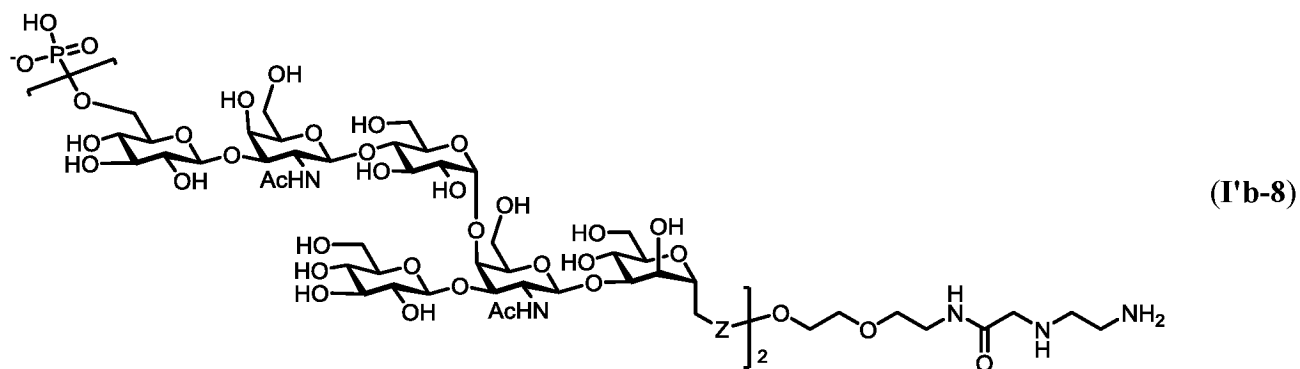
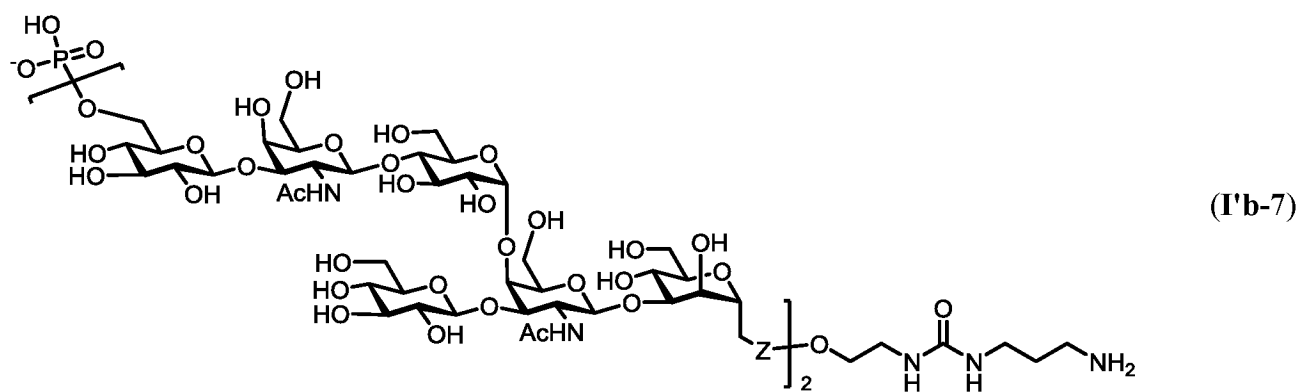


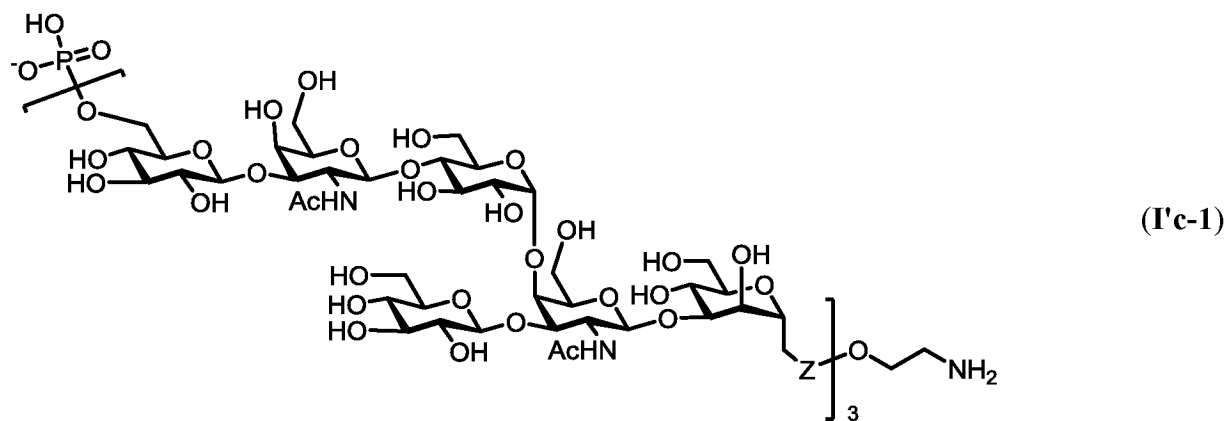
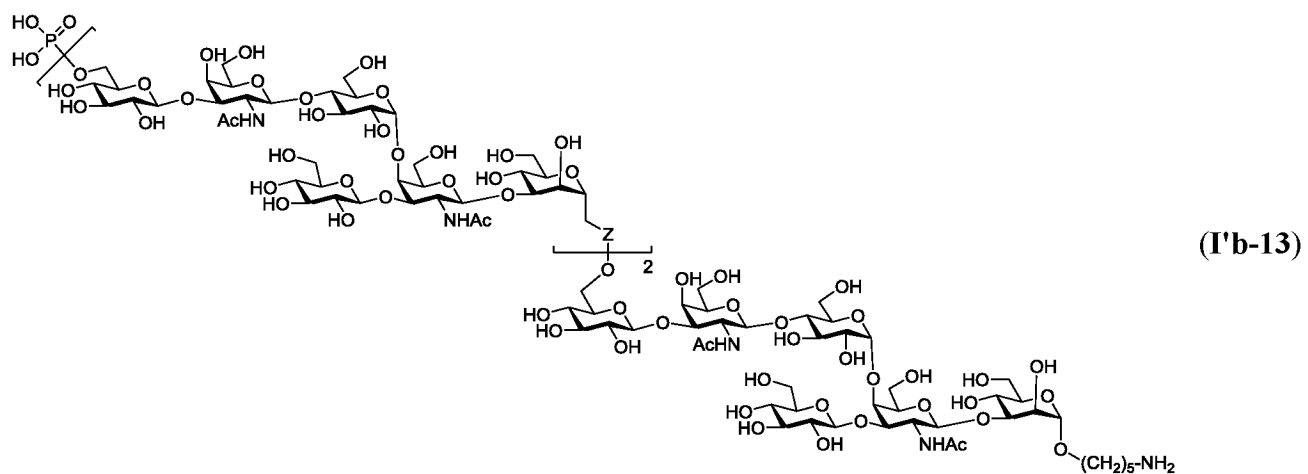
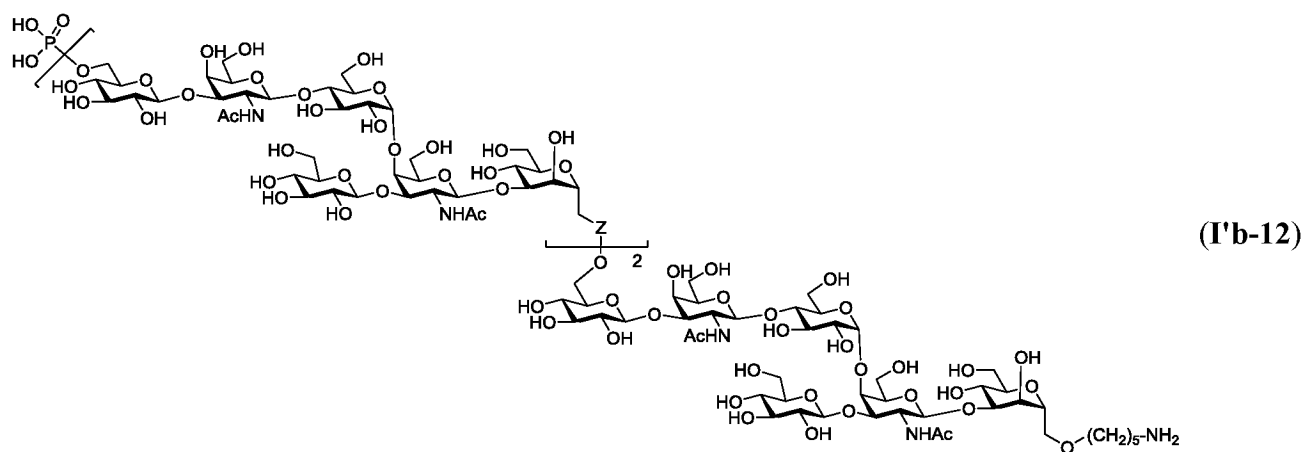
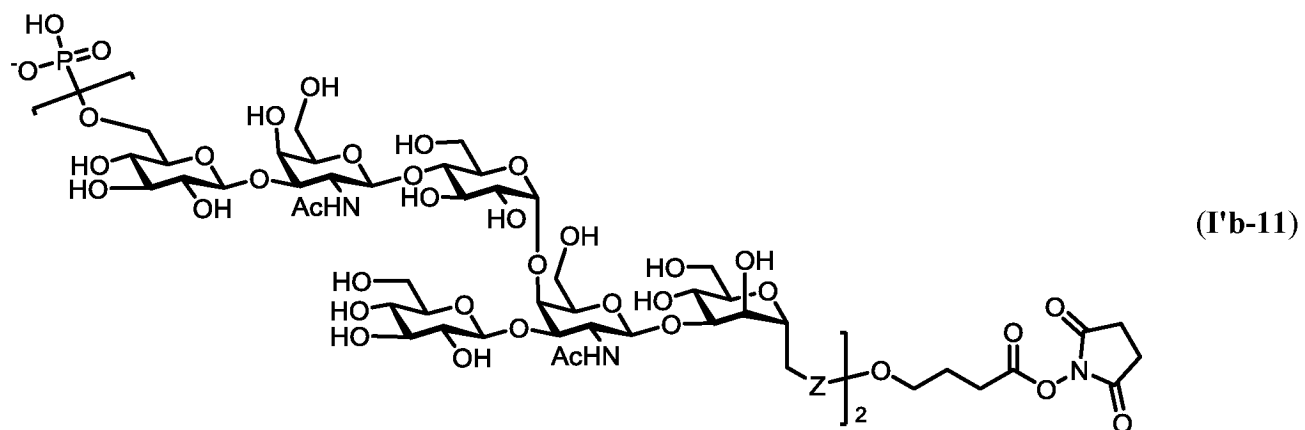
(I'a-11)

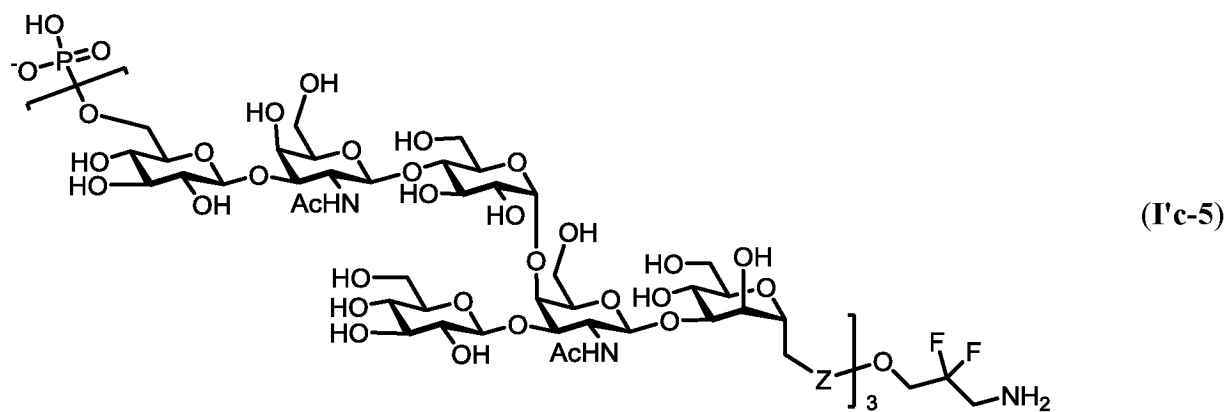
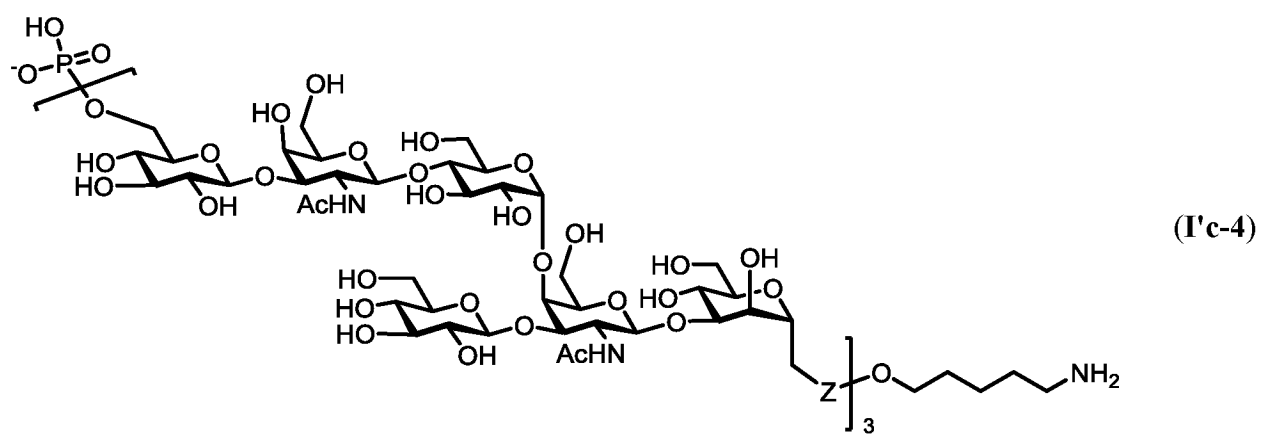
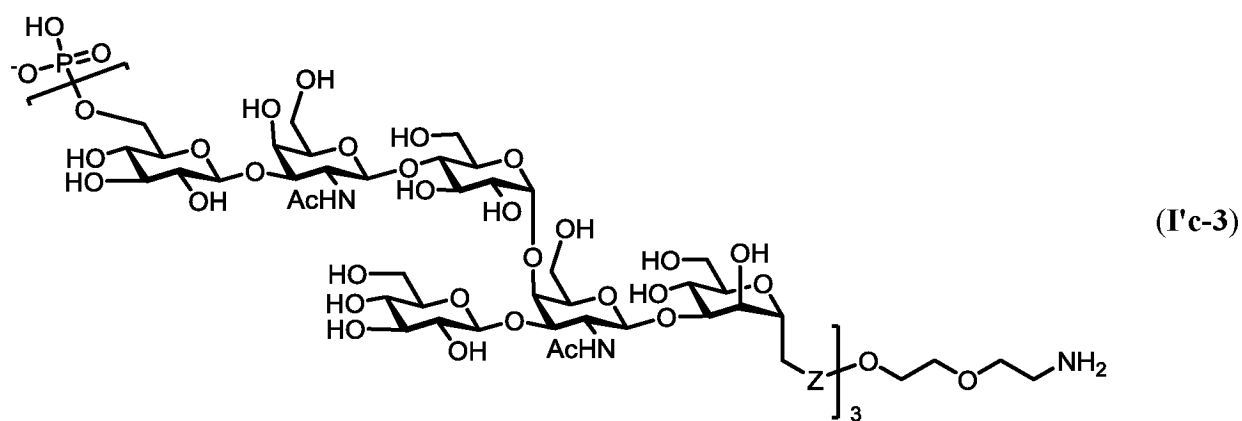
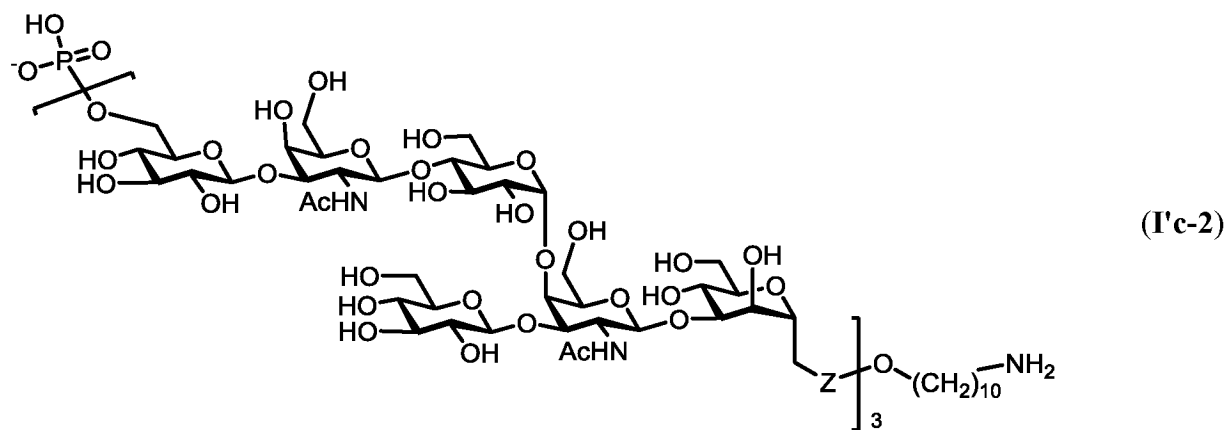


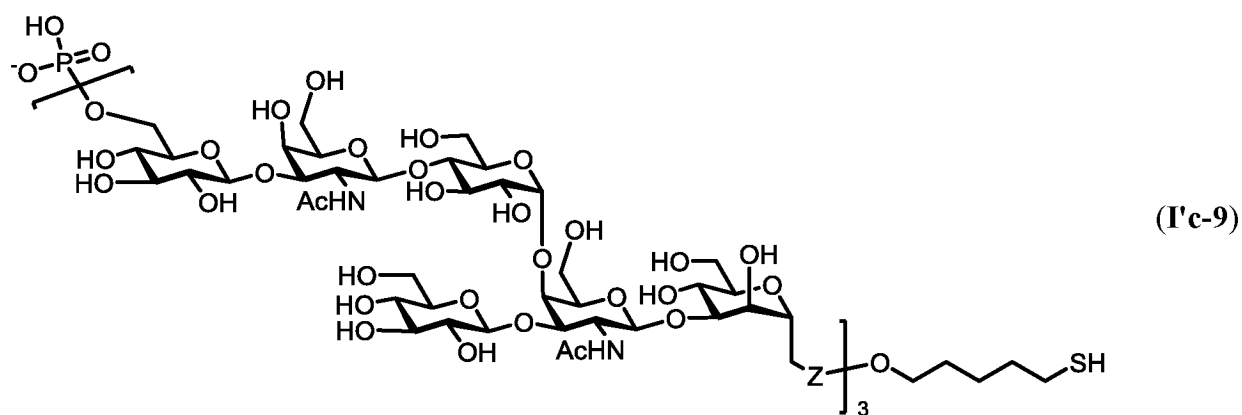
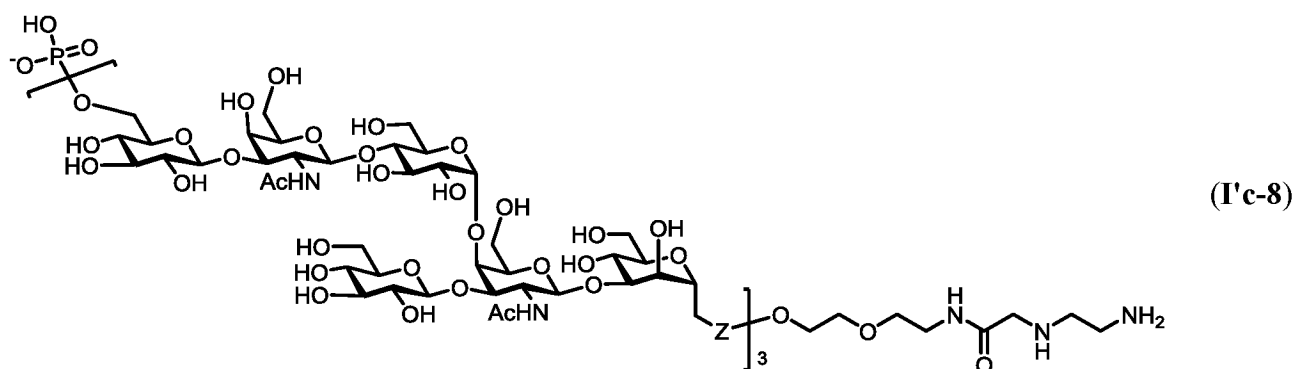
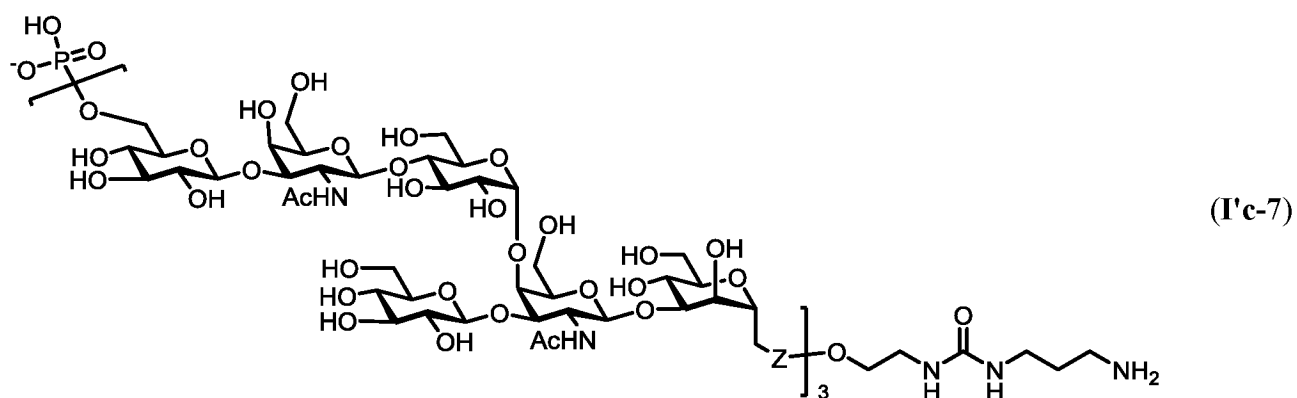
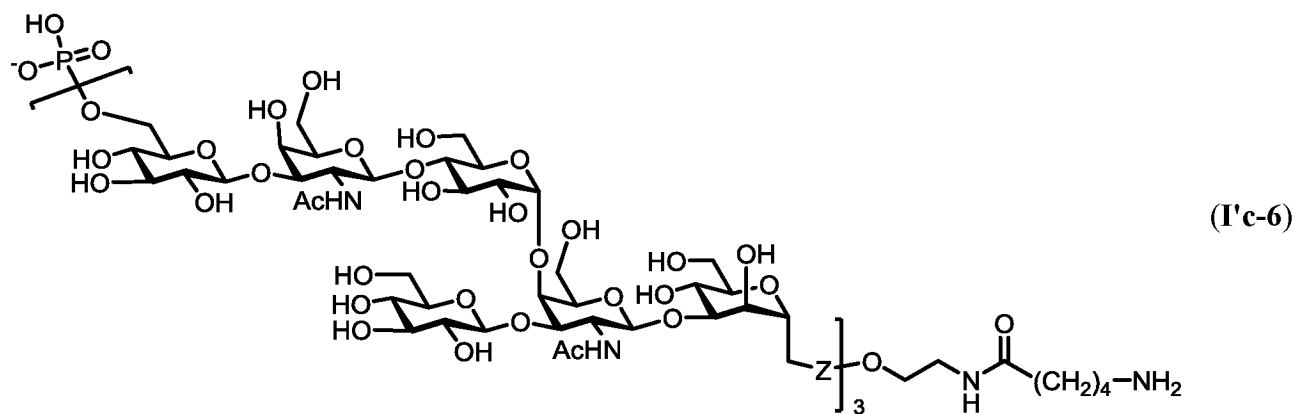


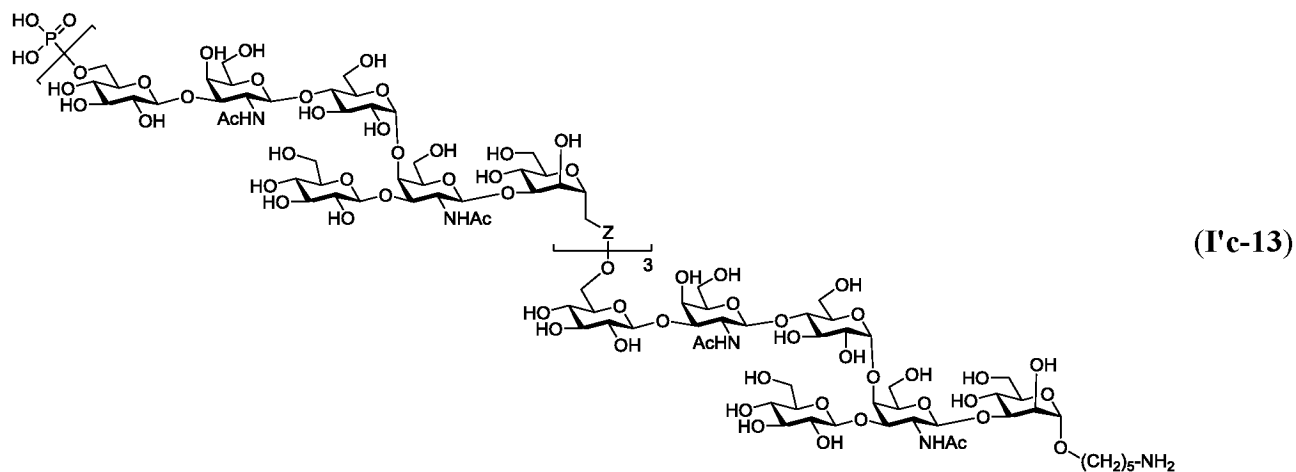
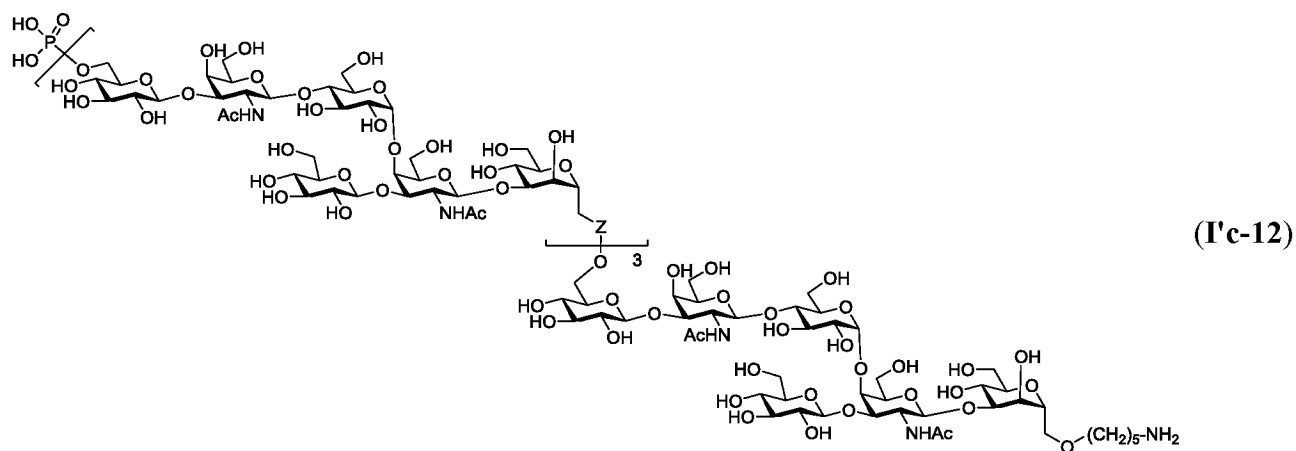
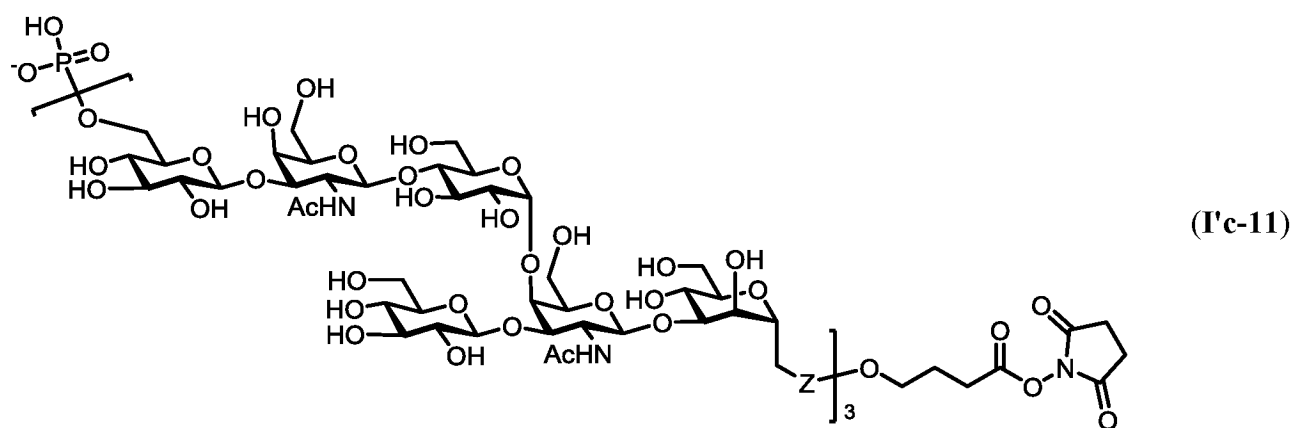
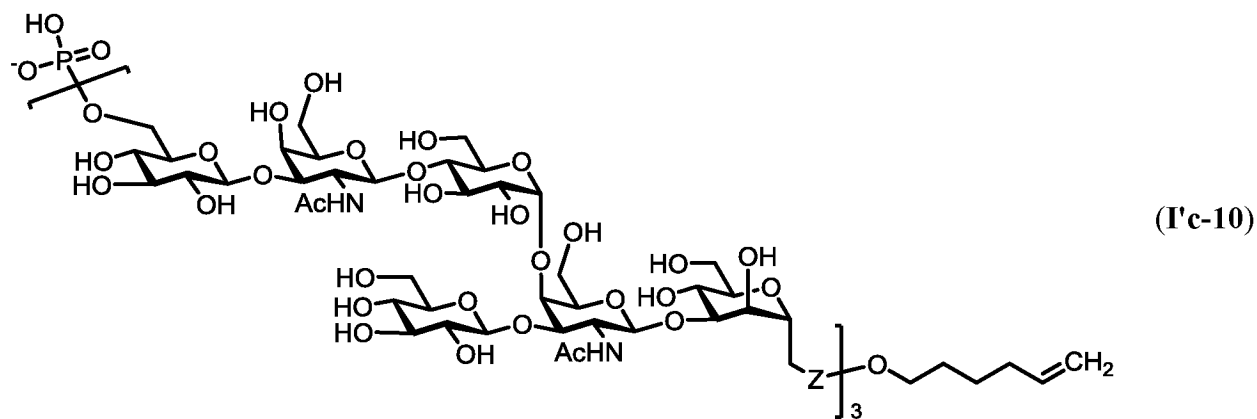


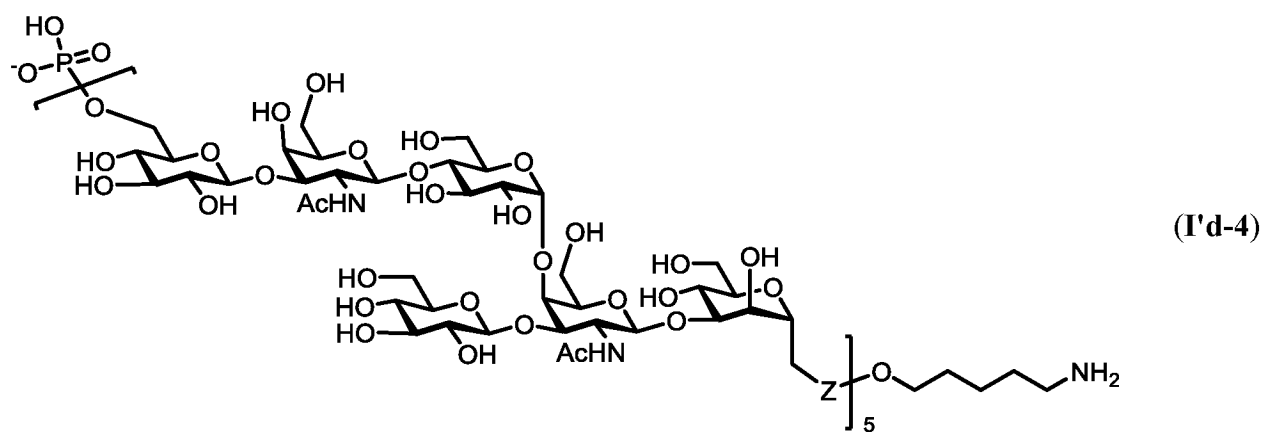
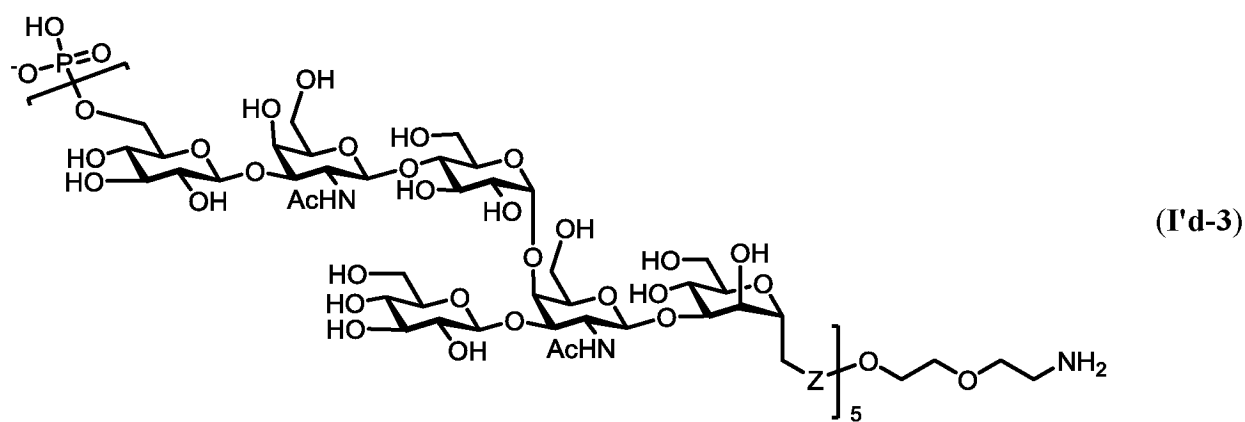
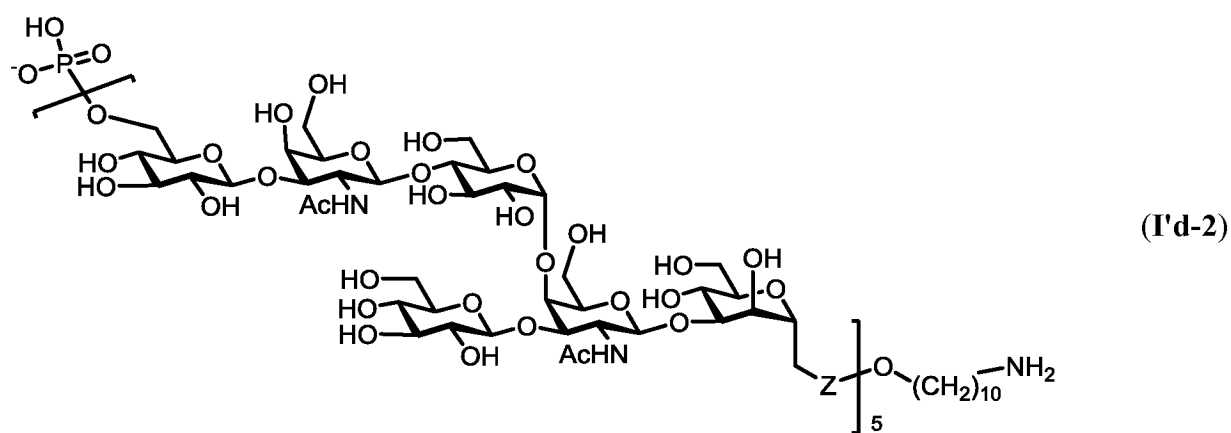
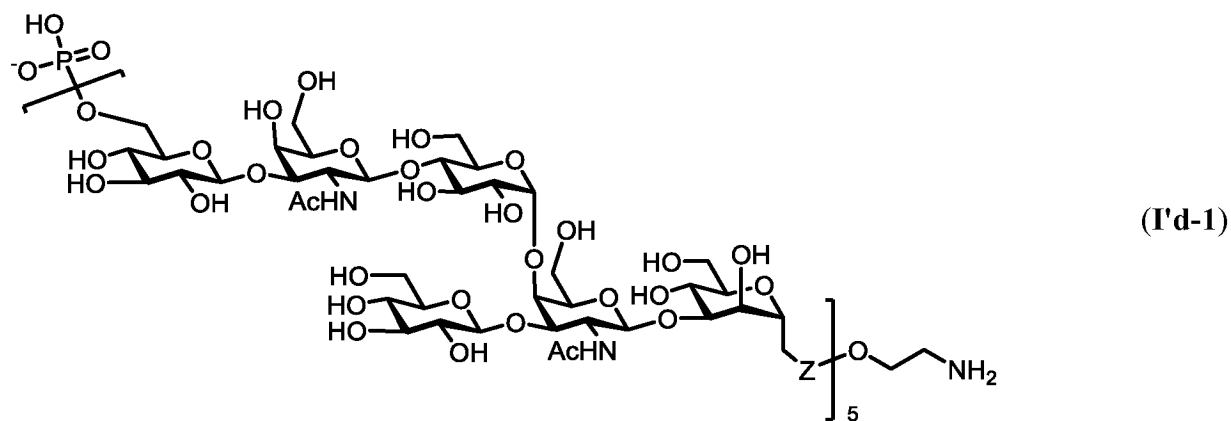


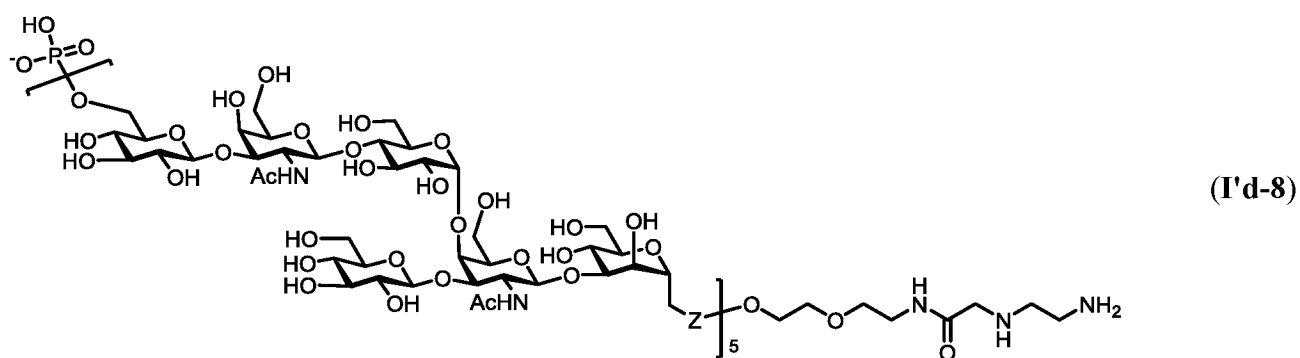
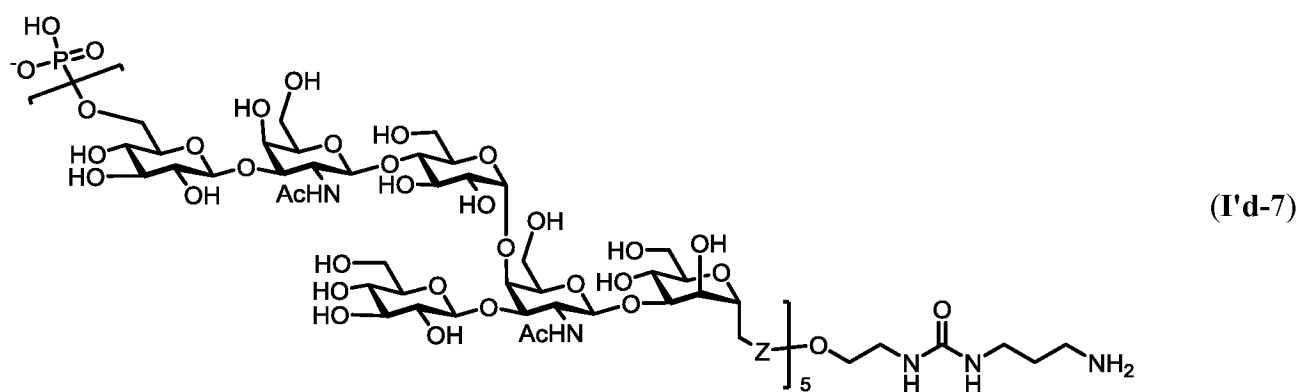
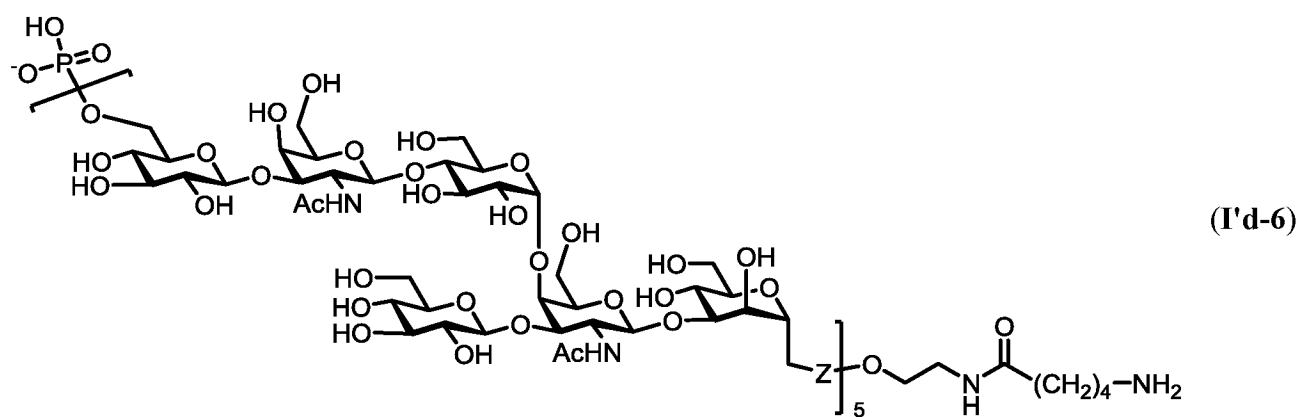
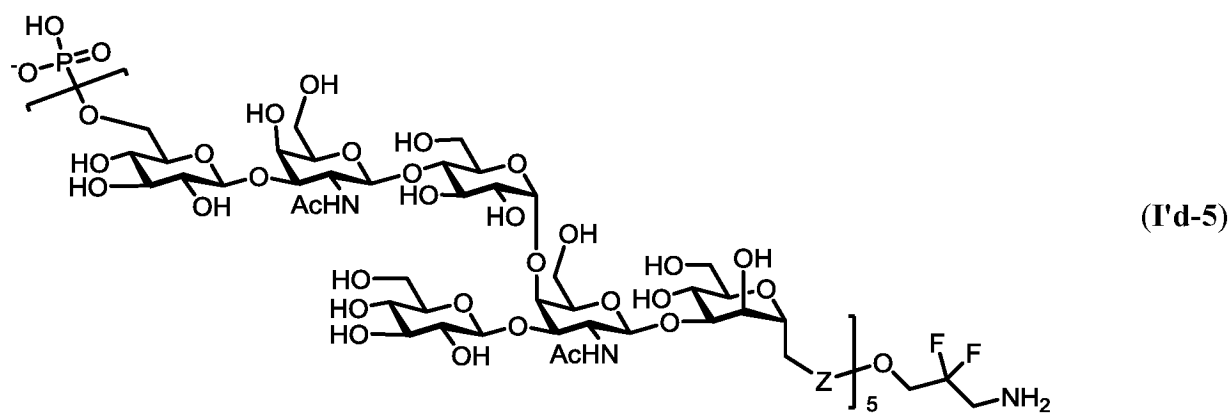


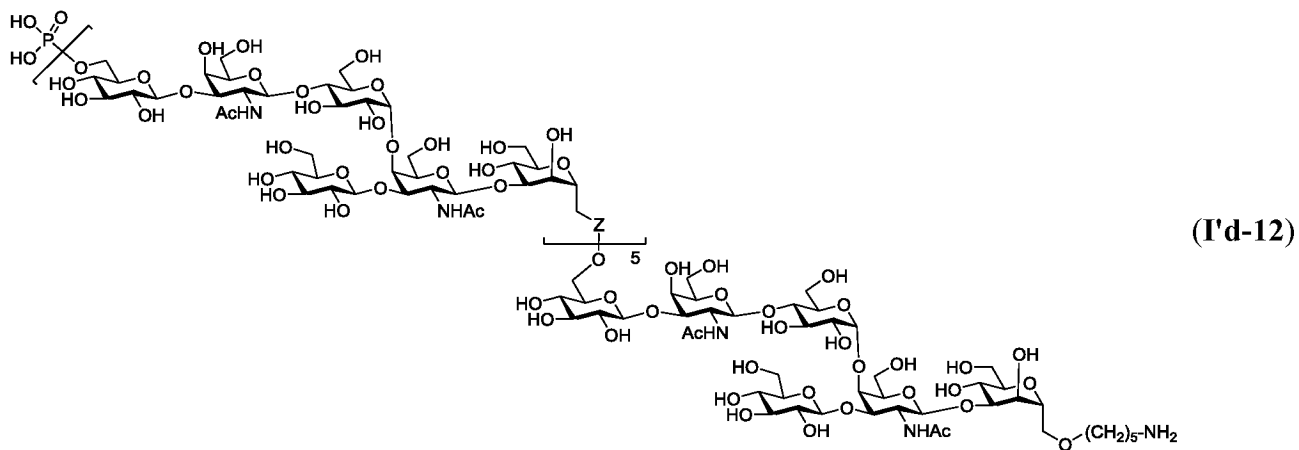
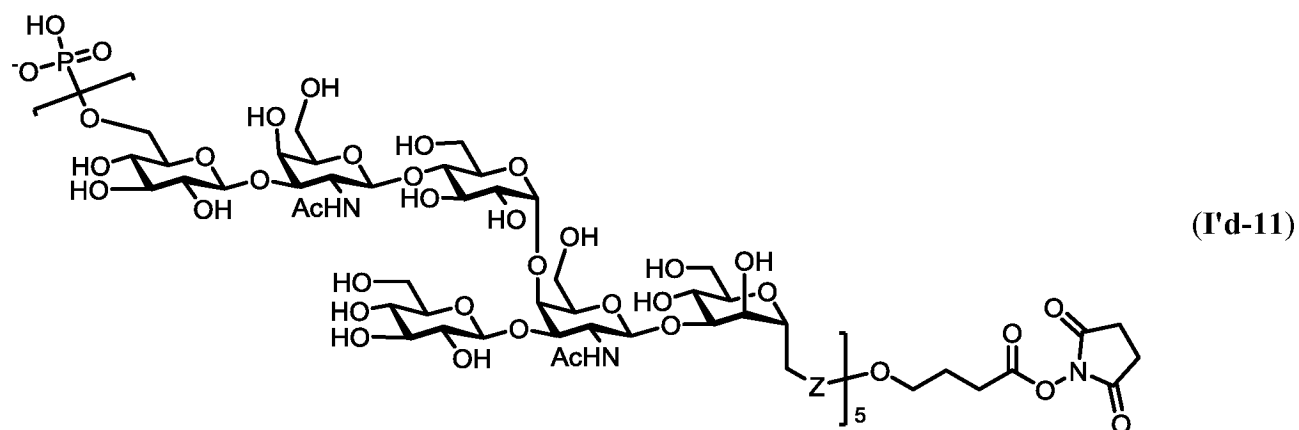
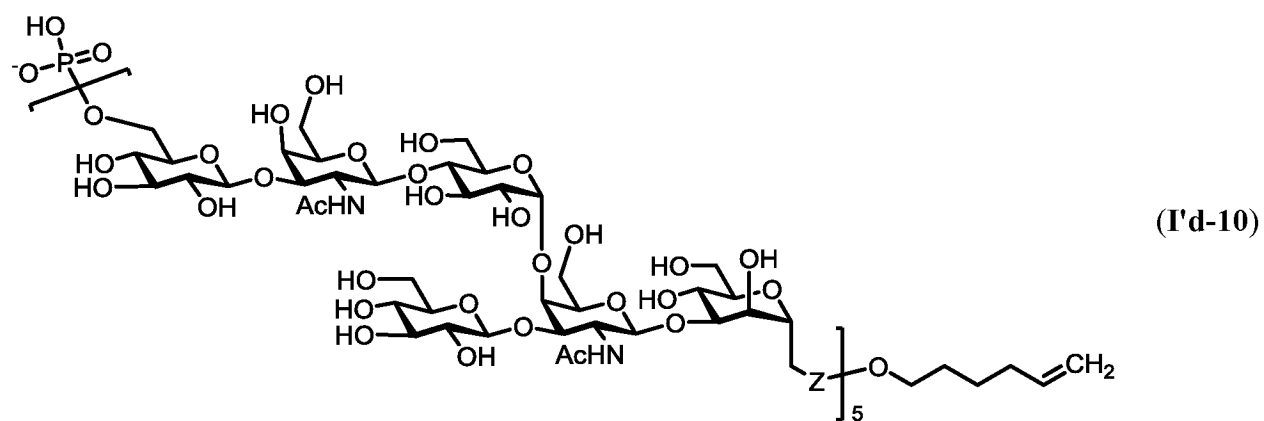
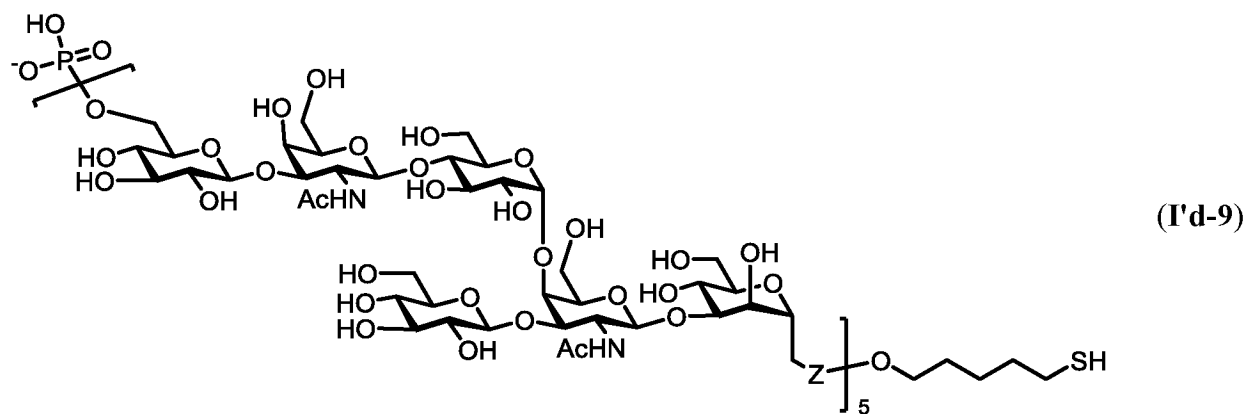




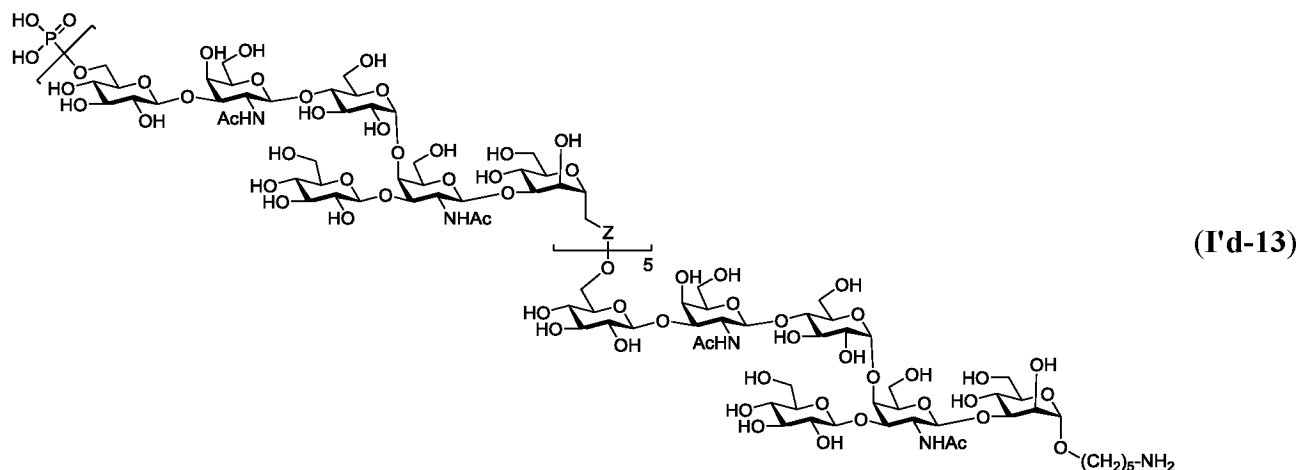




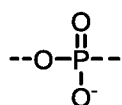




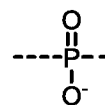




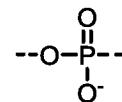
где **Z** представляет собой



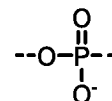
или



Особенно предпочтительным является сахарид формулы (I'a-4),  
где **Z** представляет собой



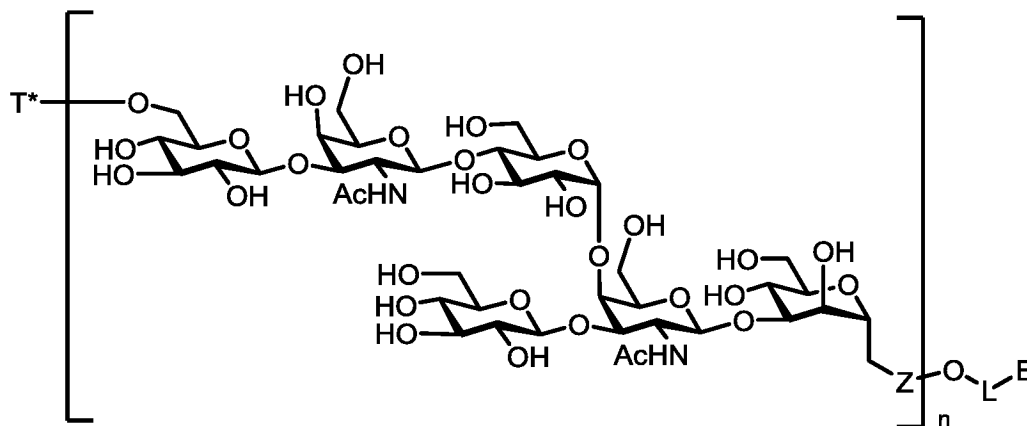
Особенно предпочтительным является сахарид формулы (I'b-4),  
где **Z** представляет собой



5

### Химический синтез

Другой аспект настоящего изобретения направлен на способ синтеза сахараида общей формулы (I)



(I)

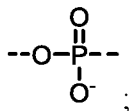
где

n представляет собой 1;

T\*— представляет собой H– или фосфатную группу;

Z

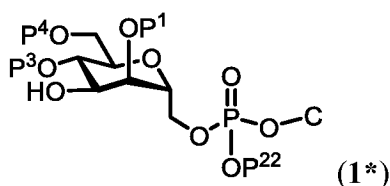
представляет собой



- 5 L представляет собой линкер; и  
 E представляет собой  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{N}_3$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{O}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ,  $-\text{Br}$ ,  $-\text{Cl}$ ,  $-\text{I}$ ,  $-\text{CO}_2\text{R}'$ ,  $-\text{CONH}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{OH}$  или  $-\text{SAc}$ ;  
 R' представляет собой  $-\text{H}$ ,  $-\text{Me}$ ,  $-\text{Et}$ , 4-нитрофенил, пентафторфенил, или N-сукцинимидил;

10 который включает следующие стадии:

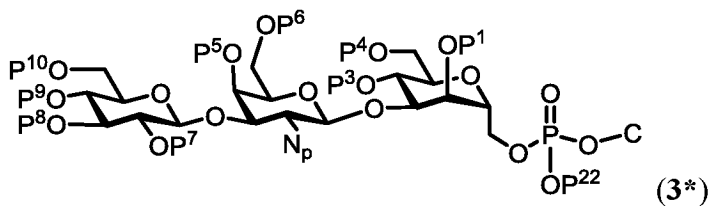
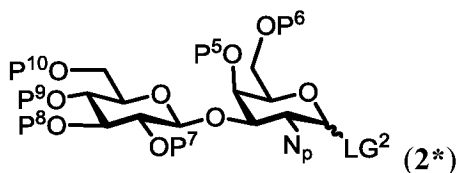
A1) обеспечение моносахарида формулы 1\*:



15 где P<sup>1</sup>, P<sup>3</sup>, P<sup>4</sup> и P<sup>22</sup> представляют собой защитные группы, C представляет собой –L–E<sub>p</sub>, где E<sub>p</sub> представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу; и

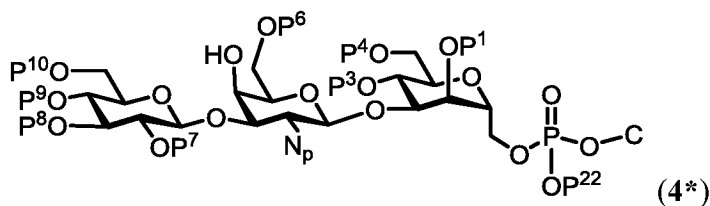
A2) введение в реакцию моносахарида формулы 1\* с соединением формулы 2\* с получением соединения 3\*:

20



где  $P^1, P^3, P^4 - P^{10}$  и  $P^{22}$  представляют собой защитные группы, С представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу E,  $LG^2$  представляет собой уходящую группу, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

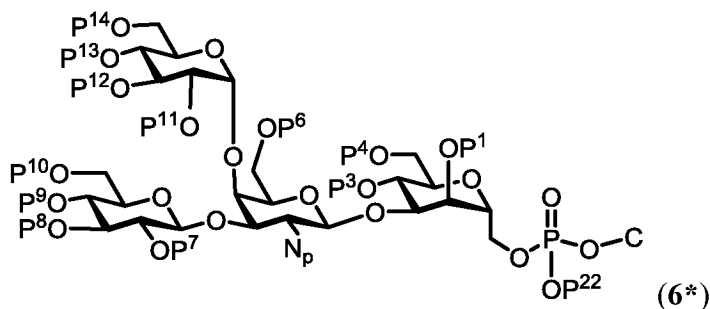
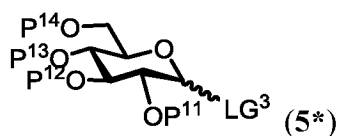
- 5        **A3)**        осуществление удаления защитной группы  $P^5$  соединения **3\*** с получением соединения **4\***



- 10        где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{10}$  и  $P^{22}$  представляют собой защитные группы, С представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу E, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

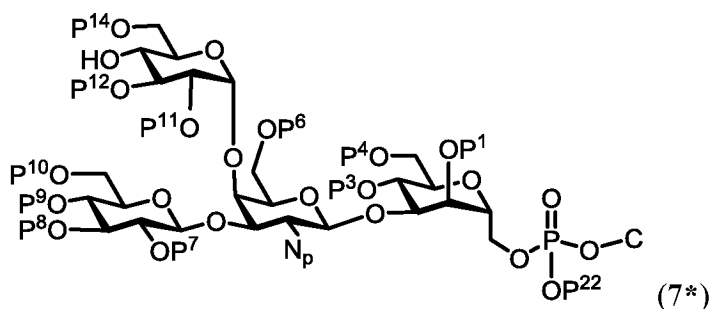
**A4)**        введение в реакцию соединения **4\*** с моносахаридом **5\*** с получением соединения **6\***

15



- 20        где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{14}$  и  $P^{22}$  представляют собой защитные группы, С представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу E,  $LG^3$  представляет собой уходящую группу, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

**A5)** осуществление удаления защитной группы  $P^{13}$  соединения  $6^*$  с получением соединения  $7^*$

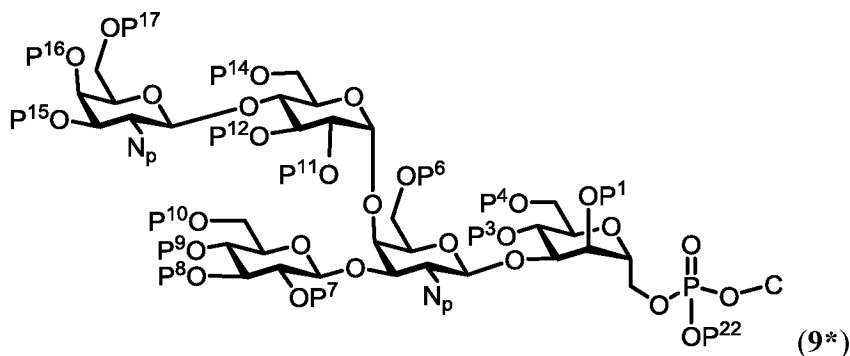
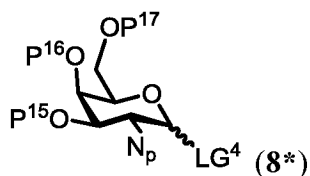


5

где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}$  и  $P^{22}$  представляют собой защитные группы,  $C$  представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу  $E$ , и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

**A6)** введение в реакцию соединения  $7^*$  с моносахаридом  $8^*$  с получением соединения  $9^*$

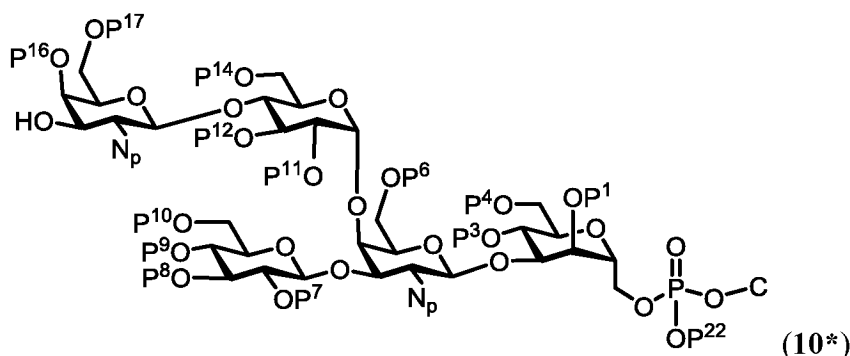
10



15

где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14} - P^{17}$  и  $P^{22}$  представляют собой защитные группы,  $C$  представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу  $E$ ,  $LG^4$  представляет собой уходящую группу, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

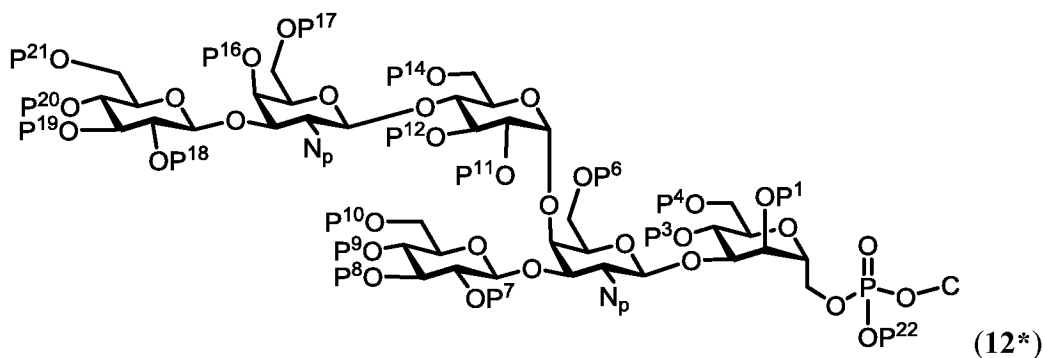
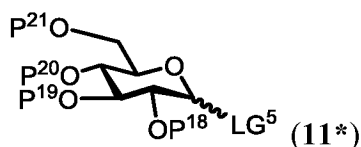
**A7)** осуществление удаления защитной группы  $P^{15}$  соединения  $9^*$  с получением соединения  $10^*$



5 где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}, P^{16}, P^{17}$  и  $P^{22}$  представляют собой защитные группы,  $C$  представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу  $E$ , и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

**A8)** введение в реакцию соединения  $10^*$  с моносахаридом  $11^*$  с получением соединения  $12^*$

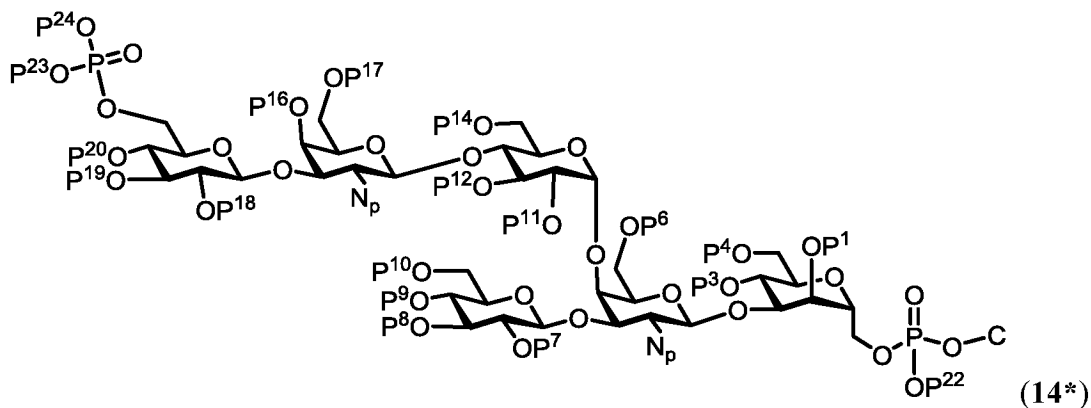
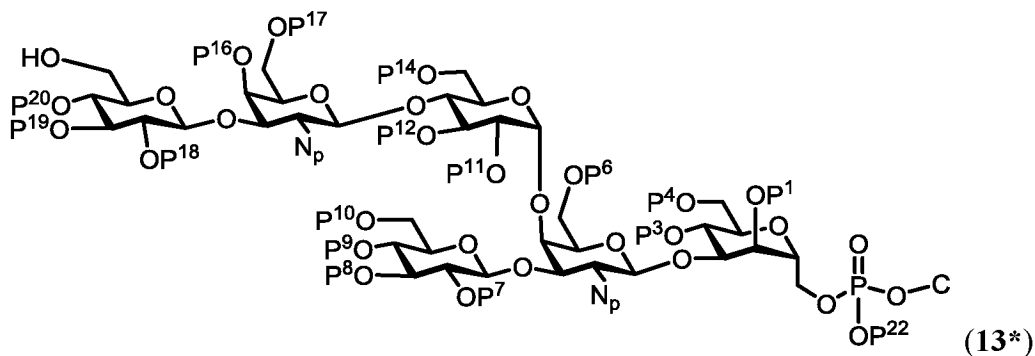
10



15 где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}$  и  $P^{16} - P^{22}$  представляют собой защитные группы,  $C$  представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу  $E$ ,  $LG^5$  представляет собой уходящую группу, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

**A9)** необязательно осуществление удаления защитной группы  $P^{21}$  соединения **12\*** с получением соединения **13\*** и введение в реакцию соединения **13\*** с фосфорилирующим агентом с получением соединения **14\***

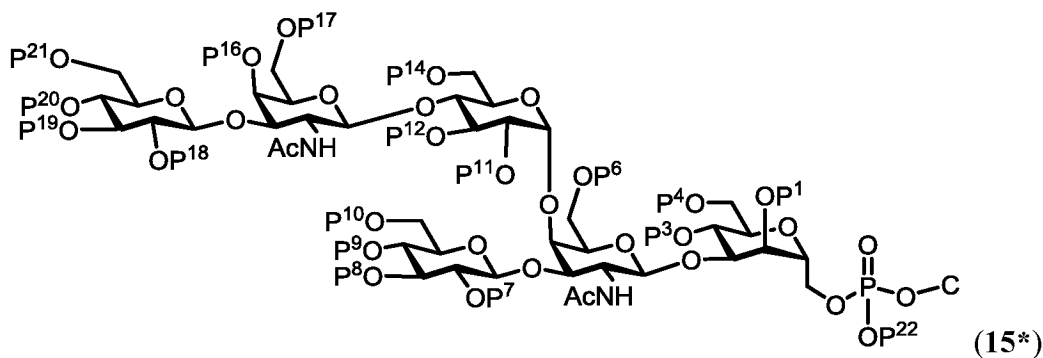
5

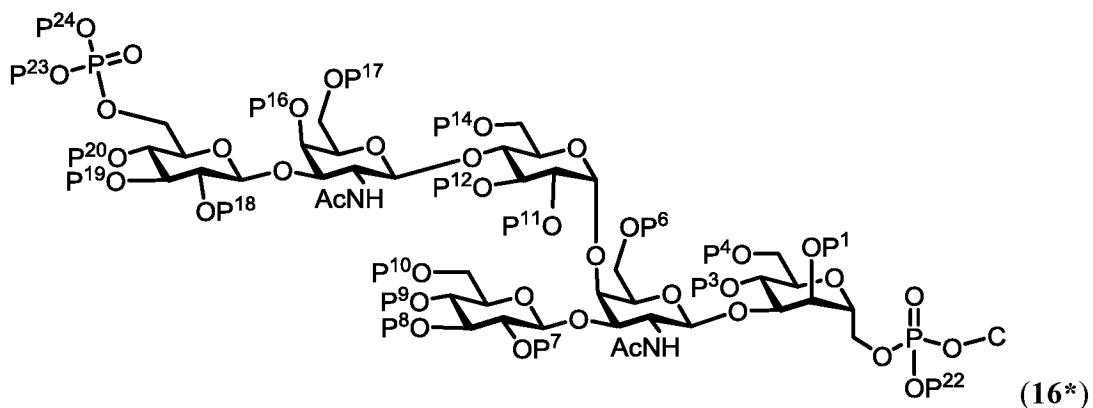


где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}, P^{16} - P^{20}$  и  $P^{22} - P^{24}$  представляют собой защитные группы, С представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу Е, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

**A10)** превращение защищенных аминогрупп соединения **12\*** или **14\*** в соответствующие ацетиамидо группы с получением соединения **15\*** или **16\***

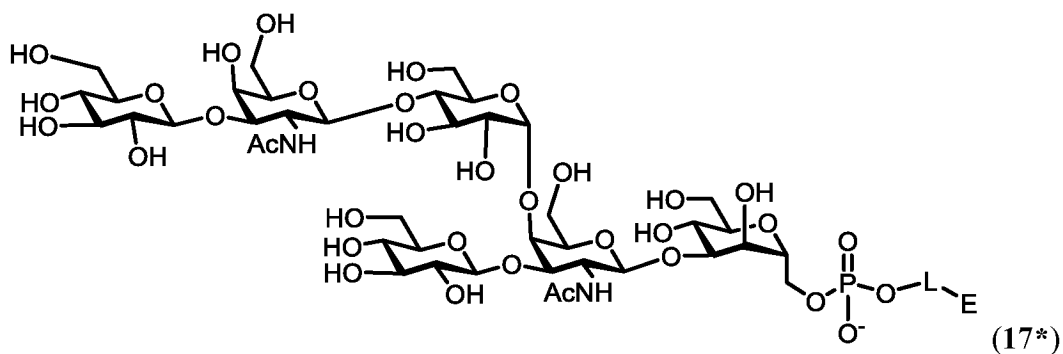
15



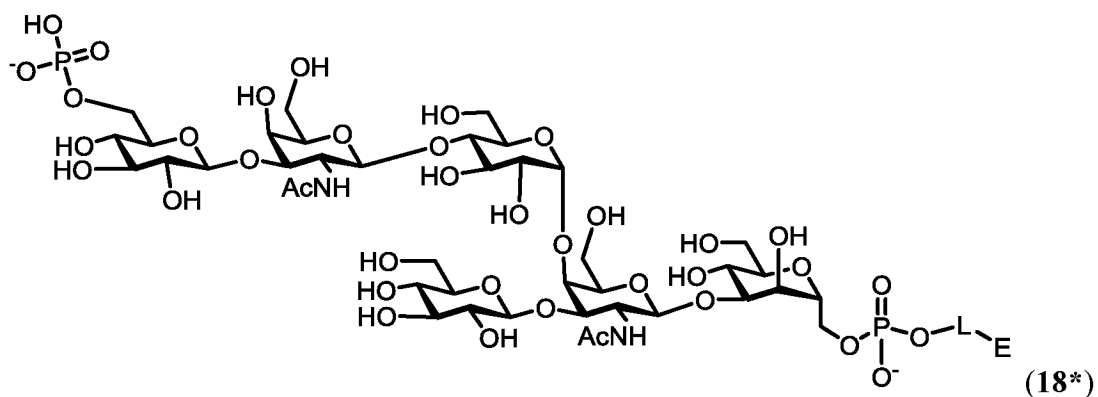


5 где P<sup>1</sup>, P<sup>3</sup>, P<sup>4</sup>, P<sup>6</sup> – P<sup>12</sup>, P<sup>14</sup> и P<sup>16</sup> – P<sup>24</sup> представляют собой защитные группы, и C представляет собой –L–E<sub>p</sub>, где E<sub>p</sub> представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу; и

**A11)** осуществление удаления всех оставшихся защитных групп из соединения **15\*** или **16\*** с получением соединения **17\*** или **18\*** общей формулы (I)



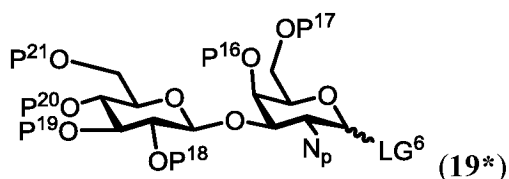
10



15

Другой аспект настоящего изобретения направлен на синтез сахара **17\*** или **18\*** общей формулы (I), где гексасакхаридное промежуточное соединение **12\*** получают непосредственно из соединения **7\*** путем осуществления стадии **A6'**.

**A6')** Введение в реакцию соединения **7\*** с дисахаридом **19\*** с получением соединения **12\***



5

где P<sup>16</sup> – P<sup>20</sup> и P<sup>21</sup> представляют собой защитные группы, LG<sup>6</sup> представляет собой уходящую группу, и N<sub>p</sub> представляет собой защищенную аминогруппу.

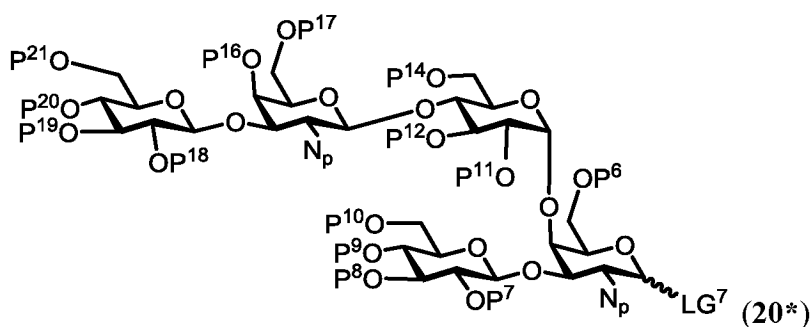
Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения способ синтеза сахара **17\*** или **18\*** общей формулы (I) включает стадии A1), A2), A3), A4), A5), A6'), A9), A10) и A11).

10

Другой аспект настоящего изобретения направлен на синтез сахара **17\*** или **18\*** общей формулы (I), где гексасахаридное промежуточное соединение **12\*** получают непосредственно из соединения **1\*** путем осуществления стадии **A2'**.

**A2')** Введение в реакцию соединения **1** с пентасахаридом **20\*** с получением соединения **12\***

15



где P<sup>6</sup> – P<sup>12</sup>, P<sup>14</sup> и P<sup>16</sup> – P<sup>21</sup> представляют собой защитные группы, LG<sup>7</sup> представляет собой уходящую группу, и N<sub>p</sub> представляет собой защищенную аминогруппу. Пентасахарид **20\*** можно получить путем введения в реакцию соединения **2\*** впоследствии с соединением **5\***, чем с соединением **8\***, и затем с соединением **11\*** или путем введения в реакцию соединения **2\*** с соединением **5\***, и затем с соединением **19\***.

20

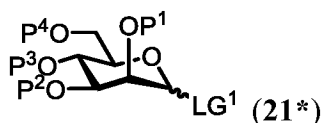
Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения способ синтеза сахара **17\*** или **18\*** общей формулы (I) включает стадии A1), A2'), A9), A10) и A11).

25



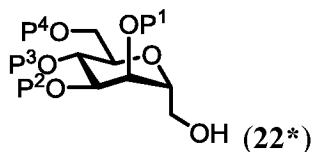
Соединение **1\*** можно получить из соответствующего защищенного донора маннозы **21\*** путем осуществления стадий A1a), A1b) и A1c).

**A1a)** Обеспечение соединения **21\***



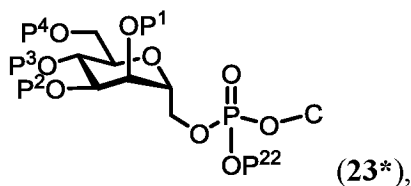
5 где  $P^1 - P^4$  представляют собой защитные группы, и  $LG^1$  представляет собой уходящую группу; и

превращение соединения формулы **21\*** в спирт формулы **22\***



где  $P^1 - P^4$  представляют собой защитные группы; и

10 **A1b)** введение в реакцию соединения формулы **22\*** со спиртом  $HO-L-C$  в присутствии фосфорилирующего агента с получением соединения **23\***;



15 где  $P^1 - P^4$  и  $P^{22}$  представляют собой защитные группы, и  $C$  представляет собой  $-L-$

Е<sub>p</sub>, где Е<sub>p</sub> представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу Е; и

Спирт **22\*** в стадии A1a) можно получить в соответствии с Brooks et al.

(Tetrahedron 1995, 51, 7999) путем введения в реакцию соединения **21\*** с

аллилтриметилсилан в присутствии кислоты Льюиса (J. Am. Chem Soc. 1982, 104, 4976;

Tetrahedron Letters, 1985, 26, 1479), последующей изомеризации хлоридом

20 бис(бензонитрил)палладия (II) в толуол при нагревании с обратным холодильником до

пропенил С-маннозида, озонолиза или окисления Лемье-Джонсона с помощью

периодата натрия и тетроксид осмия, и восстановления до спирта **22\*** с помощью

ацетоксиборогидрида натрия (см. также Org. Biomol. Chem 2016, 14, 3913).

В качестве альтернативы, спирт **22\*** в стадии A1a) можно получить путем

25 введения в реакцию соединения **21\*** с  $(iPrO)Me_2SiCH_2MgCl$  в присутствии иодида

меди(I) (Org. Lett. 2004, 6, 119). Дополнительно, спирт **22\*** в стадии A1a) можно

получить путем введения в реакцию соединения **21\*** с виниловым реактивом Гриньяра,

который затем окисляют тетроксидом осмия и периодатом натрия и восстанавливают до спирта **22\*** реагентом борогидридом натрия, таким как ацетоксиборогидрид натрия.

В другом варианте осуществления изобретения, спирт **22\*** получают из соответствующего гликозида путем введения в реакцию с йодидом  
 5 триметилсульфония и гидридом натрия (J. Org. Chem. 2002, 67, 7439) или путем введения в реакцию с пропаргилтриметилсиланом и  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  с последующим озонолизом и восстановлением борогидрида натрия (Synlett 2005, 7, 1147).

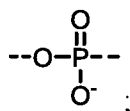
**A1c)** Осуществление удаления защитной группы  $\text{P}^2$  соединения **23\*** с получением соединения **1\***

10 Другой аспект настоящего изобретения направлен на способ синтеза сахара общей формулы (I), где

$n$  представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

$\text{T}^*$ — представляет собой  $\text{H}$ - или фосфатную группу;

$\text{Z}$  представляет собой



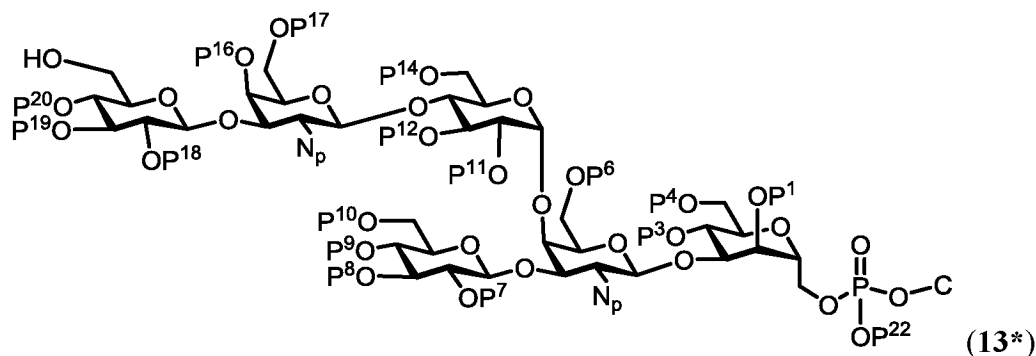
$\text{L}$  представляет собой линкер; и

15  $\text{E}$  представляет собой  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{N}_3$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{O}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ,  $-\text{Br}$ ,  $-\text{Cl}$ ,  $-\text{I}$ ,  $-\text{CO}_2\text{R}'$ ,  $-\text{CONH}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{OH}$  или  $-\text{SAc}$ ;

$\text{R}'$  представляет собой  $-\text{H}$ ,  $-\text{Me}$ ,  $-\text{Et}$ , 4-нитрофенил, пентафторфенил, или *N*-сукцинимидил;

который включает следующие стадии:

20 **B1)** обеспечение соединения **13\***



где  $\text{P}^1$ ,  $\text{P}^3$ ,  $\text{P}^4$ ,  $\text{P}^6 - \text{P}^{12}$ ,  $\text{P}^{14}$ ,  $\text{P}^{16} - \text{P}^{20}$  и  $\text{P}^{22}$  представляют собой защитные группы,  $\text{C}$   
 25 представляет собой  $-\text{L}-\text{E}_p$ , где  $\text{E}_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу  $\text{E}$ , и  $\text{N}_p$  представляет собой защищенную аминогруппу;

и повторение следующих стадий  $n - 1$  раз:

**V1.1)** введение в реакцию с соединением формулы **22\*** в присутствии фосфорилирующего агента,

**V1.2)** осуществление удаления защитной группы  $P^2$ ;

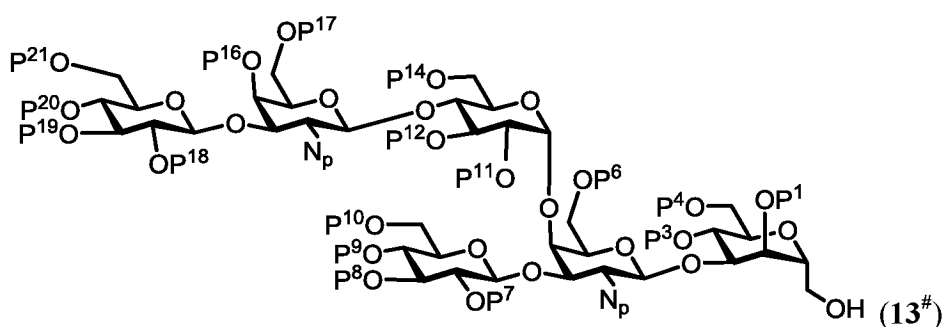
5 **V1.3)** осуществление стадий A2) – A8) или стадий A2) – A5) и A6') или стадии A2');

**V1.4)** осуществление удаления защитной группы  $P^{21}$ ;

или

**V2.1)** введение в реакцию соединения **13\*** с соединением формулы

10

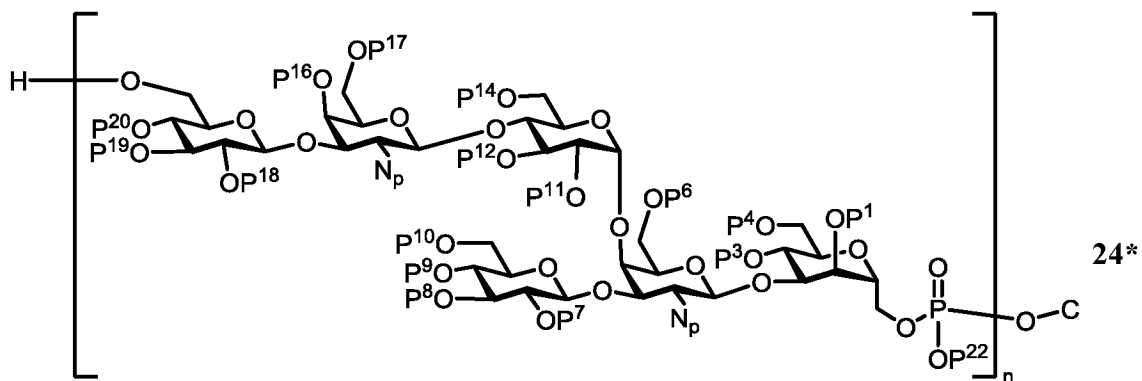


в присутствии фосфорилирующего агента,

**V2.2)** осуществление удаления защитной группы  $P^{21}$ ;

15 **V2.3)** необязательно повторение стадий **V2.1** и **V2.2** от одного до восьми раз для того, чтобы синтезировать соответствующие трисахариды ( $n=3$ ) до декасахаридов ( $n=10$ );

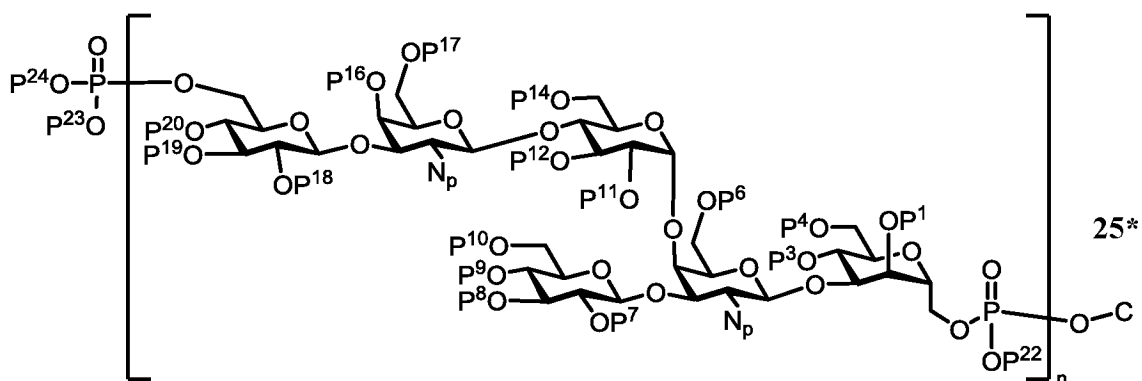
с получением соединения **24\***:



20

где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{14}, P^{16} - P^{20}$  и  $P^{22}$  представляют собой защитные группы, С представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу Е,  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу, и  $n$  представляет собой целое число от 2 до 10; и

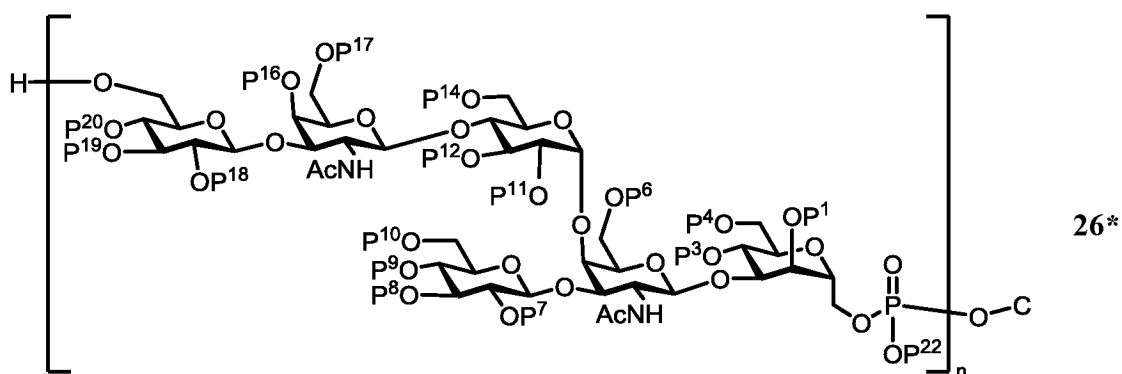
- 5 **В2)** Необязательно введение в реакцию соединения **24\*** с фосфорилирующим агентом с получением соединения **25\***

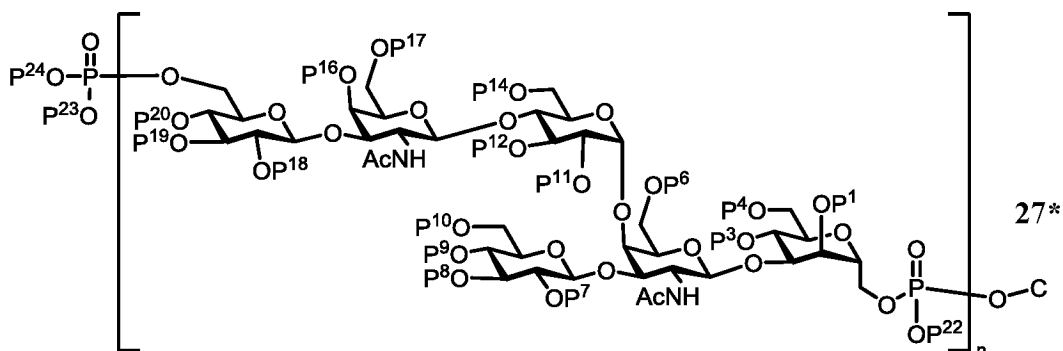


где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}, P^{16} - P^{20}$  и  $P^{22} - P^{24}$  представляют собой защитные группы, С представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу Е,  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу, и  $n$  представляет собой целое число от 2 до 10; и

10

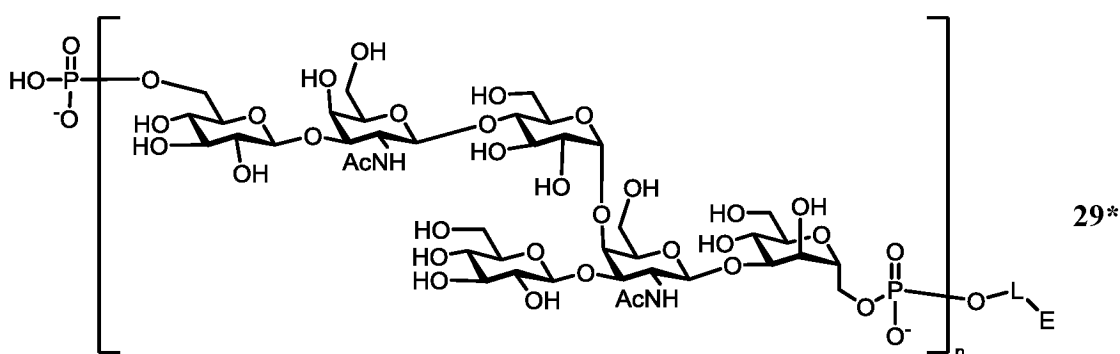
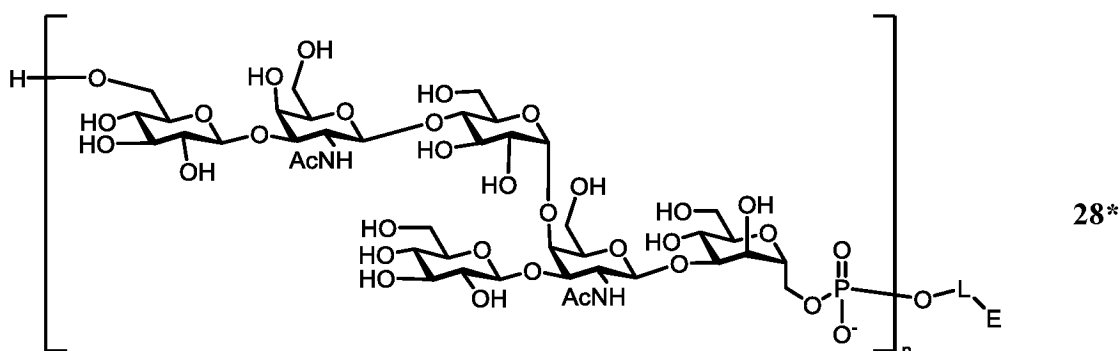
- В3)** превращение защищенных аминогрупп соединения **24\*** или **25\*** в соответствующие ацетиамидо группы с получением соединения **26\*** или **27\***





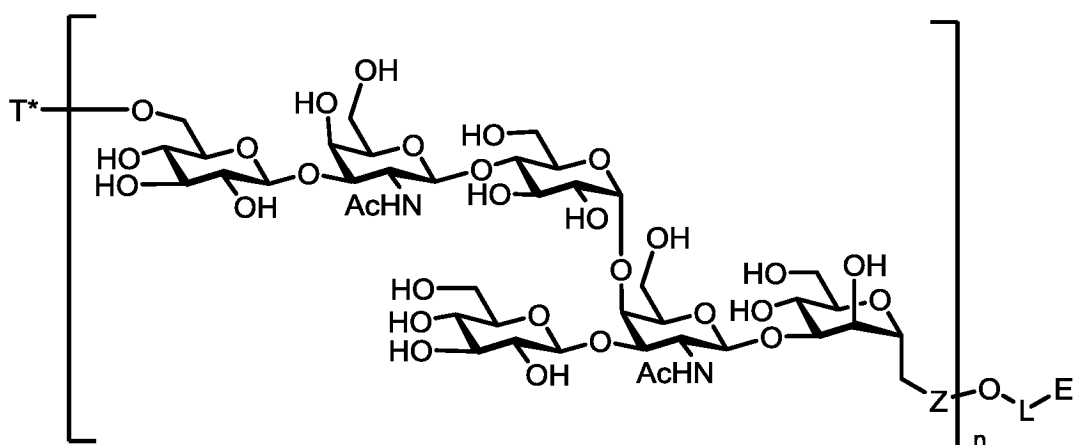
где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}, P^{16} - P^{20}$  и  $P^{22} - P^{24}$  представляют собой защитные группы, С представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу Е, и n представляет собой целое число от 2 до 10; и

- 5 **В4)** осуществление удаления всех оставшихся защитных групп из соединения **26\*** или **27\*** с получением соединения **28\*** или **29\*** общей формулы (I)



- 10 где n представляет собой целое число от 2 до 10, и L и E имеют значения, указанные в данном документе.

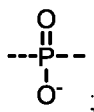
Другой аспект настоящего изобретения направлен на способ синтеза сахара общей формулы (I)



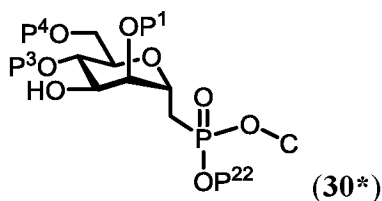
(I)

5

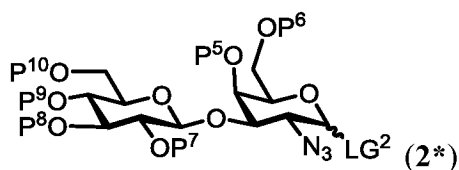
где

 $n$  представляет собой 1; $T^*$ – представляет собой  $H^-$  или фосфатную группу; $Z$  представляет собой $L$  представляет собой линкер; и10  $E$  представляет собой  $-NH_2$ ,  $-N_3$ ,  $-CN$ ,  $-O-NH_2$ ,  $-CH=CH_2$ ,  $-C\equiv CH$ ,  $-Br$ ,  $-Cl$ ,  $-I$ ,  $-CO_2R'$ ,  $-CONH-NH_2$ ,  $-SH$ ,  $-OH$  или  $-SAc$ ; $R'$  представляет собой  $-H$ ,  $-Me$ ,  $-Et$ , 4-нитрофенил, пентафторфенил, или *N*-сукцинимидил;

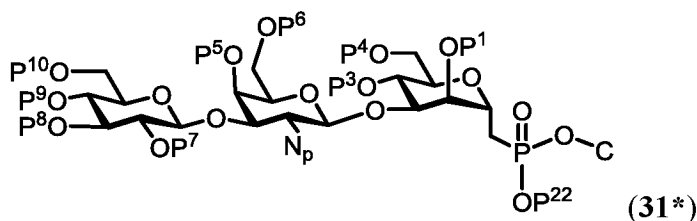
который включает следующие стадии:

15 **C1)** обеспечение моносахарида формулы **30\***, который можно получить в соответствии с методикой, раскрытой в Chem. Eur. J. 2015, 21, 7511-7519 или Synlett, 2005, 7, 1147-1151:20 где  $P^1$ ,  $P^3$ ,  $P^4$  и  $P^{22}$  представляют собой защитные группы,  $C$  представляет собой  $-L-$   
 $E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу; и

**C2)** введение в реакцию моносахарида формулы **30\*** с соединением формулы **2\*** с получением соединения **31\***:



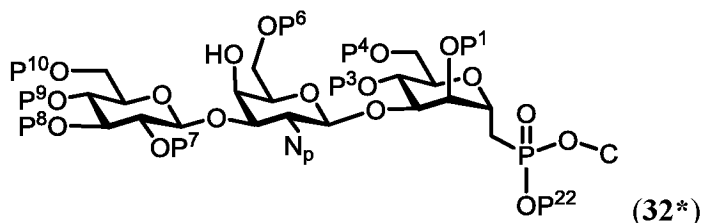
5



10

где  $P^1, P^3, P^4 - P^{10}$  и  $P^{22}$  представляют собой защитные группы, С представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу E,  $LG^2$  представляет собой уходящую группу, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

**C3)** осуществление удаления защитной группы  $P^5$  соединения **31\*** с получением соединения **32\***

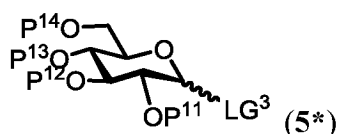


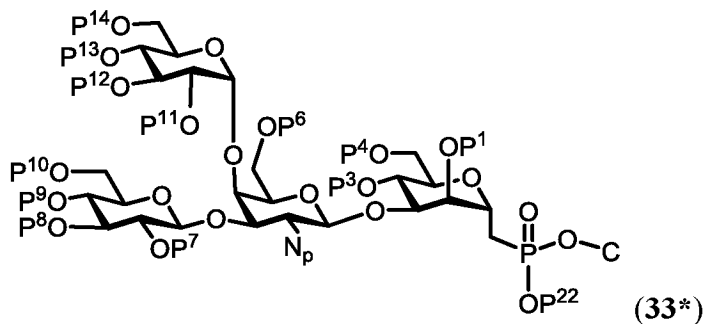
15

где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{10}$  и  $P^{22}$  представляют собой защитные группы, С представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу E, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

20

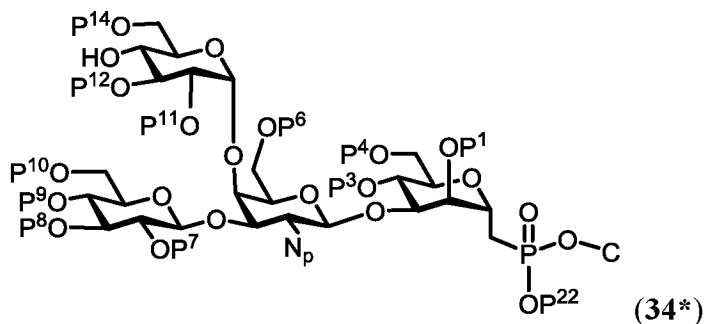
**C4)** введение в реакцию соединения **32\*** с моносахаридом **5\*** с получением соединения **33\***





5 где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{14}$  и  $P^{22}$  представляют собой защитные группы,  $C$  представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу  $E$ ,  $LG^3$  представляет собой уходящую группу, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

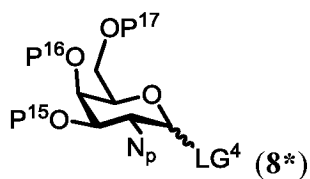
**C5)** осуществление удаления защитной группы  $P^{13}$  соединения **33\*** с получением соединения **7\***



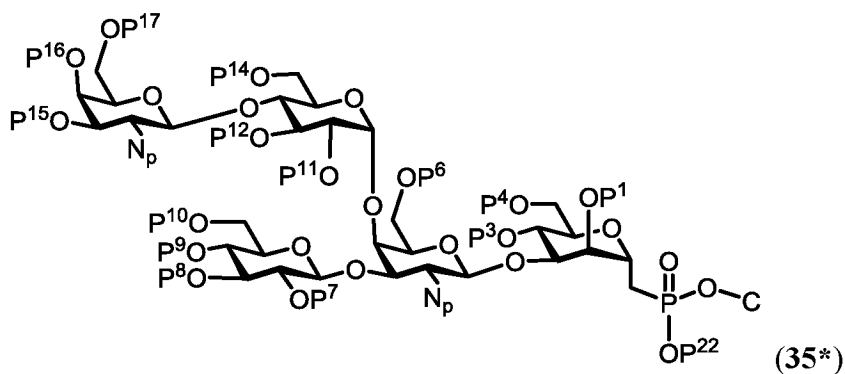
10

где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}$  и  $P^{22}$  представляют собой защитные группы,  $C$  представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу  $E$ , и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

15 **C6)** введение в реакцию соединения **34\*** с моносахаридом **8\*** с получением соединения **35\***

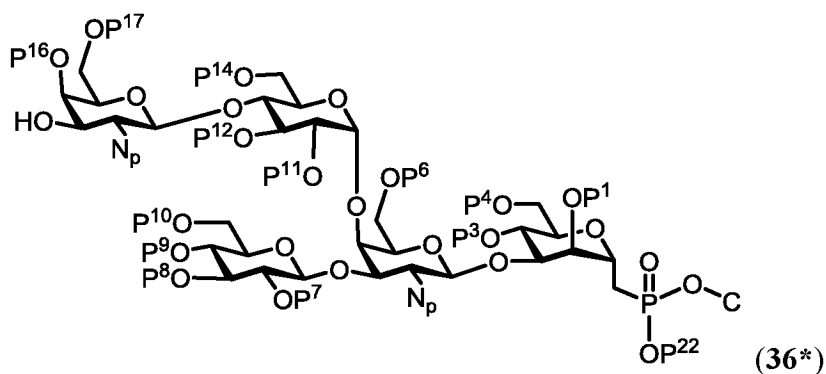






5 где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14} - P^{17}$  и  $P^{22}$  представляют собой защитные группы,  $C$  представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу  $E$ ,  $LG^4$  представляет собой уходящую группу, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

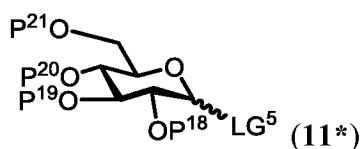
**C7)** осуществление удаления защитной группы  $P^{15}$  соединения **35\*** с получением соединения **36\***

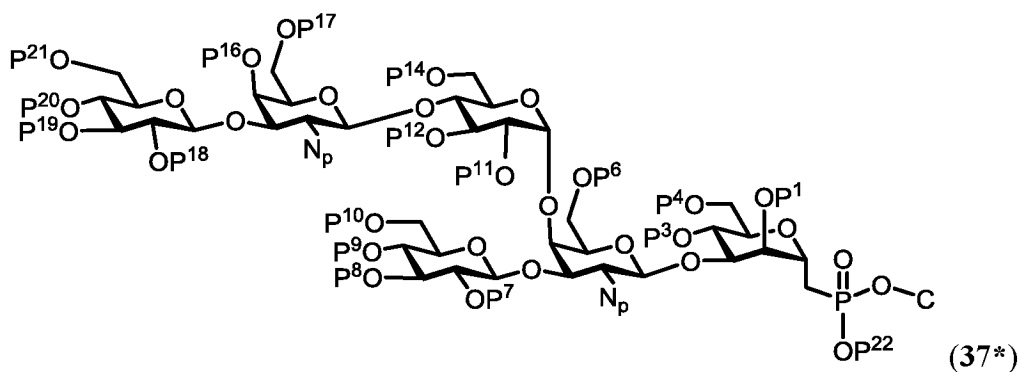


10

где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}, P^{16}, P^{17}$  и  $P^{22}$  представляют собой защитные группы,  $C$  представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу  $E$ , и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

15 **C8)** Введение в реакцию соединения **36\*** с моносахаридом **11\*** с получением соединения **37\***

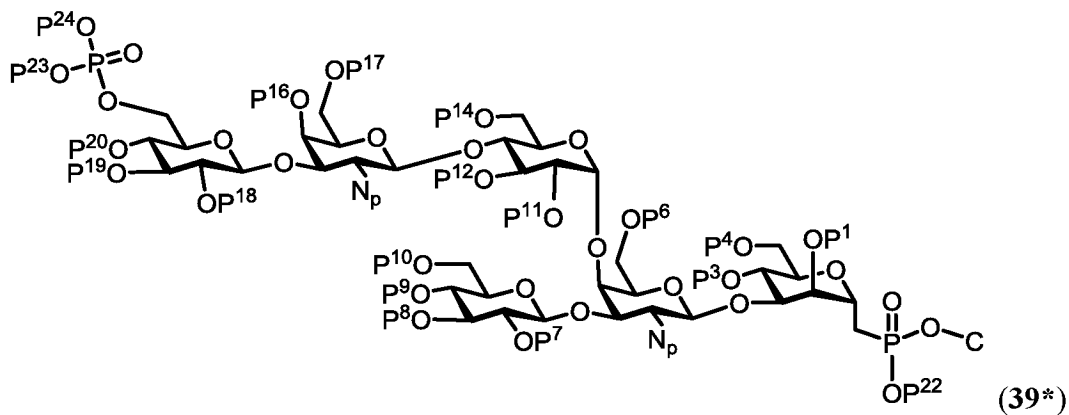
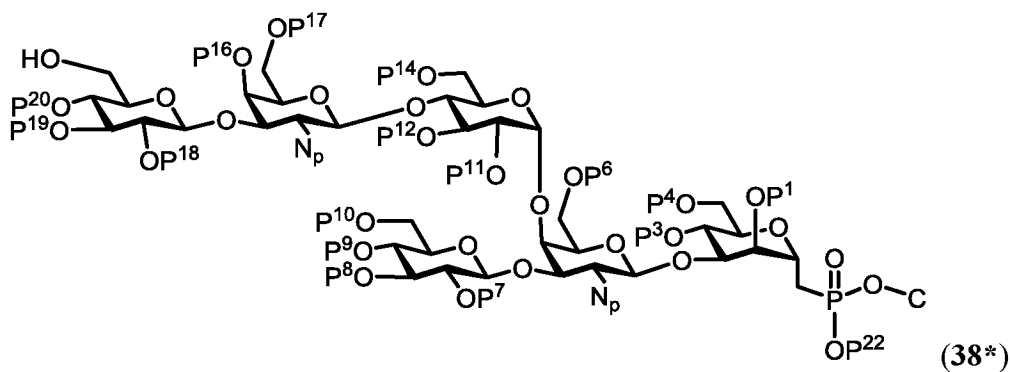




где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}$  и  $P^{16} - P^{22}$  представляют собой защитные группы, С представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу E,  $LG^5$  представляет собой уходящую группу, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

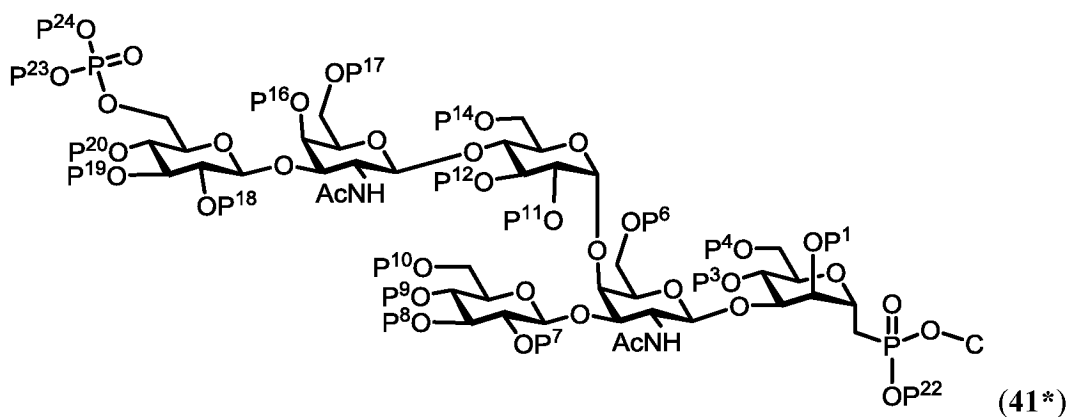
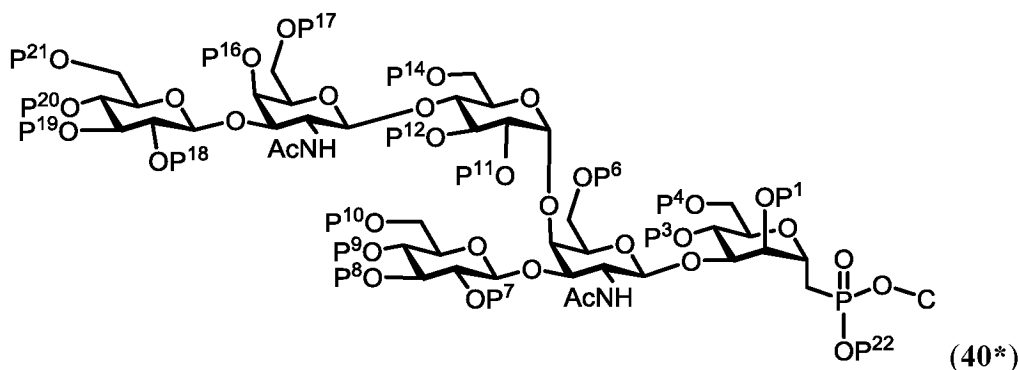
**С9)** необязательно осуществление удаления защитной группы  $P^{21}$  соединения **37\*** с получением соединения **38\*** и введение в реакцию соединения **38\*** с фосфорилирующим агентом с получением соединения **39\***

10



15 где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}, P^{16} - P^{20}$  и  $P^{22} - P^{24}$  представляют собой защитные группы, С представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу E, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

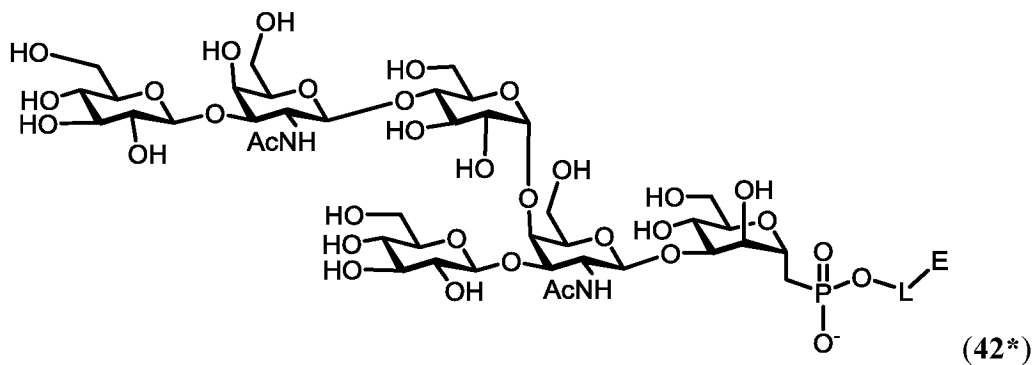
**C10)** Превращение защищенных аминогрупп соединения **37\*** или **39\*** в соответствующие ацетидамо группы с получением соединения **40\*** или **41\***

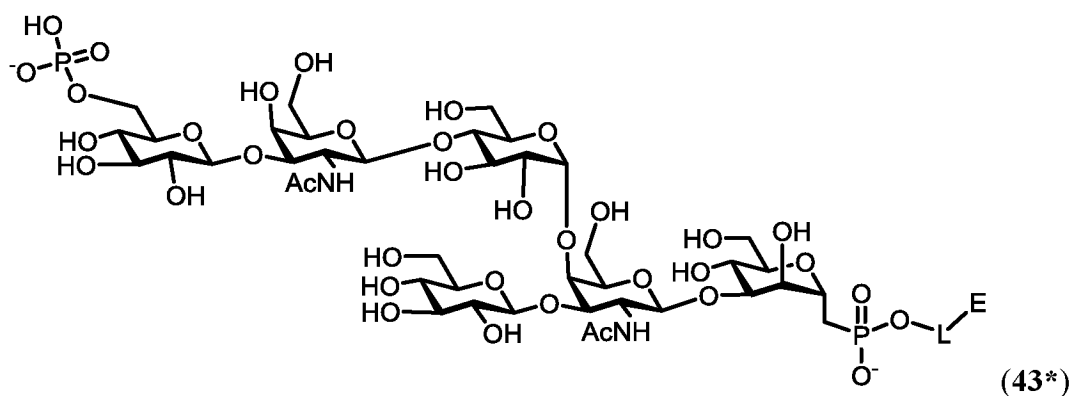


5

где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}$  и  $P^{16} - P^{24}$  представляют собой защитные группы и  $S$  представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу; и

10 **C11)** осуществление удаления всех оставшихся защитных групп из соединения **40\*** или **41\*** с получением соединения **42\*** или **43\*** общей формулы (I)



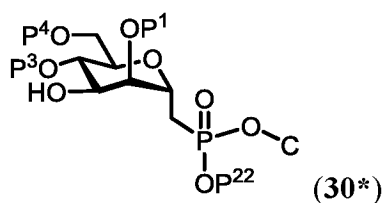


Другой аспект настоящего изобретения направлен на синтез сахараида **42\*** или **43\*** общей формулы (I), где гексасахаридное промежуточное соединение **37\*** получают непосредственно из соединения **34\*** путем осуществления стадии **A6'**). Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения способ синтеза сахараида **42\*** или **43\*** общей формулы (I) включает стадии C1), C2), C3), C4), C5), **A6'**), C9), C10) и C11).

Другой аспект настоящего изобретения направлен на синтез сахараида **42\*** или **43\*** общей формулы (I), где гексасахаридное промежуточное соединение **37\*** получают непосредственно из соединения **30\*** путем осуществления стадии **A2'**). Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения способ синтеза сахараида **42\*** или **43\*** общей формулы (I) включает стадии C1), **A2'**), C9), C10) и C11).

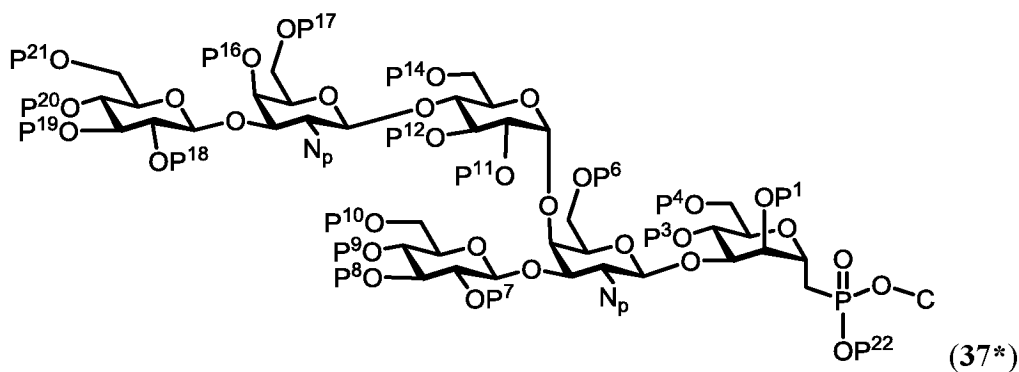
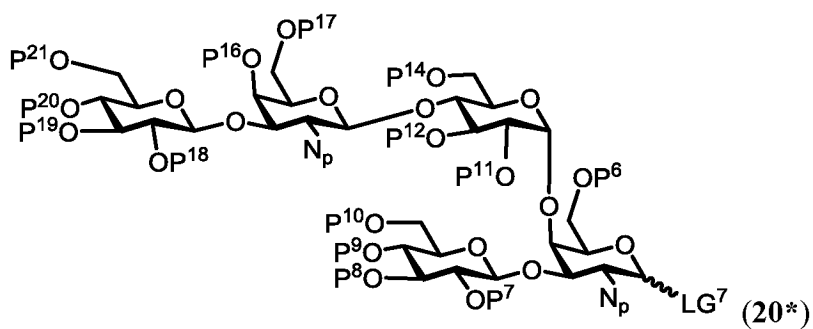
Таким образом, другой способ синтеза сахараида общей формулы (I) включает следующие стадии:

**C1)** обеспечение моносахарида формулы **30\***:



где  $P^1$ ,  $P^3$ ,  $P^4$  и  $P^{22}$  представляют собой защитные группы, С представляет собой –  $L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу; и

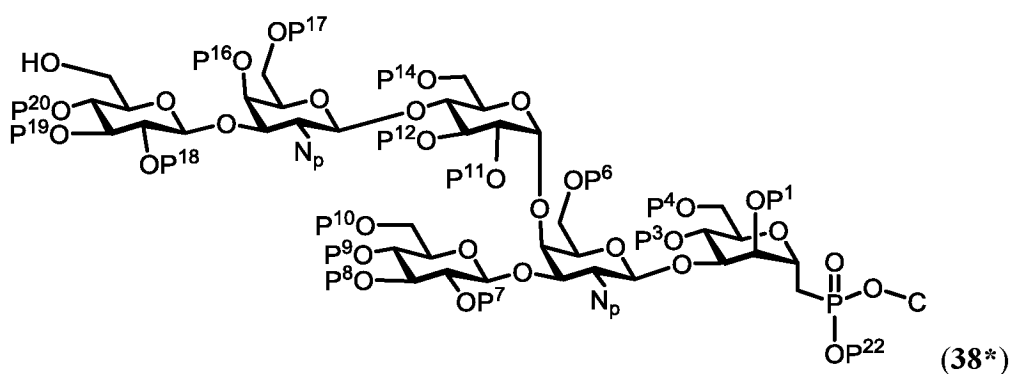
**C2')** введение в реакцию соединения **30\*** с пентасахаридом **20\*** с получением соединения **37\***

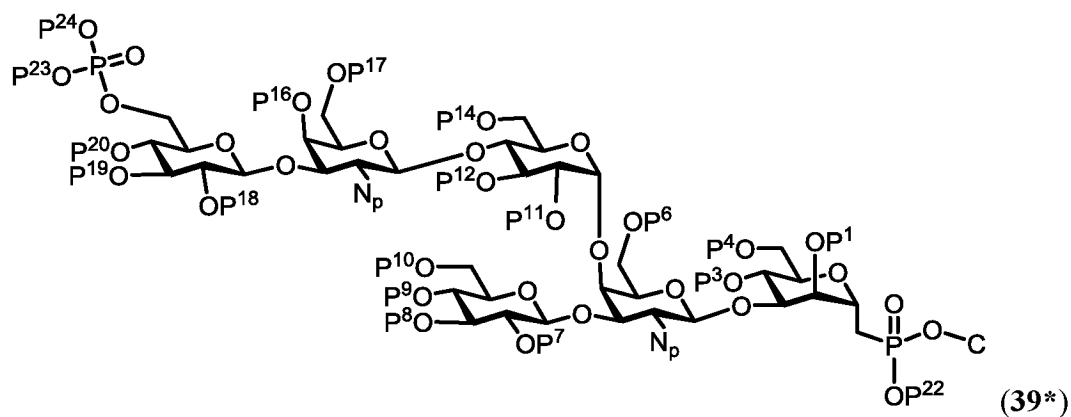


5 где P<sup>6</sup> – P<sup>12</sup>, P<sup>14</sup> и P<sup>16</sup> – P<sup>21</sup> представляют собой защитные группы, LG<sup>7</sup> представляет собой уходящую группу, и N<sub>p</sub> представляет собой защищенную аминогруппу.

С9) Необязательно осуществление удаления защитной группы P<sup>21</sup> соединения 37\* с получением соединения 38\* и введение в реакцию соединения 38\* с фосфорилирующим агентом с получением соединения 39\*

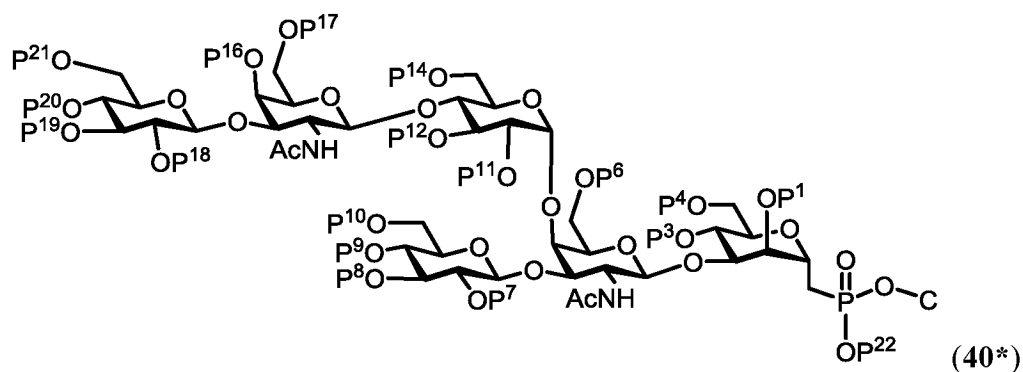
10



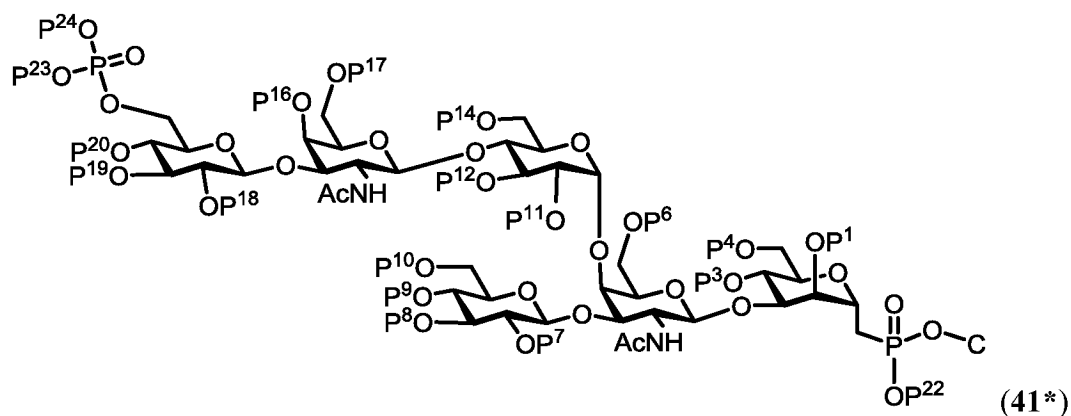


где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}, P^{16} - P^{20}$  и  $P^{22} - P^{24}$  представляют собой защитные группы, С представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу E, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

**С10)** превращение защищенных аминогрупп соединения **37\*** или **39\*** в соответствующие ацетидамо группы с получением соединения **40\*** или **41\***

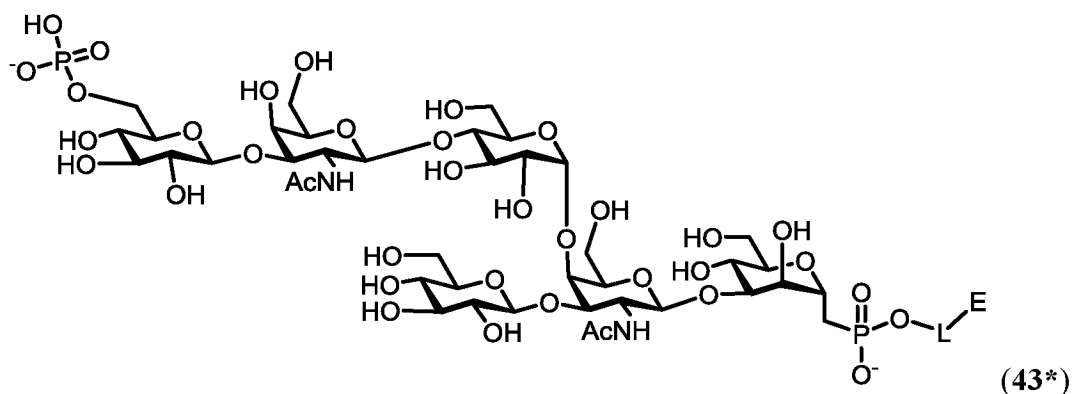
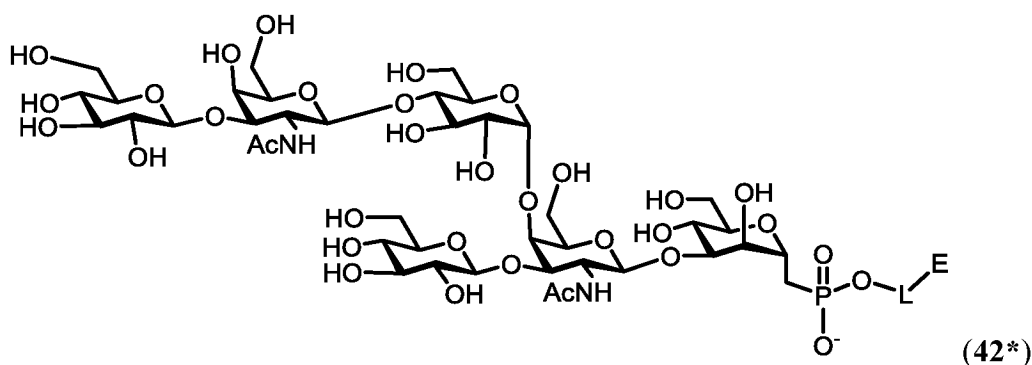


10



где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}$  и  $P^{16} - P^{24}$  представляют собой защитные группы и  $C$  представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу; и

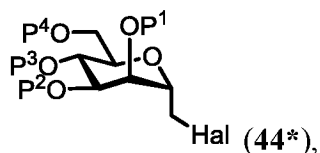
5 **C11)** осуществление удаления всех оставшихся защитных групп из соединения **40\*** или **41\*** с получением соединения **42\*** или **43\*** общей формулы (I)



10 где  $L$  и  $E$  имеют значения, указанные в данном документе.

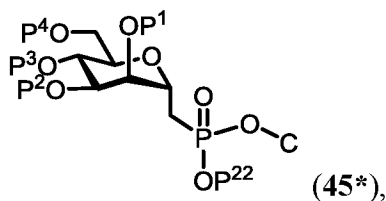
Соединение **30\*** можно получить из соответствующего защищенного донора маннозы **21\*** путем осуществления стадий A1a), C1b), C1c) и C1d).

**C1b)** Превращение соединения формулы **22\*** в соответствующий галогенид **44\***



15 где  $P^1 - P^4$  представляют собой защитные группы, и  $Hal$  выбран из  $-Br$  или  $-I$ ; и

**C1c)** введение в реакцию соединения формулы **44\*** со спиртом  $HO-L-C$  в присутствии фосфита с получением соединения **45\***;



где  $P^1 - P^4$  и  $P^{22}$  представляют собой защитные группы, и  $C$  представляет собой  $-L-$   $E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу  $E$ ; и

**C1d)** осуществление удаления защитной группы  $P^2$  соединения **45\*** с  
5 получением соединения **30\***.

Превращение спирта **22\*** в соответствующий галогенид **44\*** в стадии C1b) может  
быть достигнуто в соответствии со стандартными методиками, т.е. путем введения в  
реакцию спирта **22\*** с  $SVr_4$  или  $I_2$  в присутствии  $PPh_3$ , или в качестве альтернативы,  
путем превращение спирта **22\*** в метансульфонат или трифторметансульфонат и  
10 последующего замещения бромидом тетрабутиламмония или йодидом  
тетрабутиламмония.

Фосфит, используемый на стадии C1c), предпочтительно представляет собой  
триалкилфосфит, такой как триэтилфосфит, который вводят в реакцию с галогенидом **44\***  
до фосфоната, и впоследствии гидролизуют до фосфоновой кислоты с помощью  
15 кислоты Льюиса, такой как бромтриметилсилан, с последующей водой (Tetrahedron 1995,  
51, 7999). Фосфоновую кислоту вводят в реакцию со спиртом  $HO - L - C$  в присутствии  
трихлорацетонитрила с получением соединения **45\***.

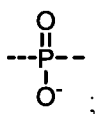
В качестве альтернативы, фосфит, используемый на стадии C1c) может  
представлять собой фосфорамидит, такой как диалкил или дибензил  $N,N$ -  
20 диэтилфосфорамидит, или бис(диизопропиламино)бензилоксифосфин, который вводят в  
реакцию с соединением **44\*** в реакции Арбузова и со спиртом  $HO-L-C$  при  
высвобождении диэтиламина.

Другой аспект настоящего изобретения направлен на способ синтеза сахара  
общей формулы (I), где

25  $n$  представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

$T^*$ — представляет собой  $H-$  или фосфатную группу;

$Z$  представляет собой



$L$  представляет собой линкер; и

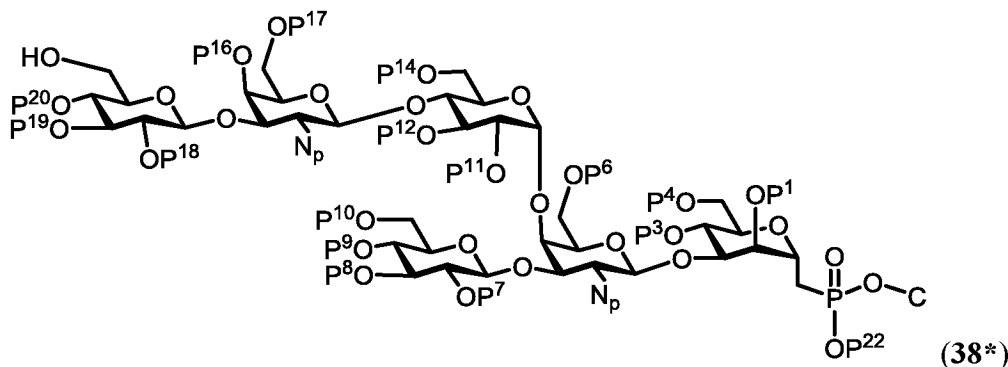


**E** представляет собой  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{N}_3$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{O}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ,  $-\text{Br}$ ,  $-\text{Cl}$ ,  $-\text{I}$ ,  $-\text{CO}_2\text{R}'$ ,  $-\text{CONH}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{OH}$  или  $-\text{SAc}$ ;

**R'** представляет собой  $-\text{H}$ ,  $-\text{Me}$ ,  $-\text{Et}$ , 4-нитрофенил, пентафторфенил, или *N*-сукцинимидил;

5 который включает следующие стадии:

**D1)** обеспечение соединения **38\***



10 где  $\text{P}^1$ ,  $\text{P}^3$ ,  $\text{P}^4$ ,  $\text{P}^6 - \text{P}^{14}$ ,  $\text{P}^{16} - \text{P}^{20}$  и  $\text{P}^{22}$  представляют собой защитные группы, **C** представляет собой  $-\text{L}-\text{E}_p$ , где  $\text{E}_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу **E**, и  $\text{N}_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и повторение следующих стадий  $n - 1$  раз:

**D1.1)** введение в реакцию с соединением формулы **44\*** в присутствии фосфита,

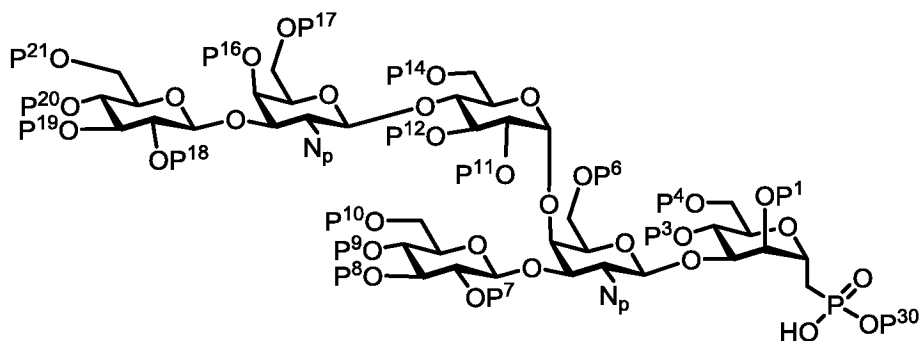
15 **D1.2)** осуществление удаления защитной группы  $\text{P}^2$ ;

**D1.3)** осуществление стадий **C2) – C8)** или стадий **C2) – C5)** и **A6')** или стадии **A2')**;

**D1.4)** осуществление удаления защитной группы  $\text{P}^{21}$ ;

или

20 **D2.1)** введение в реакцию соединения **38\*** с соединением формулы

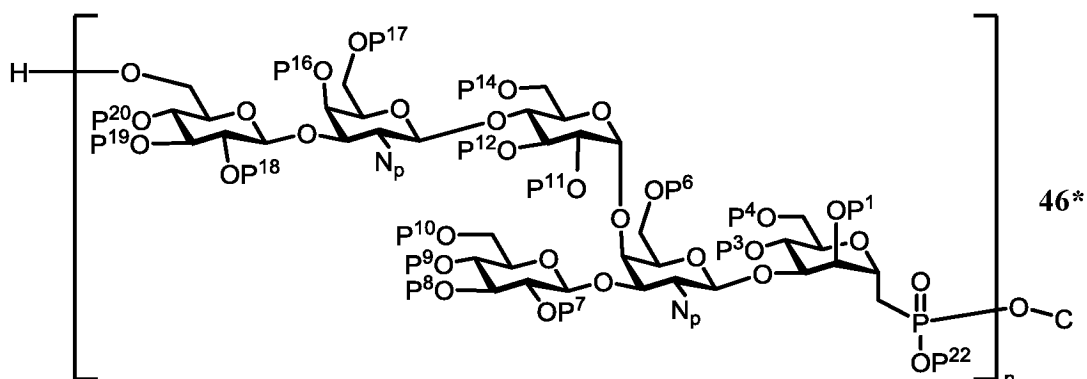


в присутствии сопрягающего агента,

**D2.2)** осуществление удаления защитной группы P<sup>21</sup>;

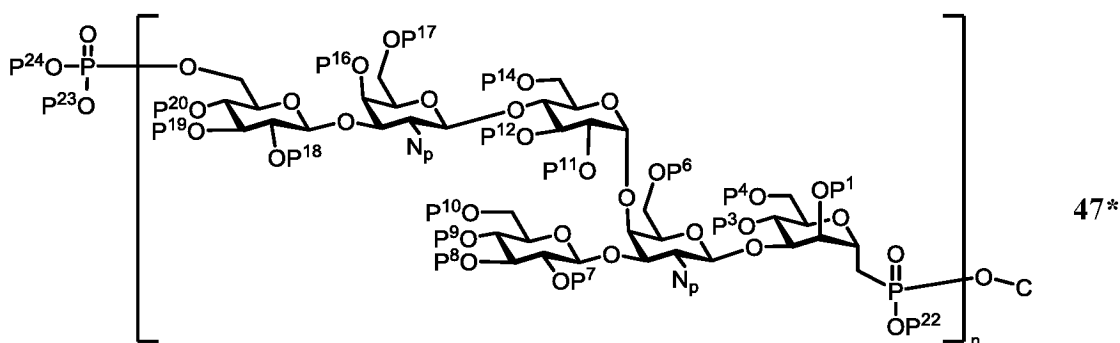
**D2.3)** необязательно повторение стадий **D2.1** и **D2.2** от одного до восьми раз для того, чтобы синтезировать соответствующие трисахариды (n=3) до декасахаридов (n=10);

5 с получением соединения **46\***:



где P<sup>1</sup>, P<sup>3</sup>, P<sup>4</sup>, P<sup>6</sup> – P<sup>14</sup>, P<sup>16</sup> – P<sup>20</sup> и P<sup>22</sup> представляют собой защитные группы, С представляет собой –L–E<sub>p</sub>, где E<sub>p</sub> представляет собой твёрдую подложку или  
10 защищенную концевую группу E, N<sub>p</sub> представляет собой защищенную аминогруппу и n представляет собой целое число от 2 до 10; и

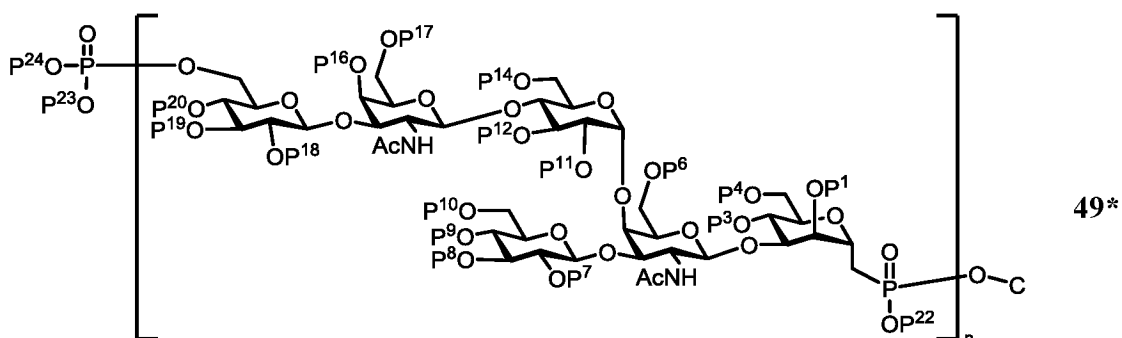
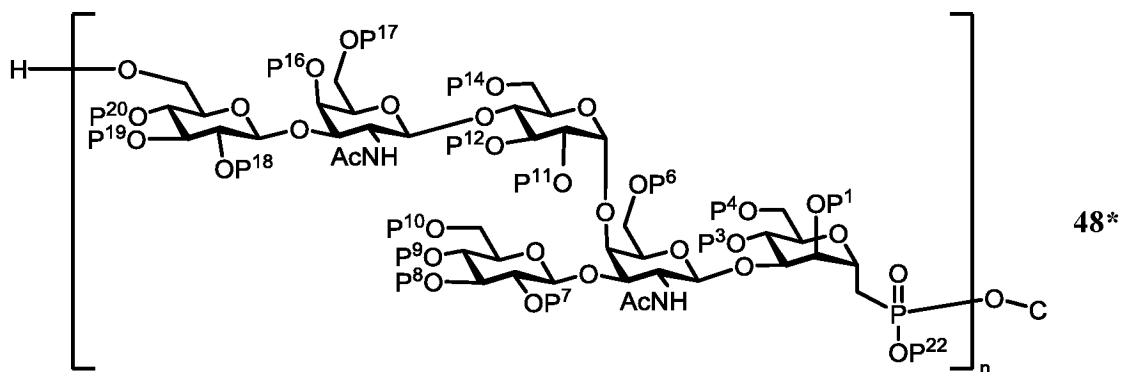
**D2)** необязательно введение в реакцию соединения **46\*** с фосфорилирующим агентом с получением соединения **47\***



15 где P<sup>1</sup>, P<sup>3</sup>, P<sup>4</sup>, P<sup>6</sup> – P<sup>14</sup>, P<sup>16</sup> – P<sup>20</sup> и P<sup>22</sup> – P<sup>24</sup> представляют собой защитные группы, С представляет собой –L–E<sub>p</sub>, где E<sub>p</sub> представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу E, N<sub>p</sub> представляет собой защищенную аминогруппу и n представляет собой целое число от 2 до 10; и

**D3)** превращение защищенных аминогрупп соединения **46\*** или **47\*** в соответствующие ацетиамидо группы с получением соединения **48\*** или **49\***

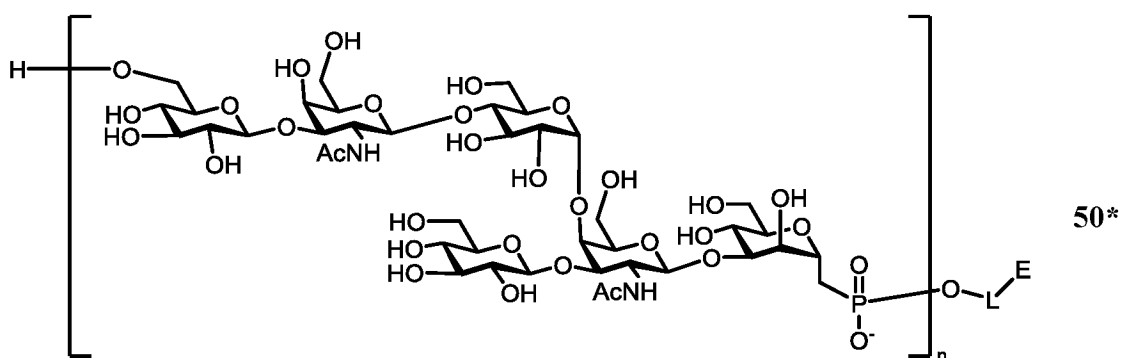
20

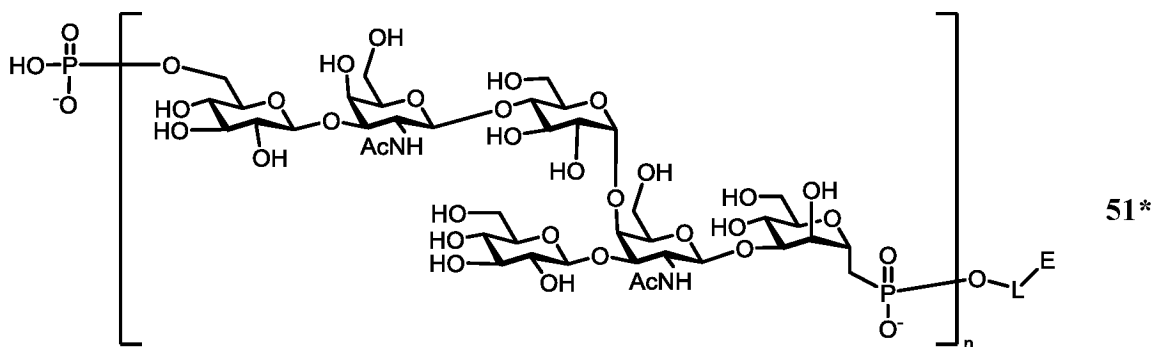


где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}, P^{16} - P^{20}$  и  $P^{22} - P^{24}$  представляют собой защитные группы, С представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу E, и n представляет собой целое число от 2 до 10; и

5

**D4)** осуществление удаления всех оставшихся защитных групп из соединения **48\*** или **49\*** с получением соединения **50\*** или **51\*** общей формулы (I)





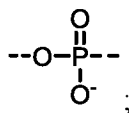
где  $n$  представляет собой целое число от 2 до 10, и  $L$  и  $E$  имеют значения, указанные в данном документе.

5 Другой аспект настоящего изобретения направлен на способ синтеза сахара общей формулы (I), где

$n$  представляет собой 1;

$T^*$ — представляет собой  $H^-$  или фосфатную группу;

$Z$  представляет собой



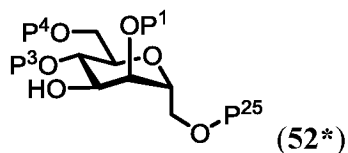
$L$  представляет собой линкер; и

10  $E$  представляет собой  $-NH_2$ ,  $-N_3$ ,  $-CN$ ,  $-O-NH_2$ ,  $-CH=CH_2$ ,  $-C\equiv CH$ ,  $-Br$ ,  $-Cl$ ,  $-I$ ,  $-CO_2R'$ ,  $-CONH-NH_2$ ,  $-SH$ ,  $-OH$  или  $-SAc$ ;

$R'$  представляет собой  $-H$ ,  $-Me$ ,  $-Et$ , 4-нитрофенил, пентафторфенил, или *N*-сукцинимидил;

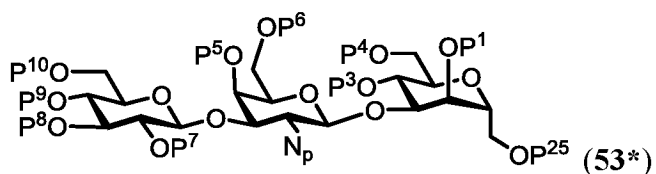
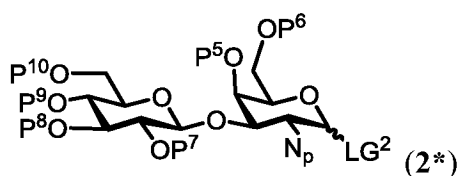
который включает следующие стадии:

15 **E1)** обеспечение моносахарида формулы **52\***:



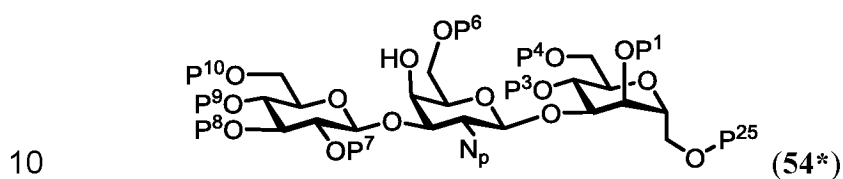
где  $P^1$ ,  $P^3$ ,  $P^4$  и  $P^{25}$  представляют собой защитные группы; и

20 **E2)** введение в реакцию моносахарида формулы **52\*** с соединением формулы **2\*** с получением соединения **53\***:



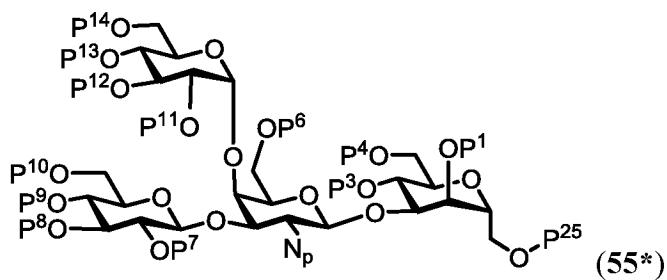
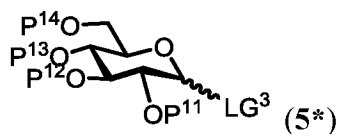
5 где  $P^1, P^3, P^4 - P^{10}$  и  $P^{25}$  представляют собой защитные группы,  $LG^2$  представляет собой уходящую группу, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

**Е3)** осуществление удаления защитной группы  $P^5$  соединения **53\*** с получением соединения **54\***



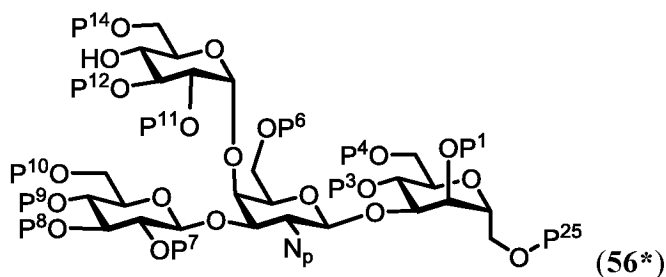
где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{10}$  и  $P^{25}$  представляют собой защитные группы, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

15 **Е4)** введение в реакцию соединения **54\*** с моносахаридом **5\*** с получением соединения **55\***



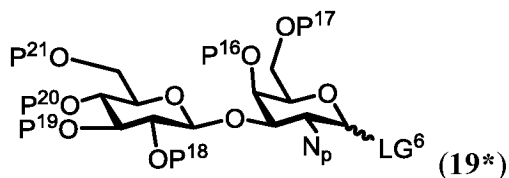
где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{14}$  и  $P^{25}$  представляют собой защитные группы,  $LG^3$  представляет собой уходящую группу, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

5 **E5)** осуществление удаления защитной группы  $P^{13}$  соединения **55\*** с получением соединения **56\***

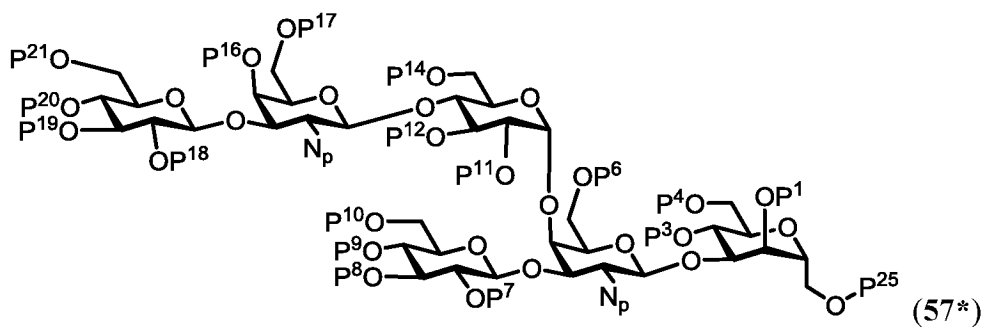


10 где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}$  и  $P^{25}$  представляют собой защитные группы, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

**E6)** введение в реакцию соединения **56\*** с дисахаридом **19\*** с получением соединения **57\***



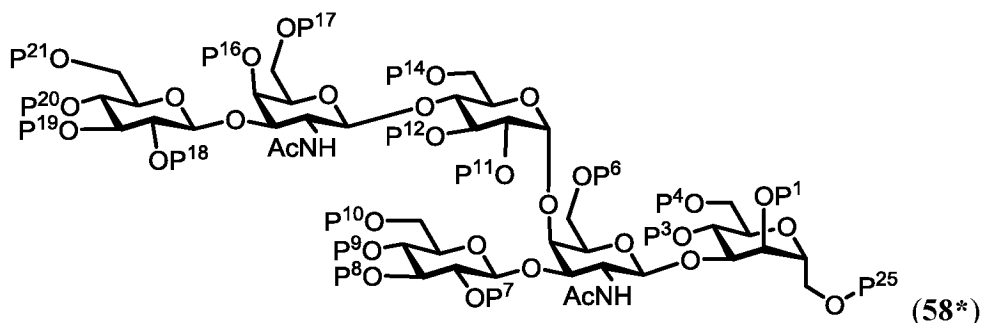
15



20

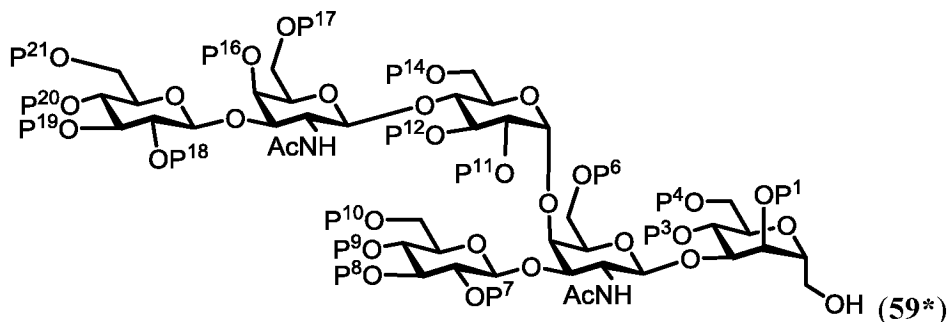
где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}$  и  $P^{16} - P^{25}$  представляют собой защитные группы,  $LG^6$  представляет собой уходящую группу, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

**Е7)** превращение защищенных аминогрупп соединения **57\*** в соответствующие ацетамидо группы с получением соединения **58\***

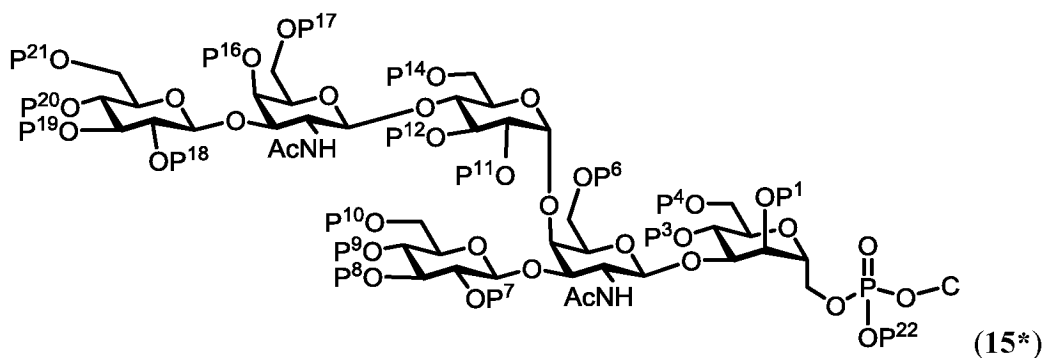


5 где P<sup>1</sup>, P<sup>3</sup>, P<sup>4</sup>, P<sup>6</sup> – P<sup>12</sup>, P<sup>14</sup>, P<sup>21</sup> и P<sup>25</sup> представляют собой защитные группы; и

**Е8)** осуществление удаления защитной группы P<sup>25</sup> соединения **58\*** с получением соединения **59\*** и введение в реакцию соединения **59\*** со спиртом HO–L–C в присутствии фосфорилирующего агента с получением соединения **15\***

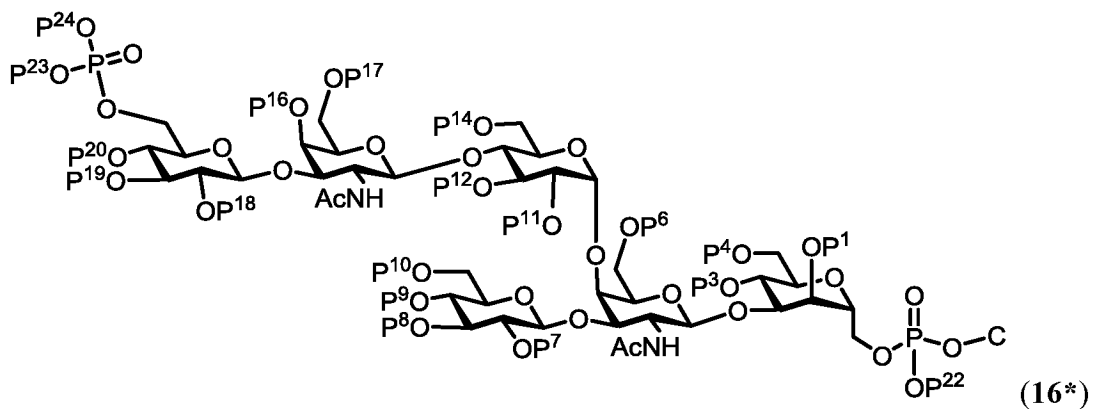
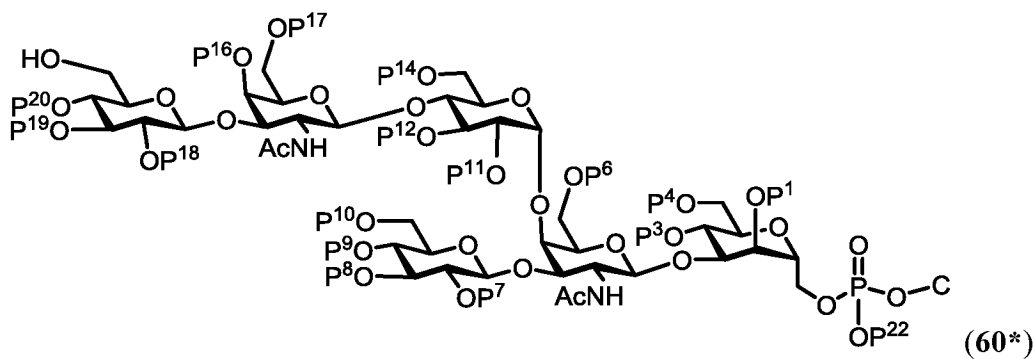


10



где P<sup>1</sup>, P<sup>3</sup>, P<sup>4</sup>, P<sup>6</sup> – P<sup>12</sup>, P<sup>14</sup>, P<sup>16</sup> – P<sup>22</sup> представляют собой защитные группы, и

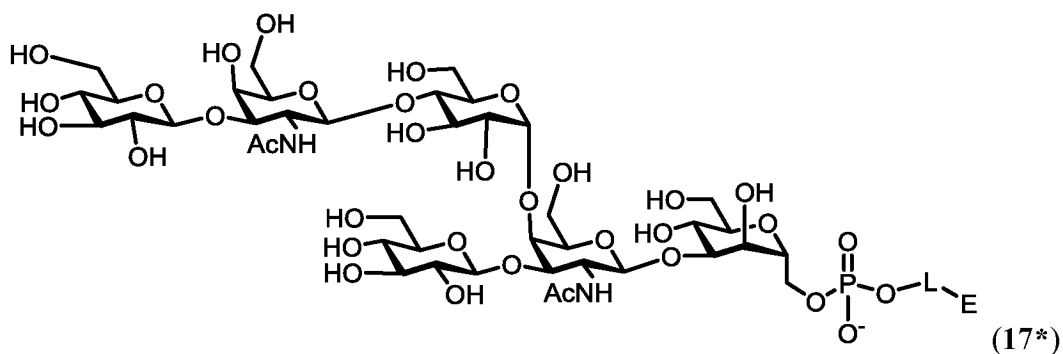
15 **Е9)** необязательно осуществление удаления защитной группы P<sup>21</sup> соединения **15\*** с получением соединения **60\*** и введение в реакцию соединения **60\*** с фосфорилирующим агентом с получением соединения **16\***



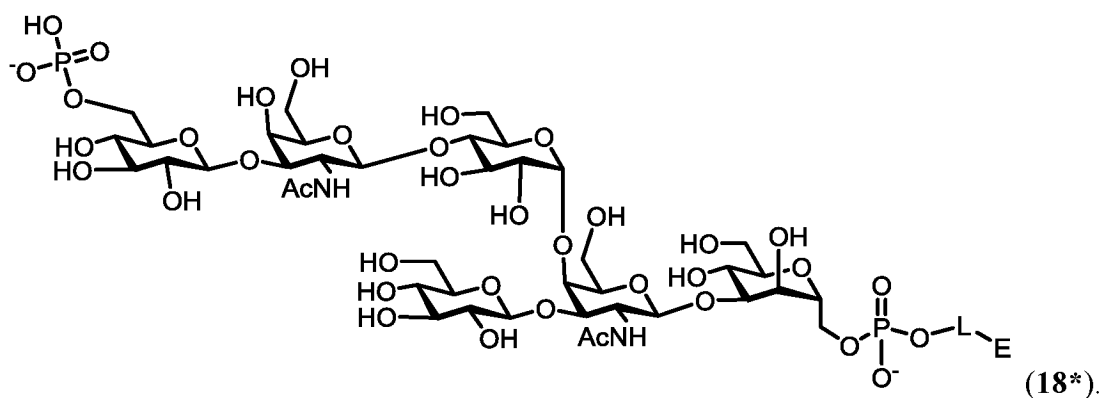
5

где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}, P^{16} - P^{20}$  и  $P^{22} - P^{24}$  представляют собой защитные группы, С представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу E; и

**E10)** осуществление удаления всех оставшихся защитных групп из соединения **15\*** или **16\*** с получением соединения **17\*** или **18\*** общей формулы (I)





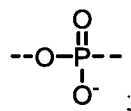


Другой аспект настоящего изобретения направлен на способ синтеза сахара общей формулы (I), где

5  $n$  представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

$T^*$ — представляет собой H— или фосфатную группу;

$Z$  представляет собой



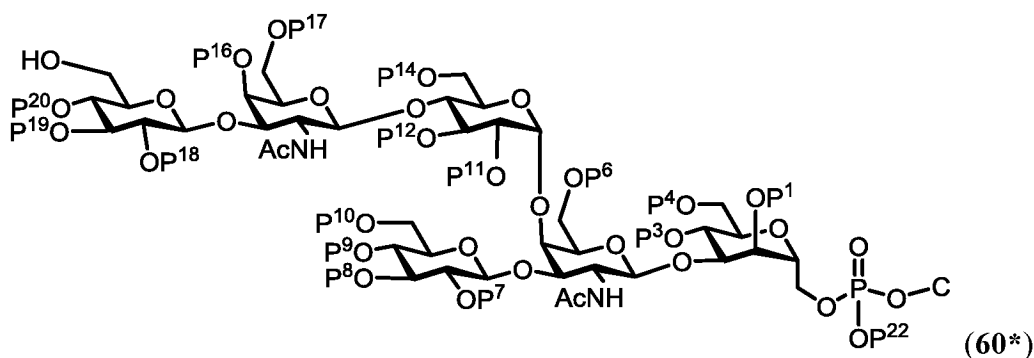
$L$  представляет собой линкер; и

$E$  представляет собой  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{N}_3$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{O}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ,  $-\text{Br}$ ,  $-\text{Cl}$ ,  $-\text{I}$ ,  $-\text{CO}_2\text{R}'$ ,  $-\text{CONH}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{OH}$  или  $-\text{SAc}$ ;

10  $\text{R}'$  представляет собой  $-\text{H}$ ,  $-\text{Me}$ ,  $-\text{Et}$ , 4-нитрофенил, пентафторфенил, или *N*-сукцинимидил;

который включает следующие стадии:

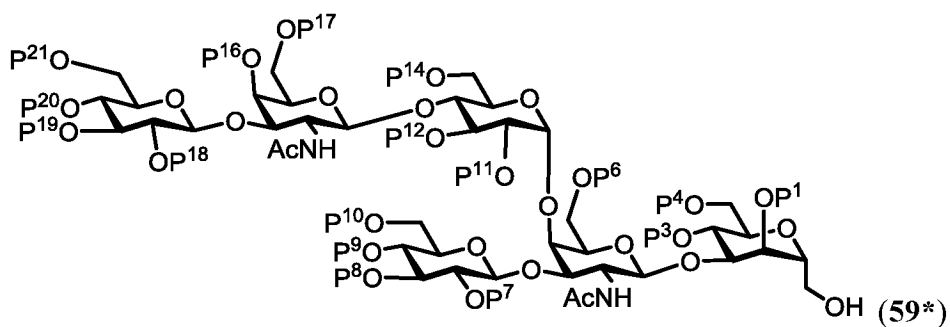
**F1)** обеспечение соединения **60\***



15

где  $P^1$ ,  $P^3$ ,  $P^4$ ,  $P^6 - P^{12}$ ,  $P^{14}$ ,  $P^{16} - P^{20}$  и  $P^{22}$  представляют собой защитные группы,  $C$  представляет собой  $-\text{L}-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу;

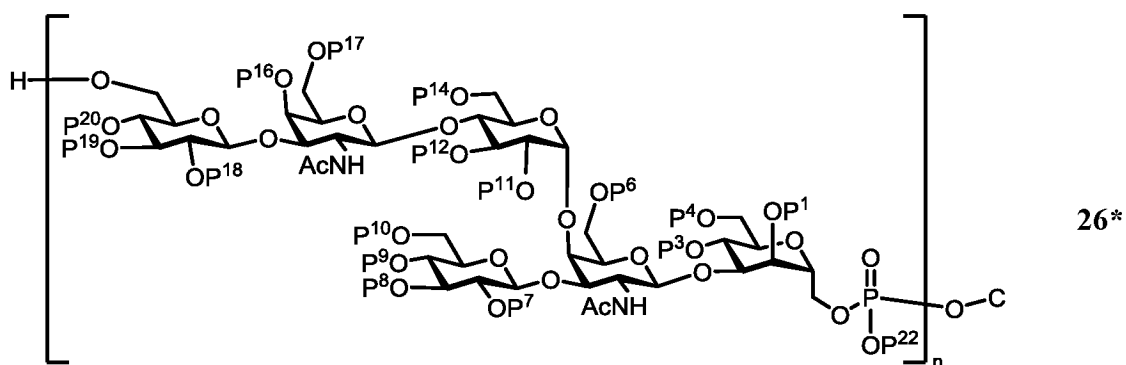
**F2.1)** введение в реакцию соединения **60\*** с соединением формулы



в присутствии фосфорилирующего агента,

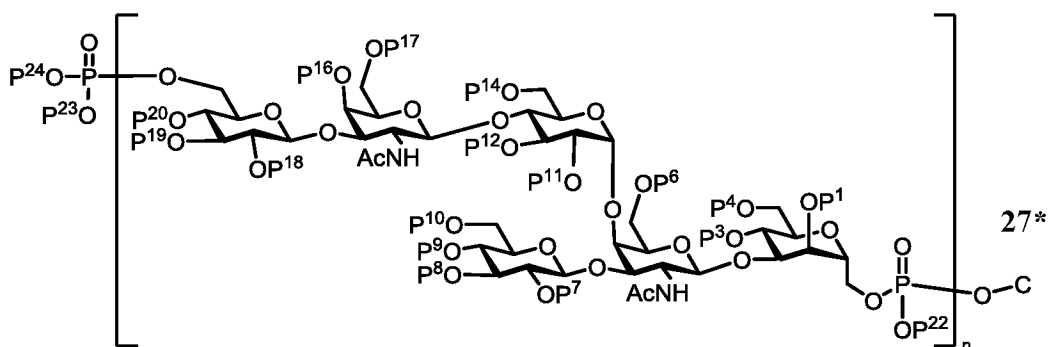
**F2.2)** осуществление удаления защитной группы P<sup>21</sup>;

**F3)** необязательно повторение стадий **F2.1** и **F2.2** n-2 раз для того, чтобы синтезировать соответствующие тримеры (n=3) до декамеров (n=10); с получением соединения **26\***:



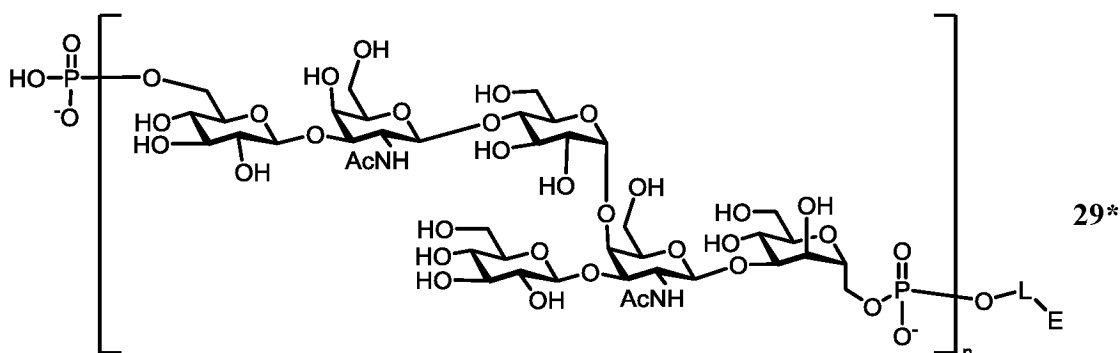
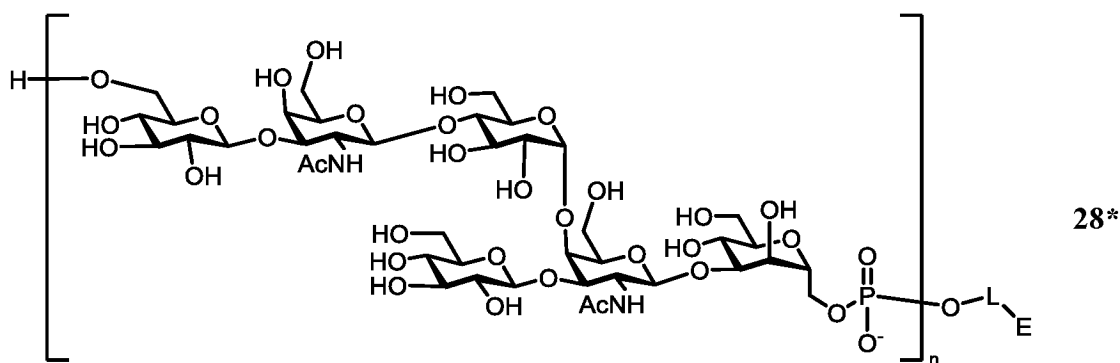
где P<sup>1</sup>, P<sup>3</sup>, P<sup>4</sup>, P<sup>6</sup> – P<sup>14</sup>, P<sup>16</sup> – P<sup>20</sup> и P<sup>22</sup> представляют собой защитные группы, С представляет собой –L–E<sub>p</sub>, где E<sub>p</sub> представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу E, и n представляет собой целое число от 2 до 10; и

**F4)** необязательно введение в реакцию соединения **26\*** с фосфорилирующим агентом с получением соединения **27\***



где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}, P^{16} - P^{20}$  и  $P^{22} - P^{24}$  представляют собой защитные группы, С представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу Е, и n представляет собой целое число от 2 до 10; и

**F5)** осуществление удаления всех оставшихся защитных групп из соединения **26\*** или **27\*** с получением соединения **28\*** или **29\*** общей формулы (I)



где n представляет собой целое число от 2 до 10, и L и E имеют значения, указанные в данном документе.

Другой аспект настоящего изобретения направлен на способ синтеза сахара общей формулы (I), где

n представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10;

T\*— представляет собой H— или фосфатную группу;

Z представляет собой  $\text{--O--P(=O)(O^-)--}$  ;

L представляет собой линкер; и

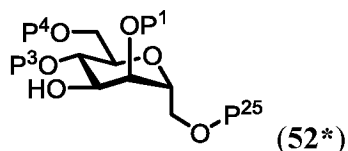
E представляет собой  $-\text{NH}_2, -\text{N}_3, -\text{CN}, -\text{O}-\text{NH}_2, -\text{CH}=\text{CH}_2, -\text{C}\equiv\text{CH}, -\text{Br}, -\text{Cl}, -\text{I}, -\text{CO}_2\text{R}', -\text{CONH}-\text{NH}_2, -\text{SH}, -\text{OH}$  или  $-\text{SAc}$ ;

$R'$  представляет собой  $-H$ ,  $-Me$ ,  $-Et$ , 4-нитрофенил, пентафторфенил, или *N*-сукцинимидил;

который включает следующие стадии:

**G1)** обеспечение моносахарида формулы **52\***:

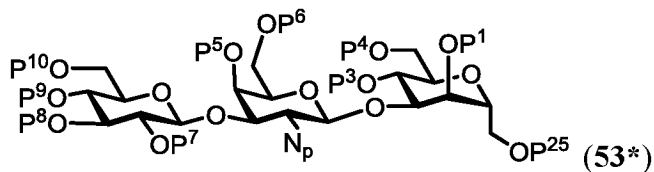
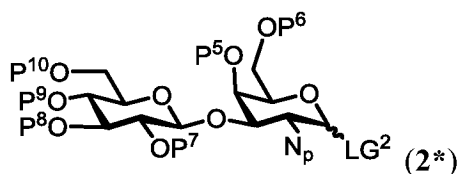
5



где  $P^1$ ,  $P^3$ ,  $P^4$  и  $P^{25}$  представляют собой защитные группы; и

**G2)** введение в реакцию моносахарид формулы **52\*** с соединением формулы **2\***

10 с получением соединения **3\***:

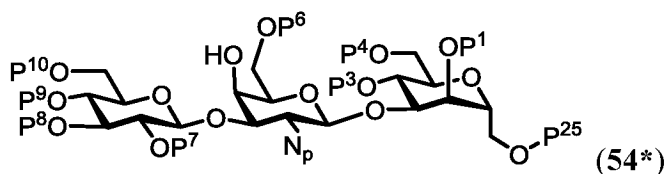


15

где  $P^1$ ,  $P^3$ ,  $P^4 - P^{10}$  и  $P^{25}$  представляют собой защитные группы,  $LG^2$  представляет собой уходящую группу, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

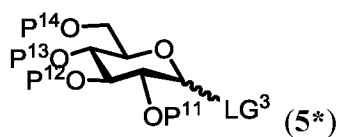
**G3)** осуществление удаления защитной группы  $P^5$  соединения **53\*** с получением соединения **54\***

20

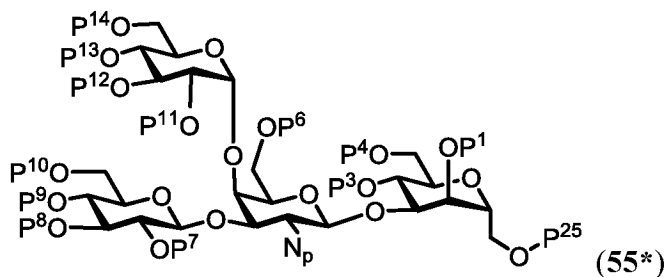


где  $P^1$ ,  $P^3$ ,  $P^4$ ,  $P^6 - P^{10}$  и  $P^{25}$  представляют собой защитные группы, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

**G4)** введение в реакцию соединения **54\*** с моносахаридом **5\*** с получением соединения **55\***



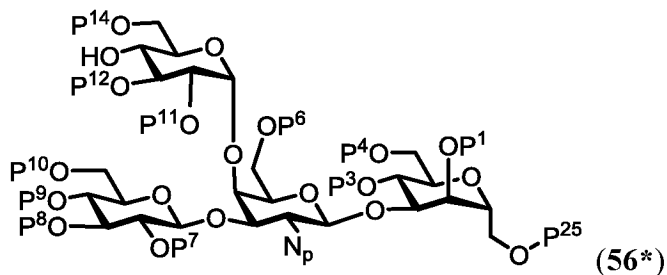
5



где  $P^1$ ,  $P^3$ ,  $P^4$ ,  $P^6 - P^{14}$  и  $P^{25}$  представляют собой защитные группы,  $LG^3$  представляет собой уходящую группу, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

10

**G5)** осуществление удаления защитной группы  $P^{13}$  соединения **55\*** с получением соединения **56\***

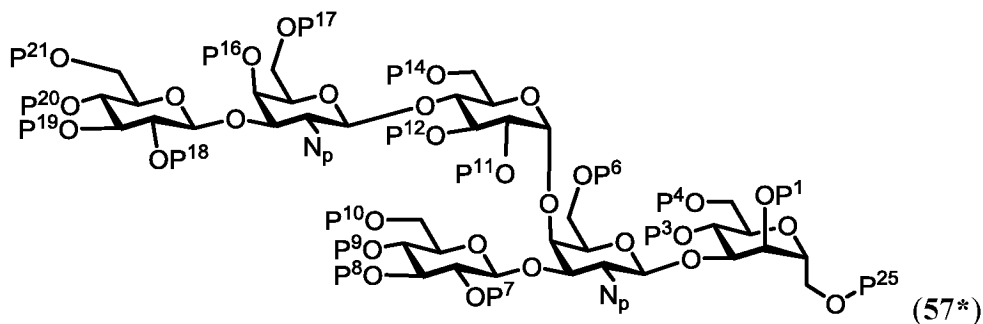
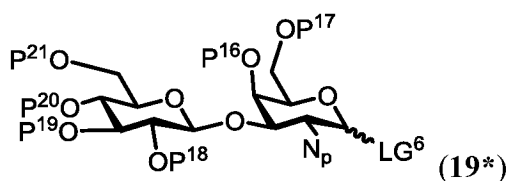


15

где  $P^1$ ,  $P^3$ ,  $P^4$ ,  $P^6 - P^{12}$ ,  $P^{14}$  и  $P^{25}$  представляют собой защитные группы, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

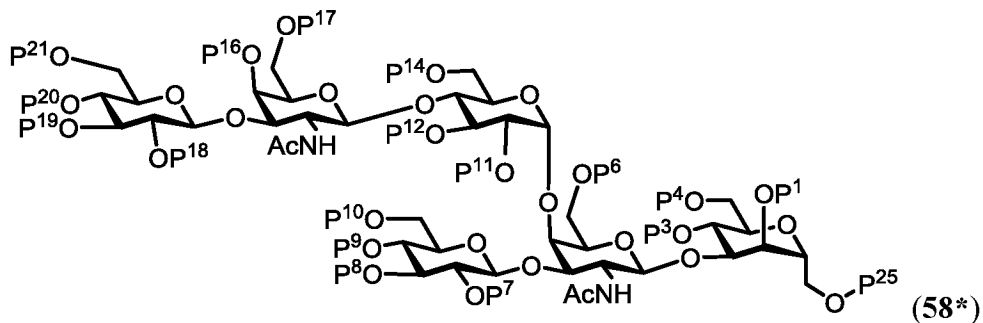
**G6)** введение в реакцию соединения **56\*** с дисахаридом **19\*** с получением соединения **57\***

20



5 где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}$  и  $P^{16} - P^{25}$  представляют собой защитные группы,  $LG^6$  представляет собой уходящую группу, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

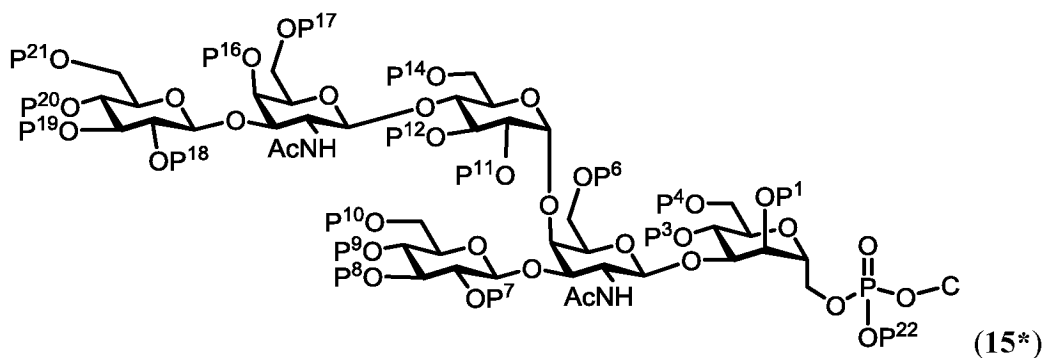
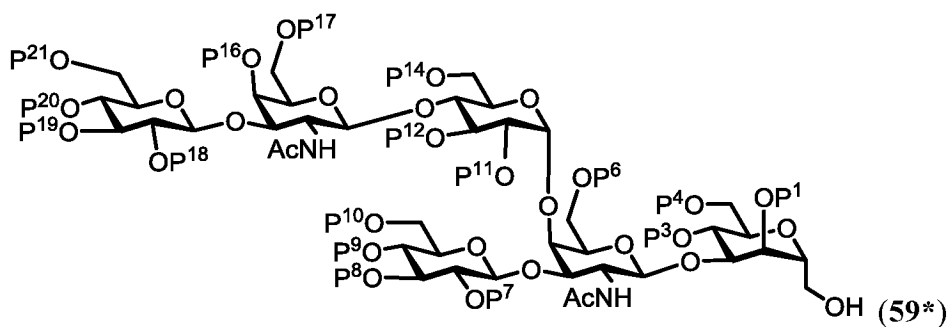
**G7)** превращение защищенных аминогрупп соединения **57\*** в соответствующие ацетиамидо группы с получением соединения **58\***



10 где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}, P^{21}$  и  $P^{25}$  представляют собой защитные группы; и

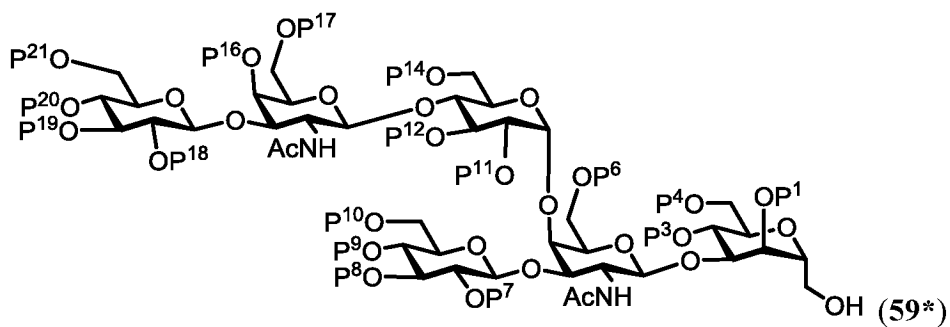
**G8)** осуществление удаления защитной группы  $P^{25}$  соединения **58\*** с получением соединения **59\*** и введение в реакцию соединения **59\*** со спиртом HO-L-C в присутствии фосфорилирующего агента с получением соединения **15\***

15

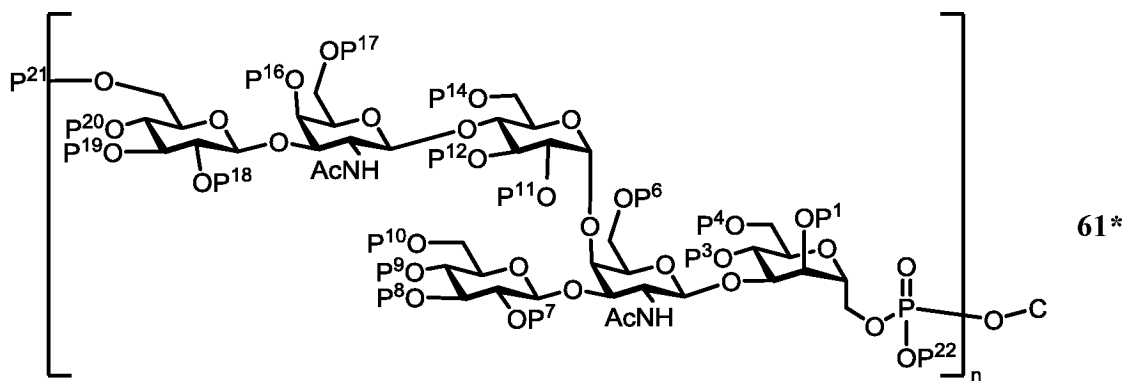


- 5 где P<sup>1</sup>, P<sup>3</sup>, P<sup>4</sup>, P<sup>6</sup> – P<sup>12</sup>, P<sup>14</sup>, P<sup>16</sup> – P<sup>22</sup> представляют собой защитные группы, и
- G9)** повторение стадий **G9.1** и **G9.2** n-1 раз для того, чтобы синтезировать соответствующие димеры (n=3) до декамеров (n=10);
- G9.1)** осуществление удаления защитной группы P<sup>21</sup>; и
- G9.2)** введение в реакцию продукта стадии G9.1) с соединением формулы

10

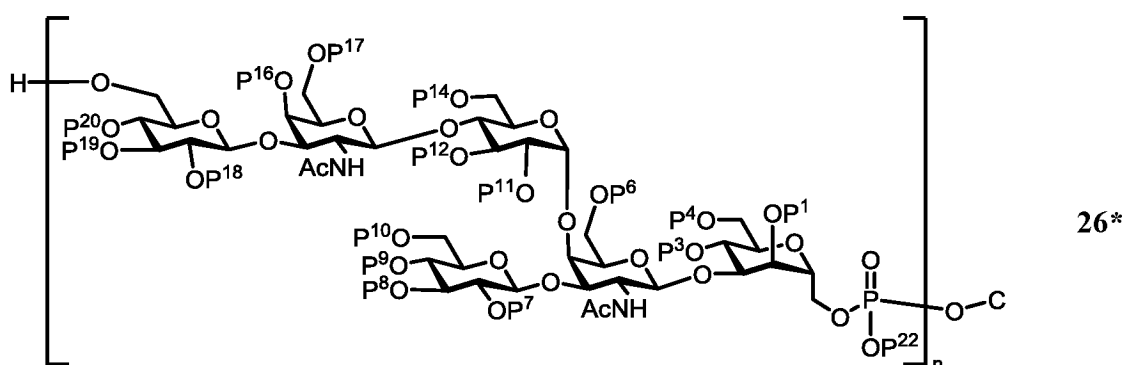


в присутствии фосфорилирующего агента, с получением соединения **61\***

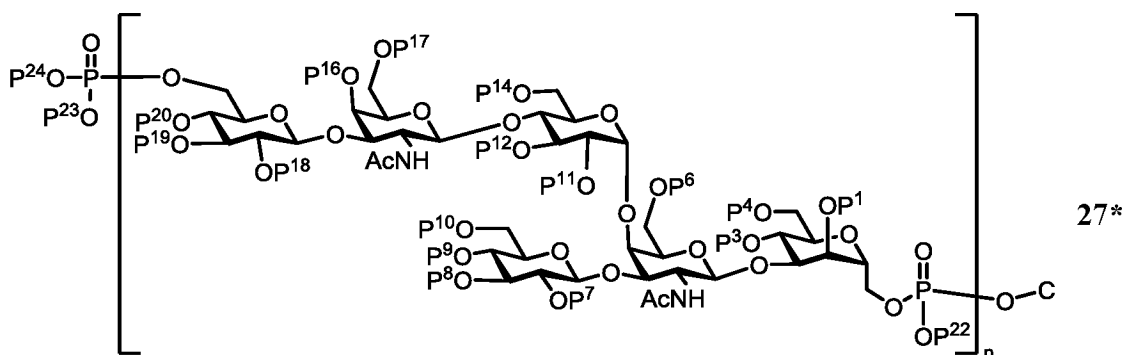


где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}, P^{16} - P^{22}$  представляют собой защитные группы, С представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу;

- 5 **G10)** необязательно осуществление удаления защитной группы  $P^{21}$  соединения **61\*** или соединения **15\*** с получением соединения **26\*** и введение в реакцию соединения **26\*** с фосфорилирующим агентом с получением соединения **27\*** с обеспечением соединения **26\***:



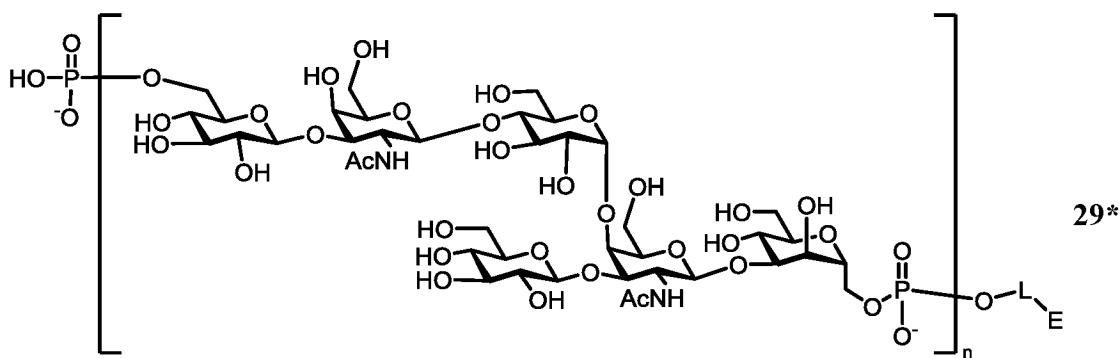
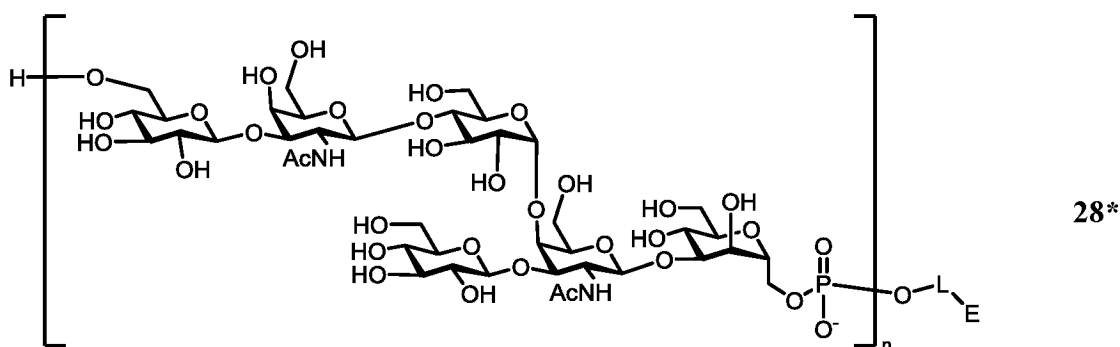
10



где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}, P^{16} - P^{20}$  и  $P^{22} - P^{24}$  представляют собой защитные группы, С представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу E, и n представляет собой целое число от 1 до 10; и



**G11)** осуществление удаления всех оставшихся защитных групп из соединения **26\*** или **27\*** с получением соединения **28\*** или **29\*** общей формулы (I)



5

где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 10, и  $L$  и  $E$  имеют значения, указанные в данном документе.

$E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу.  $E$  представляет собой  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{N}_3$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{O}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ,  $-\text{Br}$ ,  $-\text{Cl}$ ,  $-\text{I}$ ,  $-\text{CO}_2\text{R}'$ ,  $-\text{CONHNH}_2$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{OH}$  или  $-\text{SAc}$ ; и соответствующие защищенная концевая группа  $E_p$  представляет собой  $-\text{N}(\text{P}^{26})(\text{P}^{27})$ ,  $-\text{N}_3$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{O}-\text{N}(\text{P}^{26})(\text{P}^{27})$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ,  $-\text{Br}$ ,  $-\text{Cl}$ ,  $-\text{I}$ ,  $-\text{CO}_2\text{R}'$ ,  $-\text{CONHN}(\text{P}^{26})(\text{P}^{27})$ ,  $-\text{SP}_s$ , или  $-\text{SAc}$

$N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу. Предпочтительно,  $N_p$  выбрана из  $-\text{N}_3$ ,  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CCl}_3$  и  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CCl}_3$  (Тroc).

$\text{P}^1, \text{P}^2, \text{P}^3, \text{P}^4, \text{P}^5, \text{P}^6, \text{P}^7, \text{P}^8, \text{P}^9, \text{P}^{10}, \text{P}^{11}, \text{P}^{12}, \text{P}^{13}, \text{P}^{14}, \text{P}^{15}, \text{P}^{16}, \text{P}^{17}, \text{P}^{18}, \text{P}^{19}, \text{P}^{20}, \text{P}^{21}, \text{P}^{22}, \text{P}^{23}, \text{P}^{24}, \text{P}^{25}, \text{P}^{26}$  и  $\text{P}^{27}$  представляют собой защитные группы. Используемый в данном документе термин “защитная группа” относится к обычно используемым группам в органическом синтезе, обычно используемым для защиты гидроксильных групп, аминогрупп и тиолов.

Предпочтительно, защитную группу  $P^{21}$  можно удалить в условиях, при которых другие защитные группы, присутствующие в молекуле, являются стабильными.

Амино-защитные группы предпочтительно являются стабильными в условиях, применяемых для удаления гидроксильных защитных групп, присутствующих в молекуле.

Гидроксильные защитные группы, предпочтительно кроме защитной группы  $P^{21}$ , предпочтительно могут быть удалены посредством гидрирования.

Более предпочтительно,  $P^1, P^2, P^3, P^4, P^5, P^6, P^7, P^8, P^9, P^{10}, P^{11}, P^{12}, P^{13}, P^{14}, P^{15}, P^{16}, P^{17}, P^{18}, P^{19}, P^{20}, P^{21}, P^{22}, P^{23}, P^{24}$  и  $P^{25}$  являются подходящими защитными группами для гидроксильных групп, более предпочтительно различные подходящие защитные группы для гидроксильных групп, которые способны удаляться друг за другом подходящей последовательностью снятия защиты. Предпочтительными защитными группами для гидроксильных групп являются ацетил, фенил, бензил, изопропилиден, бензилиден, бензоил, п-метоксибензил, п-метоксибензилиден, п-метоксифенил, п-бромбензилиден, п-нитрофенил, аллил, ацетил, изопропил, п-бромбензил, диметокситритил, тритил, 2-нафтилметил, пивалоил, триизопропилсилил, трет-бутилдиметилсилил, трет-бутилдифенилсилил, трет-бутилметоксифенилсилил, триэтилсилил, триметилсилил, 2-триметилсилилэтоксиметил, 9-флуоренилметоксикарбонил, бензилоксиметил, метилоксиметил, трет-бутилоксиметил, метоксиэтилоксиметил, левулиноил, нафтилиден, хлорацетил, пиколоил, тексилдиметилсилил (TDS), (2-нитрофенил) ацетил (NPAC), 2-(азидометил)бензоил (AzMB).

Защитные группы можно разделить на постоянные защитные группы и временные защитные группы. Постоянные защитные группы - это защитные группы, которые стабильны в течение всего синтеза и которые могут быть эффективно удалены на поздней стадии синтеза. В этом случае постоянные защитные группы включают  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}, P^{16} - P^{20}, P^{22} - P^{26}$ .  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{12}, P^{14}, P^{16} - P^{20}$  и  $P^{22} - P^{24}$  являются маскирующими гидроксильными группами в течение всего синтеза, в то время как защитные группы  $P^{26}$  и  $P^{27}$  являются маскирующими концевыми аминогруппами, присутствующими в концевой группе  $E_p$ . Предпочтительно защитными группами  $P^3, P^4, P^8 - P^{12}, P^{14}, P^{16} - P^{20}$  и  $P^{22} - P^{24}$  являются бензильные группы, защитная группа  $P^1$  представляет собой бензоильную группу, защитными группами  $P^7$  и  $P^{18}$  являются ацетильные группы, защитная группа  $P^{26}$  представляет собой бензильную группу и защитная группа  $P^{27}$  представляет собой бензилоксикарбонильную группу (Cbz).

Временные защитные группы представляют собой в целом ортогональные защитные группы, которые можно выборочно удалять на разных уровнях синтеза до свободных гидроксильных групп для последующего введения различных заместителей, включая моносахариды, другие защитные группы или другие остатки, присутствующие на молекуле. В этом случае к временным защитным группам относятся  $P^2$ ,  $P^5$ ,  $P^{13}$ ,  $P^{15}$ ,  $P^{21}$  и  $P^{25}$ .

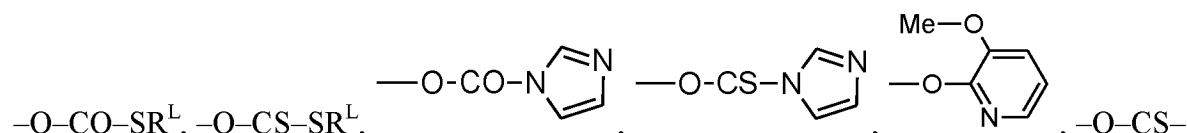
Временные защитные группы  $P^2$ ,  $P^5$ ,  $P^{13}$ ,  $P^{15}$ ,  $P^{21}$  и  $P^{25}$  предпочтительно выбраны из следующих, но не ограничиваются ими: аллил, *n*-метоксибензил, 2-нафтилметил, три-изопропилсилил, трет-бутилдиметилсилил, трет-бутилметоксифенилсилил, триэтилсилил, триметилсилил, 2-триметилсилилэтоксиметил, 9-флуоренилметоксикарбонил, тексилдиметилсилил, (2-нитрофенил)ацетил, 2-(азидометил)бензоил, и левулиноил. Предпочтительно, защитные группы  $P^2$ ,  $P^5$ ,  $P^{13}$ ,  $P^{15}$ ,  $P^{21}$  и  $P^{25}$  могут быть выборочно удалены в присутствии защитных групп  $P^1$ ,  $P^3$ ,  $P^4$ ,  $P^6$ ,  $P^{12}$ ,  $P^{14}$ ,  $P^{16}$  –  $P^{20}$ ,  $P^{22}$  –  $P^{24}$ . Предпочтительно,  $P^2$ ,  $P^5$ ,  $P^{13}$ ,  $P^{15}$ ,  $P^{21}$  и  $P^{25}$  представляют собой 9-флуоренилметоксикарбонил или левулиноил. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, защитные группы  $P^{13}$  и  $P^{21}$  представляют собой 9-флуоренилметоксикарбонил, и защитные группы  $P^1$ ,  $P^5$  и  $P^{15}$  представляют собой левулиноил. Предпочтительно,  $P^{21}$  выбран из три-изопропилсилила, трет-бутилдиметилсилила, трет-бутилметоксифенилсилила. Предпочтительно,  $P^{25}$  представляет собой 2-нафтилметил.

Инновационный выбор защитных групп позволяет получить доступ к библиотеке сахаридов общих формул (I), (II), (II-a), (II-b), (III), (III-a) или (III-b). ), функционализированных с концевой группой для последующего конъюгирования до иммуногенного носителя или твердой подложки. Кроме того, выбор уходящей группы влияет на стереохимический исход реакций гликозилирования на стадиях A1a), A2), A2'), A4), A6), A6'), A8), B1.3), C2), C4), C6), C8), D1.3), E2), E4) и E6).

Структурные элементы  $2^*$ ,  $5^*$ ,  $8^*$ ,  $11^*$ ,  $19^*$ ,  $20^*$  и  $21^*$  являются гликозилирующими агентами. Используемый в данном документе термин гликозилирующий агент относится к моносахариду, функционализированному в аномерном положении с уходящей группой, который после активации подходящим активирующим агентом дает оксокарбениевое промежуточное соединение, способное взаимодействовать с нуклеофилом, как например гидроксильная группа. Следовательно, гликозилирующие агенты  $2^*$ ,  $5^*$ ,  $8^*$ ,  $11^*$ ,  $19^*$ ,  $20^*$  и  $21^*$  являются функционализированными в аномерном положении с уходящими группами  $LG^1$ ,  $LG^2$ ,

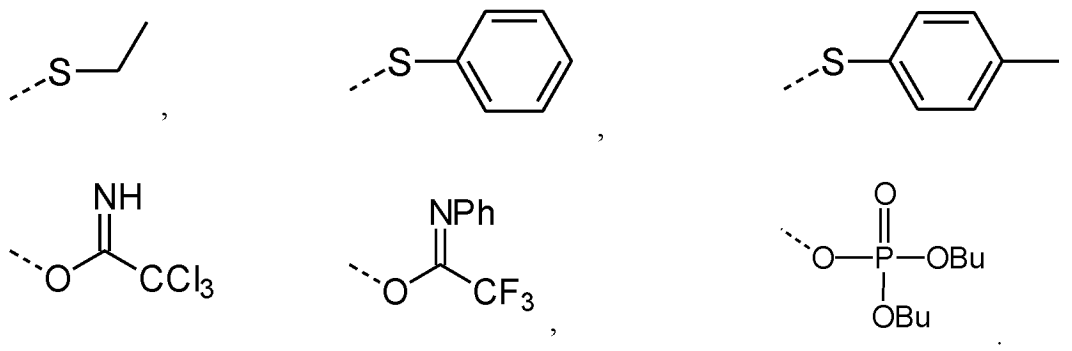
LG<sup>3</sup>, LG<sup>4</sup>, LG<sup>5</sup>, LG<sup>6</sup> и LG<sup>7</sup>. Примеры уходящих групп, пригодных для настоящего синтеза, хорошо известны специалистам в химии углеводов и включают галогениды, тиоэфиры, имидаты, ацетат и фосфат.

Предпочтительно, уходящие группы LG<sup>1</sup>, LG<sup>2</sup>, LG<sup>3</sup>, LG<sup>4</sup>, LG<sup>5</sup>, LG<sup>6</sup> и LG<sup>7</sup> выбраны из галогена (-Cl, -Br, -F, -I), -O-C(=NH)-CCl<sub>3</sub>, -O-C(=NPh)-CF<sub>3</sub>, -OAc, -SR<sup>L</sup>,  
5 -SO-R<sup>L</sup>, -SO-Ph, -SO-CH<sub>2</sub>-Ph, -SO-Tol, -SO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-(пара-OCH<sub>3</sub>),  
-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH=CH<sub>2</sub>, -O-P(OR<sup>L</sup>)<sub>2</sub>, -O-PO(OR<sup>L</sup>)<sub>2</sub>, -O-CO-OR<sup>L</sup>,



OR<sup>L</sup>, где R<sup>L</sup> может представлять собой любую из групп алкил или арил,  
10 предпочтительно, метил, этил, пропил, изопропил, фенил или толуил.

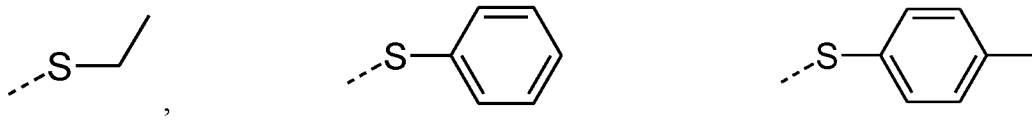
Предпочтительно, уходящие группы LG<sup>1</sup>, LG<sup>2</sup>, LG<sup>3</sup>, LG<sup>4</sup>, LG<sup>5</sup>, LG<sup>6</sup> и LG<sup>7</sup> выбраны из групп уходящих групп, которые состоят из: SBox, STaz,



где тиоэфиры также могут быть замещены.

Как указывалось выше, предоставление оксокарбениевого промежуточного соединения зависит от активации уходящей группы, установленной в аномерном  
15 положении гликозилирующего агента, с подходящим или пригодным активирующим агентом. Для квалифицированного специалиста известно, что подходящие активирующие агенты для фосфата (т.е. фосфатные активирующие агенты) и имидата (т.е. имидатные активирующие агенты) представляют собой кислоты Льюиса, такие как  
20 силилтрифлат или трифлат серебра, в то время как подходящие активирующие агенты для тиоэфира т.е. агенты, активирующие тиоэфир, включают, но не ограничиваются ими: NIS/TfOH, NIS/TMSOTf, NIS/BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, NIS/AgOTf, DMTST/Tf<sub>2</sub>O, IDPC, BSP/Tf<sub>2</sub>O, Ph<sub>2</sub>SO/Tf<sub>2</sub>O. Примеры силилтрифлата включают, но не ограничиваются ими,  
25 триметилсилил трифторметансульфонат, трет-бутилдиметил трифторметансульфонат, трииоспропил трифторметансульфонат.

Предпочтительно,  $LG^1$ ,  $LG^2$ ,  $LG^3$ ,  $LG^4$ ,  $LG^5$ ,  $LG^6$  и  $LG^7$  представляют собой тиоэфиры и даже более предпочтительно, когда  $LG^1$ ,  $LG^2$ ,  $LG^3$ ,  $LG^4$ ,  $LG^5$ ,  $LG^6$  и  $LG^7$  выбраны из группы, которая состоит из:



- 5           Предпочтительно, чтобы реакция сочетания между сахарами на стадиях A1a), A2), A2'), A4), A6), A6'), A8), B1.3), C2), C4), C6), C8), D1.3), E2), E4) и E6) осуществлялась активацией NIS/TfOH или TMSOTf в смеси неполярного растворителя и полярного апротонного растворителя при температуре от  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  до  $10\text{ }^\circ\text{C}$ . Даже более предпочтительно, когда указанная реакция осуществляется в смеси неполярного
- 10           растворителя и полярного апротонного растворителя путем обработки NIS/TfOH при температуре приблизительно  $0\text{ }^\circ\text{C}$ .

Предпочтительный полярный апротонный растворитель представляет собой тетрагидрофуран, диэтиловый эфир и диоксан. Предпочтительными неполярными растворителями являются толуол, галогенированные растворители, такие как хлороформ

15           и метиленхлорид. Предпочтительные смеси неполярного и полярного апротонного растворителя представляют собой: метиленхлорид/тетрагидрофуран, метиленхлорид/диэтиловый эфир, толуол/диэтиловый эфир, толуол/тетрагидрофуран.

Удаление защитных групп  $P^1$ ,  $P^3$ ,  $P^4$ ,  $P^6 - P^{12}$ ,  $P^{14}$ ,  $P^{16} - P^{20}$ ,  $P^{22} - P^{24}$ ,  $P^{26}$  и  $P^{27}$ , которое осуществляют на стадиях **A11)**, **B4)**, **C11)**, **D4)**, **E10)** и **F5)**, включает:

- 20           - первое расщепление основно-лабильных защитных групп путем обработки основанием в присутствии пероксида водорода в смеси растворителей. Предпочтительно, основание представляет собой - NaOMe или LiOH; и

25           - второе расщепление защитных групп, чувствительных к гидрированию, путем воздействия на соединение водородом в присутствии палладиевого катализатора в смеси растворителей.

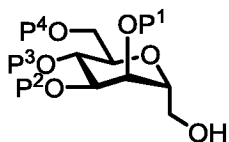
Фосфорилирующий агент, используемый на стадиях A9), B2), C9), D2), E9) и F2.1), представляет собой соединение, способное вводить группу  $P(O)(OH)_2$  в ее свободную форму или в виде сложного моноэфира в реактивном положении в соединении. Таким образом, фосфатную группу переносят в гидроксильную группу на

30           стадиях A9), B2), C9), D2), E9) и F2.1). Предпочтительными фосфорилирующими агентами, используемыми в настоящем изобретении, являются дифенилфосфит,

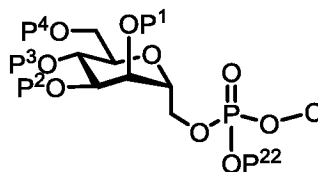
бис(диизопропиламино)бензилоксифосфин, бензил N,N-диизопропилфосфоамидат или N,N-диэтил-1,5-дигидро-3Н-2,3,4-бензодиоксафосфепин-3-амин в сочетании с активирующим агентом, таким как 1Н-тетразол, и последующим окислением окислителем, таким как пероксид водорода или 3-хлорпербензойная кислота. В предпочтительном варианте осуществления изобретения на стадиях А9), В2), С9), D2), Е9) и F2.1) фосфорилирующий агент представляет собой бис(диизопропиламино)бензилоксифосфин в комбинации с 1Н-тетразолом и 3-хлорпербензойной кислотой. В предпочтительном варианте осуществления изобретения на стадиях А9), В2), С9), D2), Е9) и F2.1) фосфорилирующий агент представляет собой дифенилфосфит.

Фосфорилирующий агент, используемый на стадии А1b), предпочтительно представляет собой бис(диизопропиламино)бензилоксифосфин, бензил N,N-диизопропилфосфоамидат или N,N-диэтил-1,5-дигидро-3Н-2,3,4-бензодиоксафосфепин-3-амин. Предпочтительный активирующий агент, применяемый на стадии А1b), представляет собой 1Н-тетразол, 4,5-дицианоимидазол, 2-бензилтиотетразол, 5-этилтиотетразол, трифлат бензимидазолия или трифлат имидазолия. Наиболее предпочтительным является 1Н-тетразол в качестве активирующего агента. Реакция окисления предпочтительно проводится в присутствии окислителя, такого как пероксид водорода или 3-хлорпербензойная кислота.

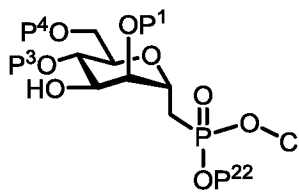
Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к промежуточному соединению для получения сахара общих формул (I), (II), (II-a), (II-b), (III), (III-a) или (III-b), где промежуточное соединение имеет любую из общих формул (I2a), (I2b), (I2c), (I2d), (I2e), (I2f), (I4a), (I4b), (I4c), (I4d), (I4e), (I4f), (I4g), (I4h), (I4i), (I4j), (I5a), (I5b), (I5c), (I5d), (I5e), (I5f), (I5g), (I5h), (I5i), (I5j), (I6a), (I6b), (I6c), (I6d), (I6e), (I6f), (I6g), (I6h), (I7a), (I7b), (I7c), (I7d), (I7e), (I7f), (I7g), (I7h), (I7i), (I7j), (I7k), (I7m), (I7n), (I7o) или (I7p):



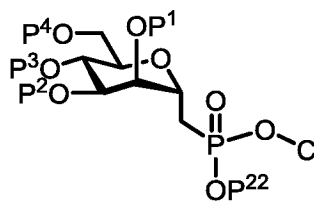
(I2a)



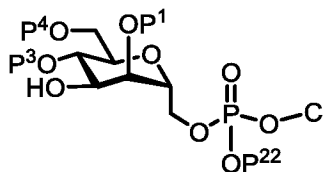
(I2b)



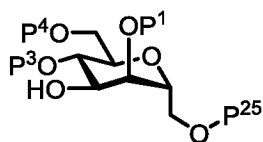
(I2c)



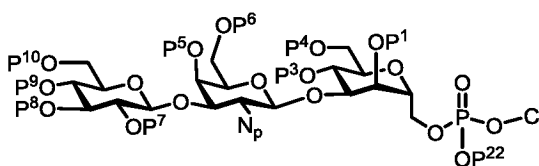
(I2d)



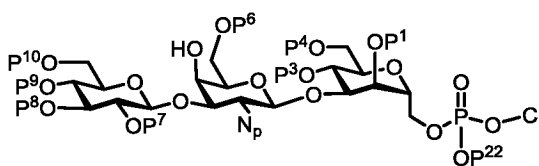
(I2e)



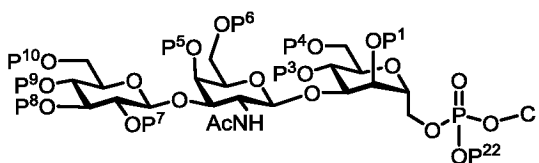
(I2f)



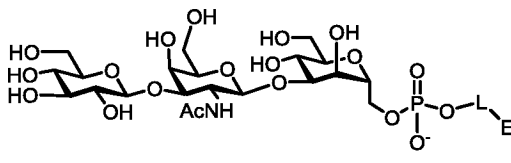
(I4a)



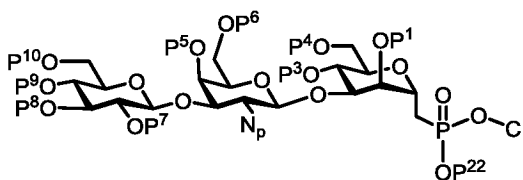
(I4b)



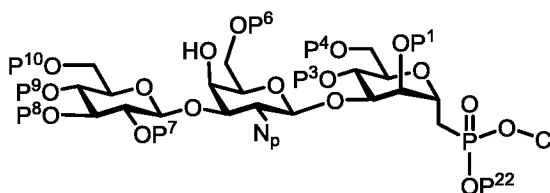
(I4c)



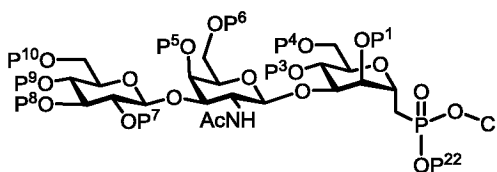
(I4d)



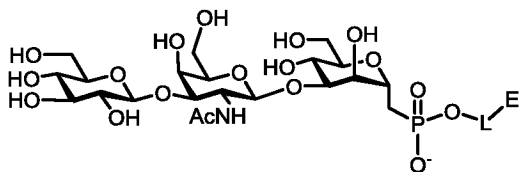
(I4e)



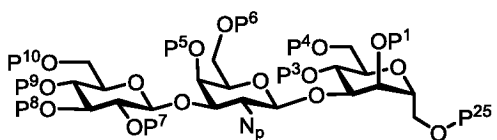
(I4f)



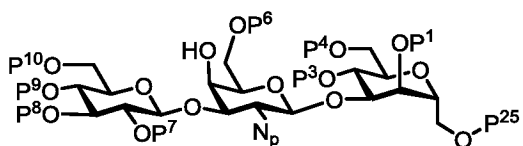
(I4g)



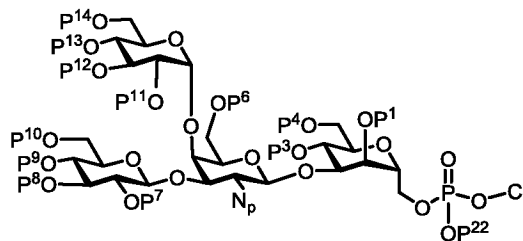
(I4h)



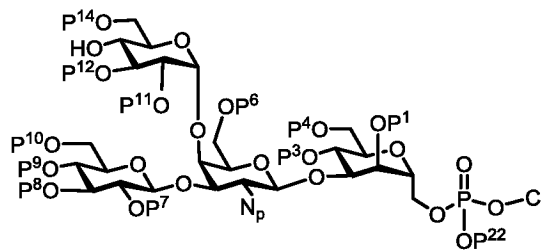
(I4i)



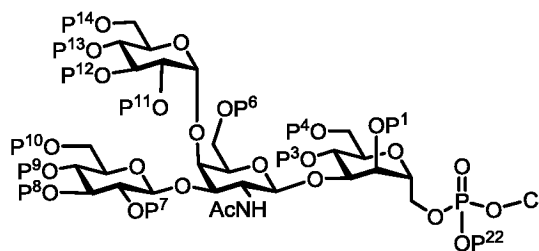
(I4j)



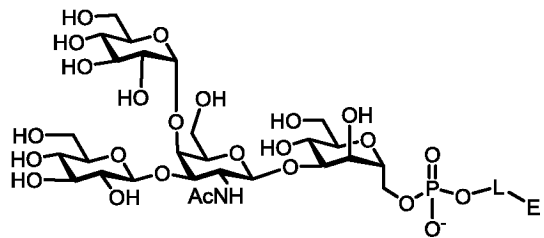
(I5a)



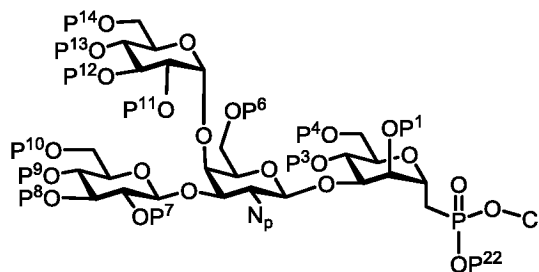
(I5b)



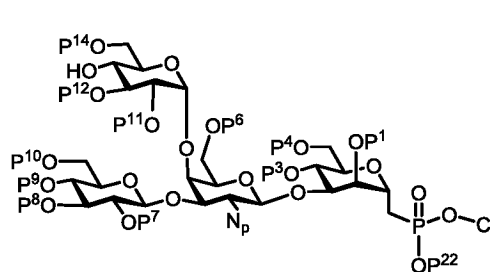
(I5c)



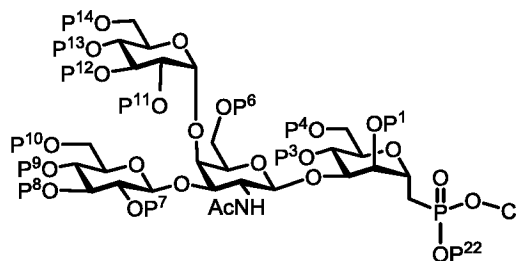
(I5d)



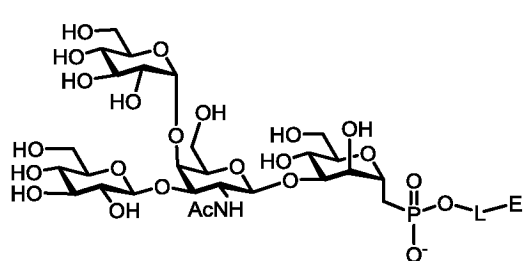
(I5e)



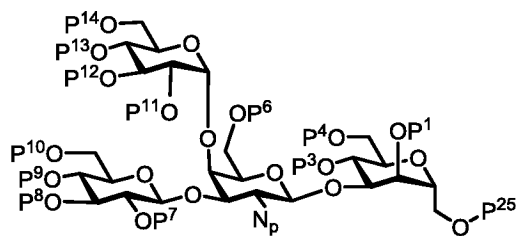
(I5f)



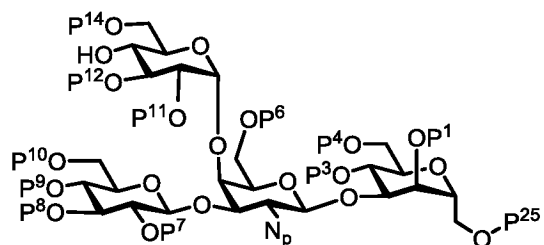
(I5g)



(I5h)

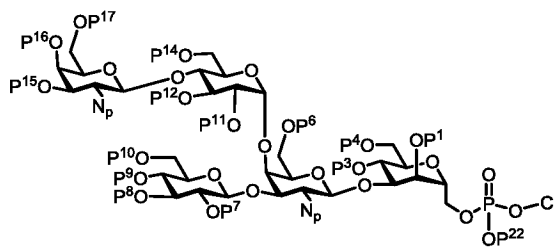


(I5i)

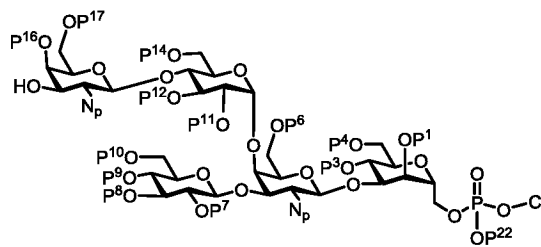


(I5j)

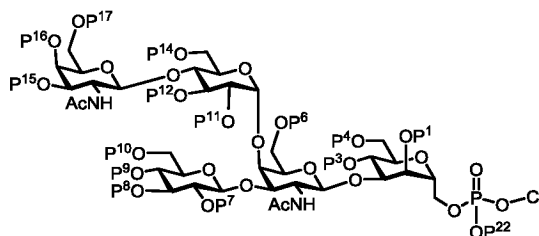




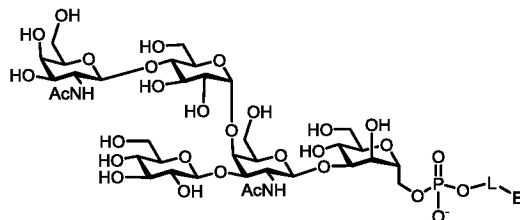
(I6a)



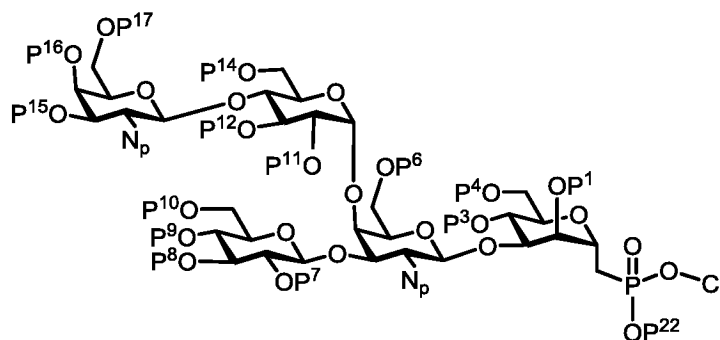
(I6b)



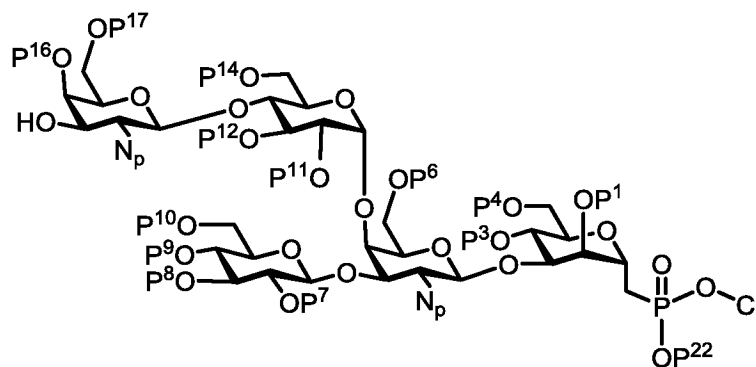
(I6c)



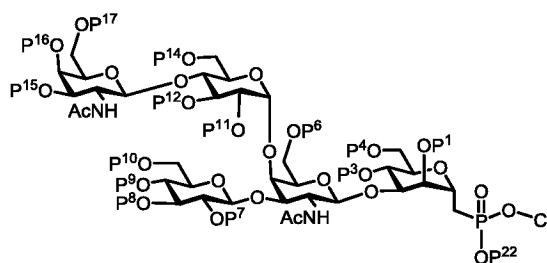
(I6d)



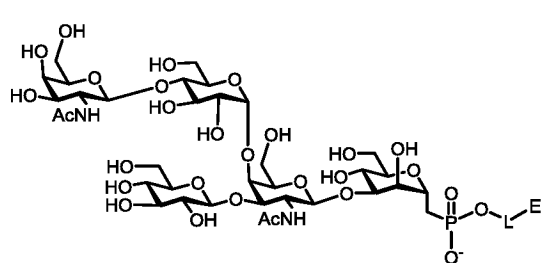
(I6e)



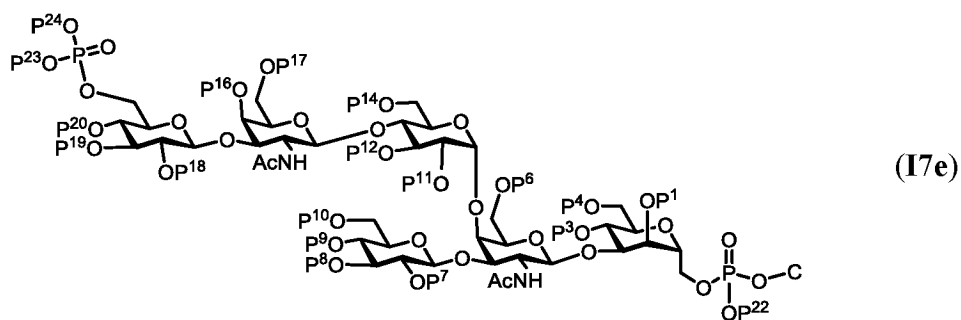
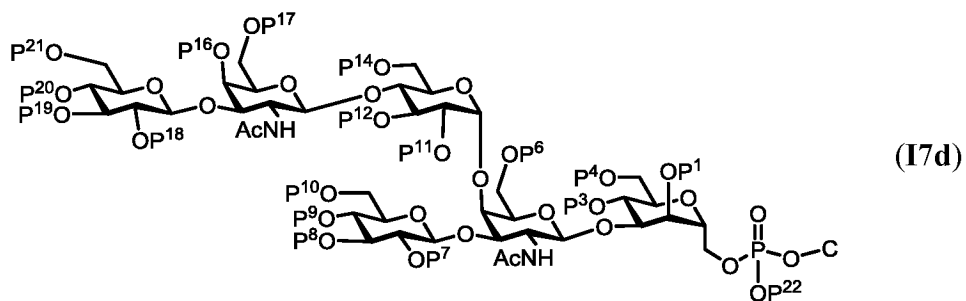
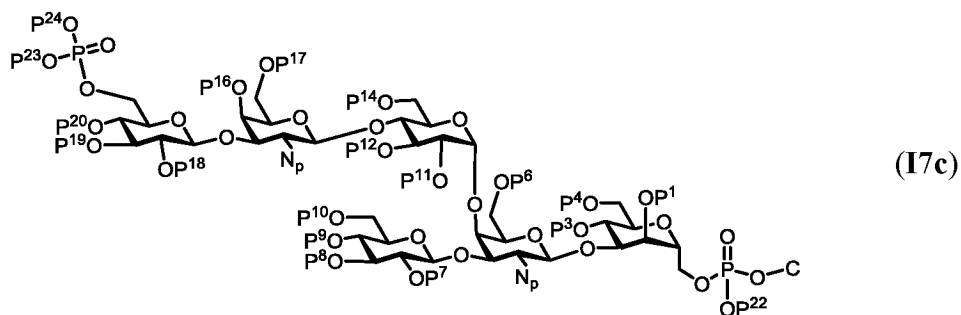
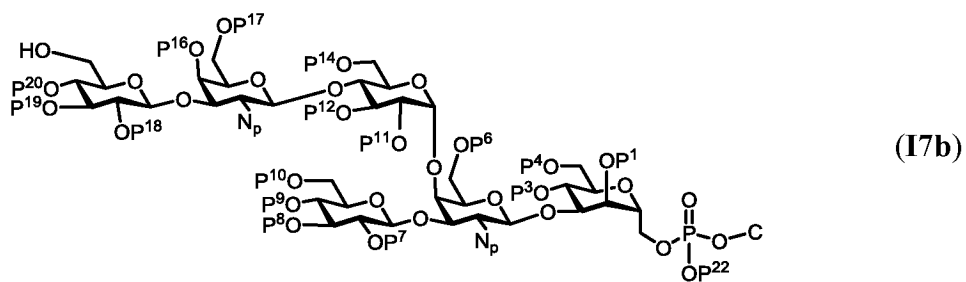
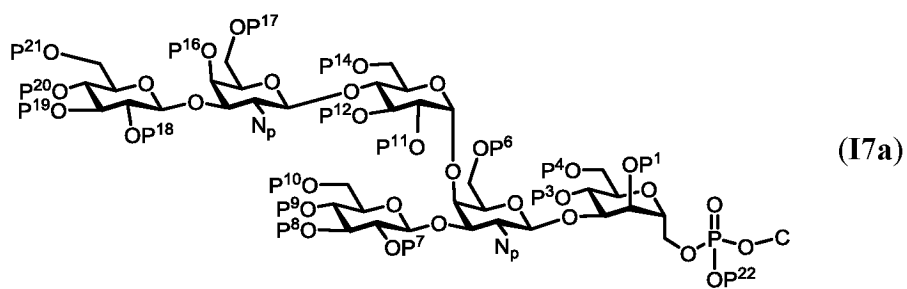
(I6f)

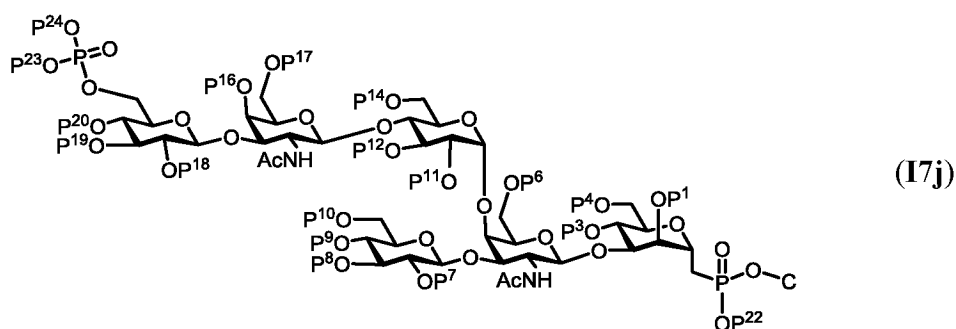
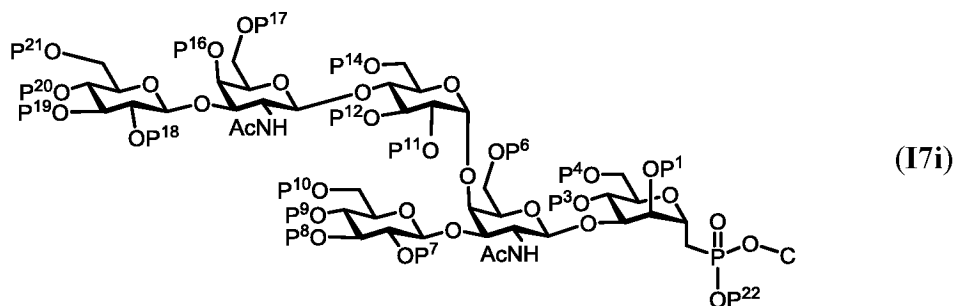
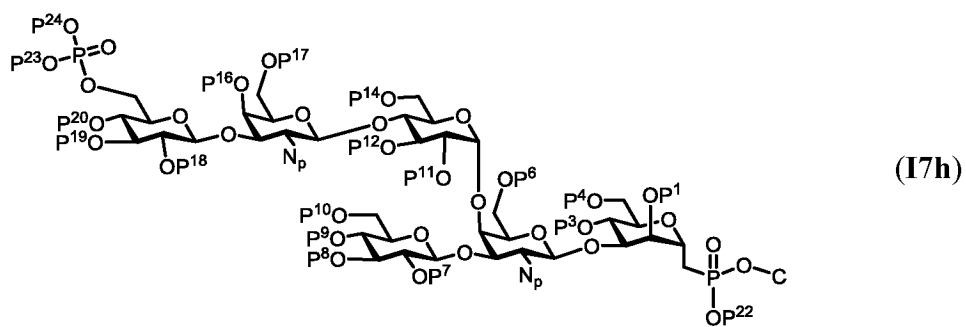
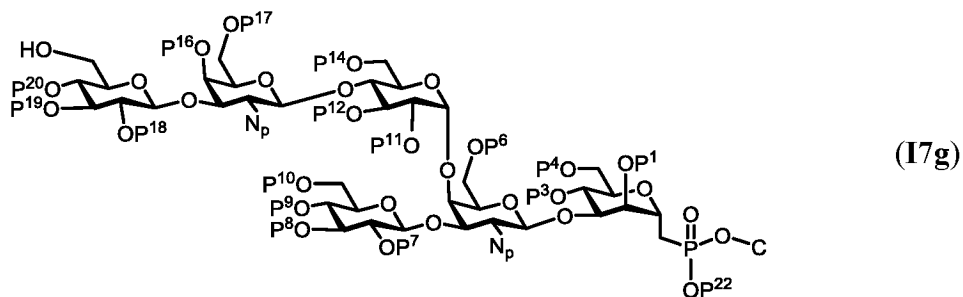
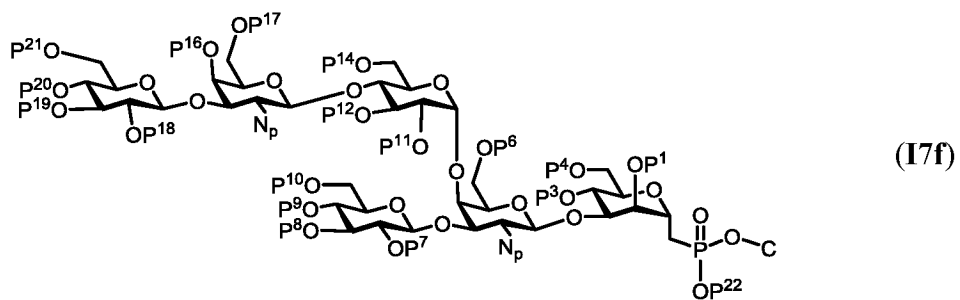


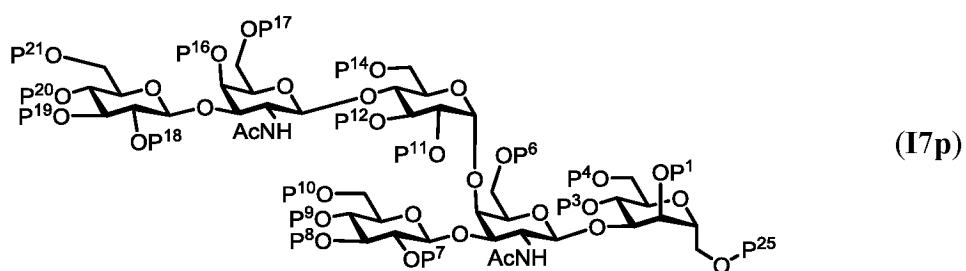
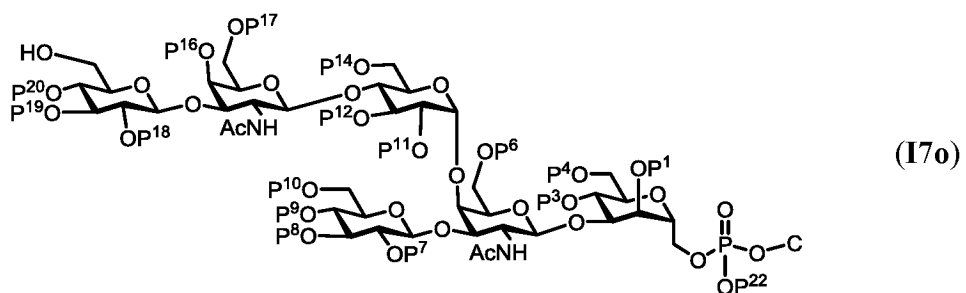
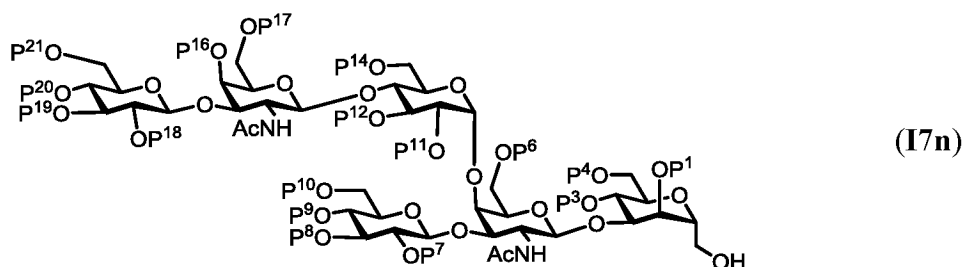
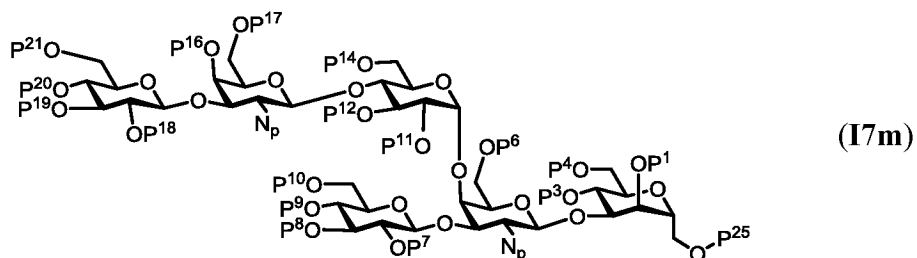
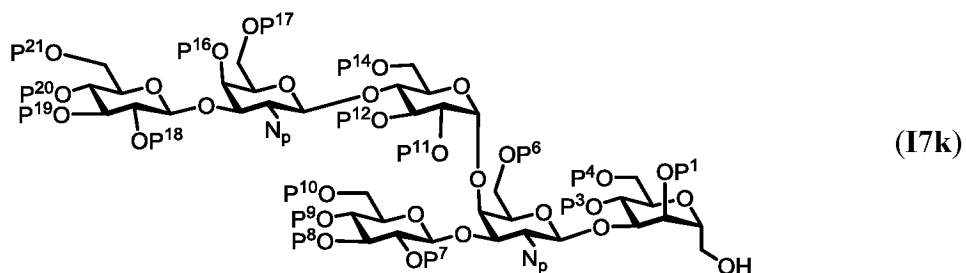
(I6g)



(I6h)







где С представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу E,

5  $P^1, P^2, P^3, P^4, P^5, P^6, P^7, P^8, P^9, P^{10}, P^{11}, P^{12}, P^{13}, P^{14}, P^{15}, P^{16}, P^{17}, P^{18}, P^{19}, P^{20}, P^{21}, P^{22}, P^{23}, P^{24}$  и  $P^{25}$  представляют собой защитные группы,  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу, LG представляет собой уходящую группу, и E и L имеют те же значения, как указано выше.

Более предпочтительными являются промежуточные соединения общих формул (I), (II), (II-a), (II-b), (III), (III-a) или (III-b), где промежуточное соединение имеет любую из общих формул (I2a), (I2b), (I2c), (I2d), (I2e), (I2f), (I4a), (I4b), (I4c), (I4d), (I4e), (I4f), (I4g), (I4h), (I4i), (I4j), (I5a), (I5b), (I5c), (I5d), (I5e), (I5f), (I5g), (I5h), (I5i), (I5j), (I6a), (I6b), (I6c), (I6d), (I6e), (I6f), (I6g), (I6h), (I7a), (I7b), (I7c), (I7d), (I7e), (I7f), (I7g), (I7h), (I7i), (I7j), (I7k), (I7m), (I7n), (I7o) или (I7p).

В формулах (I2a), (I2b), (I2c), (I2d), (I2e), (I2f), (I4a), (I4b), (I4c), (I4d), (I4e), (I4f), (I4g), (I4h), (I4i), (I4j), (I5a), (I5b), (I5c), (I5d), (I5e), (I5f), (I5g), (I5h), (I5i), (I5j), (I6a), (I6b), (I6c), (I6d), (I6e), (I6f), (I6g), (I6h), (I7a), (I7b), (I7c), (I7d), (I7e), (I7f), (I7g), (I7h), (I7i), (I7j), (I7k), (I7m), (I7n), (I7o) или (I7p) предпочтительно линкер  $-L-$  представляет собой  $-L^a-$ ,  $-L^a-L^c-$ ,  $-L^a-L^b-L^c-$ , или  $-L^a-L^d-L^c-$ ;

$-L^a-$  представляет собой  $-(CH_2)_o-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_o-C_2H_4-$ , или  $-(CH_2-CH_2-O)_o-CH_2-$ ;

$-L^b-$  представляет собой  $-O-$ ;

$-L^d-$  представляет собой  $-(CH_2)_q-$ ,  $-(CH(OH))_q-$ ,  $-(CF_2)_q-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_q-C_2H_4-$ , или  $-(CH_2-CH_2-O)_q-CH_2-$ ;

$-L^c-$  представляет собой  $-(CH_2)_{p1}-$ ,  $-(CF_2)_{p1}-$ ,  $-C_2H_4-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$ ,  $-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$  или  $-(CH_2)_{p1}-O-(CH_2)_{p2}-$ ; и

**o**, **q**, **p1** и **p2** представляют собой независимо друг от друга целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, и 6.

Особенно предпочтительное промежуточное соединение представляет собой промежуточное соединение формулы (I2a), (I2b), (I2c), (I2d), (I2e), (I2f), (I4a), (I4b), (I4c), (I4d), (I4e), (I4f), (I4g), (I4h), (I4i), (I4j), (I5a), (I5b), (I5c), (I5d), (I5e), (I5f), (I5g), (I5h), (I5i), (I5j), (I6a), (I6b), (I6c), (I6d), (I6e), (I6f), (I6g), (I6h), (I7a), (I7b), (I7c), (I7d), (I7e), (I7f), (I7g), (I7h), (I7i), (I7j), (I7k), (I7m), (I7n), (I7o) или (I7p), где  $-L-$  представляет собой  $-(CH_2)_o-$  и  $o$  представляет собой целое число, выбранное из 2, 5 и 6.

$P^1$ ,  $P^2$ ,  $P^3$ ,  $P^4$ ,  $P^5$ ,  $P^6$ ,  $P^7$ ,  $P^8$ ,  $P^9$ ,  $P^{10}$ ,  $P^{11}$ ,  $P^{12}$ ,  $P^{13}$ ,  $P^{14}$ ,  $P^{15}$ ,  $P^{16}$ ,  $P^{17}$ ,  $P^{18}$ ,  $P^{19}$ ,  $P^{20}$ ,  $P^{21}$ ,  $P^{22}$ ,  $P^{23}$ ,  $P^{24}$  и  $P^{25}$  являются подходящими защитными группами для гидроксильных групп, более предпочтительно разными подходящими защитными группами для гидроксильных групп, которые способны удаляться впоследствии друг за другом с помощью подходящей последовательности реакций снятия защиты.

Предпочтительными защитными группами для гидроксильных групп являются ацетил, фенил, бензил, изопропилиден, бензилиден, бензоил, *n*-метоксибензил, *n*-метоксибензилиден, *n*-метоксифенил, *n*-бромбензилиден, *n*-нитрофенил, аллил, ацетил,

изопропил, *n*-бромбензил, диметокситритил, тритил, 2-нафтилметил, пивалоил, триизопропилсилил, *трет*-бутилдиметилсилил, *трет*-бутилдифенилсилил, *трет*-бутилметокси-фенилсилил, триэтилсилил, триметилсилил, 2-триметилсилилэтоксиметил, 9-флуоренилметоксикарбонил, бензилоксиметил, метилоксиметил, *трет*-бутилоксиметил, метоксиэтилоксиметил, левулиноил.

Таким образом, промежуточные соединения (I2a), (I2b), (I2c), (I2d), (I2e), (I2f), (I4a), (I4b), (I4c), (I4d), (I4e), (I4f), (I4g), (I4h), (I4i), (I4j), (I5a), (I5b), (I5c), (I5d), (I5e), (I5f), (I5g), (I5h), (I5i), (I5j), (I6a), (I6b), (I6c), (I6d), (I6e), (I6f), (I6g), (I6h), (I7a), (I7b), (I7c), (I7d), (I7e), (I7f), (I7g), (I7h), (I7i), (I7j), (I7k), (I7m), (I7n), (I7o) или (I7p) являются особенно предпочтительными, когда защитные группы P<sup>3</sup>, P<sup>4</sup>, P<sup>8</sup> – P<sup>12</sup>, P<sup>14</sup>, P<sup>16</sup> – P<sup>20</sup> и P<sup>22</sup> – P<sup>24</sup> являются бензильными группами или ацетильными группами, защитная группа P<sup>1</sup> представляет собой бензоильную группу, защитные группы P<sup>7</sup> и P<sup>18</sup> представляют собой ацетильные группы, защитная группа P<sup>26</sup> представляет собой бензильную группу, и защитная группа P<sup>27</sup> представляет собой бензилоксикарбонильную группу (Cbz). Предпочтительно, защитная группа P<sup>21</sup> представляет собой *n*-бромбензил или *трет*-бутилдифенилсилил (TBDPS). Предпочтительно, защитная группа P<sup>25</sup> представляет собой 2-нафтилметильную группу.

Предпочтительно, Nr выбран из –N<sub>3</sub>, –NH–CO–CCl<sub>3</sub> и –NH–CO–O–CH<sub>2</sub>–CCl<sub>3</sub> (Трос). Таким образом, промежуточные соединения (I2a), (I2b), (I2c), (I2d), (I2e), (I2f), (I4a), (I4b), (I4c), (I4d), (I4e), (I4f), (I4g), (I4h), (I4i), (I4j), (I5a), (I5b), (I5c), (I5d), (I5e), (I5f), (I5g), (I5h), (I5i), (I5j), (I6a), (I6b), (I6c), (I6d), (I6e), (I6f), (I6g), (I6h), (I7a), (I7b), (I7c), (I7d), (I7e), (I7f), (I7g), (I7h), (I7i), (I7j), (I7k), (I7m), (I7n), (I7o) или (I7p) являются предпочтительными, когда Nr выбран из –N<sub>3</sub>, –NH–CO–CCl<sub>3</sub> и –NH–CO–O–CH<sub>2</sub>–CCl<sub>3</sub> (Трос). Особенно предпочтительными являются промежуточные соединения (I2a), (I2b), (I2c), (I2d), (I2e), (I2f), (I4a), (I4b), (I4c), (I4d), (I4e), (I4f), (I4g), (I4h), (I4i), (I4j), (I5a), (I5b), (I5c), (I5d), (I5e), (I5f), (I5g), (I5h), (I5i), (I5j), (I6a), (I6b), (I6c), (I6d), (I6e), (I6f), (I6g), (I6h), (I7a), (I7b), (I7c), (I7d), (I7e), (I7f), (I7g), (I7h), (I7i), (I7j), (I7k), (I7m), (I7n), (I7o) или (I7p), когда Nr представляет собой –NH–CO–O–CH<sub>2</sub>–CCl<sub>3</sub> (Трос).

### 30 Гликоконъюгаты

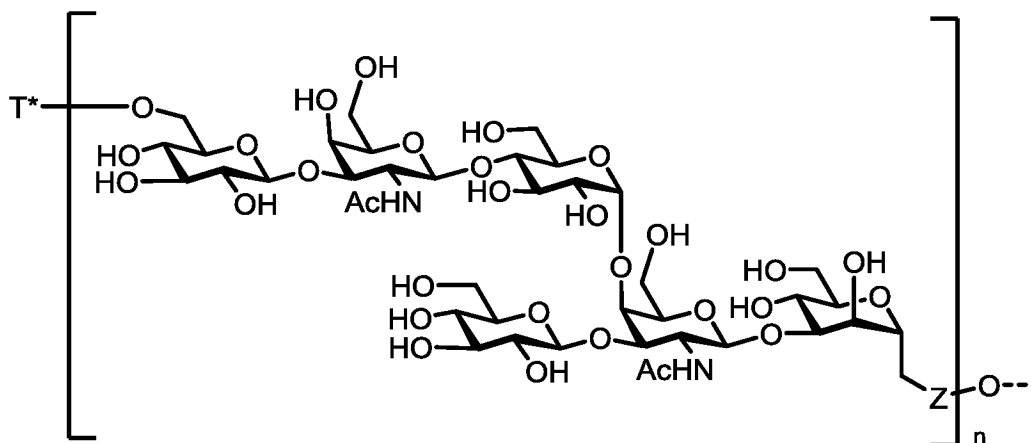
Другой аспект настоящего изобретения относится к конъюгату, который содержит сахарид общей формулы (I), ковалентно связанный или ковалентно присоединенный к иммуногенному носителю через концевую группу E группы –O–L–E. Другими словами, другой аспект настоящего изобретения направлен на сахарид любой из общих формул (I),

(II), (II-a), (II-b), (III), (III-a) или (III-b), конъюгированный с иммуногенным носителем через концевую группу E группы –O–L–E. Конъюгат, который содержит синтетический сахарид общей формулы (I), (II), (II-a), (II-b), (III), (III-a) или (III-b), ковалентно связанный или ковалентно присоединенный к иммуногенному носителю через концевую группу E группы –O–L–E, также определен как конъюгат, полученный путем введения в реакцию сахарада любой из общих формул (I), (II), (II-a), (II-b), (III), (III-a) или (III-b) с иммуногенным носителем. Неожиданно, указанный конъюгат оказался эффективным в качестве вакцины для иммунизации против заболеваний, связанных с бактериями *Clostridium difficile*.

10 Сахариды известны специалистам в данной области обычно как TI-2 (T-независимые от клеток типа 2) антигены и слабые иммуногены. Антигены TI-2 - это антигены, которые распознаются только зрелыми В-клетками посредством перекрестного связывания расположенных на поверхности рецепторов иммуноглобулинов. Без помощи Т-клеток не создается иммунологическая память, и не происходит ни переключение изотипа с IgM на другие подклассы IgG, ни созревание аффинности В-клеток. Более того, сахариды известны плохими иммуногенами у человека из-за структурной гомологии с человеческими гликолипидами и гликобелками. Из-за своих слабых иммуногенных свойств сахариды проявляют плохую способность продуцировать как антитела В-клетками, так и образовывать клетки памяти, особенности, которые необходимы для производства мощных вакцин.

20 Следовательно, для производства сильнодействующей вакцины на основе сахаридов конъюгируются сахариды общих формул (I), (II), (II-a), (II-b), (III), (III-a) или (III-b) с иммуногенным носителем для обеспечения конъюгатов, которые представляют повышенную иммуногенность по сравнению с сахаридом.

25 Следовательно, в объем настоящей заявки входит также конъюгат, который содержит фрагмент сахарада.



где  $n$ ,  $Z$  и  $T^*$  имеют значения, указанные в данном документе, ковалентно присоединены через  $O$  атом к иммуногенному носителю.

5 Указанный конъюгат включает по меньшей мере один синтетический сахарид общей формулы (I) и иммуногенный носитель, с которым ковалентно связан по меньшей мере один сахарид (I).

10 Неожиданно было обнаружено, что иммунизация с помощью конъюгата, который содержит сахарид общей формулы (I), ковалентно присоединенный к иммуногенному носителю, приводит к получению высоких титров антител, специфичных к углеводной части сахараида общей формулы (I). Указанные антитела подвергаются перекрестной реакции с природной клеточной стенкой PS-II *Clostridium difficile* и проявляют опсонофагоцитоз и бактерицидную активность, таким образом обеспечивая защиту от бактерий *Clostridium difficile*.

15 В этом контексте термин «иммуногенный носитель» определяется как структура, которая конъюгирована с сахаридом с образованием конъюгата, который проявляет повышенную иммуногенность по сравнению с сахаридом *per se*. Таким образом, конъюгирование сахаридов общих формул (I), (II), (II-a), (II-b), (III), (III-a) или (III-b), с иммуногенным носителем имеет в качестве эффекта стимуляцию иммунного ответа  
20 против сахараида общей формулы (I) без индукции иммунного ответа против указанного иммуногенного носителя.

Предпочтительные иммуногенные носители являются белками-носителями (CP) или гликофинголипидами с иммуномодулирующими свойствами. Для специалиста в данной области белок-носитель (CP) представляет собой белок, который является  
25 нетоксичным и неактогенным, и может быть получен в достаточном количестве и чистотой. Белок-носитель выбирают из группы, которая включает или состоит из:



дифтерийного анатоксина, такого как CRM<sub>197</sub>, мутированного дифтерийного анатоксина, модифицированного дифтерийного анатоксина, мутированного и модифицированного дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, модифицированного столбнячного анатоксина, мутированного столбнячного анатоксина, 5 нелипидированного липоротеина клеточной поверхности (белок D) нетипируемого *Haemophilus influenzae*, белка внешней мембраны (OMP), комплекса *Neisseria meningitidis*, бычьего сывороточного альбумина (BSA), фиссуреллового гемоцианина (KLH) или холерного анатоксина (CT). Термин «анатоксин», используемый в данном документе, относится к бактериальному токсину (обычно экзотоксину), токсичность которого была инактивирована или подавлена либо 10 химической (формалин), либо термической обработкой, в то время как другие свойства, как правило, иммуногенность, сохраняются. Мутировавший анатоксин, используемый в данном документе, представляет собой рекомбинантный бактериальный токсин, который был изменен, чтобы быть менее токсичным или даже нетоксичным, путем 15 изменения аминокислотной последовательности дикого типа. Такая мутация может быть заменой одной или нескольких аминокислот. Такой мутировавший анатоксин представляет на своей поверхности функциональную группу, которая может взаимодействовать с функциональной группой Y соединяющей молекулы с образованием модифицированного анатоксина. Указанная функциональность известна 20 специалисту в данной области и включает, но не ограничивается ими, первичную функциональную аминокислотную группу остатка лизина, который может взаимодействовать с активированными сложными эфирами, изоцианатной группой или альдегидом в присутствии восстанавливающего агента, карбоксилатную функциональную группу остатка глутамата или аспартата, который может быть активирован карбодиимидами, 25 или тиольную функциональную группу остатка цистеина.

Активированные сложные эфиры включают сложный N- ( $\gamma$ -малеимидобутирилокси)сульфосукцинимидный эфир (сульфо-GMBS), 30 сукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоат (сульфо-SIAB), сукцинимидил-3-(бромацетамидо)пропионат (SBAP), дисукцинимидил глутарат (DSG), дисукцинимидил адипат (DSA), 2-пиридилдитиол-тетраоксатетрадекан-N-гидроксисукцинимид (PEG-4-SPDP) (см. **Фигуру 2**).

Остаток цистеина на белке-носителе может быть превращен в соответствующий дегидроаланин, который может далее взаимодействовать с подходящей связывающей

молекулой с получением модифицированного белка-носителя, имеющего на своей поверхности функциональную группу X соединяющей молекулы.

Особенно предпочтительным является, когда сахараиды общей формулы I конъюгированы с нетоксичным мутированным дифтерийным токсином CRM<sub>197</sub>, представляющим в качестве функциональных групп первичные аминные функциональные группы остатка лизина.

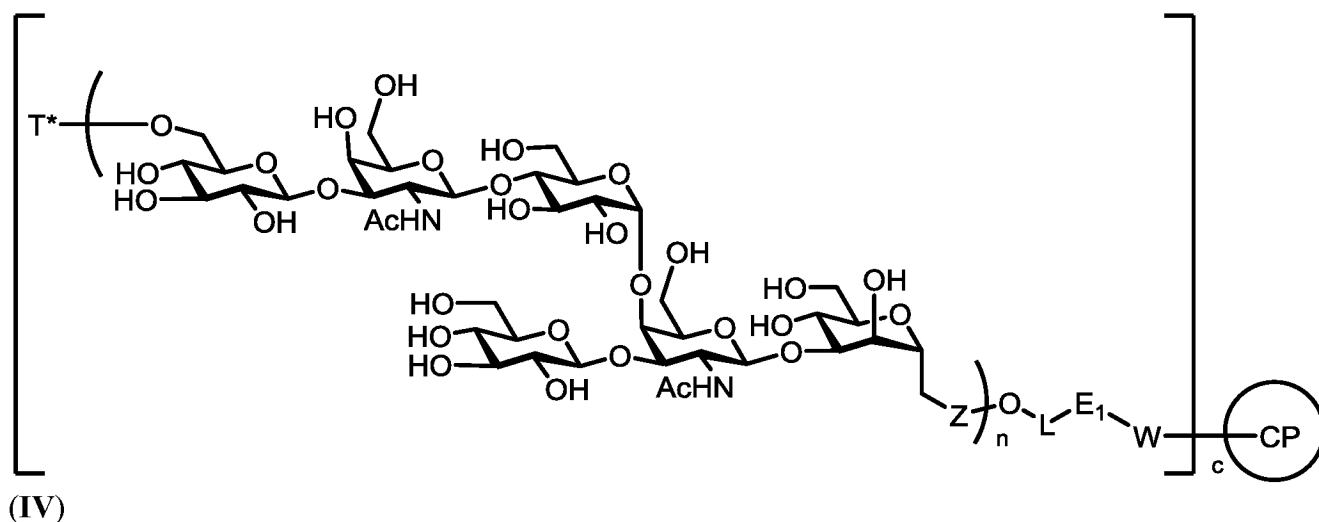
CRM<sub>197</sub>, как дифтерийный токсин дикого типа, представляет собой единую полипептидную цепь из 535 аминокислот (58 кДа), состоящую из двух субъединиц, связанных дисульфидными мостиками, имеющими единственное аминокислотную замену глутаминовой кислоты на глицин. Он используется в качестве белка-носителя в ряде одобренных конъюгатных вакцин от заболеваний, как например Prevnar.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления изобретения белок-носитель представляет на своей поверхности первичные функциональные аминогруппы остатков лизина, которые способны взаимодействовать с функциональной группой Y соединяющей молекулы с образованием модифицированного белка-носителя, имеющего на своей поверхности указанную функциональную группу X соединяющей молекулы, которая способна взаимодействовать с концевой аминогруппой линкеров соединений общей формулы (I).

Указанная функциональная группа X соединяющих молекул выбрана из группы, которая содержит или состоит из следующих: малеимид,  $\alpha$ -йодацетил,  $\alpha$ -бромацетил, и сложный N-гидроксисукцинимидный эфир (NHS), альдегид, сложный имидозфир, карбоновая кислота, алкилсульфонат, сульфонилахлорид, эпоксид, ангидрид, карбонат (см. **Фигуру 3**).

Предпочтительно, сахараид общей формулы I конъюгирован с нетоксичным мутированным дифтерийным токсином CRM<sub>197</sub>, который модифицирован малеимидом. В еще одном другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, сахараид общей формулы I конъюгирован с нетоксичным мутированным дифтерийным токсином CRM<sub>197</sub>, который модифицирован  $\alpha$ -бромацетамидом. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения сахараид общей формулы I конъюгирован с нетоксичным мутированным дифтерийным токсином CRM<sub>197</sub>, который модифицирован N-гидроксисукцинимид адипатом.

Предпочтительным является конъюгат общей формулы (IV)



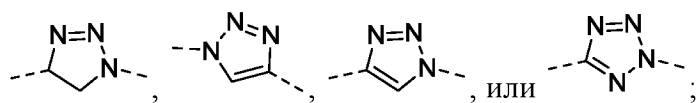
5

где

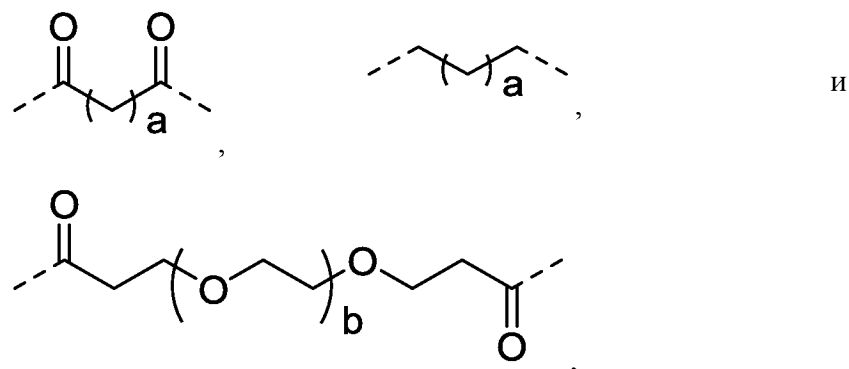
c находится в диапазоне между 2 и 18;

-E<sub>1</sub>- представляет собой ковалентную связь, -NH-, -O-NH-, -O-, -S-, -CO-,  
-CH=CH-, -CONH-, -CO-NHNH-,

10



-W- выбран из:



a представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10,

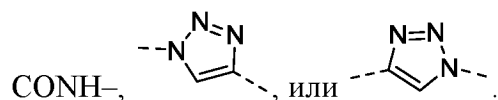
b представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3 и 4,

CP представляет собой белок-носитель; и

15

n, L, Z и T\* имеют значения, указанные в данном документе.

Предпочтительно E<sub>1</sub> представляет собой ковалентную связь, -NH-, -CH=CH-, -



Предпочтительно СР представляет собой CRM<sub>197</sub>. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения конъюгат имеет общую формулу (IV), где СР представляет собой CRM<sub>197</sub> и с, -E<sub>1</sub>-, W, n, L, Z и T\* имеют значения, указанные в данном документе.

5 Предпочтительно, в общей формуле (IV) линкер -L- выбран из: -L<sup>a</sup>-, -L<sup>a</sup>-L<sup>e</sup>-, -L<sup>a</sup>-L<sup>b</sup>-L<sup>e</sup>-, и -L<sup>a</sup>-L<sup>d</sup>-L<sup>e</sup>-;

-L<sup>a</sup>- выбран из: -(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>o</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>o</sub>-CH<sub>2</sub>-;

-L<sup>b</sup>- представляет собой -O-;

-L<sup>d</sup>- выбран из: -(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-, -(CF<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>q</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-, и

10 -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>q</sub>-CH<sub>2</sub>-;

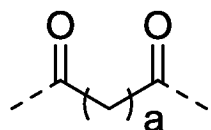
-L<sup>e</sup>- выбран из: -(CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>-, -(CF<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>-, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>-,

-CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>- и -(CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p2</sub>-;

и o, q, p1 и p2 представляют собой независимо друг от друга целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, и 6.

15

Также конъюгат общей формулы (IV), где -W- представляет собой



, и a представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6,

является предпочтительным.

Конъюгат общей формулы (IV), где

линкер -L- выбран из: -L<sup>a</sup>-, -L<sup>a</sup>-L<sup>e</sup>-, -L<sup>a</sup>-L<sup>b</sup>-L<sup>e</sup>-, и -L<sup>a</sup>-L<sup>d</sup>-L<sup>e</sup>-;

20 -L<sup>a</sup>- выбран из: -(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>o</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>o</sub>-CH<sub>2</sub>-;

-L<sup>b</sup>- представляет собой -O-;

-L<sup>d</sup>- выбран из: -(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-, -(CF<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>q</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-, и

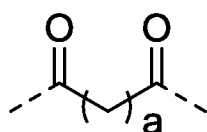
-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>q</sub>-CH<sub>2</sub>-;

-L<sup>e</sup>- выбран из: -(CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>-, -(CF<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>-, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>-,

25 -CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>- и -(CH<sub>2</sub>)<sub>p1</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p2</sub>-;

o, q, p1 и p2 представляют собой независимо друг от друга целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, и 6;

-W- представляет собой



, и a представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6,

является особенно предпочтительным.

Даже более предпочтительным является конъюгат общей формулы (IV), где  $n$  выбран из 1, 2 или 3;

линкер  $-L-$  выбран из:  $-L^a-$ ,  $-L^a-L^e-$ ,  $-L^a-L^b-L^e-$ , и  $-L^a-L^d-L^e-$ ;

5  $-L^a-$  выбран из:  $-(CH_2)_o-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_o-C_2H_4-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_o-CH_2-$ ;

$-L^b-$  представляет собой  $-O-$ ;

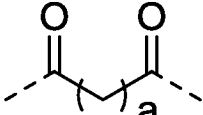
$-L^d-$  выбран из:  $-(CH_2)_q-$ ,  $-(CF_2)_q-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_q-C_2H_4-$ , и

$-(CH_2-CH_2-O)_q-CH_2-$ ;

$-L^e-$  выбран из:  $-(CH_2)_{p1}-$ ,  $-(CF_2)_{p1}-$ ,  $-C_2H_4-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$ ,

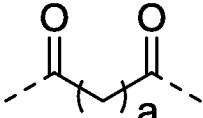
10  $-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$  и  $-(CH_2)_{p1}-O-(CH_2)_{p2}-$ ;

$o$ ,  $q$ ,  $p1$  и  $p2$  представляют собой независимо друг от друга целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, и 6;

$-W-$  представляет собой , и  $a$  представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6.

Особенно предпочтительным является конъюгат общей формулы (IV), где линкер  $-L-$  представляет собой  $-(CH_2)_o-$ ,

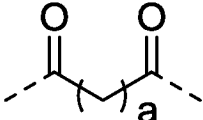
15  $o$  представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6;

$-W-$  представляет собой , и  $a$  представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6.

Особенно предпочтительным является конъюгат общей формулы (IV), где  $n$  представляет собой целое число от 1, 2 или 3;

20 линкер  $-L-$  представляет собой  $-(CH_2)_o-$ ,

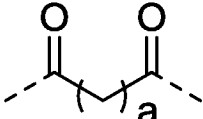
$o$  представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6;

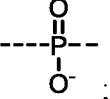
$-W-$  представляет собой , и  $a$  представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6.

Особенно предпочтительным является конъюгат общей формулы (IV), где  $n$  представляет собой целое число от 1, 2 или 3;

линкер  $-L-$  представляет собой  $-(CH_2)_o-$ ,

о представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6;

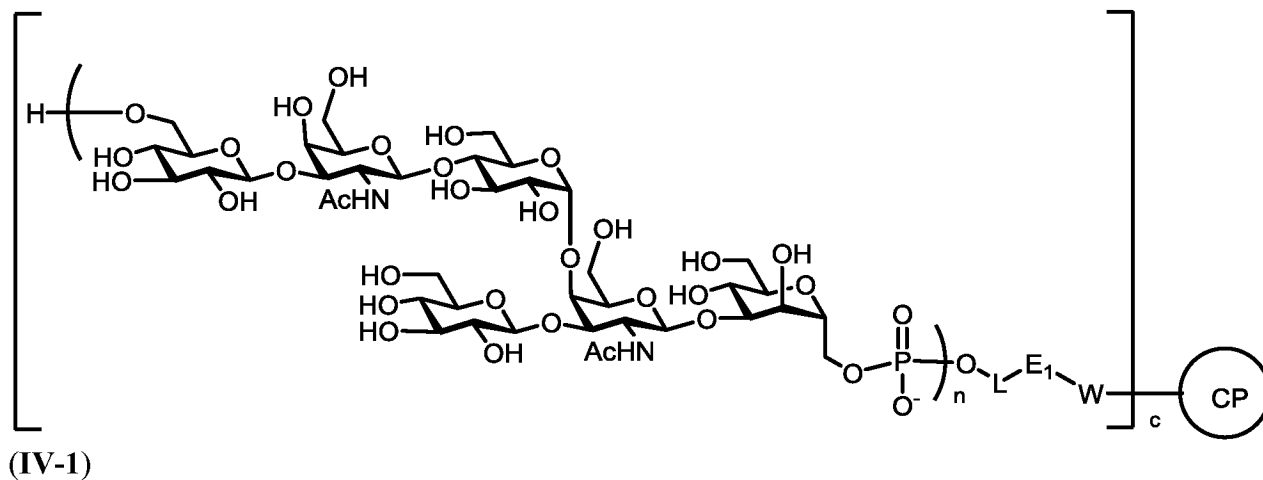
$-W-$  представляет собой , и а представляет собой целое число, выбранное собой из 2, 3, 4, 5 и 6:

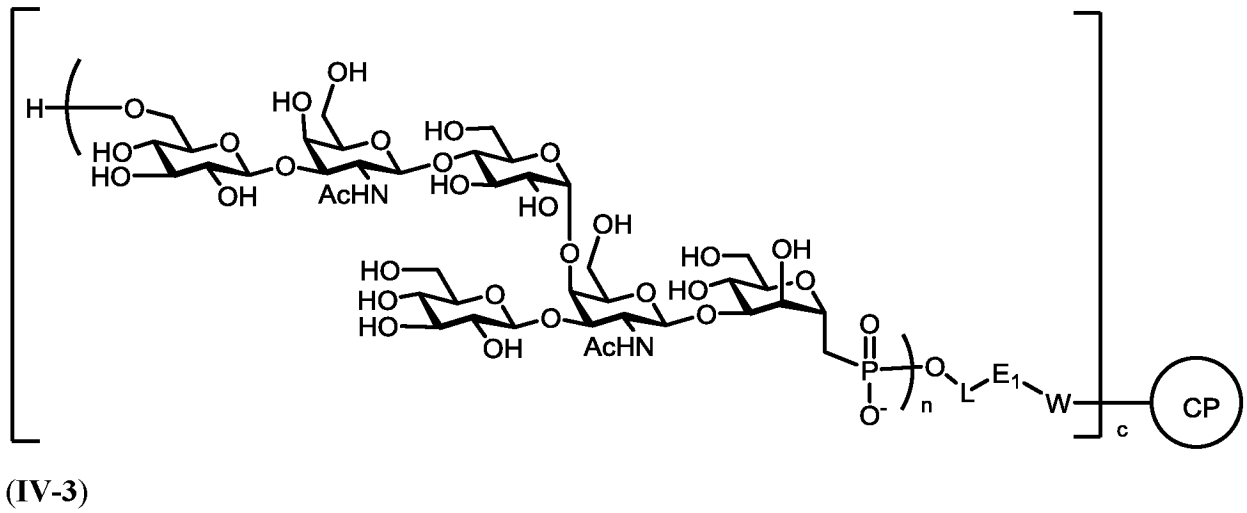
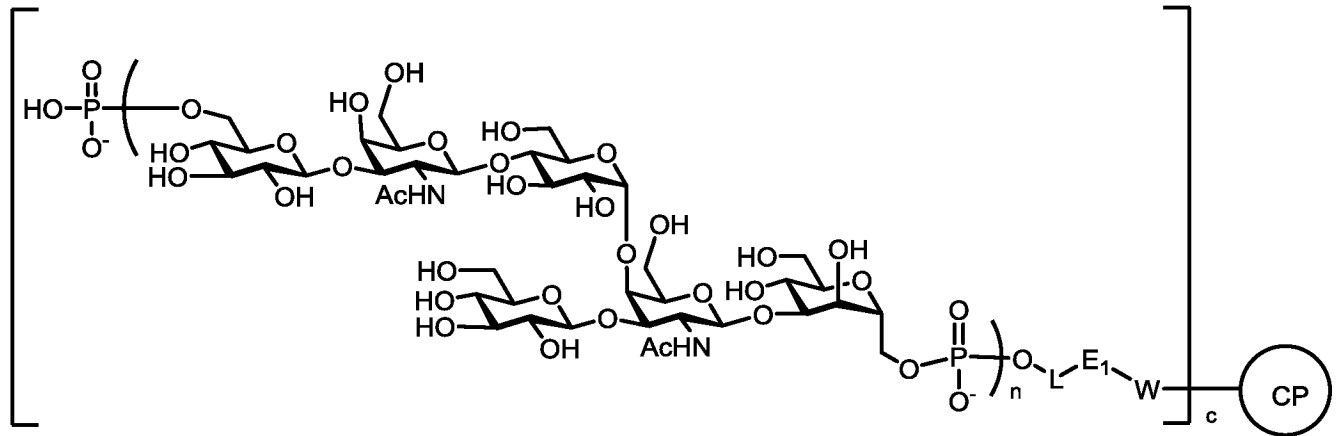
и Z представляет собой ;

- 5 Предпочтительно с находится в диапазоне между 2 и 18, более предпочтительно между 5 и 15, даже более предпочтительно между 8 и 12. Также предпочтительно, когда n представляет собой 1.

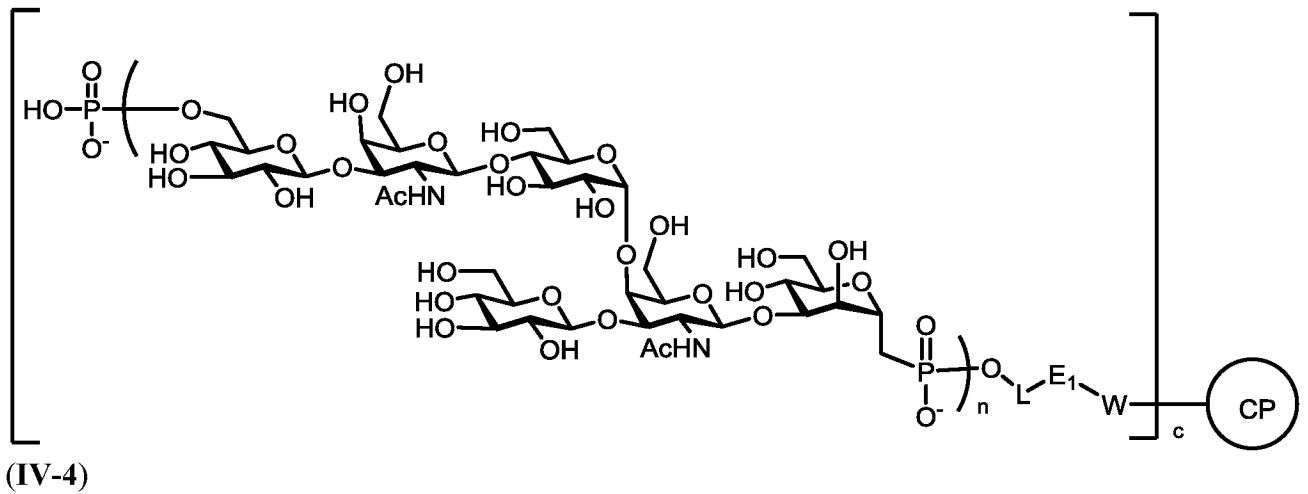
Более предпочтительным является конъюгат любой из формул (IV-1) – (IV-4):

10





5

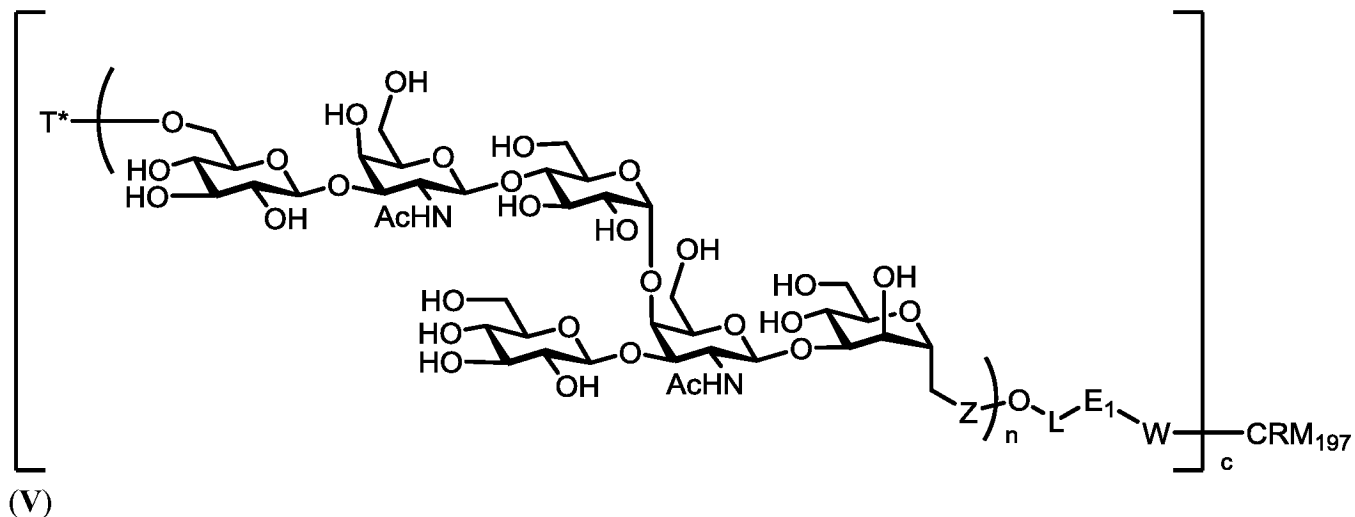


где L, E<sub>1</sub>, W, c, CP, и n имеют те же значения, которые указаны выше.

10

Особенно предпочтительным является конъюгат формулы (IV-2), где L представляет собой  $-(CH_2)_5-$ , E<sub>1</sub> представляет собой  $-NH-$ , n представляет собой целое число, выбранное из 1 или 2, и с и W имеют те же значения, которые указаны выше.

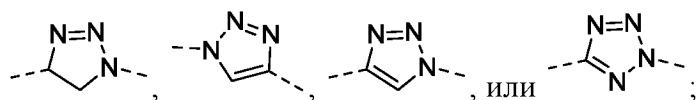
5 Предпочтительным также является конъюгат общей формулы (V)



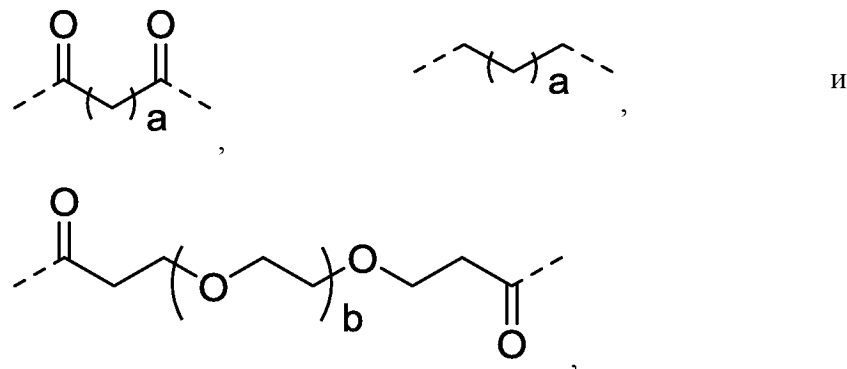
где

10 с находится в диапазоне между 2 и 18;

$-E_1-$  представляет собой ковалентную связь,  $-NH-$ ,  $-O-NH-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-CO-$ ,  $-CH=CH-$ ,  $-CONH-$ ,  $-CO-NHNH-$ ,



$-W-$  выбран из:



15 а представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10,

б представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3 и 4; и

n, L, Z и T\* имеют значения, указанные в данном документе.



Конъюгат общей формулы (V), где

линкер  $-L-$  выбран из:  $-L^a-$ ,  $-L^a-L^e-$ ,  $-L^a-L^b-L^e-$ , и  $-L^a-L^d-L^e-$ ;

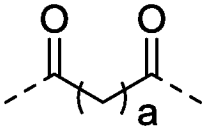
$-L^a-$  выбран из:  $-(CH_2)_o-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_o-C_2H_4-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_o-CH_2-$ ;

$-L^b-$  представляет собой  $-O-$ ;

5  $-L^d-$  выбран из:  $-(CH_2)_q-$ ,  $-(CF_2)_q-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_q-C_2H_4-$ , и  $-(CH_2-CH_2-O)_q-CH_2-$ ;

$-L^e-$  выбран из:  $-(CH_2)_{p1}-$ ,  $-(CF_2)_{p1}-$ ,  $-C_2H_4-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$ ,  $-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$  и  $-(CH_2)_{p1}-O-(CH_2)_{p2}-$ ;

10  $o$ ,  $q$ ,  $p_1$  и  $p_2$  представляют собой независимо друг от друга целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, и 6;

$-W-$  представляет собой , и  $a$  представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6, является особенно предпочтительным.

Даже более предпочтительным является конъюгат общей формулы (V), где

$n$  выбран из 1, 2 или 3;

линкер  $-L-$  выбран из:  $-L^a-$ ,  $-L^a-L^e-$ ,  $-L^a-L^b-L^e-$ , и  $-L^a-L^d-L^e-$ ;

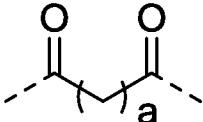
15  $-L^a-$  выбран из:  $-(CH_2)_o-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_o-C_2H_4-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_o-CH_2-$ ;

$-L^b-$  представляет собой  $-O-$ ;

$-L^d-$  выбран из:  $-(CH_2)_q-$ ,  $-(CF_2)_q-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_q-C_2H_4-$ , и  $-(CH_2-CH_2-O)_q-CH_2-$ ;

20  $-L^e-$  выбран из:  $-(CH_2)_{p1}-$ ,  $-(CF_2)_{p1}-$ ,  $-C_2H_4-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$ ,  $-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$  и  $-(CH_2)_{p1}-O-(CH_2)_{p2}-$ ;

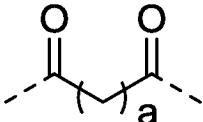
$o$ ,  $q$ ,  $p_1$  и  $p_2$  представляют собой независимо друг от друга целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, и 6;

$-W-$  представляет собой , и  $a$  представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6.

Особенно предпочтительным является конъюгат общей формулы (V), где линкер  $-L-$

25 представляет собой  $-(CH_2)_o-$ ,

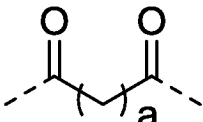
$o$  представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6;

–W– представляет собой , и a представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6.

Особенно предпочтительным является конъюгат общей формулы (V), где n представляет собой целое число от 1, 2 или 3;

линкер –L– представляет собой  $-(CH_2)_o-$ ,

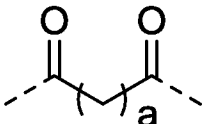
5 o представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6;

–W– представляет собой , и a представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6.

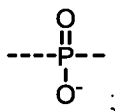
Особенно предпочтительным является конъюгат общей формулы (V), где n представляет собой целое число от 1, 2 или 3;

линкер –L– представляет собой  $-(CH_2)_o-$ ,

10 o представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6;

–W– представляет собой , и a представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6:

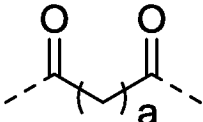
и Z представляет собой



Особенно предпочтительным является конъюгат общей формулы (V), где n представляет собой целое число от 1, 2 или 3;

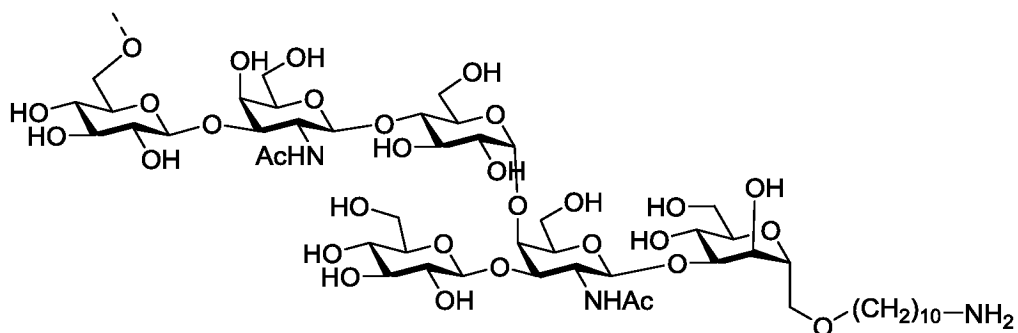
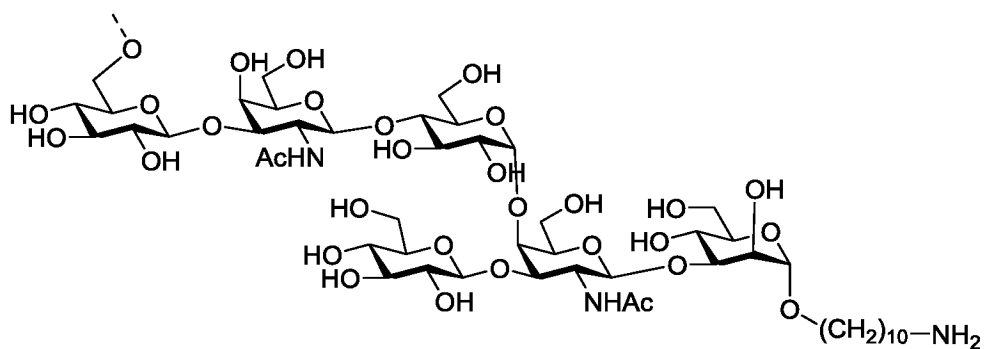
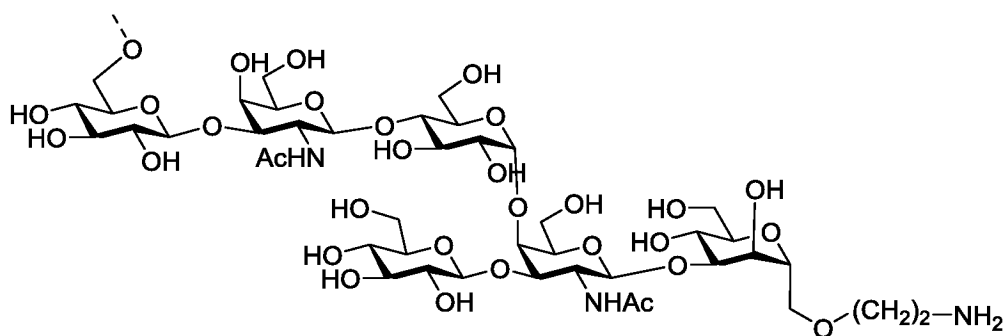
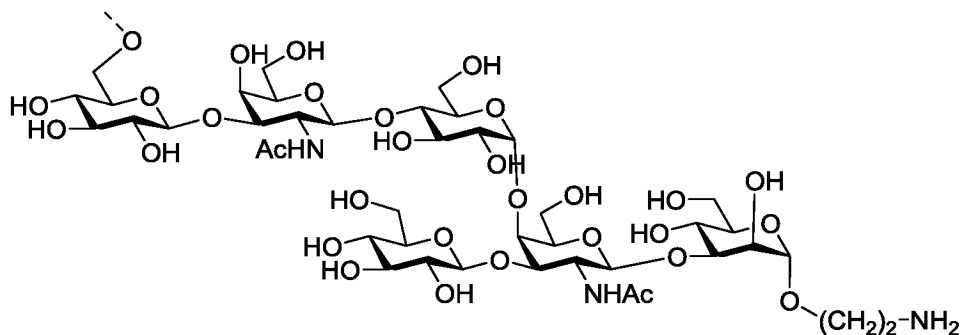
15 линкер –L– представляет собой  $-(CH_2)_o-$ ,

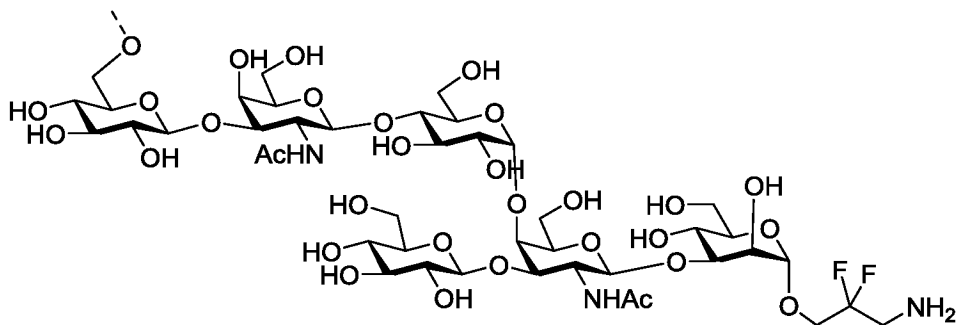
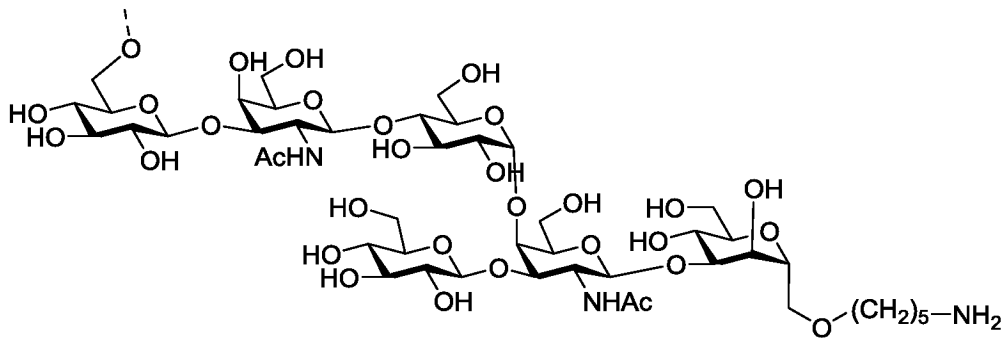
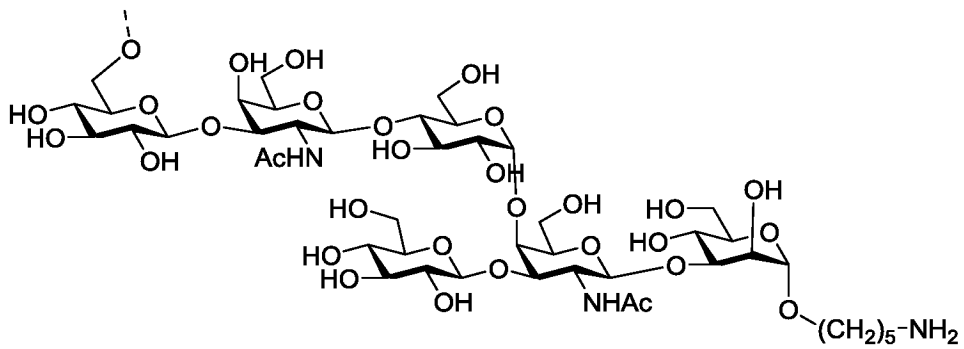
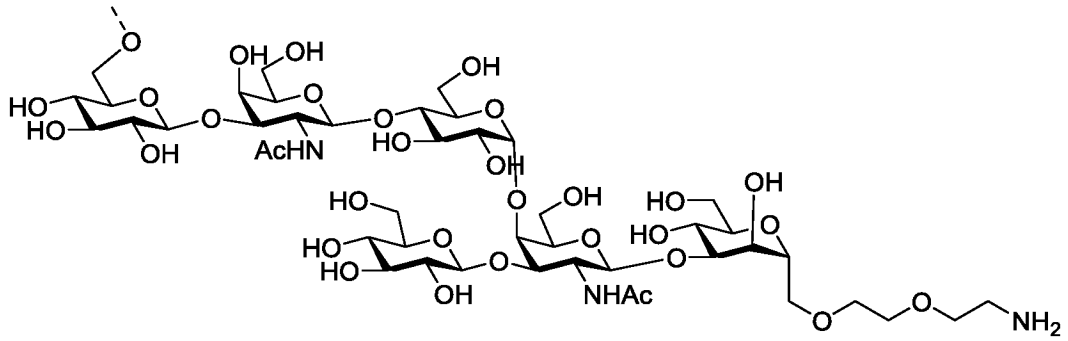
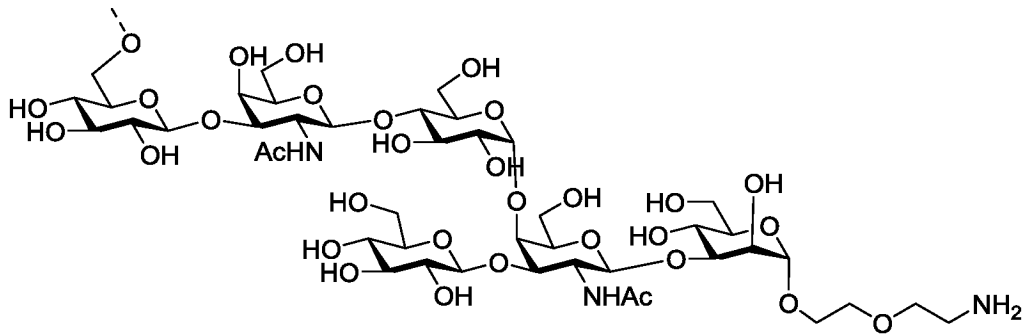
o представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6;

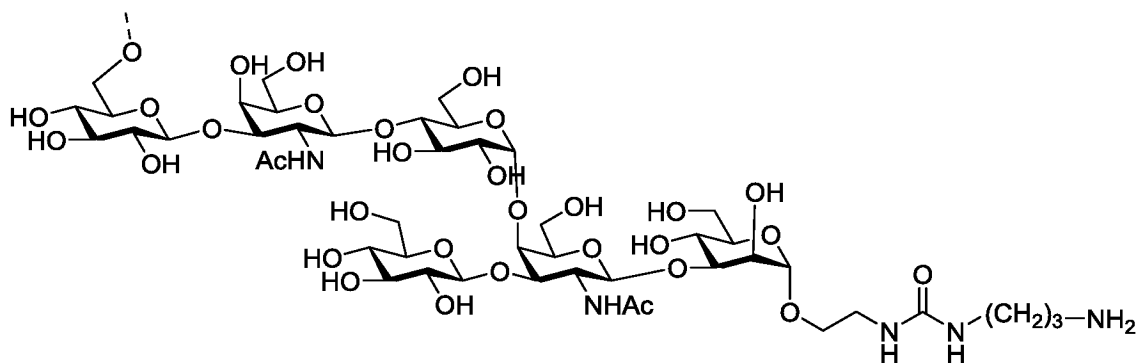
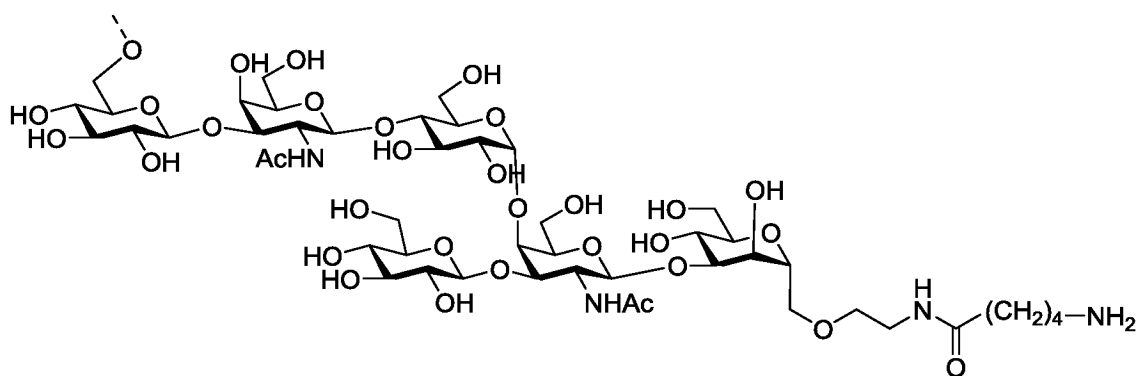
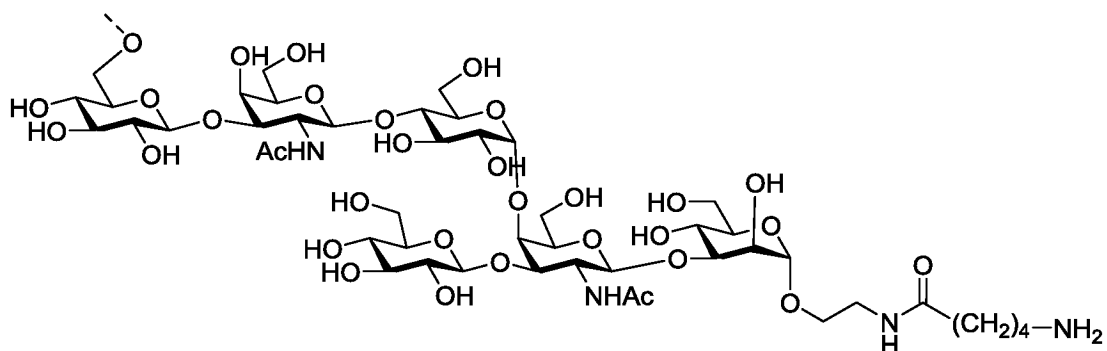
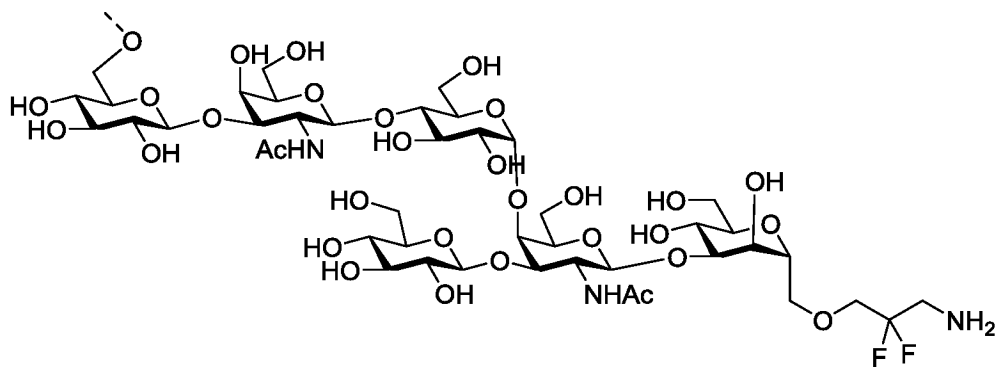
–W– представляет собой , и a представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6:

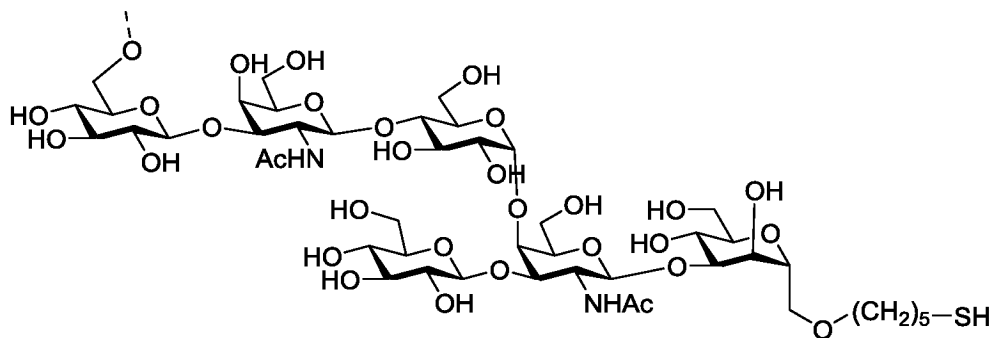
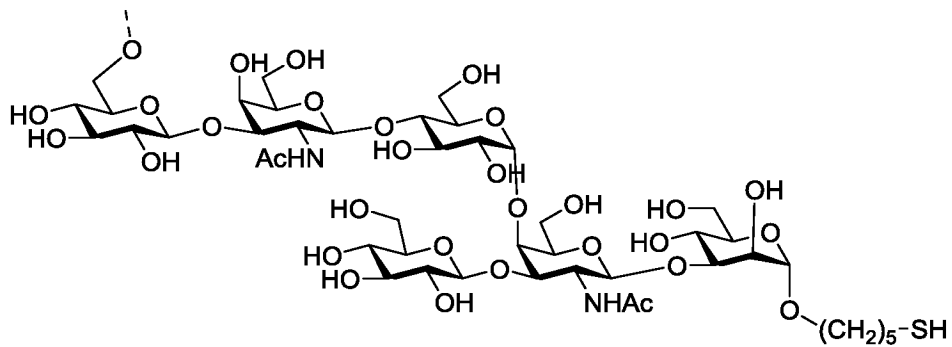
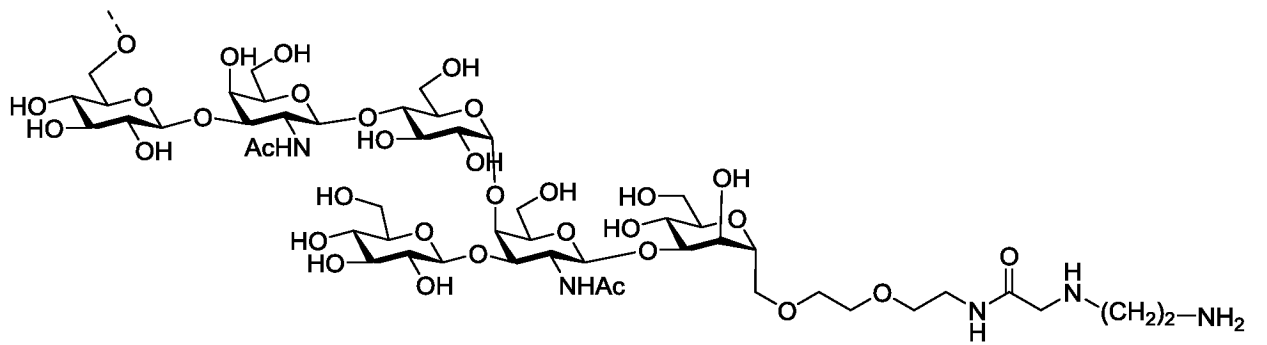
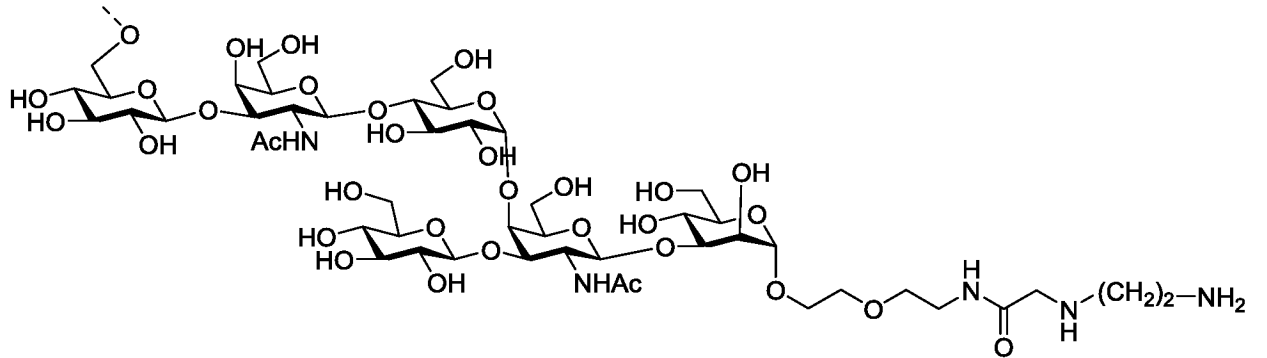
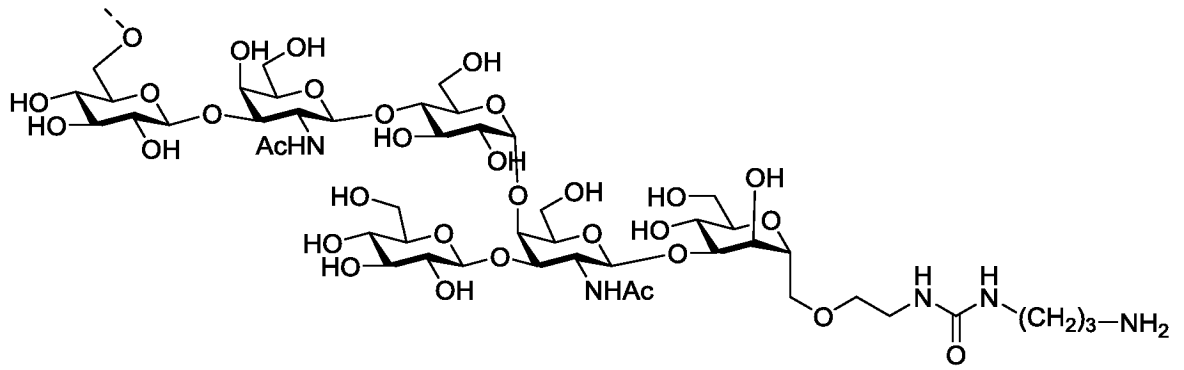
и T\* представляет собой фосфатную группу.

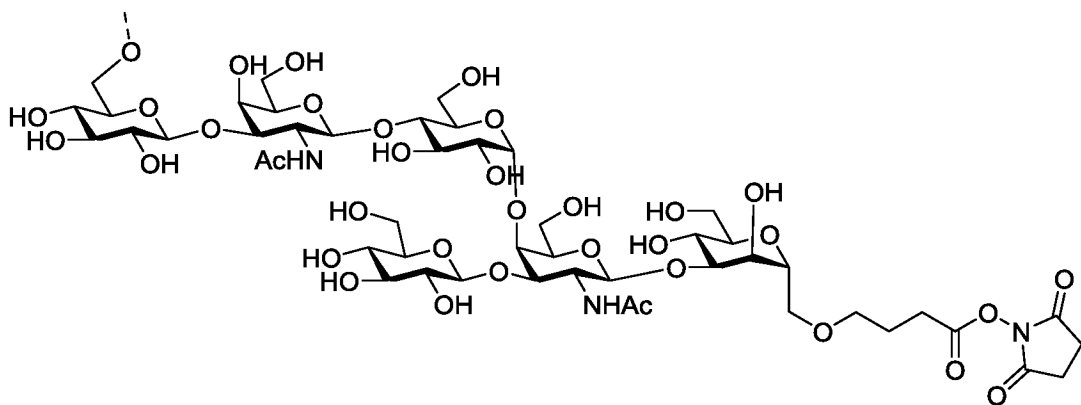
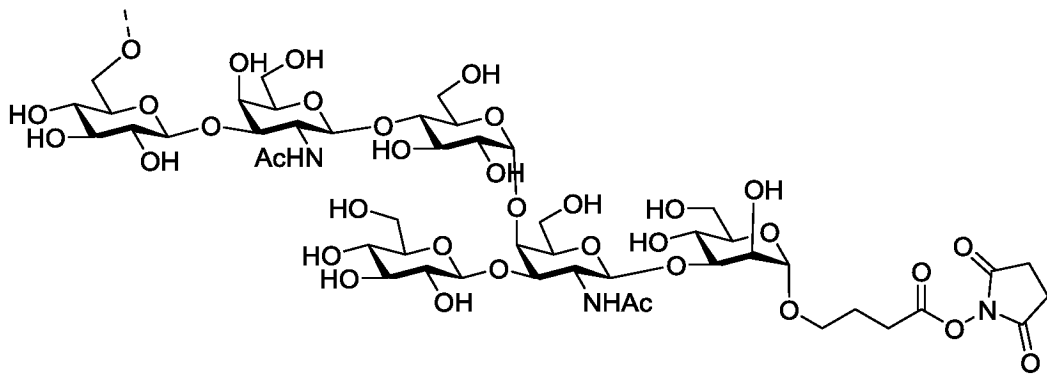
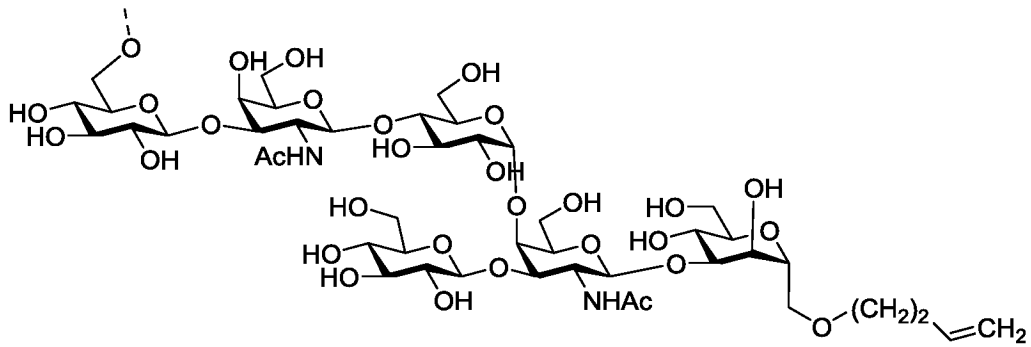
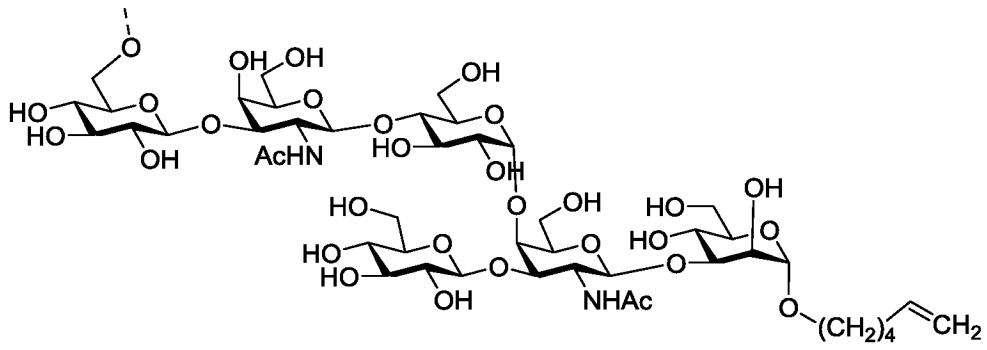
Также предпочтительным является конъюгат общей формулы (IV), где группа  $-O-L-E$  выбрана из группы, которая состоит из:



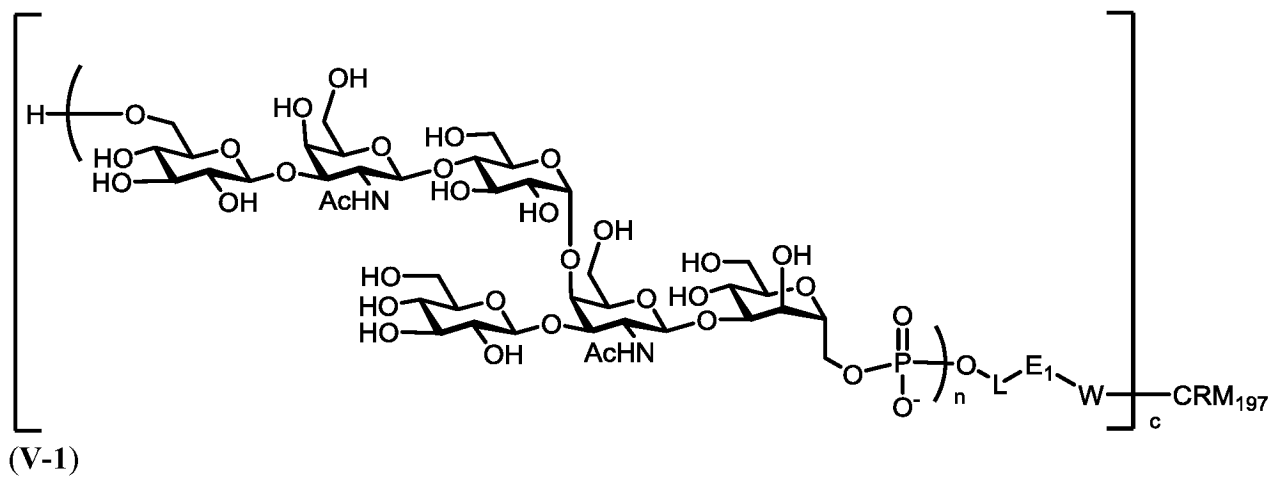




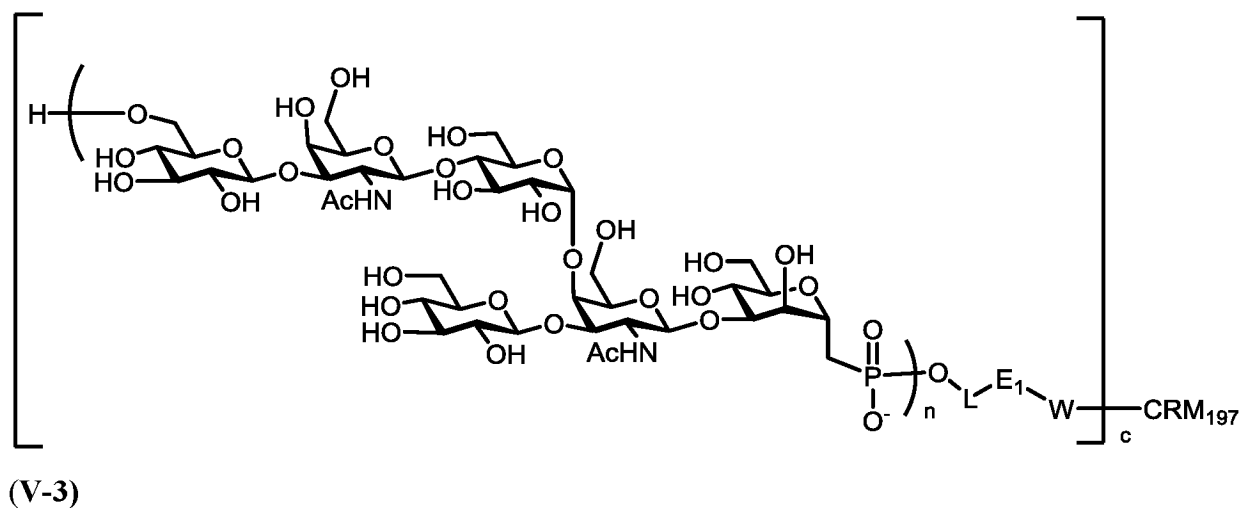
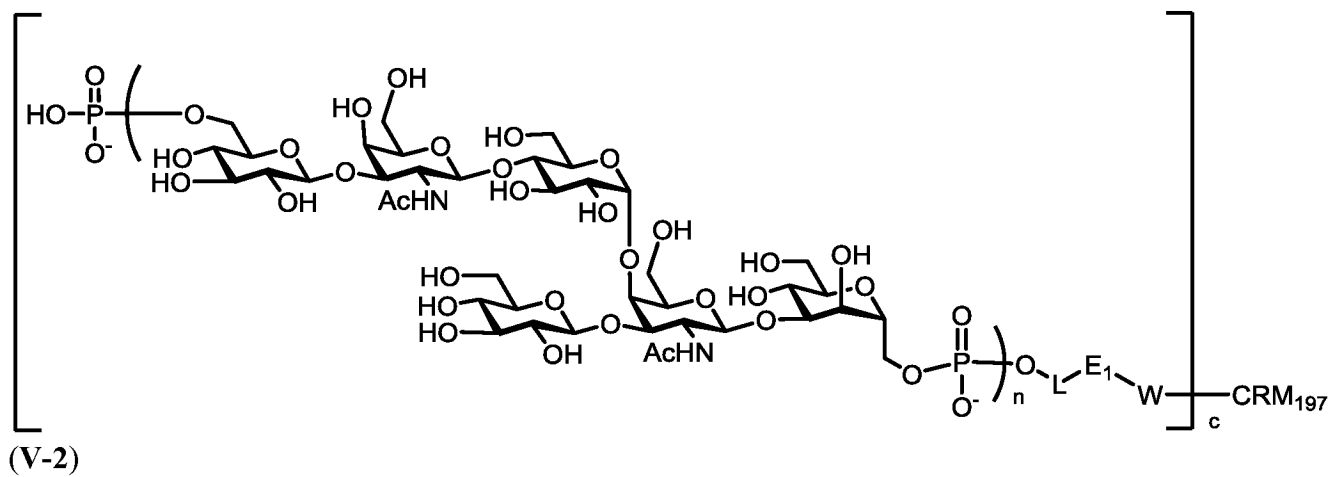




Более предпочтительным является конъюгат любой из формул (V-1) – (V-4):

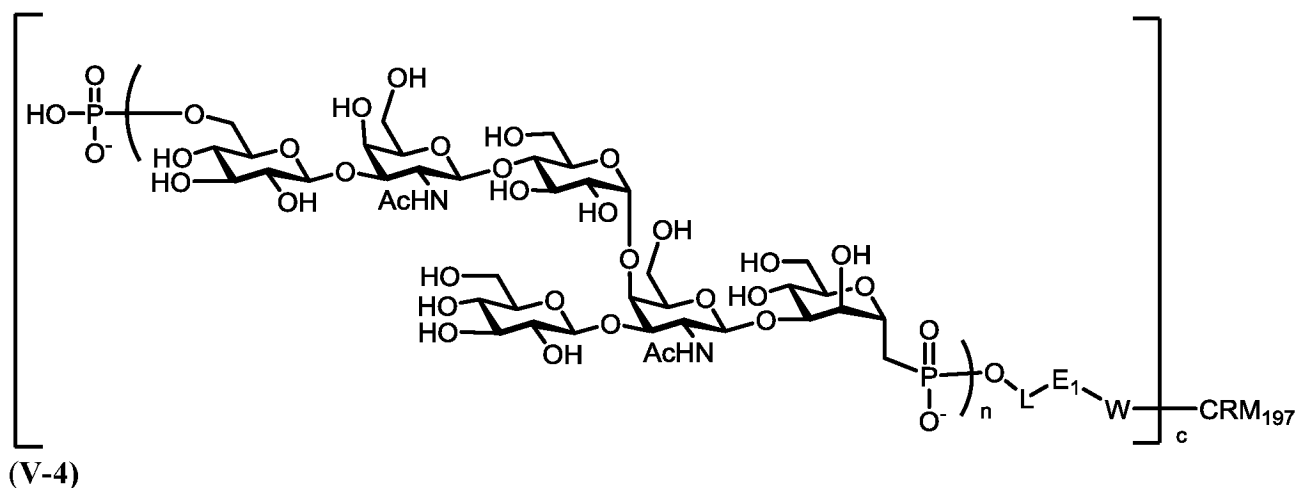


5



10



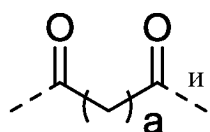


где L, E<sub>1</sub>, W, c, и n имеют те же значения, которые указаны выше.

5 Более предпочтительным является конъюгат любой из формул (IV), (IV-1) – (IV-4), (V) и (V-1) – (V-4), где n представляет собой целое число от 1 до 3.

Более предпочтительным является конъюгат любой из формул (IV), (IV-1) – (IV-4), (V) и (V-1) – (V-4), где c выбран из 4 - 10.

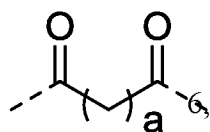
Предпочтительно –W– представляет собой



и a представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6.

10

Таким образом, конъюгат общей формулы (IV), (IV-1) – (IV-4), (V) и (V-1) – (V-4), где –W– представляет собой



и a представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5 и 6, является особенно предпочтительным.

15 Предпочтительно, линкер –L– представляет собой –L<sup>a</sup>–, –L<sup>a</sup>–L<sup>e</sup>–, –L<sup>a</sup>–L<sup>b</sup>–L<sup>e</sup>–, или –L<sup>a</sup>–L<sup>d</sup>–L<sup>e</sup>–;

–L<sup>a</sup>– представляет собой –(CH<sub>2</sub>)<sub>0</sub>–, –(CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O)<sub>0</sub>–C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>–, или –(CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O)<sub>0</sub>–CH<sub>2</sub>–;

–L<sup>b</sup>– представляет собой –O–;

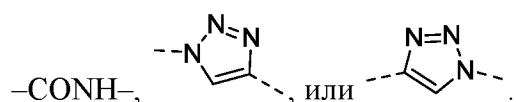
–L<sup>d</sup>– представляет собой –(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>–, –(CH(OH))<sub>q</sub>–, –(CF<sub>2</sub>)<sub>q</sub>–, –(CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O)<sub>q</sub>–C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>–,

20 или –(CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–O)<sub>q</sub>–CH<sub>2</sub>–;

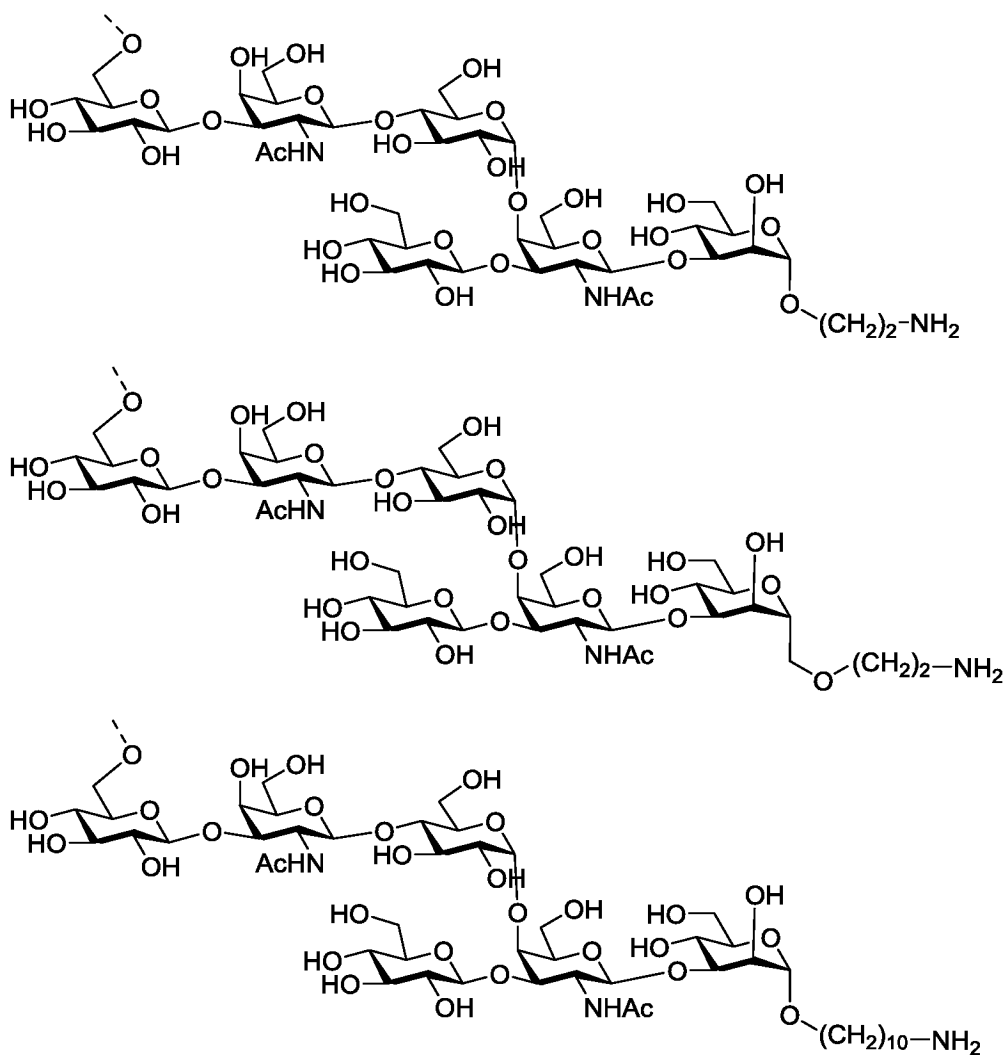
$-L^e-$  представляет собой  $-(CH_2)_{p1}-$ ,  $-(CF_2)_{p1}-$ ,  $-C_2H_4-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$ ,  $-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$  или  $-(CH_2)_{p1}-O-(CH_2)_{p2}-$ ; и

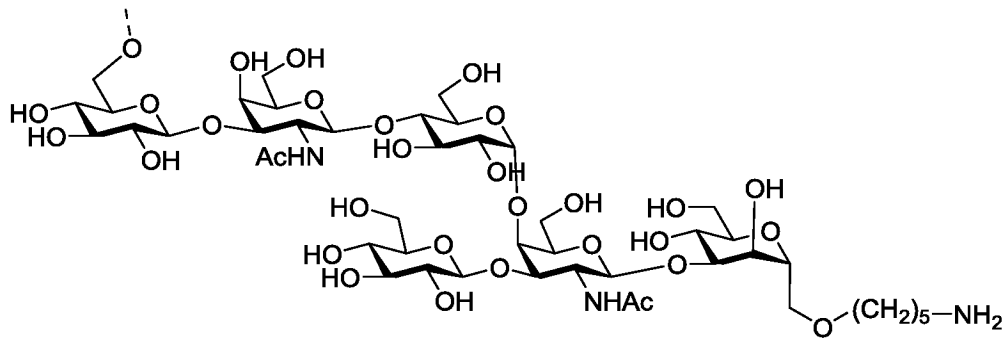
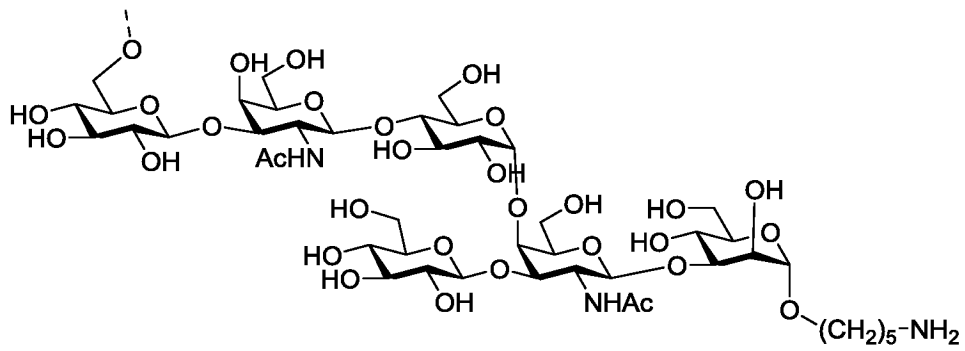
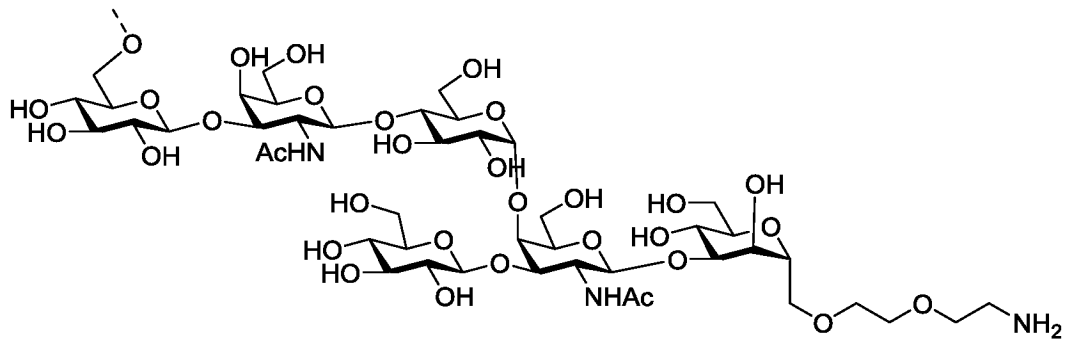
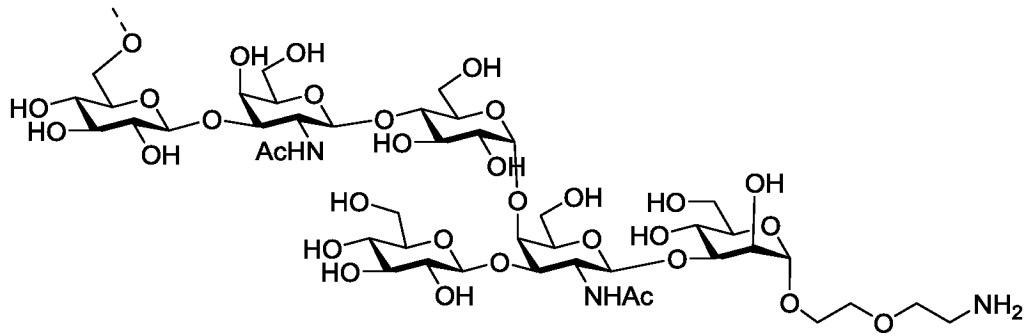
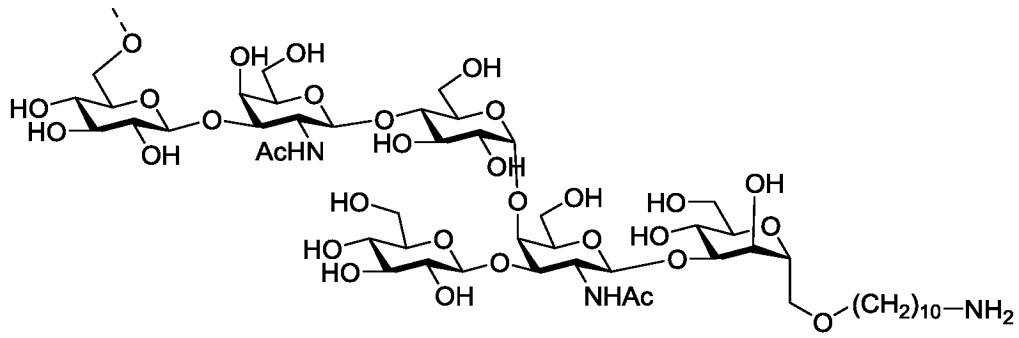
**o**, **q**, **p1** и **p2** представляют собой независимо друг от друга целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, и 6

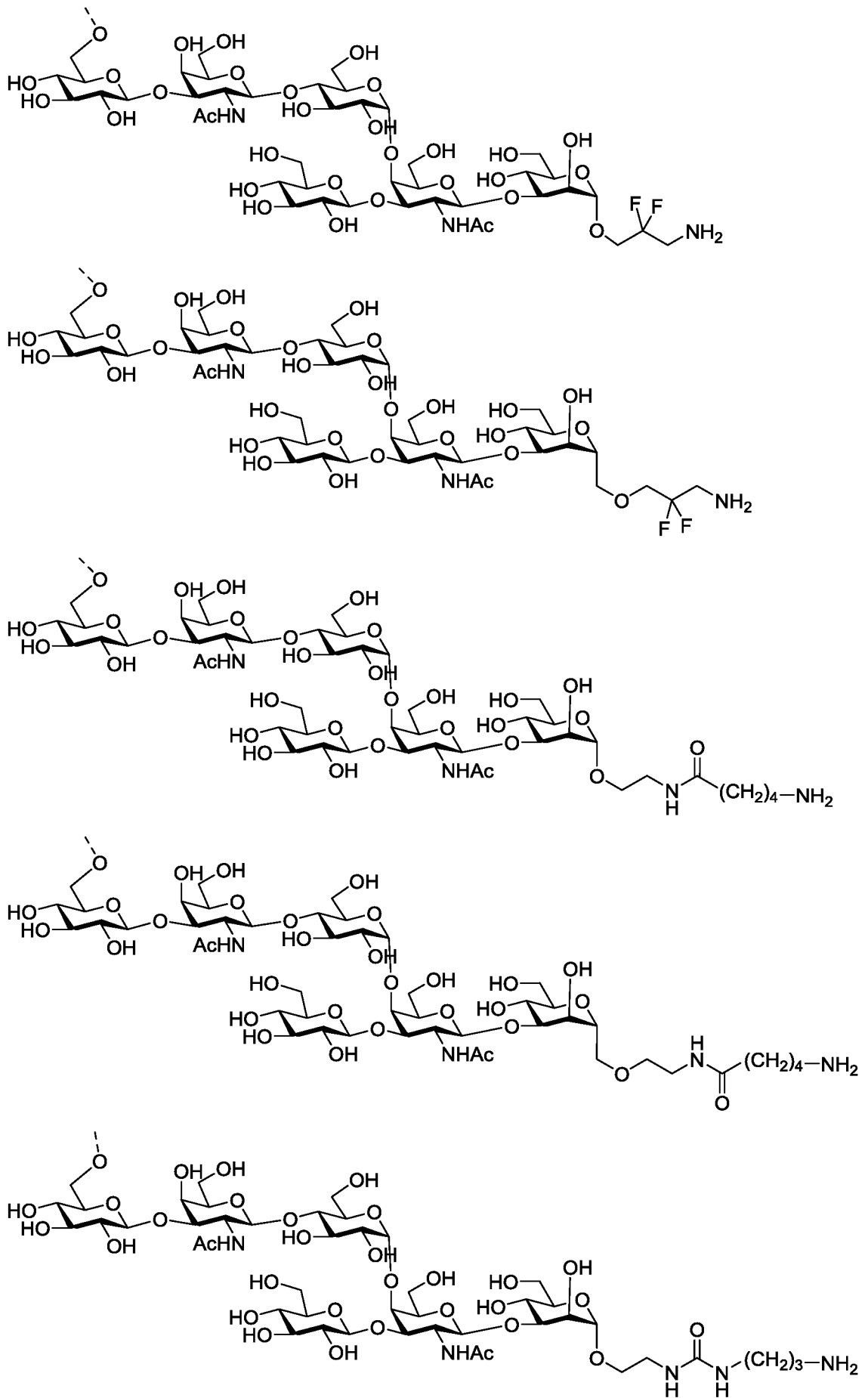
5 В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения, **E<sub>1</sub>** представляет собой ковалентную связь,  $-NH-$ ,  $-CH=CH-$ ,

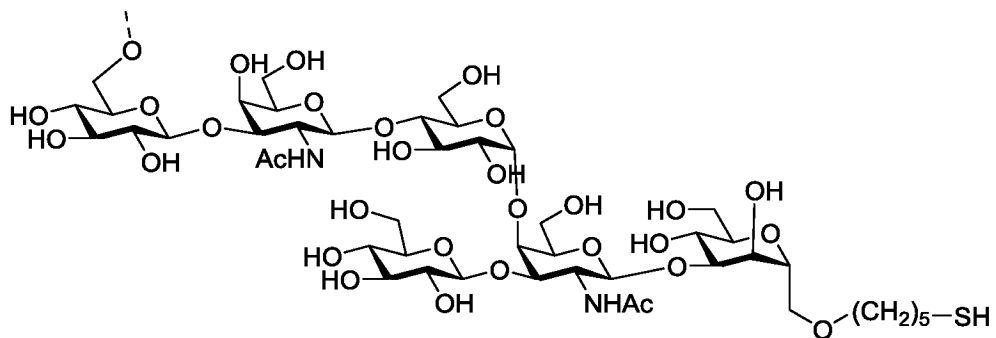
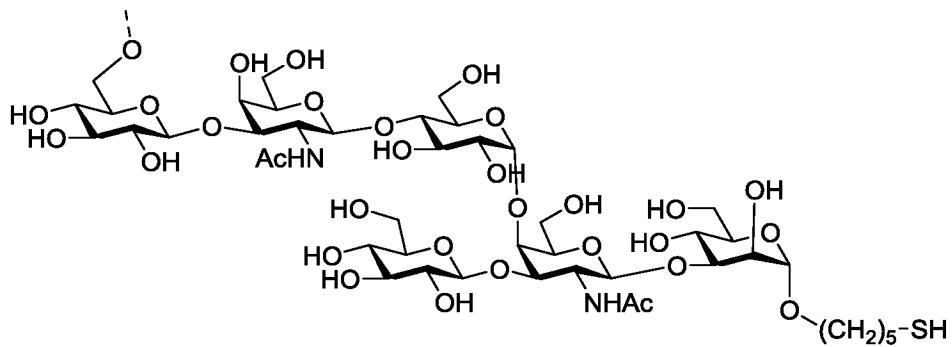
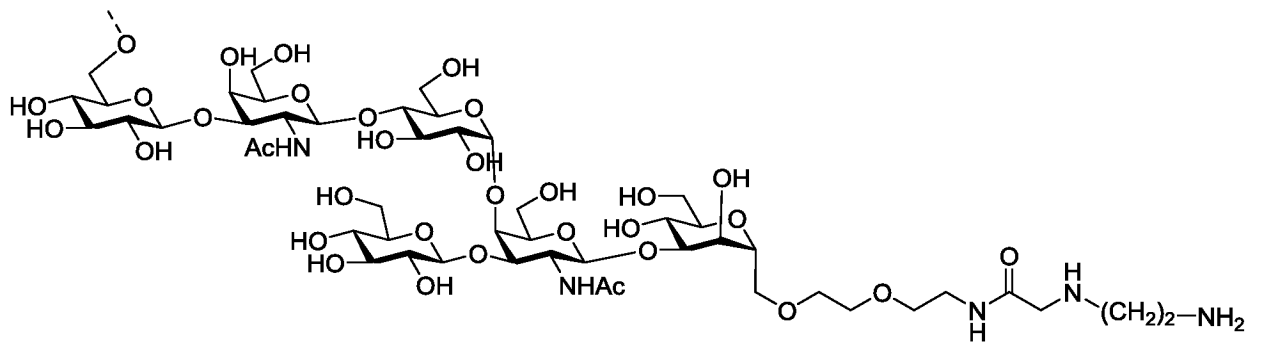
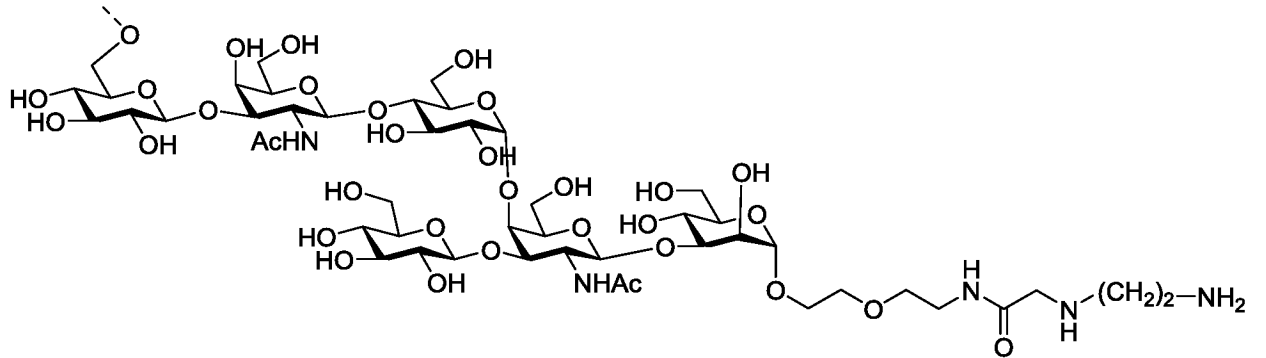
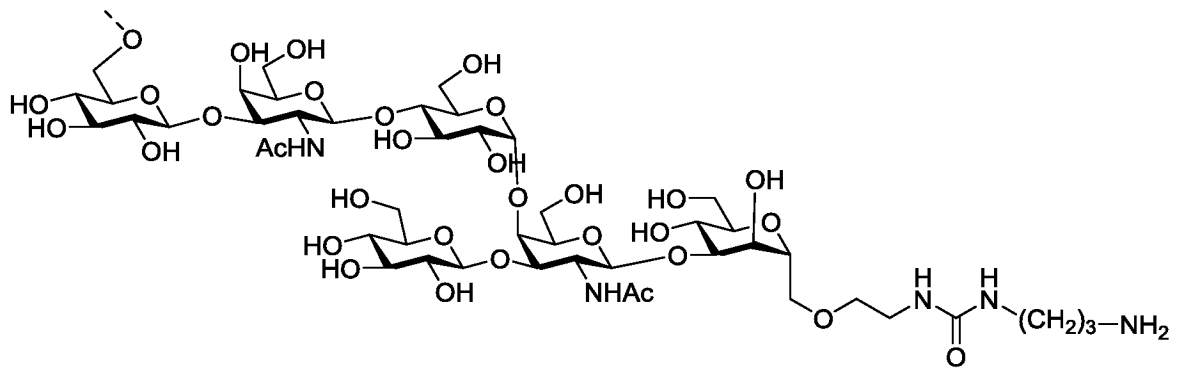


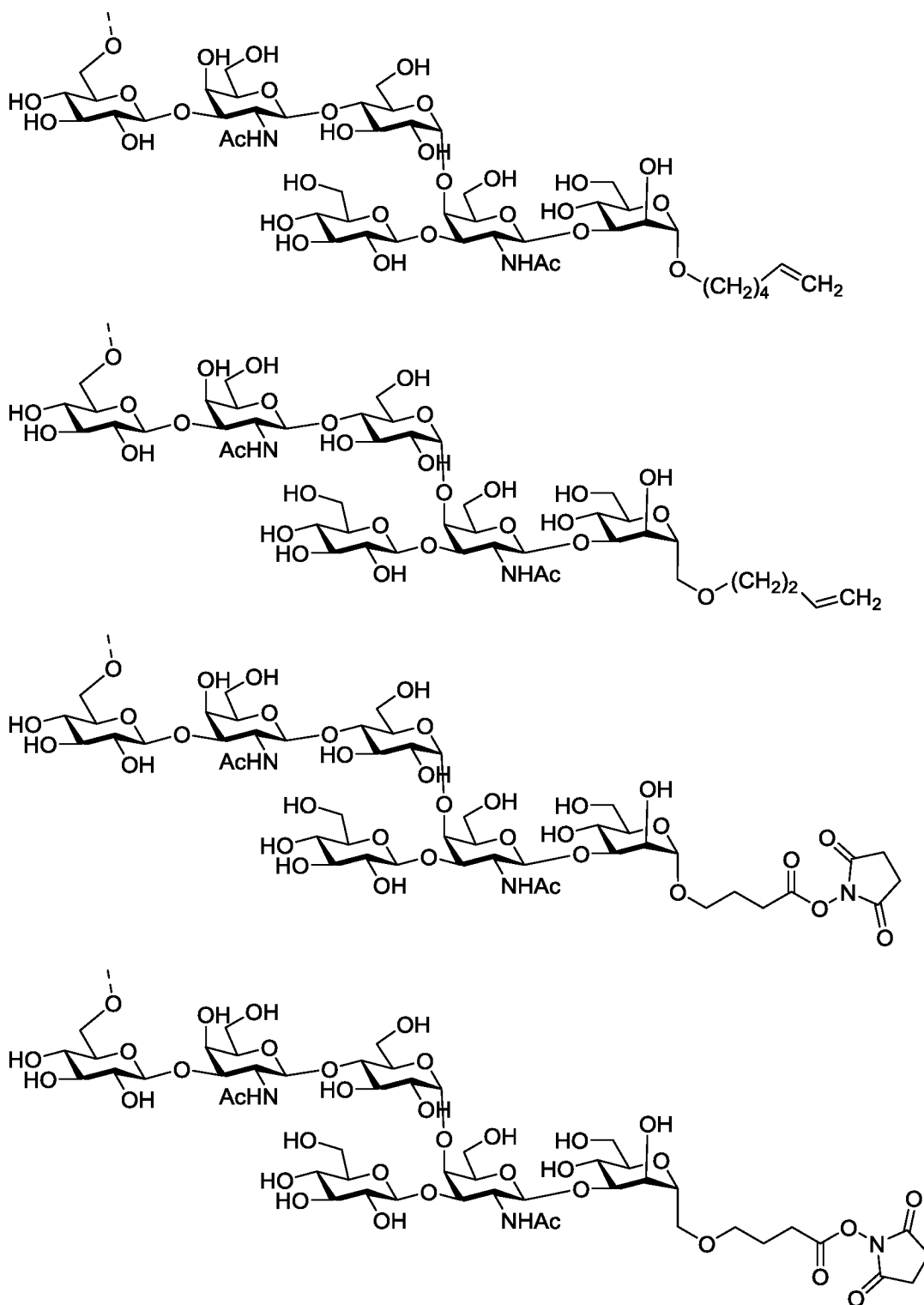
10 Также предпочтительным является конъюгат общей формулы (IV), (IV-1) – (IV-4), (V) и (V-1) – (V-4), где группа  $-O-L-E$  выбрана из группы, которая состоит из:











В другом варианте осуществления изобретения указанный иммуногенный носитель предпочтительно представляет собой гликофинголипид с иммуномодулирующими свойствами, и более предпочтительно (2S, 3S, 4R)-1-( $\alpha$ -D-галактопиранозил)-2-гексакозаноиламинооктадекан-3,4-диол. Термин «гликофинголипид с иммуномодулирующими свойствами» в контексте настоящего

документа, относится к подходящему гликофинголипиду, способному стимулировать ответ иммунной системы на целевой антиген, но который сам по себе не дает иммунитета, как определено выше.

5 Гликофинголипиды в контексте настоящего описания представляют собой соединения, содержащие углеводный фрагмент  $\alpha$  –присоединенный к сфинголипиду. Предпочтительно, углеводный фрагмент представляет собой гексопиранозу и наиболее предпочтительно представляет собой  $\alpha$ -D-галактопиранозу. Для специалиста в данной области сфинголипиды представляют собой класс липидов, содержащих C18-амино-спирт, присоединенный через амидную связь к жирной кислоте. Аминоспирт C18  
10 предпочтительно является моно-, ди- или полизамещенным гидроксильными группами.

Особенно предпочтительно, аминок-спирт C18 является фитосфингозином. Жирная кислота, предпочтительно, представляет собой монокарбоновую кислоту, имеющую насыщенную алкильную цепь из ряда атомов углерода в диапазоне от 16 до 28 и более предпочтительно от 18 до 26. Гликофинголипиды с  
15 иммуномодулирующими свойствами включают, но не ограничиваются ими, (2S, 3S, 4R)-1-( $\alpha$ -D-галактопиранозил)-2-гексакозаноиламинооктадекан-3,4-диол, который может стимулировать активность естественных киллеров (NK) и выработку цитокинов естественными киллерами T (NKT), и проявляет сильную противоопухолевую активность *in vivo* (*Proc. Natl Acad. Sci. США*, **1998**, *95*, 5690).

20 Конъюгаты сахаридов общей формулы I с гликофинголипидом с иммуномодулирующими свойствами имеют то преимущество, что они термостабильны. Чтобы быть пригодным для конъюгирования, на гликофинголипиде с иммуномодулирующими свойствами введена функциональная группа. Указанная функциональная группа склонна вступать в реакцию непосредственно с концевой  
25 аминогруппой линкера сахаридов общей формулы I, с обеспечением конъюгатов сахаридов формулы I, или с функциональной группой Y соединяющей молекулы, с обеспечением модифицированного гликофинголипида с иммуномодулирующими свойствами.

30 Предпочтительно указанная функциональность вводится в C6 углеводного фрагмента гликофинголипида с иммуномодулирующими свойствами. Таким образом, гликофинголипид с иммуномодулирующими свойствами функционализирован с помощью функциональной группы, которая подвержена введению в реакцию с концевой аминогруппой сахаридов или функциональной группой Y соединяющей молекулы. Функциональная группа, склонная к взаимодействию с аминогруппой,

включает, но не ограничивается ими, активированный сложный эфир, изоцианатную группу, альдегид, эпоксид, сложный имидоэфир, карбоновую кислоту, алкилсульфонат и сульфонилхлорид. Функциональная группа, склонная к взаимодействию с функциональной группой Y соединяющей молекулы, так что обеспечивается модифицированный гликофинголипид с иммуномодулирующими свойствами, представляющий функциональную группу X соединяющей молекулы, включает, но не ограничивается ими, амин, спирт, тиол, активированный сложный эфир, изоцианатную группу, альдегид, эпоксид, винил, сложный имидоэфир, карбоновую кислоту, алкилсульфонат, сульфонилхлорид, винильную группу, алкинильную группу и азидогруппу.

Предпочтительно функциональная группа, введенная в C6 углеводном фрагменте гликофинголипида с иммуномодулирующими свойствами, выбрана из группы, которая включает или содержит амин, тиол, спирт, карбоновую кислоту, винил, малеимид,  $\alpha$ -йодацетил,  $\alpha$ -бромацетил, сложный N-гидроксисукцинимидный эфир (NHS), 2-пиридилдитиолы.

Указанная функциональная группа X соединяющих молекул выбрана из группы, которая содержит или состоит из следующих: малеимид,  $\alpha$ -йодацетил,  $\alpha$ -бромацетил, сложный N-гидроксисукцинимидный эфир (NHS), альдегид, карбоновая кислота, эпоксид, алкилсульфонат, сульфонилхлорид, ангидрид, карбонат.

Используемый в данном документе термин «соединяющая молекула» относится к бифункциональной молекуле, содержащей функциональную группу X и функциональную группу Y, где функциональная группа X способна входить в реакцию с концевой аминогруппой на линкере -L-, и функциональная группа Y способна входить в реакцию с функциональной группой, присутствующей на иммуногенном носителе или на твёрдой подложке.

Вакцины, содержащие по меньшей мере один конъюгат в соответствии с настоящим изобретением, вызывают меньше побочных эффектов и/или не защитного иммунного ответа по сравнению с вакцинами, содержащими выделенные (и не синтезированные) смеси сахаридов, полученные неселективным расщеплением капсульного полисахарида *C. difficile* или его конъюгатов. Более того, вакцины согласно изобретению легче производить в соответствии с правилами GMP, чем вакцины, содержащие выделенные смеси неизбирательно расщепленных капсулярных полисахаридов, и их легче охарактеризовать, что облегчает контроль стабильности и чистоты, а также определение вида и количества примесей.



Было обнаружено, что конъюгат, который содержит сахарид любой из общих формул (I), (II), (II-a), (II-b), (III), (III-a) или (III-b), и особенно конъюгат любой из общих формул (IV), (IV-1) – (IV-4), (V) и (V-1) – (V-4), выявляет защитный иммунный ответ у человека и/или животного-хозяина, и следовательно является пригодным для предотвращения и/или лечения заболеваний, связанных с бактериями *Clostridium difficile*. Таким образом, конъюгаты, которые содержат сахараиды общей формулы (I), конъюгированные с иммуногенным носителем, являются пригодными для предотвращения и/или лечения заболеваний, связанных с бактериями *Clostridium difficile*, которые содержат в их сахараиде клеточной стенки один из следующих сахаридных фрагментов:

-6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1, 4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1-;

-3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1, 4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1;

-4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1;

-4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1;

-3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1, 4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1.

Предпочтительно, бактерия, которая содержит в ее сахараиде клеточной стенки один из следующих сахаридных фрагментов, представляет собой *Clostridium difficile*.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, конъюгаты, которые содержат сахараиды общей формулы I, конъюгированные с иммуногенным носителем, являются пригодными для предотвращения и/или лечения заболеваний, связанных с бактериями, и особенно заболеваний, связанных с бактериями, содержащими в их полисахаридах клеточной стенки один из следующих сахаридных фрагментов: -6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1, 4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1-; -3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1, 4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1; -4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1; -4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1; -3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1, 4)-[ $\beta$ -D-Glc-

(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1, и предпочтительно с *Clostridium difficile*, где указанные заболевания включают диарею, псевдомембранозный колит и паралитическую кишечную непроходимость.

#### **Фармацевтические композиции**

5 Другой аспект настоящего изобретения направлен на фармацевтическую композицию или вакцину, которая содержит по меньшей мере один конъюгат, который включает сахарид общей формулы (I), конъюгированный с иммуногенным носителем, и/или по меньшей мере один сахарид общей формулы (I) вместе с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым адъювантом и/или наполнителем. Указанная  
10 фармацевтическая композиция может быть использована для повышения защитного иммунного ответа у человека- и/или животного-хозяина. В идеальном варианте, фармацевтическая композиция является пригодной для применения для человека.

В другом аспекте настоящего изобретения, указанная фармацевтическая композиция или вакцина дополнительно включает по меньшей мере сахарид клеточной  
15 стенки или фрагмент сахараида клеточной стенки и/или его белковые конъюгаты бактерий *Clostridium difficile*, которые выбраны из группы, которая содержит или состоит из штаммов *Clostridium difficile*, 027, МОН718 и МОН900.

Используемый в данном документе термин «адъювант» относится к иммунологическому адъюванту, т.е. средству, используемому в композиции вакцины,  
20 который модифицирует или усиливает эффект указанной вакцины путем усиления иммунного ответа на данный антиген, который содержится в вакцине, не будучи антигенно связанным с ним. Для специалистов в данной области классически признанные примеры иммунологических адъювантов включают, но не ограничиваются ими, масляные эмульсии (например, адъювант Фрейнда), сапонины, соли алюминия  
25 или кальция (например, Alum), неионные блок-полимерные поверхностно-активные вещества и многие другие.

Фармацевтические композиции предпочтительно находятся в водной форме, особенно при введении, но они также могут быть представлены в неводных жидких формах или в сухих формах, например, в виде желатиновых капсул, или лиофилизатов  
30 и т. д.

Фармацевтические композиции могут включать один или более консервантов, таких как тиомерсал или 2-феноксиэтанол. Композиции без ртути являются предпочтительными, и можно приготовить вакцины без консервантов.

Фармацевтические композиции могут включать физиологическую соль, такую как натриевая соль, например для контроля тонуса. Хлорид натрия (NaCl) является типичным и может присутствовать в количестве от 1 до 20 мг/мл. Другие соли, которые могут присутствовать, включают хлорид калия, дигидрофосфат калия, дигидрат 5 двунатриевого фосфата, хлорид магния, хлорид кальция и т. д.

Фармацевтические композиции могут иметь осмоляльность от 200 мОсм/кг до 400 мОсм/кг.

10 Фармацевтические композиции могут включать соединения (с нерастворимой солью металла или без нее) в простой воде (например, вода для инъекций), но обычно включают один или более буферов. Типичные буферы включают: фосфатный буфер; Трис-буфер; боратный буфер; сукцинатный буфер; гистидиновый буфер (особенно с адьювантом гидроксида алюминия); или цитратный буфер. Соли буфера обычно включены в количестве в диапазоне 5-20 мМ.

15 Фармацевтические композиции обычно имеют рН от 5,0 до 9,5, например, между 6.0 и 8.0.

Фармацевтические композиции являются предпочтительно стерильными и безглютеновыми.

20 Фармацевтические композиции пригодны для введения пациентам-животным (и, в частности, людям), и таким образом включают как человеческое, так и ветеринарное применение. Их можно использовать в способе повышения иммунного ответа у пациента, который включает стадию введения композиции пациенту.

Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением можно вводить до того, как субъект подвергнется воздействию *C. difficile* и/или после того, как субъект подвергнется воздействию бактерий *C. difficile*.

25 В другом аспекте настоящего изобретения, изобретение направлено на применение по меньшей мере одного конъюгата, который включает по меньшей мере один сахарид общей формулы (I), конъюгированный с иммуногенным носителем, и/или по меньшей мере один сахарид общей формулы (I) для производства указанной фармацевтической композиции или указанной вакцины для предотвращения и/или 30 лечения заболеваний, связанных с бактериями *C. difficile*, особенно, заболеваний, связанных с бактериями *C. difficile*, выбранных из группы, которая включает или состоит из диареи, псевдомембранозного колита и паралитической кишечной непроходимости.

Предпочтительно, настоящее изобретение относится к применению по меньшей мере одного сахараида любой из общих формул (I), (II), (II-a), (II-b), (III), (III-a) или (III-b) и/или по меньшей мере одного из конъюгатов, который содержит по меньшей мере один сахараида любой из общих формул (I), (I), (II), (II-a), (II-b), (III), (III-a) или (III-b), для приготовления указанной фармацевтической композиции или указанной вакцины.

10 Более предпочтительно, настоящее изобретение относится к применению по меньшей мере одного из сахараидов Г'а-1 – Г'а-11, Г'б-1 – Г'б-11 и Г'с-1 – Г'с-11 и/или по меньшей мере одного из конъюгатов, который содержит по меньшей мере один из сахараидов Г'а-1 – Г'а-11, Г'б-1 – Г'б-11 и Г'с-1 – Г'с-11, для приготовления указанной фармацевтической композиции или указанной вакцины.

В особенности, настоящее изобретение относится к применению по меньшей мере одного конъюгата любой из общих формул (IV), (IV-1) – (IV-4), (V) и (V-1) – (V-4) для приготовления указанной фармацевтической композиции или указанной вакцины.

15 Фармацевтические композиции можно получить в форме стандартной дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения стандартная доза может иметь объем от 0,1 до 1,0 мл, например приблизительно 0,5 мл.

20 Изобретение также обеспечивает устройство для доставки (например, шприц, небулайзер, распылитель, ингалятор, кожный пластырь и т. д.), содержащее фармацевтическую композицию в соответствии с изобретением, например, содержащий стандартную дозу. Это устройство можно использовать для введения композиции позвоночному субъекту.

25 Изобретение также обеспечивает стерильный контейнер (например, сосуд), содержащий фармацевтическую композицию в соответствии с изобретением, например содержащий стандартную дозу.

Изобретение также обеспечивает стандартную дозу фармацевтической композиции в соответствии с изобретением.

30 Изобретение также обеспечивает герметично закрытый контейнер, содержащий фармацевтическую композицию в соответствии с изобретением. Пригодный контейнер включает, например, сосуд.

Фармацевтические композиции в соответствии с изобретением можно получить в различных формах. Например, композиции можно получить в виде инъекций, либо в виде жидких растворов или суспензий. Также могут быть приготовлены твердые формы, пригодные для раствора или суспензии, жидких носителей перед инъекцией

(например, лиофилизированная композиция или замороженная распылением сухая композиция). Можно получить композицию для местного применения, например, в виде мази, крема или пудры. Можно получить композицию для перорального приема, например, в виде таблетки или капсулы, в виде спрея или в виде сиропа (необязательно ароматизированного). Можно получить композицию для легочного введения, например с помощью ингалятора, используя мелкодисперсный порошок или спрей. Можно получить композицию в виде суппозиторию. Можно получить композицию для назального, ушного или окулярного введения, например в виде спрея или капель. Типичными являются инъекции для внутримышечного введения.

10 Фармацевтические композиции могут содержать эффективное количество адъюванта, т.е. количество, которое при введении индивиду, либо в виде разовой дозы, либо как часть серии, является эффективным для усиления иммунного ответа на совместно вводимый антиген сахараида PS-II *C. difficile*.

15 Это количество может варьироваться в зависимости от здоровья и физического состояния человека, подлежащего лечению, возраста, таксономической группы индивидуума, подлежащего лечению (например, примат, не являющийся человеком, примат и т.д.), способности иммунной системы человека синтезировать антитела, степени желаемой защиты, состава вакцины, оценки лечащим врачом медицинской ситуации и других соответствующих факторов. Количество будет находиться в относительно широком диапазоне, который можно определить с помощью обычных испытаний.

20 Состав и введение вакцины в соответствии с настоящим изобретением могут быть достигнуты в соответствии с любым методом, известным в данной области техники.

25 Терапевтически эффективная доза одного конъюгата в соответствии с настоящим изобретением или одного сахараида общей формулы (I) относится к такому количеству соединения, которое приводит по меньшей мере к частичной иммунизации против заболевания. Токсичность и терапевтическая эффективность таких соединений можно определить стандартными фармацевтическими, фармакологическими и токсикологическими процедурами на культурах клеток или экспериментальных животных. Соотношение доз между токсическим и терапевтическим действием представляет собой терапевтический индекс. Фактическое количество вводимой композиции будет зависеть от субъекта, который подлежит лечению, от веса субъекта, тяжести заболевания, способа введения и решения лечащего врача.

30 Другой аспект настоящего изобретения направлен на способ индукции иммунного ответа против *C. difficile* у человека- и/или животного-хозяина, который включает

введение сахарада общей формулы (I) и/или его соли и/или его конъюгата или его фармацевтической композиции указанному человеку- и/или животному-хозяину.

Способ лечения или предотвращения заболеваний, вызванных *C. difficile*, у человека- и/или животного-хозяина в соответствии с настоящим изобретением

5 включает введение по меньшей мере одного сахарада общей формулы (I) и/или его соли и/или его конъюгата, или его фармацевтической композиции указанному человеку- и/или животному-хозяину.

### **Иммунологические анализы**

10 Еще один аспект настоящего изобретения относится к сахариду общей формулы (I) для применения в качестве маркера в иммунологических анализах для обнаружения антител к бактериям, содержащим в их полисахариде клеточной стенки один из следующих сахаридных фрагментов:

-6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1, 4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1-;

-3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1, 4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1;

-4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1;

-4)- $\alpha$ -D-Glc-(1, 4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1;

-3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1, 4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1.

15 Такие анализы включают, например, микроматричный анализ и ELISA, пригодные для обнаружения антител к бактериям, содержащим в их полисахариде клеточной стенки один из вышеуказанных сахаридных фрагментов, таких как *C. difficile*.

20 Сахариды в соответствии с настоящим изобретением могут быть легко конъюгированы с твёрдыми подложками для обеспечения иммунологических анализов, пригодных для обнаружения антител против *C. difficile*. Указанные твёрдые подложки на своей поверхности представляют функциональную группу, которая может вступать в реакцию с аминогруппой сахаридов общей формулы (I) или с функциональной группой Y соединяющей молекулы с получением модифицированных твёрдых подложек, представляющих на своей поверхности функциональную группу X соединяющей молекулы, которая может далее вступать в реакцию с аминогруппой

сахаридов общей формулы (I). В одном из вариантов осуществления изобретения твёрдые подложки представляет собой микроматричные слайды, на поверхности которых присутствует функциональная группа, которая склонна взаимодействовать с функциональной группой Y соединяющей молекулы с получением модифицированных микроматричных слайдов, представляющих на их поверхности функциональную группу X соединяющей молекулы. Примеры таких микроматричных слайдов включают, но не ограничиваются ими, слайды с эпоксидным покрытием Corning® или слайды с покрытием Corning® GAPS™ II.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения твёрдые подложки представляют собой микроматричные слайды, на поверхности которых присутствует функциональная группа, которая склонна взаимодействовать с аминогруппой сахаридов общей формулы (I), и более предпочтительно сложным эфиром, активированным N-гидроксисукцинимидом (NHS). Такие микроматричные слайды представляют собой, например, слайды CodeLink® NHS.

#### 15 **Описание фигур**

**Фигура 1** демонстрирует химическую структуру повторяющейся единицы сахара PS-II клеточной стенки *C. difficile*.

**Фигура 2** демонстрирует примеры функциональной группы X соединяющей молекулы в соответствии с настоящим изобретением.

20 **Фигура 3** демонстрирует примеры функциональной группы X соединяющей молекулы в соответствии с настоящим изобретением.

**Фигура 4** демонстрирует конъюгат CRM<sub>197</sub> общей формулы (V-2) в качестве предпочтительных соединений данной заявки.

25 **Фигура 5** демонстрирует два пути расщепления соединения 33 путем обработки NaOH. Путь I демонстрирует расщепление в фосфатной группе, где фосфатная группа остается в линкерной части и образуется соединение LA, 5-аминопентил дигидрофосфат. Путь II демонстрирует расщепление в фосфатной группе, где фосфатная группа остается у сахаридного фрагмента (соединение 33B) и образуется соединение LB, 5-аминопентан-1-ол.

30 **Фигура 6** демонстрирует графики ВЭЖХ снизу вверх следующих соединений: Соединение 33 (стандарт), соединение 33A (контроль), соединение 33 после однодневной обработки 0,1 М раствором гидроксида натрия при комнатной температуре и очистки, соединение 33 после четырехдневной обработки 0,1 М раствором гидроксида натрия при комнатной температуре, очищенное соединение 33B,

соединение LB. Из Фигуры 7 очевидно, что соединение 33 полностью стабильно в основных условиях в течение одного дня. После четырех дней обработки NaOH при КТ еще 50% соединения 33 остается неизменным.

**Фигура 7** демонстрирует графики ВЭЖХ снизу вверх следующих соединений:  
 5 соединение 33А (контроль), соединение 33 после однодневной обработки 0,1 М раствором гидроксида натрия при комнатной температуре и очистки, соединение 33 (стандарт), соединение 33 через два месяца при температуре 2°C-8°C в воде, соединение 33 через два месяца при 2°C-8°C в NaPi, что является синонимом PBS (фосфатно-буферный солевой раствор), соединение 33 через два месяца при 2°C-8°C в  
 10 Алгидрогеле и PBS. Из Фигуры 7 очевидно, что соединение 33 полностью стабильно при температуре от 2°C до 8°C в течение двух месяцев.

**Фигура 8** демонстрирует графики ВЭЖХ снизу вверх следующих соединений:  
 соединение 33А (контроль), соединение 33 после однодневной обработки 0,1 М раствором гидроксида натрия при комнатной температуре и очистки, соединение 33  
 15 (стандарт), соединение 33 через два месяца при температуре 25°C в воде, соединение 33 через два месяца при 25°C в NaPi, что является синонимом PBS (фосфатно-буферный солевой раствор), соединение 33 через два месяца при 25°C в Алгидрогеле и PBS. Из Фигуры 8 очевидно, что соединение 33 полностью стабильно при 25°C в течение двух месяцев.

**Фигура 9** демонстрирует графики ВЭЖХ снизу вверх следующих соединений:  
 соединение 33А (контроль), соединение 33 после однодневной обработки 0,1 М раствором гидроксида натрия при комнатной температуре и очистки, соединение 33  
 20 (стандарт), соединение 33 через два месяца при 37°C в воде, соединение 33 через два месяца при 37°C в NaPi, что является синонимом PBS (фосфатно-буферный солевой раствор), соединение 33 через два месяца при 37°C в Алгидрогеле и PBS. Из Фигуры 9 очевидно, что соединение 33 полностью стабильно при 37°C в течение двух месяцев.

**Фигура 10** демонстрирует графики ВЭЖХ снизу вверх следующих соединений:  
 соединение 33А (контроль), соединение 33 после однодневной обработки 0,1 М раствором гидроксида натрия при комнатной температуре и очистки, соединение 33  
 30 (контроль), соединение 92 (стандарт), соединение 92 через неделю при 2-8°C в воде, соединение 92 через неделю при 2-8°C в NaPi, что является синонимом PBS (фосфатно-буферный солевой раствор), соединение 92 через неделю при 2-8°C в Алгидрогеле и PBS. Из Фигуры 10 очевидно, что соединение 92 полностью стабильно при 2-8°C в течение одной недели.



**Фигура 11** демонстрирует графики ВЭЖХ снизу вверх следующих соединений: соединение 33А (контроль), соединение 33 после однодневной обработки 0,1 М раствором гидроксида натрия при комнатной температуре и очистки, соединение 33 (контроль), соединение 92 (стандарт), соединение 92 через неделю при 25°C в воде, 5 соединение 92 через неделю при 25°C в NaPi, что является синонимом PBS (фосфатно-буферный солевой раствор), соединение 92 через неделю при 25°C в Алгидрогеле и PBS. Из Фигуры 11 очевидно, что соединение 92 полностью стабильно при 25°C в течение одной недели.

**Фигура 12** демонстрирует графики ВЭЖХ снизу вверх следующих соединений: 10 соединение 33А (контроль), соединение 33 после однодневной обработки 0,1 М раствором гидроксида натрия при комнатной температуре и очистки, соединение 33 (контроль), соединение 92 (стандарт), соединение 92 через неделю при 37°C в воде, соединение 92 через неделю при 37°C в NaPi, что является синонимом PBS (фосфатно-буферный солевой раствор), соединение 92 через неделю при 37°C в Алгидрогеле и 15 PBS. Из Фигуры 12 очевидно, что соединение 92 полностью стабильно при 37°C в течение одной недели.

**Фигура 13** демонстрирует графики ВЭЖХ снизу вверх следующих соединений: соединение 33А (контроль), соединение 33 после однодневной обработки 0,1 М раствором гидроксида натрия при комнатной температуре и очистки, соединение 33 20 (контроль), соединение 54 (стандарт), соединение 54 через неделю при 25°C в воде, соединение 54 через неделю при 2-8°C в воде, соединение 54 через неделю при 37°C в воде. Из фигуры 13 очевидно, что соединение 54 полностью стабильно при 37°C в течение одной недели.

**Фигура 14** демонстрирует графики ВЭЖХ снизу вверх следующих соединений: 25 соединение 33А (контроль), соединение 54 (стандарт), соединение 54 через неделю при 25°C в Алгидрогеле, соединение 54 через неделю при 2-8°C в Алгидрогеле, соединение 54 через неделю при 37°C в Алгидрогеле. Из Фигуры 14 очевидно, что соединение 54, когда в состав с ним входит Алгидрогель, в основном адсорбируется до гидроксида алюминия, и что не образуются предполагаемые продукты расщепления, которые 30 можно обнаружить с помощью ВЭЖХ в присутствии гидроксида алюминия. Таким образом, соединение 54 является стабильным при 37°C в течение одной недели.

**Фигура 15** демонстрирует титры ELISA на день-0, день-7 и день-42 смешанных сывороток от кроликов (n = 4), иммунизированных составами (36) сахарада **33-CRM**<sub>197</sub> *C. Difficile*. Сыворотки, полученные от кроликов, иммунизированных соединением 36,

разбавляли 1: 100, 1000 посредством 1% BSA-PBS. Разбавленные сыворотки (100 мкл) добавляли в каждую лунку планшета для микротитрования, который был покрыт 0,5 мкг соответствующего конъюгата 33-BSA (соединение 37). Детектирование проводили с использованием HRP конъюгированного козьего анти-кроличьего вторичного антитела, которое разбавлено до 1: 10000, и которое разработано с использованием 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ) в качестве субстрата. Абсорбцию измеряли при 450 нм и данные наносили на график с использованием программного обеспечения Graphpad prism. На 42-й день из Фигуры 15 очевиден замечательный иммунологический ответ.

10 **Фигура 16** демонстрирует ELISA титры кроличьих антисывороток против штамма 630 *C. difficile* (смешанные сыворотки). Кроликов (4 животных в перерасчете на исследуемую группу) иммунизировали четыре раза (дни 0, 14, 28, 77) подкожно 2,5 мкг или 10 мкг гликанового антигена в перерасчете на инъекцию с адьювантом гидроксида алюминия (Alum) или без него, как указано. PBS с Alum служил отрицательным контролем. Иммуноген был конъюгатом 56. Смешанные сыворотки из 15 разных временных точек (дни 0, 7, 21, 35, 77 и 84) тестировали на общий IgG против инактивированной формалином бактерии *C. difficile* (штамм 630), нанесенной на планшеты для ELISA. Покрытые планшеты для ELISA, приобретенные у tgcBIOMICS GmbH, блокировали посредством 200 мкл на лунку коммерческого блокирующего 20 реагента (Roche, ref. 11112589001) в течение 2 часов. Сыворотки разбавляли 1: 100 с помощью 1% (масс./об.) БСА в PBS и инкубировали в течение 1 часа в объеме 100 мкл на лунку. Общий IgG затем определяли с использованием HRP-конъюгированного козьего анти-кроличьего IgG вторичного антитела (Sigma-Aldrich, ссылка A4914), 25 разбавленного до 1:10 000 в 1% (масс./об.) BSA в PBS в течение 30 мин и проявляли с использованием субстрата ТМВ. (Thermo Scientific, исх. 34028). Абсорбцию измеряли при 450 нм в считывающем устройстве для микропланшетов, и данные с вычетом фона наносили на график с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Из Фигуры 16 очевидно, что вакцинация кроликов конъюгатом 56 индуцирует антитела IgG, которые связываются с поверхностью бактерий *C. difficile*, штамм 630. Кроме того, 30 добавление адьюванта Alum приводит к более высоким общим титрам IgG.

**Фигура 17** демонстрирует ELISA титры кроличьих антисывороток против штамма 630 *C. difficile* (индивидуальные сыворотки). Кроликов (4 животных в перерасчете в исследуемую группу) иммунизировали четыре раза (дни 0, 14, 28, 77) подкожно посредством 2,5 мкг или 10 мкг гликанового антигена в перерасчете на

инъекцию с адьювантом гидроксида алюминия (Alum) или без него, как указано. PBS с Alum служил отрицательным контролем. Иммуноген был конъюгатом 56. Сыворотки из разных временных точек (дни 0, 735, 77 и 84) тестировали на общий IgG против инактивированной формалином бактерии *C. difficile* (штамм 630), нанесенной на планшеты для ELISA. Покрытые планшеты для ELISA, приобретенные у tgcBIOMICS GmbH, блокировали посредством 200 мкл на лунку коммерческого блокирующего реагента (Roche, ref. 11112589001) в течение 2 часов. Сыворотки разбавляли 1: 300 1% (масс./об.) BSA в PBS и инкубировали в течение 1 часа в объеме 100 мкл на лунку. Общий IgG определяли с использованием HRP-конъюгированного козьего анти-кроличьего IgG вторичного антитела (Sigma-Aldrich, ссылка A4914), разбавленного до 1:10 000 в 1% (масс./об.) BSA в PBS в течение 30 мин и проявляли с использованием субстрата TMB (Thermo Scientific, исх. 34028). Абсорбцию измеряли при 450 нм в считывающем устройстве для микропланшетов, и данные с вычетом фона наносили на график с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Из фигуры 17 очевидно, что вакцинация кроликов конъюгатом 56 индуцирует антитела IgG, которые связываются с поверхностью бактерий *C. difficile*, штамм 630. Кроме того, добавление адьюванта Alum приводит к более высоким общим титрам IgG.

**Фигура 18** демонстрирует ELISA титры кроличьих антисывороток против штамма R20291 *C. difficile*. Кроликов (4 животных в перерасчете в исследуемую группу) иммунизировали четыре раза (дни 0, 14, 28, 77) подкожно посредством 2,5 мкг или 10 мкг гликанового антигена в перерасчете на инъекцию с адьювантом гидроксида алюминия (Alum) или без него, как указано. PBS с Alum служил отрицательным контролем. Иммуноген был конъюгатом 56. Смешанные сыворотки из разных временных точек (дни 21, 35, 77 и 84) тестировали на общий IgG против инактивированной формалином бактерии *C. difficile* (штамм R20291), нанесенной на планшеты для ELISA. Коммерчески доступные планшеты для ELISA с покрытием блокировали посредством 200 мкл на лунку коммерческого блокирующего реагента (Roche, ref. 11112589001) в течение 2 часов. Сыворотки разбавляли 1: 100 1% (масс./об.) BSA в PBS и инкубировали в течение 1 часа в объеме 100 мкл на лунку. Общий IgG определяли с использованием HRP-конъюгированного козьего анти-кроличьего IgG вторичного антитела (Sigma-Aldrich, ссылка A4914), разбавленного до 1:10 000 в 1% (масс./об.) BSA в PBS в течение 30 мин, и проявляли с использованием субстрата TMB (Thermo Scientific, исх. 34028). Абсорбцию измеряли при 450 нм в считывающем устройстве для микропланшетов, и данные с вычетом фона наносили на

график с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Из Фигуры 18 очевидно, что вакцинация кроликов конъюгатом 56 индуцирует антитела IgG, которые связываются с поверхностью бактерии *C. difficile*, штамм R20291. Кроме того, добавление адъюванта Alum приводит к более высоким общим титрам IgG.

5           **Фигура 19А** демонстрирует ELISA титры кроличьей антисыворотки (день 35) против штамма VPI10463 *C. difficile*. Кроликов (4 животных в перерасчете в исследуемую группу) иммунизировали четыре раза (дни 0, 14, 28, 77) подкожно посредством 2,5 мкг или 10 мкг гликанового антигена в перерасчете на инъекцию с адъювантом гидроксида алюминия (Alum) или без него, как указано. PBS с Alum служил отрицательным контролем. Иммуноген был конъюгатом 56. Смешанные сыворотки с 35-го дня тестировали на общий IgG против инактивированной формалином бактерии *C. difficile* (штамм VPI10463), нанесенной на планшеты для ELISA. Из Фигуры 19А очевидно, что вакцинация кроликов конъюгатом 56 индуцирует антитела IgG, которые связываются с поверхностью бактерии *C. difficile*, штамм VPI10463. Кроме того, добавление адъюванта Alum приводит к более высоким общим титрам IgG.

10           **Фигура 19В** демонстрирует ELISA титры кроличьей антисыворотки (день 35) против выделенного полисахарида PS-II *C. difficile*. Кроликов (4 животных в перерасчете на исследуемую группу) иммунизировали четыре раза (дни 0, 14, 28, 77) подкожно посредством 2,5 мкг или 10 мкг гликанового антигена в перерасчете на инъекцию адъюванта гидроксида алюминия (Alum), как указано. PBS с Alum служил отрицательным контролем. Иммуноген был конъюгатом 56. Смешанные сыворотки с 35-го дня тестировали на общий IgG против выделенного полисахарида PS-II. Из Фигуры 19В очевидно, что вакцинация кроликов конъюгатом 56 индуцирует антитела IgG, которые связываются с выделенным полисахаридом PS-II.

20           **Фигура 19С** демонстрирует ELISA титры кроличьей антисыворотки (день 35) против штамма 630 *C. difficile* с или без предварительной инкубации с выделенным полисахаридом PS-II *C. difficile*. Кроликов (4 животных в перерасчете на исследуемую группу) иммунизировали четыре раза (дни 0, 14, 28, 77) подкожно посредством 10 мкг гликанового антигена в перерасчете на инъекцию адъюванта гидроксида алюминия (Alum). Иммуноген был конъюгатом 56. Смешанные сыворотки (разбавляли 1: 100 в 1% (масс./об.) BSA в PBS) с 35 дня инкубировали на льду в течение 30 мин с 10 или 50 мкг выделенного полисахарида PS-II или с PBS. Затем сыворотки инкубировали в течение 1 часа (100 мкл/лунку) на коммерчески доступных планшетах для ELISA с

покрытием (штамм *C. difficile* 630), которые предварительно блокировали посредством 200 мкл на лунку коммерческого блокирующего реагента (Roche, ref. 11112589001) в течение 2 часов. Общий IgG определяли с использованием HRP-конъюгированного козьего анти-кроличьего IgG вторичного антитела (Sigma-Aldrich, ссылка A4914),  
5 разбавленного до 1:10 000 в 1% (масс./об.) BSA в PBS в течение 30 мин и проявляли с использованием субстрата TMB (Thermo Scientific, исх. 34028). Абсорбцию измеряли при 450 нм в считывающем устройстве для микропланшетов, и данные с вычетом фона наносили на график с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Из  
10 фигуры 19С очевидно, что связывание кроличьей антисыворотки с бактериями *C. difficile* может блокироваться полисахаридом PS-II дозозависимым образом, что указывает на то, что ответы антибактериальных антител являются специфическими для полисахарида PS-II.

**Фигура 20** демонстрирует ELISA титры кроличьей антисыворотки против синтетических гексасахарид 54PS-II *C. difficile*. Кроликов (4 животных в перерасчете на  
15 испытываемую группу) иммунизировали четыре раза (дни 0, 14, 28, 77) подкожно посредством 2,5 мкг или 10 мкг гликанового антигена в перерасчете на инъекцию с адьювантом гидроксида алюминия (Alum) или без него, как указано. PBS с Alum служил отрицательным контролем. Иммуноген был конъюгатом 5б. Смешанные сыворотки из разных временных точек (дни 0, 21, 35, 77 и 84) были протестированы на  
20 общий IgG против синтетического гексасахарид 54 PS-II *C. difficile*. Из Фигуры 20 очевидно, что вакцинация кроликов конъюгатом 5б индуцирует антитела IgG, которые связываются с синтетическим иммуногеном 54. Кроме того, добавление адьюванта Alum приводит к более высоким общим титрам IgG.

**Фигура 21** демонстрирует ELISA титры кроличьих антисывороток против  
25 штамма 630 *C. difficile*. Мышей (7 или 8 животных в перерасчете на испытываемую группу) иммунизировали два раза (дни 0, 14, 28) подкожно либо конъюгатом 94, либо конъюгатом 5б в дозе 0,5 или 2 мкг гликанового антигена в перерасчете на инъекцию. PBS служил отрицательным контролем, и адьювант гидроксида алюминия (Alum) использовали для всех иммунизаций. Смешанные сыворотки с 21 и 35 дня тестировали  
30 на общий IgG против инактивированной формалином бактерии *C. difficile* (штамм 630), нанесенной на планшеты для ELISA. Из Фигуры 21 очевидно, что вакцинация мышей конъюгатом 94 или 5б индуцирует антитела IgG, которые связываются с поверхностью бактерии *C. difficile*, штамм 630.

**Фигура 22** демонстрирует ELISA титры кроличьих антисывороток против штамма R20291 *C. difficile*. Мышей (7 или 8 животных в перерасчете на испытываемую группу) иммунизировали два раза (дни 0, 14, 28) подкожно либо конъюгатом 94, либо 56 в дозе 0,5 или 2 мкг гликанового антигена в перерасчете на инъекцию. PBS служил отрицательным контролем, и адъювант гидроксида алюминия (Alum) использовали для всех иммунизаций. Смешанные сыворотки с 21 и 35 дня тестировали на общий IgG против инактивированных формалином бактерий *C. difficile* (штамм R20291), нанесенных на планшеты для ELISA. Из Фигуры 22 очевидно, что вакцинация мышей конъюгатом 94 или 56 индуцирует антитела IgG, которые связываются с поверхностью бактерий *C. difficile*, штамм 630.

**Фигура 23** демонстрирует ELISA титры мышинных антисывороток против синтетических антигенов PS-II *C. difficile*. Мышей (7 или 8 животных в перерасчете на испытываемую группу) иммунизировали два раза (дни 0, 14, 28) подкожно либо конъюгатом 94, либо конъюгатом 56 в дозе 0,5 или 2 мкг гликанового антигена на инъекцию. PBS служил отрицательным контролем, и адъювант гидроксида алюминия (Alum) использовали для всех иммунизаций. Смешанные сыворотки с 21 и 35 дня тестировали на общий IgG против соответствующего синтетического гликанового антигена *C. difficile*, который использовали для иммунизации. Из Фигуры 23 очевидно, что вакцинация мышей конъюгатом 94 или 56 индуцирует антитела IgG, которые связываются с синтетическими иммуногенами. Кроме того, добавление адъюванта Alum приводит к более высоким общим титрам IgG.

**Фигура 24** демонстрирует SEC-хроматограммы двух гликоконъюгатов 94 и 56, используемых для экспериментов по иммунизации. Неконъюгированный белок CRM<sub>197</sub> служил контролем.

**Фигура 25** демонстрирует SDS-PAGE гликоконъюгатов *C. difficile* 94 и 56 (2,5 мкг на лунку), используемых для экспериментов по иммунизации, разделенных с использованием 10% полиакриламидного геля. Неконъюгированный белок CRM<sub>197</sub> служил контролем.

Следующие примеры включены в данный документ для демонстрации предпочтительного варианта осуществления изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что методы, раскрытые в качестве примеров, которые следуют за методами, открытыми изобретателем для хорошего функционирования изобретения на практике и таким образом, можно рассматривать как предпочтительные способы для его практики. Однако специалисты в данной

области должны понимать, в свете настоящего описания, что многие изменения могут быть внесены в конкретные варианты осуществления изобретения, которые раскрыты и по-прежнему получают аналогичный или похожий результат без отклонения от сути и объема данного изобретения.

5 Дальнейшие модификации и альтернативные варианты осуществления изобретения различных аспектов в соответствии с изобретением будут очевидны специалистам в данной области техники ввиду данного описания. Соответственно, данное описание должно толковаться только как иллюстративное и предназначенное для обучения специалистов в данной области общему способу выполнения  
10 изобретения. Следует понимать, что формы изобретения, показанные и описанные в данном документе, следует рассматривать как примеры вариантов осуществления изобретения. Элементы и материалы могут быть заменены на те, которые проиллюстрированы и описаны в данном документе, части и процессы могут быть обращены, и некоторые особенности в соответствии с изобретением могут быть  
15 использованы независимо, всё, как будет очевидно специалисту в данной области после ознакомления с данным описанием с изобретением. В элементы, описанные в данном документе, могут быть внесены изменения без отклонения от сути и объема изобретения, как описано в последующей формуле изобретения.

### **Примеры**

#### **А. Химический синтез**

##### Общая информация:

Если не указано иначе, использовали растворители коммерческой категории. Сухие растворители получали из системы Waters Dry Solvent System. Растворители для хроматографии перед использованием дистиллировали. Чувствительные реакции  
25 проводили в термически просушенной стеклянной посуде и в атмосфере аргона. Аналитическую тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на стеклянных планшетах Kieselgel 60 F254, предварительно покрытых силикагелем толщиной 0,25 мм. Пятна визуализировали путем окрашивания раствором ванилина (6% (масс./об.) и 10% (об./об.) серной кислоты в 95% EtOH) или с помощью красителя Ханессиана (5% (масс./об.) молибдата аммония, 1% (масс./об.) сульфата церия (II) и 10% (об./об.)  
30 серной кислоты в воде). Колоночную хроматографию на силикагеле выполняли на Fluka Kieselgel 60 (230-400 меш).

$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и двумерные спектры ЯМР были измерены на спектрометре Varian 400-MR при 296 К. Химические сдвиги (d) указаны в миллионных долях (м.д.)

относительно соответствующих пиков остаточного растворителя ( $\text{CDCl}_3$ :  $d$  7.27 в  $^1\text{H}$  и 77.23 в  $^{13}\text{C}$  ЯМР;  $\text{CD}_3\text{OD}$ :  $d$  3.31 в  $^1\text{H}$  и 49.15 в  $^{13}\text{C}$  ЯМР).

Следующие сокращения используются для обозначения кратностей пиков: *s* синглет; *d* дублет; *dd* дублет дублетов; *t* триплет; *dt* дублет триплетов; *q* квартет; *m* мультиплет. Константы связи (*J*) указаны в герцах (Гц). Измерения оптического вращения (OR) проводили с помощью поляриметра Schmidt & Haensch UniPol L1000 при  $\lambda = 589$  нм и концентрации (с), выраженной в г/100 мл в растворителе, как указано в скобках. Масс-спектрометрию высокого разрешения (МСВР) осуществляли в Free University Berlin, Mass Spectrometry Core Facility на масс-спектрометре Agilent 6210 ESI-TOF. Инфракрасные (IR) спектры измеряли на спектрометре Perkin Elmer 100 FTIR.

### A.1 Сокращения

	ACN	ацетонитрил
	AcOH	уксусная кислота
15	AIBN	азобисизобутиронитрил
	Алгидрогель	Адьювант-Гель гидроксида алюминия, Al: 10 мг/мл (фирмы Brenntag)
	Alloc	аллилоксикарбонил
	водн.	водный
20	$\text{BH}_3$	боран
	$\text{BBr}_3$	трибромид бора
	Boc	трет-бутоксикарбонил
	BnBr	бензилбромид
	br.	широкий
25	CAS	регистрационный номер CAS (CAS = Химическая реферативная служба)
	$\text{CHCl}_3$	хлороформ
	cHex	циклогексан
	d	дуплет
30	dd	дуплет дуплетов
	ДХМ	дихлорметан
	DDQ	2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон
	DEAD	диэтилазодикарбоксилат
	DIPEA	N,N-диизопропилэтиламин

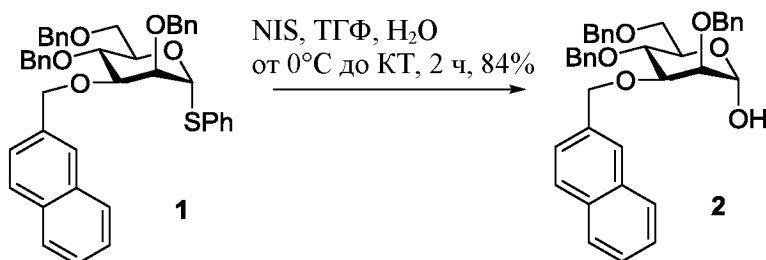


	DMAP	диметиламинопиридин
	DME	диметоксиэтан
	DMФА	диметилформаид
	DMCO	диметилсульфоксид
5	DPPA	дифенилфосфорилазид
	EDC•HCl	N1-((этилимино)метилен)-N3,N3-диметилпропан-1,3- диамин гидрохлорид
	ES	электроспрей
	Et <sub>2</sub> O	диэтиловый эфир
10	EtOAc	этилацетат
	FCS	фетальная телячья сыворотка
	FmocCl	9-флуоренилметоксикарбонилхлорид
	GSDMD	Гасдермин-D
	ч	час
15	HCl	хлористоводородная кислота
	HEK293T	линия фибробластических клеток эмбриональной почки
	H <sub>2</sub> O	вода
	HOEt.H <sub>2</sub> O	1H-бензо[d][1,2,3]триазол-1-ол гидрат
	hPBMC	моноклеарные клетки периферической крови человека
20	IC <sub>50</sub>	концентрация полумаксимального ингибирования
	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	карбонат калия
	LDH	лактатдегидрогеназа
	LiAlH <sub>4</sub>	алюмогидрид лития
	m	мультиплет
25	MeCN	ацетонитрил
	MeOH	метанол
	MeI	метил йодид
	MgSO <sub>4</sub>	сульфат магния
	мин	минуты
30	МС	масс-спектрометрия
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	карбонат натрия
	NaCNBH <sub>3</sub>	цианоборогидрид натрия
	NaHCO <sub>3</sub>	гидрокарбонат натрия
	NaH	гидрид натрия

	NaOH	гидроксид натрия
	NAP	2-нафтилметил
	NapBr	2-нафтилметилбромид
	NaPi буфер	фосфатно-буферный солевой раствор (PBS)
5	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	сульфат натрия
	NBS	N-бромсукцинимид
	NCS	N-хлорсукцинимид
	NET	нейтрофильные внеклеточные ловушки
	NIS	N-йодосукцинимид
10	ЯМР	ядерный магнитный резонанс
	PBBBr	<i>n</i> -бромбензилбромид
	PBS = NaPi	фосфатно-буферный солевой раствор
	Pd/C	палладиевый катализатор на углеродном носителе
	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	Тетраakis(трифенилфосфин)палладий (0)
15	PMA	форбол 12-миристат 13-ацетат
	PPh <sub>3</sub>	трифенилфосфин
	PTFE	политетрафторэтилен
	q	квартет
	RBF	колба с круглым дном
20	КТ	комнатная температура
	s	синглет
	насыщ.	насыщенный
	sep	септет
	t	триплет
25	TBAF	фторид тетрабутиламмония
	ТФУ	трифторуксусная кислота
	ТГФ	тетрагидрофуран
	ТНР1	линия раковых клеток острого моноцитарного лейкоза
	ТСХ	тонкослойная хроматография
30	TMSOTf	триметилсилил трифторметансульфонат
	TsOH	тозиновая кислота
	Масс.	масса

## A.2 Синтез гексасахарида 33

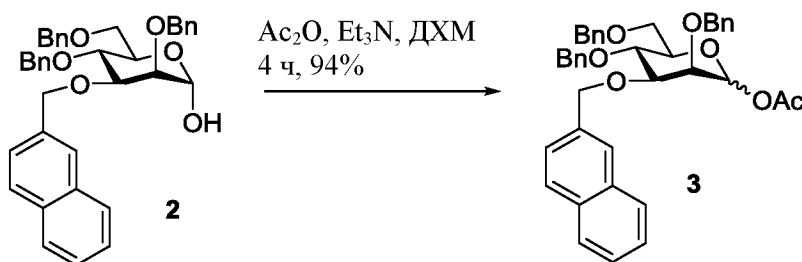
### Синтез соединения 2



5 NIS (3.0 эквив.) добавляли к охлажденному раствору соединения **1** (полученного в соответствии с *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 3578 – 3583) в ТГФ : H<sub>2</sub>O (4:1, 25 мл/1 г) при 0°C. Через 10 мин, реакционную смесь доводили до КТ и перемешивали в течение 2 ч. После полного израсходования исходного вещества, ТГФ удаляли при пониженном давлении и полученный сырой остаток растворяли в EtOAc и промывали водн. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и водн. NaHCO<sub>3</sub>. Отделенный органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, концентрировали и сырой продукт очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-60% EtOAc в циклогексане) с получением желаемого полуацетала **2** (84%) в виде пены. МСВР (ESI+) рассчитывали для C<sub>38</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 613.2566, было обнаружено 613.2574.

15

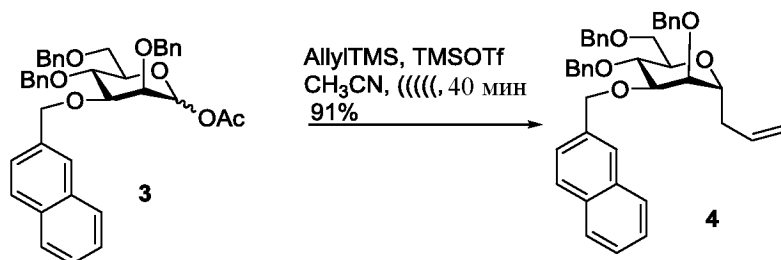
### Синтез соединения 3



20 Ac<sub>2</sub>O (2.0 эквив.) и триметиламин (6.0 эквив.) добавляли к чистому раствору соединения **2** в ДХМ (10 мл/1 г) и поддерживали при перемешивании при КТ в течение 4 ч. После полного израсходования исходного вещества, растворители удаляли в вакууме и сырой продукт очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-50% EtOAc в циклогексане) с получением желаемого продукта **3** (94%) в виде вязкой жидкости. МСВР (ESI+) рассчитывали для C<sub>40</sub>H<sub>40</sub>O<sub>7</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 655.2672, было обнаружено 655.2679.

25

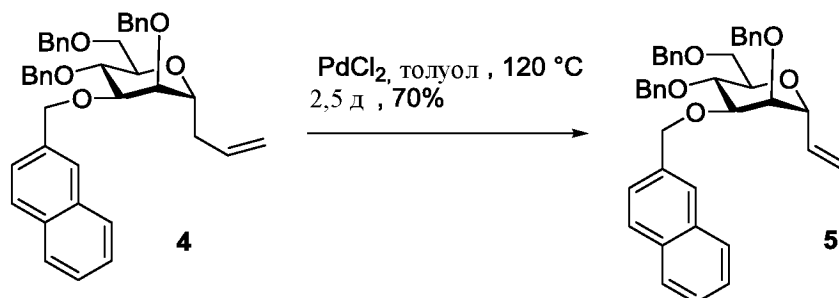
## Синтез соединения 4



Аллил триметилсилан (2.0 эквив.) добавляли к чистому раствору соединения **3** в сухом ацетонитриле (20 мл/1 г) при комнатной температуре и затем по каплям добавляли TMSOTf (0.5 эквив.). Колбу запаивали и помещали в ванну для ультразвуковой очистки (частота 80 Гц, 100% мощность 230 В, КТ) пока реакция не была завершена с помощью ТСХ (40 мин)). После полного израсходования исходного вещества, реакцию гасили с помощью водн. NaHCO<sub>3</sub>, разбавляли EtOAc и промывали соляным раствором. Отделенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, концентрировали и сырой продукт очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-60% EtOAc в циклогексане) с получением желаемого С-гликозида **4** в виде масла (91%). МСВР (ESI+) рассчитывали для C<sub>41</sub>H<sub>42</sub>O<sub>5</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 637.2930, было обнаружено 637.2929.

15

## Синтез соединения 5

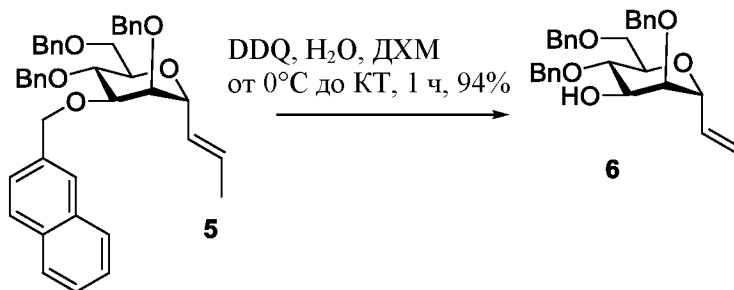


PdCl<sub>2</sub> (0.1 эквив.) добавляли к дегазированному (30 мин) раствору соединения **4** в толуоле (100 мл/1 г). После добавления PdCl<sub>2</sub> реакцию гасили с помощью водн. NaHCO<sub>3</sub>, разбавляли EtOAc и промывали соляным раствором. Отделенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, концентрировали и сырой продукт очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-50% EtOAc в циклогексане) с получением соединения с мигрированной двойной

25

связью **5** (70%) в виде желтоватой жидкости. МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{41}H_{42}O_5Na^+$   $[M+Na]^+$  637.2930, было обнаружено 637.2942.

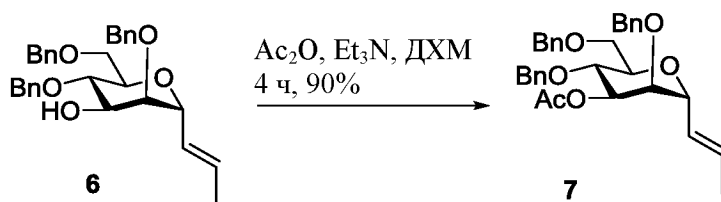
### Синтез соединения **6**



DDQ (1.2 эквив.) добавляли к двухфазному раствору соединения **5** в ДХМ:Н<sub>2</sub>O (19:1, 20 мл/1 г) при 0°C. Через 10 мин при 0°C, реакцию смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч.

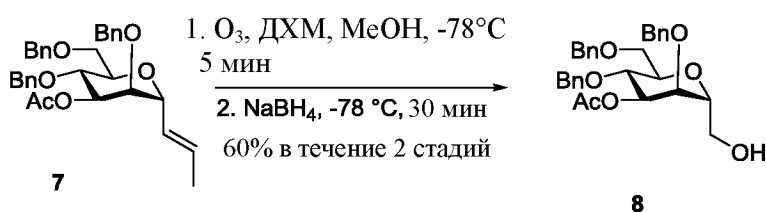
10 После полного израсходования исходного вещества, реакцию смесь разбавляли ДХМ и экстрагировали водн. NaHCO<sub>3</sub> и соляным раствором. Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали, и фильтрат концентрировали с получением сырого продукта. Сырой продукт очищали с помощью автоматической флэш-хроматографии на силикагеле (0-80% EtOAc в циклогексане) с получением желаемого продукта **6** в  
15 виде белого масла (94%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{30}H_{34}O_5Na^+$   $[M+Na]^+$  497.2304, было обнаружено 497.2312.

### Синтез соединения **7**



20 Ac<sub>2</sub>O (2.0 эквив.) и триметиламин (6.0 эквив.) добавляли к чистому раствору соединения **6** в ДХМ (10 мл/1 г) и поддерживали при перемешивании при КТ в течение 4 ч. После полного израсходования исходного вещества, растворители удаляли в вакууме и сырой продукт очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-50% EtOAc в циклогексане) с получением желаемого  
25 продукта **7** (90%) в виде вязкой жидкости. МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{32}H_{36}O_6Na^+$   $[M+Na]^+$  539.2410, было обнаружено 539.2419.

## Синтез соединения 8

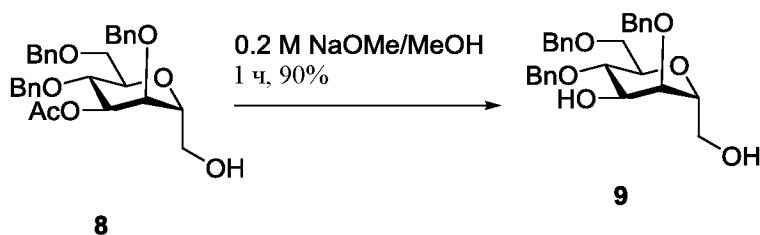


5

Озон барботировали через охлажденный раствор соединения 7 в ДХМ:MeOH (1:1, 170 мл/1 г) при -78°C до того, как сохранялся синий цвет. Чтобы удалить остаток O<sub>3</sub>, чистый O<sub>2</sub> барботировали через реакционную смесь, пока раствор не станет чистым. Затем, NaBH<sub>4</sub> добавляли при -78°C, и реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин при такой же температуре. После полного израсходования исходного вещества, реакционную смесь гасили водн. NH<sub>4</sub>Cl при -78°C и промывали ДХМ. Отделенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали при пониженном давлении. Сырой остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100% EtOAc в циклогексане) с получением желаемого соединения 8 (60% в течение 2 стадий) в виде желтоватой жидкости. МСВР (ESI<sup>+</sup>) рассчитывали для C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 529.2202, было обнаружено 529.2220.

15

## Синтез соединения 9

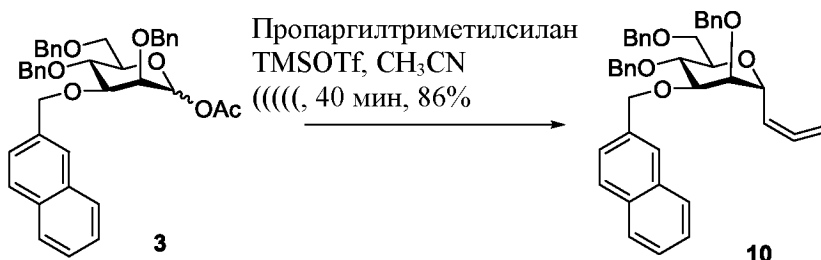


20

К раствору соединения 8 в метаноле (10 мл/1 г) добавляли метоксид натрия в MeOH (0.5 M, 10 мл) и смесь поддерживали при перемешивании при КТ в течение 1 ч. После полного израсходования соединения 8, AcOH (1 мл) добавляли до тех пор, пока pH реакционной смеси не станет кислотным. После нейтрализации, реакционную смесь концентрировали, и сырой остаток очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (0-100%, EtOAc в циклогексане) с получением желаемого соединения 9 (90%) в виде пасты. МСВР (ESI<sup>+</sup>) рассчитывали для C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 487.2097, было обнаружено 487.2111.

25

## Альтернативный синтез соединения 9 – соединения 10

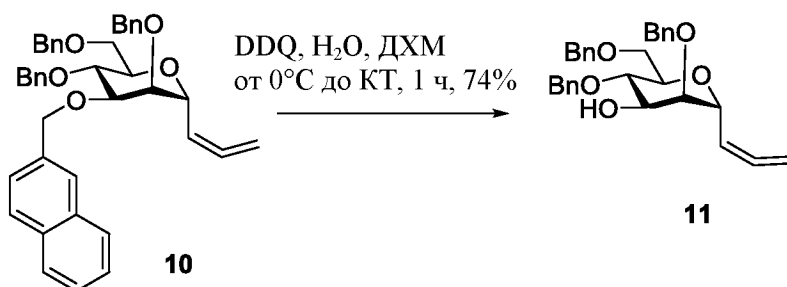


5 Пропаргилтриметилсилан (9.11 мл, 61.5 ммоль, 2.0 эквив.) добавляли к чистому раствору соединения **3** (19.5 г, 30.8 ммоль) в сухом ацетонитриле (390 мл) при комнатной температуре и затем по каплям добавляли TMSOTf (2.8 мл, 15.4 ммоль, 0.5 эквив.). Колбу запаивали и помещали в ванну для ультразвуковой очистки (частота 80 Гц, 100% мощность 230 V, 5-10 °С) пока реакция не была завершена с помощью ТСХ

10 (40 мин)). После полного израсходования исходного вещества, реакционную смесь гасили водн. NaHCO<sub>3</sub>, разбавляли EtOAc и промывали соляным раствором. Отделенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, концентрировали и сырой продукт очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-60% EtOAc в циклогексане) с получением желаемого С-гликозида **10** в виде масла

15 (16.2 г, 86%). МСВР (ESI+) рассчитывали для C<sub>41</sub>H<sub>40</sub>O<sub>5</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 635.2773, было обнаружено 635.2786.

## Альтернативный синтез соединения 9 – соединения 11



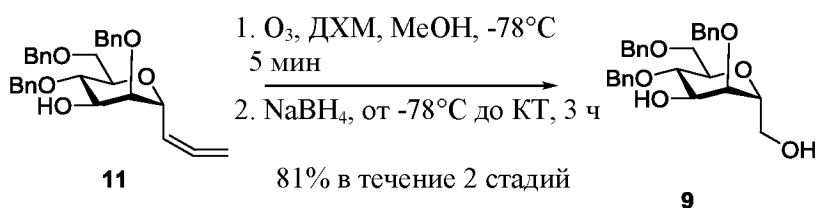
20 DDQ (18.7 г, 82.0 ммоль, 1.2 эквив.) добавляли к двухфазному раствору соединения **10** (42 г, 68.5 ммоль) в ДХМ:H<sub>2</sub>O (19:1, 950 мл) при 0 °С. Через 10 мин при 0 °С, реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. После полного израсходования исходного

25 вещества, реакционную смесь разбавляли ДХМ и экстрагировали водн. NaHCO<sub>3</sub> и

соляным раствором. Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали, и фильтрат концентрировали с получением сырого продукта. Сырой продукт очищали с помощью автоматической флэш-хроматографии на силикагеле (0-80% EtOAc в циклогексане) с получением желаемого продукта **11** в виде белого масла (24 г, 74%, только  $\alpha$ -изомер).

5 МСВР (ESI+) рассчитывали для  $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_5\text{Na}^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  495.2147, было обнаружено 495.2151.

### Альтернативный синтез соединения **9** – соединения **9**



10

Озон барботировали через охлажденный раствор соединения **11** (10.6 г, 22.4 ммоль) в ДХМ:MeOH (1:1, 1 L) при  $-78^\circ\text{C}$  до того, как сохранялся синий цвет. Чтобы удалить остаток  $\text{O}_3$ , чистый  $\text{O}_2$  барботировали через реакционную смесь, пока раствор не станет чистым. Затем,  $\text{NaBH}_4$  (5.1 г, 135.0 ммоль, 6.0 эквив.) добавляли при  $-78^\circ\text{C}$ , и реакционную смесь постепенно доводили до КТ в течение 3 ч и перемешивали при КТ в течение 45 мин. После полного израсходования исходного вещества, реакционную смесь гасили водн.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и промывали ДХМ трижды. Отделенные органические слои сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали при пониженном давлении. Сырой остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100% EtOAc в циклогексане) с получением желаемого соединения **9** (8.4 г, 81% в течение 2 стадий) в виде масла (липкое белое твердое вещество после высыхания в вакууме). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_6\text{Na}^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  487.2097, было обнаружено 487.2106.

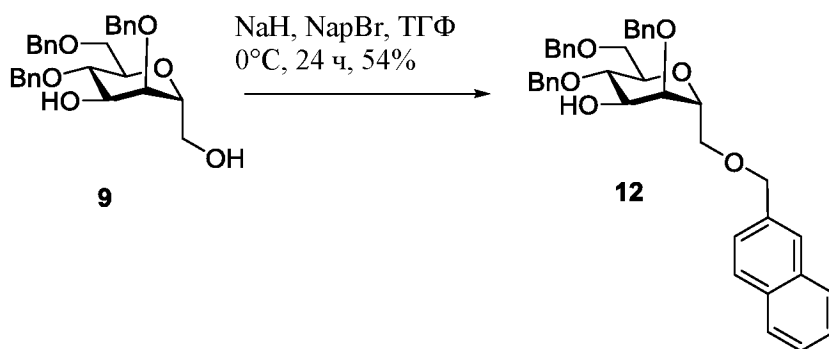
15

20

25

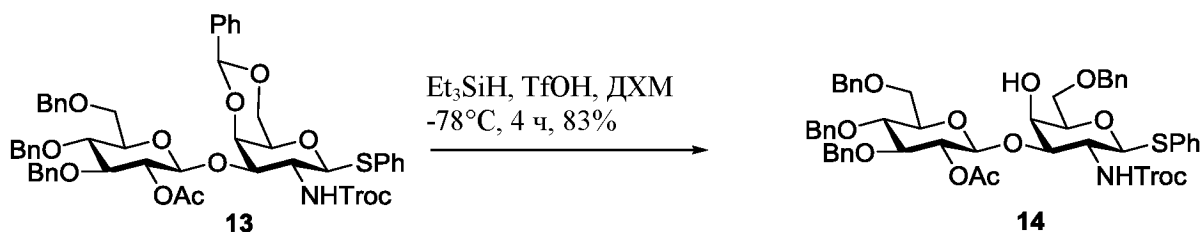


## Синтез соединения 12



Гидрид натрия (2.0 эквив., 60% в минеральном масле) добавляли при 0°C к перемешиваемому раствору соединения **9** в ТГФ (20 мл/1 г). Через 10 мин добавляли **5** NapBr (1.05 экв.) и смесь перемешивали в течение 24 ч при 0°C. Через 24 ч, реакцию смесь гасили MeOH, водой, и экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои промывали соляным раствором, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали, и концентрировали. Полученный сырой остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100%, EtOAc в циклогексане) с **10** получением желаемого соединения **12** (54%) в виде пасты. МСВР (ESI+) рассчитывали для C<sub>39</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 627.2723, было обнаружено 627.2748.

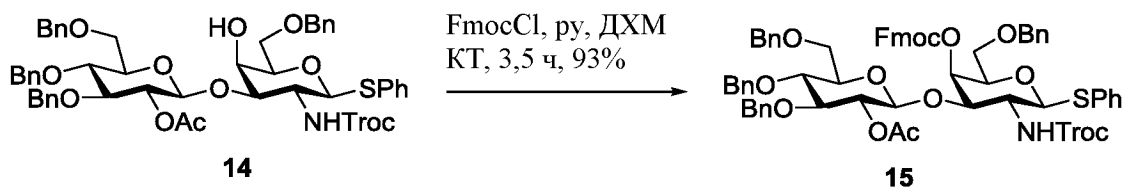
## Синтез соединения 14



Et<sub>3</sub>SiH (3.0 эквив.), TfOH (3.3 эквив.) добавляли к охлажденному раствору соединения **13** (полученное в соответствии с *Org. Lett.* **2011**, *13*, 378 – 381) в ДХМ (10 мл/1 г) со свежее активированными молекулярными ситами (4 Å) при -78°C. Реакционную смесь перемешивали при такой же температуре в течение 4 ч. После **20** полного израсходования исходного вещества, реакцию смесь гасили Et<sub>3</sub>N (1 мл) и разбавляли ДХМ. Раствор промывали водн. NaHCO<sub>3</sub> и соляным раствором. Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Сырой остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100%, EtOAc в циклогексане) с получением желаемого 4-ОН соединения

**14** (83%) в виде белого твердого вещества. МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{51}H_{54}Cl_3NO_{12}NaS^+$   $[M+Na]^+$  1034.2300, было обнаружено 1034.2406.

### Синтез соединения 15

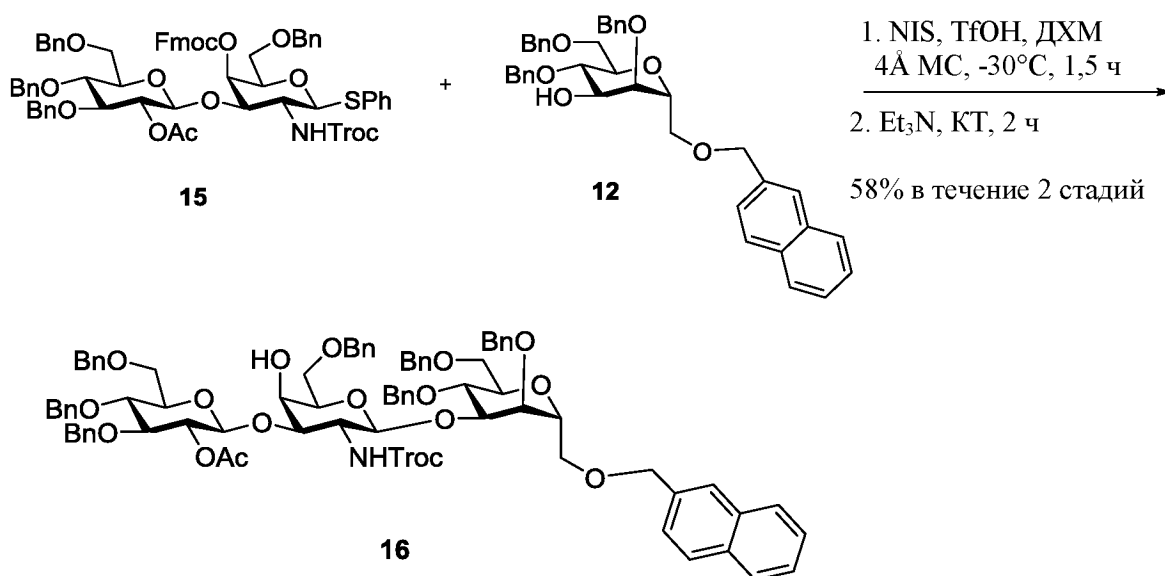


5

FmocCl (2.0 эквив.) и пиридин (3.0 эквив.) добавляли к чистому раствору соединения **14** в ДХМ (10 мл/1 г) и поддерживали при перемешивании при КТ в течение 3.5 ч. После полного израсходования исходного вещества, реакционную смесь разбавляли ДХМ и ее промывали соляным раствором. Органический слой сушили над  $Na_2SO_4$ , фильтровали и концентрировали. Сырой остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100%, EtOAc в циклогексане) с получением желаемого соединения **15** (93%) в виде белого твердого вещества. МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{66}H_{64}Cl_3NO_{14}NaS^+$   $[M+Na]^+$  1256.2981, было обнаружено 1256.3125.

15

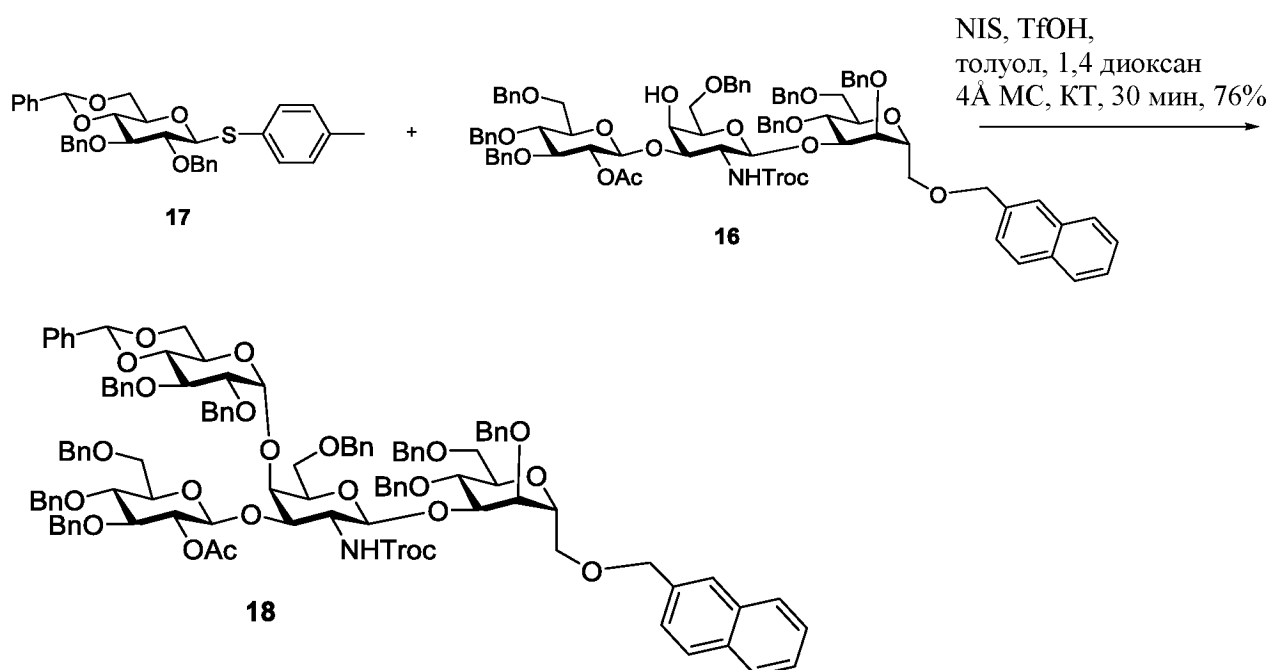
### Синтез соединения 16



20 NIS (1.4 эквив.) и TfOH (0.26 эквив.) добавляли к охлажденному раствору акцептора **15** (1.0 эквив.) и донора **12** (1.2 эквив.) в ДХМ (0.06 М) в присутствии 4 Å МС при -30°C. Через 1.5 ч, исходное вещество было полностью израсходовано, затем

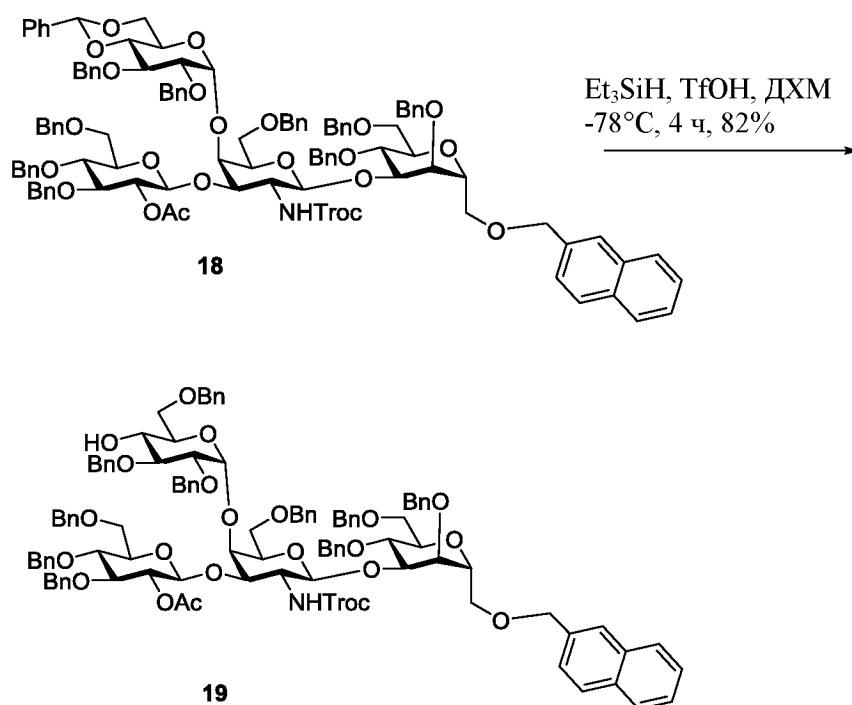
добавляли Et<sub>3</sub>N (1.4 эквив.) и поддерживали при перемешивании при КТ в течение 2 ч. Через 2 ч, реакционную смесь разбавляли ДХМ и МС фильтровали. Органический слой промывали водн. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и отделенный органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Сырой остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100%, EtOAc в циклогексане) с получением желаемого акцептора трисахарида **16** (58% в течение 2 стадий) в виде белого твердого вещества. МСВР (ESI+) рассчитывали для C<sub>84</sub>H<sub>88</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>18</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 1528.4935, было обнаружено 1528.5037.

### 10 Синтез соединения **18**



NIS (1.5 эквив.) и TfOH (0.4 эквив.) добавляли к охлажденному раствору акцептора **16** (1.0 эквив.) и донора **17** (получено в соответствии с *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 162–184) (1.5 эквив.) в смеси толуол:диоксан (4:1, 0.03 М) в присутствии 4 Å МС при 0°C. Через 2 мин, реакционную смесь поддерживали при КТ и перемешивали в течение 30 мин. Через 30 мин, реакционную смесь гасили Et<sub>3</sub>N, разбавляли ДХМ и МС фильтровали. Органический слой промывали водн. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и отделенный органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Сырой остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100%, EtOAc в циклогексане) с получением желаемого тетрасахарида **18** (76%) в виде белого твердого вещества. МСВР (ESI+) рассчитывали для C<sub>111</sub>H<sub>114</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>23</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 1958.6745, было обнаружено 1958.6871.

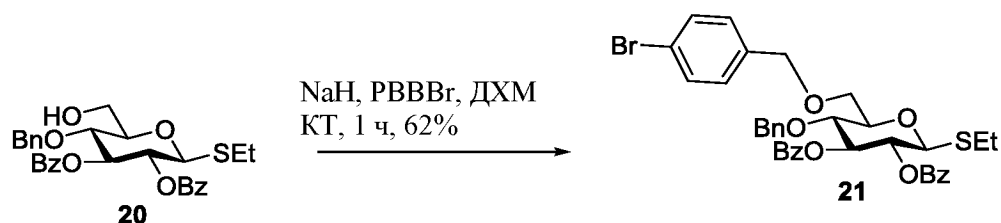
## Синтез соединения 19



- 5  $\text{Et}_3\text{SiH}$  (3.0 эквив.),  $\text{TfOH}$  (3.3 эквив.) добавляли к охлажденному раствору соединения **18** в ДХМ (10 мл/1 г) в присутствии свежеактивированных молекулярных сит (4 Å) при  $-78^\circ\text{C}$ . Реакционную смесь перемешивали при такой же температуре в течение 4 ч. После полного израсходования исходного вещества, реакционную смесь гасили  $\text{Et}_3\text{N}$  (1 мл) и разбавляли ДХМ. Раствор промывали водн.  $\text{NaHCO}_3$  и соляным раствором. Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Сырой остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100%,  $\text{EtOAc}$  в циклогексане) с получением желаемого тетрасахарида **19** (82%) в виде белого твердого вещества. МСВР (ESI+) рассчитывали для  $\text{C}_{111}\text{H}_{116}\text{Cl}_3\text{NO}_{23}\text{Na}^+ [\text{M}+\text{Na}]^+$  1960.6901, было обнаружено 1960.7024.

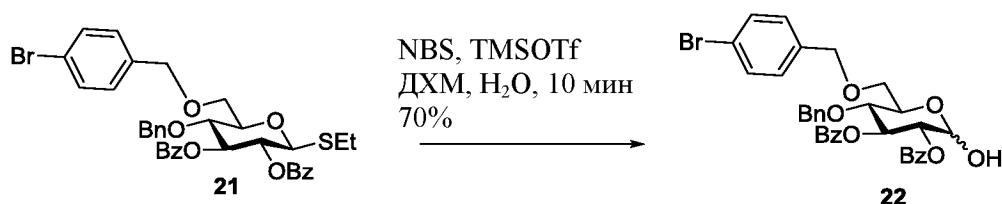
15

## Синтез соединения 21



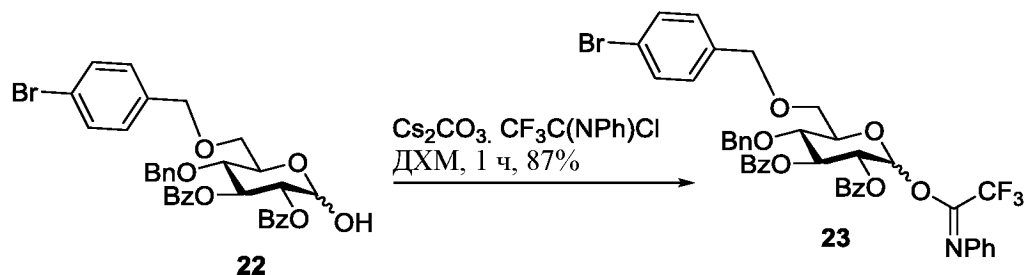
Гидрид натрия (2.0 эквив., 60% в минеральном масле) добавляли при 0°C к перемешиваемому раствору соединения **20** (получено в соответствии с *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, *11*, 481–492) в ДМФА (10 мл/1 г). Через 10 мин, PVBBr (1.1 экв.) добавляли и смесь доводили до КТ. После перемешивания при КТ в течение 1 ч, реакцию смесь гасили NH<sub>4</sub>Cl и экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои промывали соляным раствором, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали, и концентрировали. Полученный сырой остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100%, EtOAc в циклогексане) с получением желаемого соединения **21** (62%) в виде пасты. МСВР (ESI+) рассчитывали для C<sub>36</sub>H<sub>35</sub>BrO<sub>7</sub>NaS<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 713.1185, было обнаружено 713.1225.

### Синтез соединения **22**



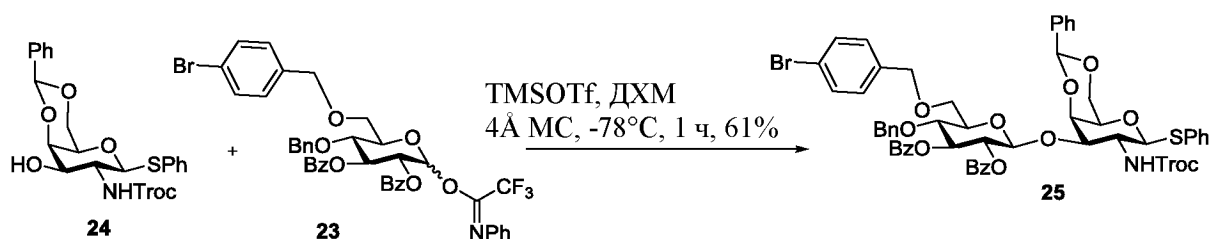
NBS (1.1 эквив.) и TMSOTf (0.1 эквив.) добавляли к охлажденному раствору соединения **21** в ДХМ : H<sub>2</sub>O (20:1, 10 мл/1 г) при 0°C. Через 10 мин, реакцию смесь гасили водн. NaHCO<sub>3</sub> и разбавляли ДХМ. Органический слой промывали соляным раствором. Отделенный органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, концентрировали и сырой продукт очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-60% EtOAc в циклогексане) с получением желаемого полуацетала **22** (70%) в виде пены. МСВР (ESI+) рассчитывали для C<sub>34</sub>H<sub>31</sub>BrO<sub>8</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 669.1100, было обнаружено 669.1132.

### Синтез соединения **23**



$\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (3.0 эквив.),  $\text{CF}_3\text{C}(\text{NPh})\text{Cl}$  (3.0 эквив.) добавляли к перемешиваемому раствору соединения **22** в ДХМ (10 мл/1 г) при  $0^\circ\text{C}$ . Через 10 мин. смесь доводили до КТ и перемешивали в течение 1 ч. После полного израсходования соединения **22**, реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали. Полученный сырой остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-60% EtOAc в циклогексане) с получением желаемого донора-имидата **23** (87%) в виде пены.

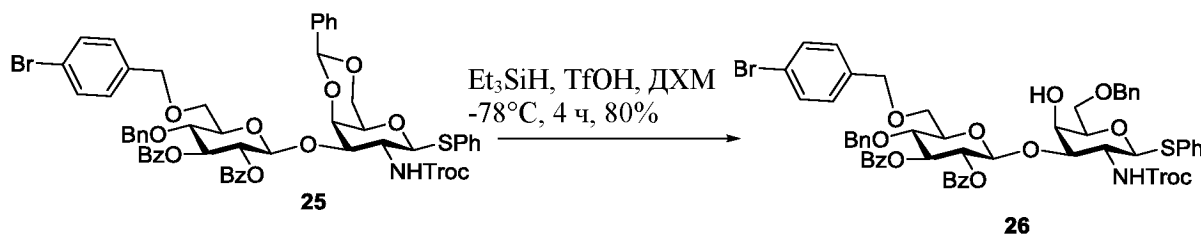
### Синтез соединения 25



Акцептор-тиогликозид **24** синтезировали в соответствии с Danieli, E.; Lay, L.; Proietti, D.; Berti, F.; Costantino, P.; Adamo, R. *Org Lett.* 2011, 13, 378-381.

$\text{TMSOTf}$  в ДХМ (0.1 М, 0.2 эквив.) добавляли к смеси акцептора тиогликозида **24** (1.0 эквив.) и свежесушенного 4 Å МС в ДХМ при  $-78^\circ\text{C}$ . Через 2 мин добавляли раствор имидата **23** (1.2 эквив.) в ДХМ. Через 1 ч реакционную смесь гасили  $\text{Et}_3\text{N}$ , и затем фильтровали через слой целита. Фильтрат концентрировали, и сырой остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100% EtOAc в циклогексане) с получением желаемого дисахарида **25** (61%) в виде твердого вещества. МСВР (ESI+) рассчитывали для  $\text{C}_{56}\text{H}_{51}\text{BrCl}_3\text{NO}_{13}\text{NaS}^+ [\text{M}+\text{Na}]^+$  1186.1207, было обнаружено 1186.1314.

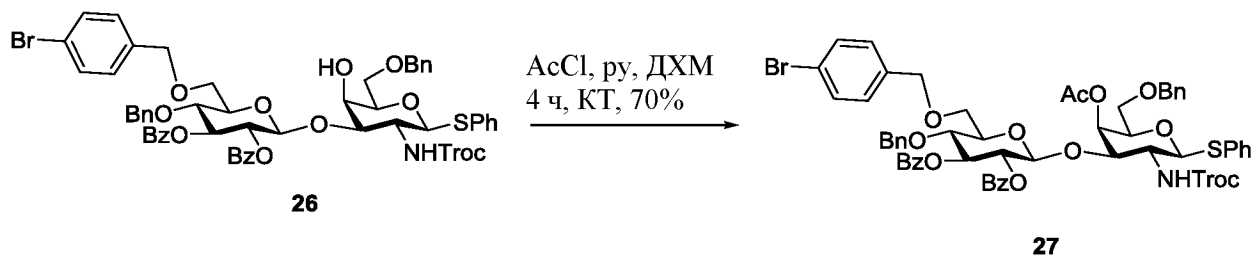
### Синтез соединения 26



$\text{Et}_3\text{SiH}$  (3.0 эквив.),  $\text{TfOH}$  (3.3 эквив.) добавляли к охлажденному раствору соединения **25** в ДХМ (10 мл/1 г) со свежеективированными молекулярными ситами (4 Å) при  $-78^\circ\text{C}$ . Реакционную смесь перемешивали при такой же температуре в течение 4 ч. После полного израсходования исходного вещества, реакционную смесь гасили  $\text{Et}_3\text{N}$

(1 мл) и разбавляли ДХМ. Раствор промывали водн.  $\text{NaHCO}_3$  и соляным раствором. Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Сырой остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100%, EtOAc в циклогексане) с получением желаемого 4-ОН соединения **26** (80%) в виде белого твердого вещества. МСВР (ESI+) рассчитывали для  $\text{C}_{56}\text{H}_{53}\text{Cl}_3\text{NBrO}_{13}\text{NaS}^+ [\text{M}+\text{Na}]^+$  1188.1364, было обнаружено 1188.1436.

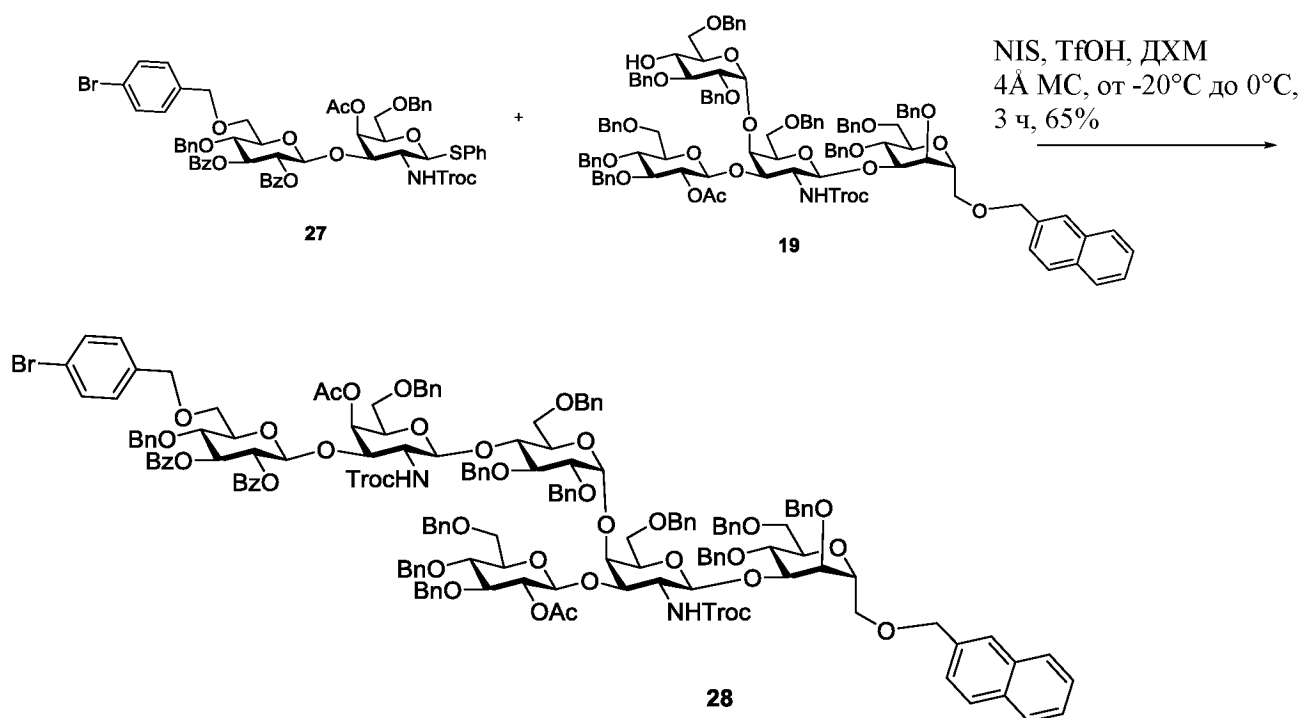
### Синтез соединения **27**



10  $\text{AcCl}$  (2.0 эквив.) и пиридин (3.0 эквив.) добавляли к чистому раствору соединения **26** в ДХМ (10 мл/1 г) при  $0^\circ\text{C}$  и поддерживали при перемешивании при КТ в течение 3.5 ч. После полного израсходования исходного вещества, реакционную смесь разбавляли ДХМ и ее промывали соляным раствором. Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Сырой остаток очищали с помощью

15 автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100%, EtOAc в циклогексане) с получением желаемого соединения **27** (70%) в виде белого твердого вещества. МСВР (ESI+) рассчитывали для  $\text{C}_{58}\text{H}_{55}\text{Cl}_3\text{NBrO}_{14}\text{NaS}^+ [\text{M}+\text{Na}]^+$  1230.1469, было обнаружено 1230.1563.

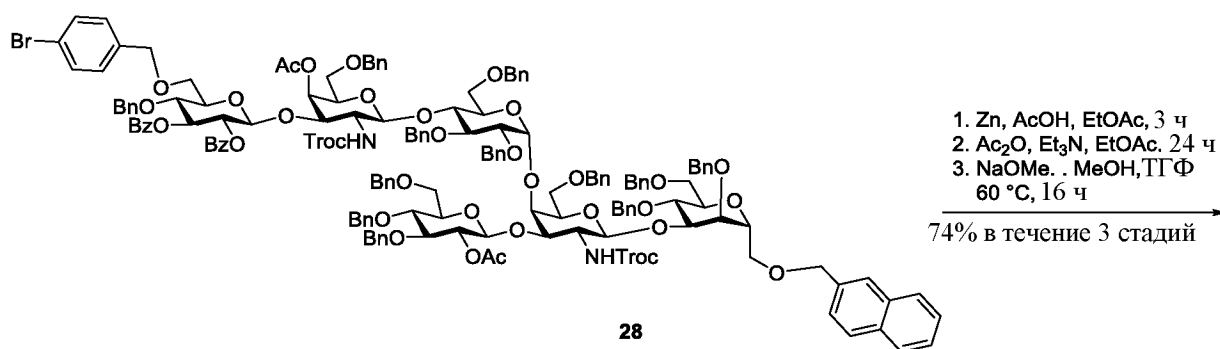
## Синтез соединения 28



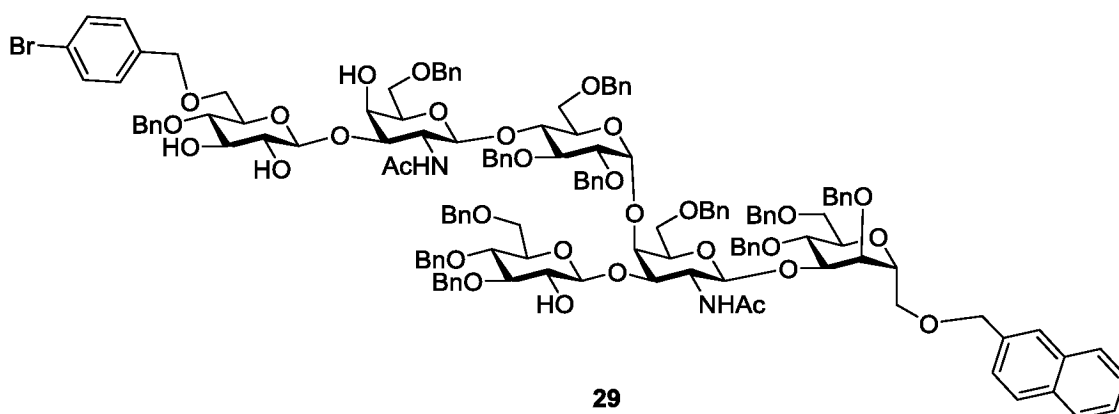
5 NIS (1.8 эквив.) и TfOH (0.4 эквив.) добавляли к охлажденному раствору акцептора **19** (1.0 эквив.) и донора **27** (1.8 эквив.) в ДХМ (0.025 М) в присутствии 4 Å МС при -20°C. Затем реакционную смесь постепенно нагревали до 0°C в течение 3 ч. Через 3 ч реакционную смесь гасили Et<sub>3</sub>N, разбавляли ДХМ и МС фильтровали. Органический слой промывали водн. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и отделенный органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Сырой остаток очищали с помощью

10 автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100%, EtOAc в циклогексане) с получением желаемого гексасахарида **28** (65%) в виде белого твердого вещества. МСВР (ESI<sup>+</sup>) рассчитывали для C<sub>163</sub>H<sub>165</sub>Cl<sub>6</sub>N<sub>2</sub>BrO<sub>37</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 3060.8258, было обнаружено 3060.8275.

## 15 Синтез соединения 29

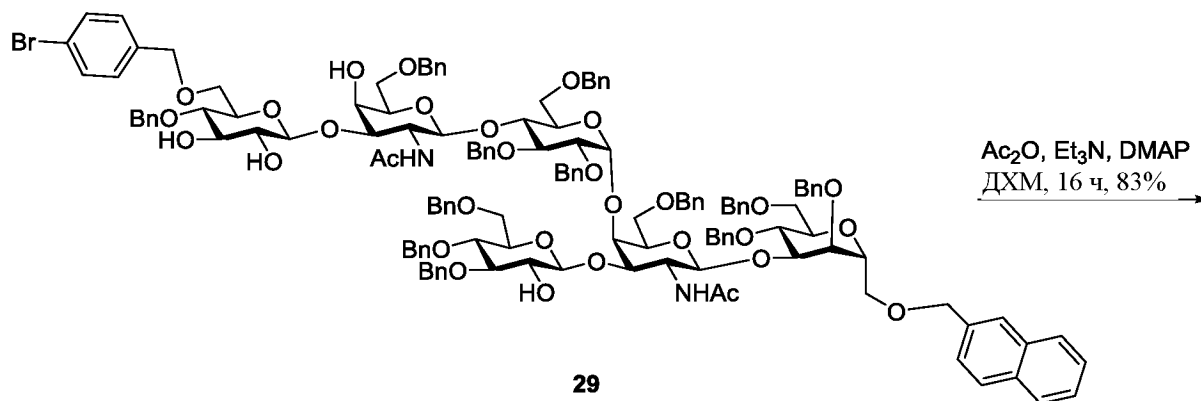


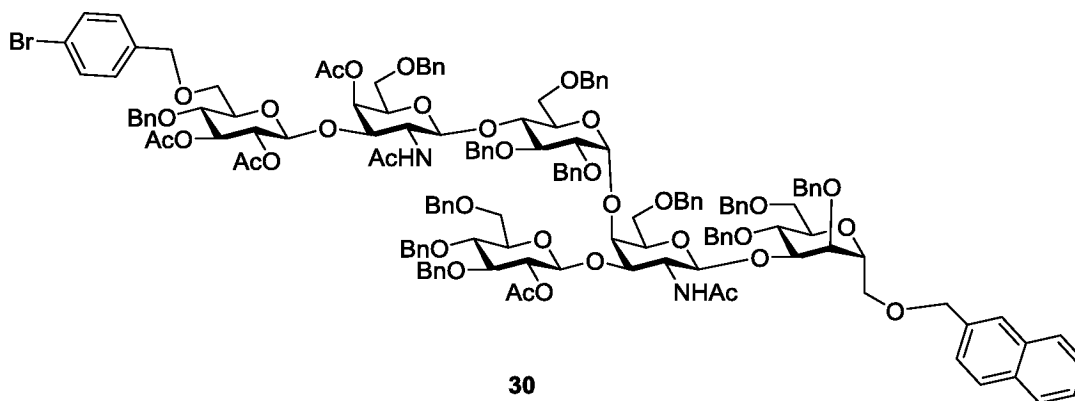




К чистому раствору **28** в EtOAc (2.0 mM) добавляли Zn (100 эквив.), и AcOH (100 эквив.) и реакционную смесь поддерживали при перемешивании при комнатной температуре 3 ч. После полного израсходования исходного вещества, реакционную смесь фильтровали через слой целита и концентрировали. Остаток, полученный после удаления растворителей, растворяли в EtOAc (2.0 mM), добавляли Et<sub>3</sub>N (0.5 мл) и Ac<sub>2</sub>O (0.5 мл). После перемешивания при КТ в течение 2.5 д., реакционную смесь концентрировали. сырое вещество, полученное после удаления растворителей, растворяли в ТГФ и метаноле. К этому чистому раствору добавляли 0.5 M NaOMe (3 мл) и поддерживали при нагревании с обратным холодильником при 65°C. Через 16 ч, реакционную смесь нейтрализовали посредством AcOH и растворители удаляли. Сырой остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100%, EtOAc в циклогексане) с получением желаемого гексасахарида **29** (74% в течение 3 стадий) в виде белого твердого вещества. MСВР (ESI+) рассчитывали для C<sub>143</sub>H<sub>155</sub>N<sub>2</sub>BrO<sub>31</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 2500.9708, было обнаружено 2500.9739.

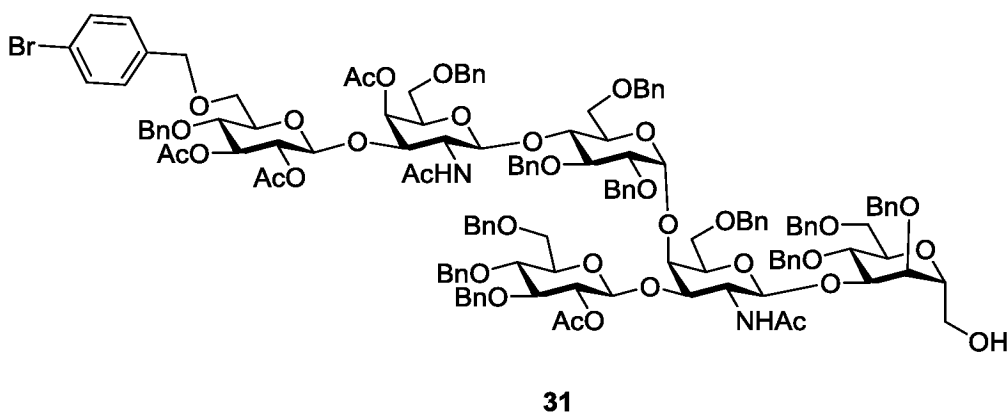
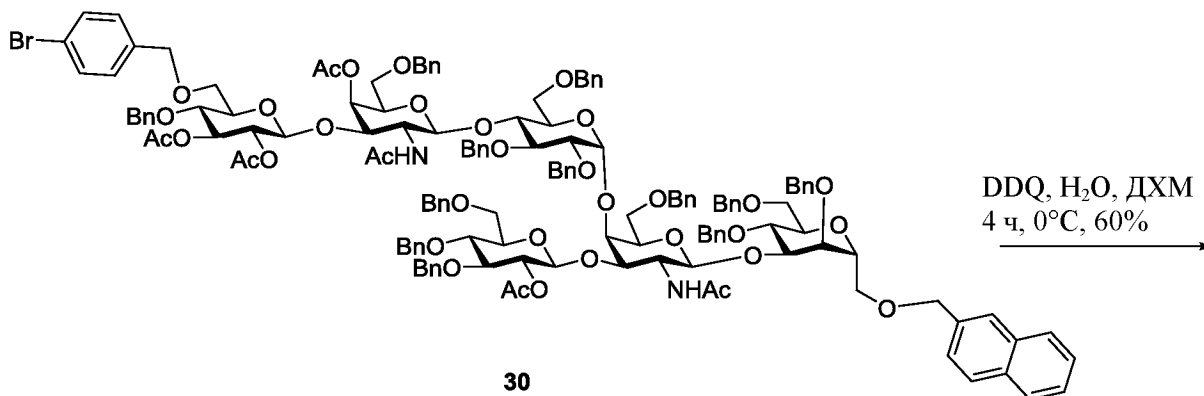
### Синтез соединения 30





5  $\text{Ac}_2\text{O}$  (8.0 эквив.) и триметиламин (8.0 эквив.) добавляли к чистому раствору соединения **29** в ДХМ (10 мл/1 г) и поддерживали при перемешивании при КТ в течение 16 ч. После полного израсходования исходного вещества, растворители удаляли в вакууме и сырой продукт очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100% EtOAc в циклогексане) с получением желаемого продукта **30** (83%) в виде вязкой жидкости. МСВР (ESI<sup>+</sup>) рассчитывали для  $\text{C}_{151}\text{H}_{163}\text{N}_2\text{BrO}_{35}\text{Na}^+ [\text{M}+\text{Na}]^+$  2669.0131, было обнаружено 2669.0407.

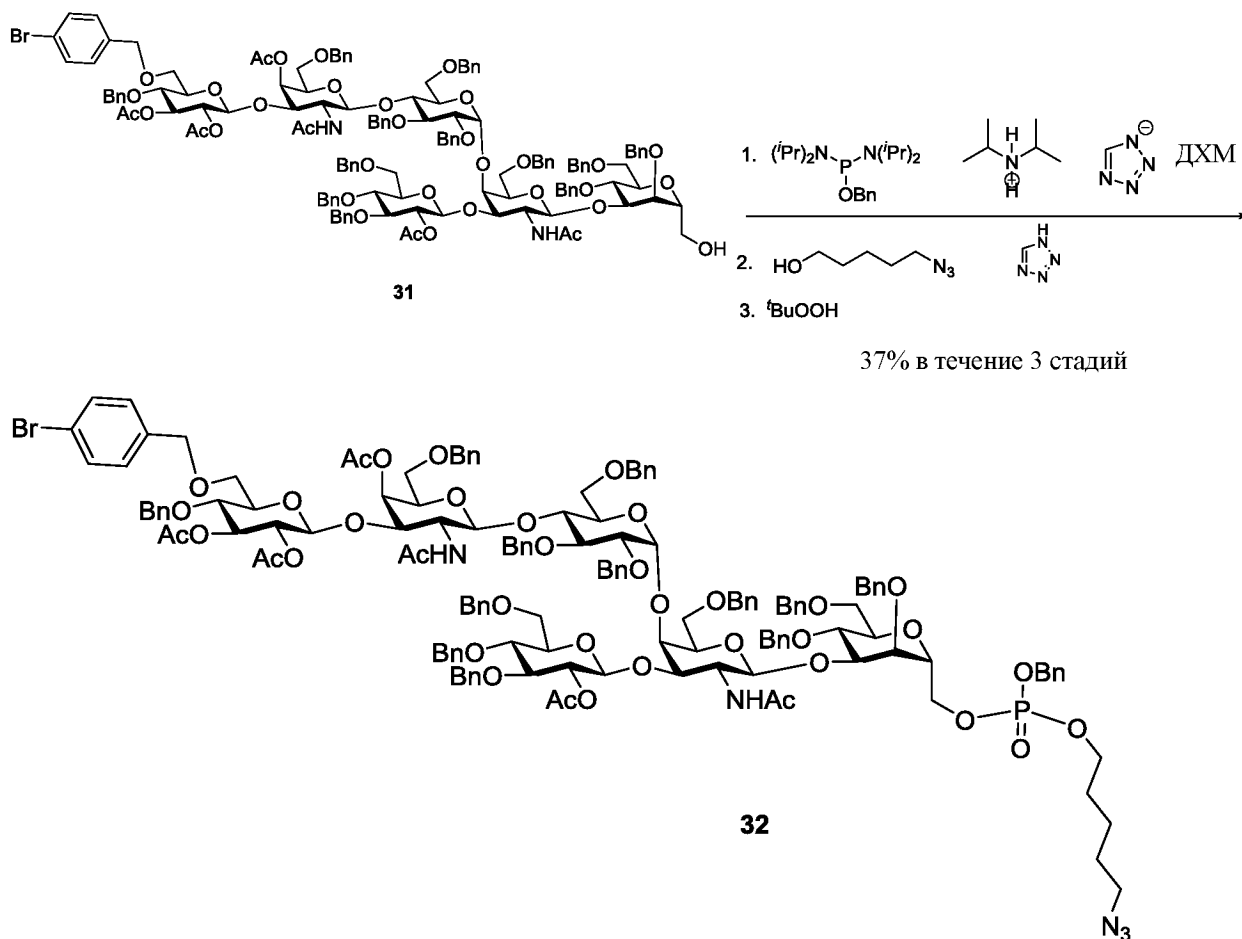
#### 10 Синтез соединения 31



DDQ (1.1 эквив.) добавляли к охлажденному раствору соединения **30** в ДХМ :  
 H<sub>2</sub>O при 0°C. После перемешивания реакционной смеси при такой же температуре в  
 течение 4 ч, реакционную смесь разбавляли ДХМ и экстрагировали водн. насыщ.  
 раствором NaHCO<sub>3</sub> и соляным раствором. Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
 5 фильтровали, и фильтрат концентрировали с получением сырого продукта. Сырой  
 продукт очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на  
 силикагеле (0-100% EtOAc в циклогексане) с получением желаемого продукта **31** (60%)  
 в виде вязкой жидкости. МСВР (ESI+) рассчитывали для C<sub>140</sub>H<sub>155</sub>N<sub>2</sub>BrO<sub>35</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>  
 2527.9559, было обнаружено 2527.9731.

10

### Синтез соединения **32**



15

К раствору соединения **31** в ДХМ, добавляли  
 бис(диизопропиламино)бензилоксифосфин (2.0 эквив.) и тетразолид  
 диизопропиламмония (1.5 эквив.) и раствор перемешивали при КТ в течение 1.5 ч.

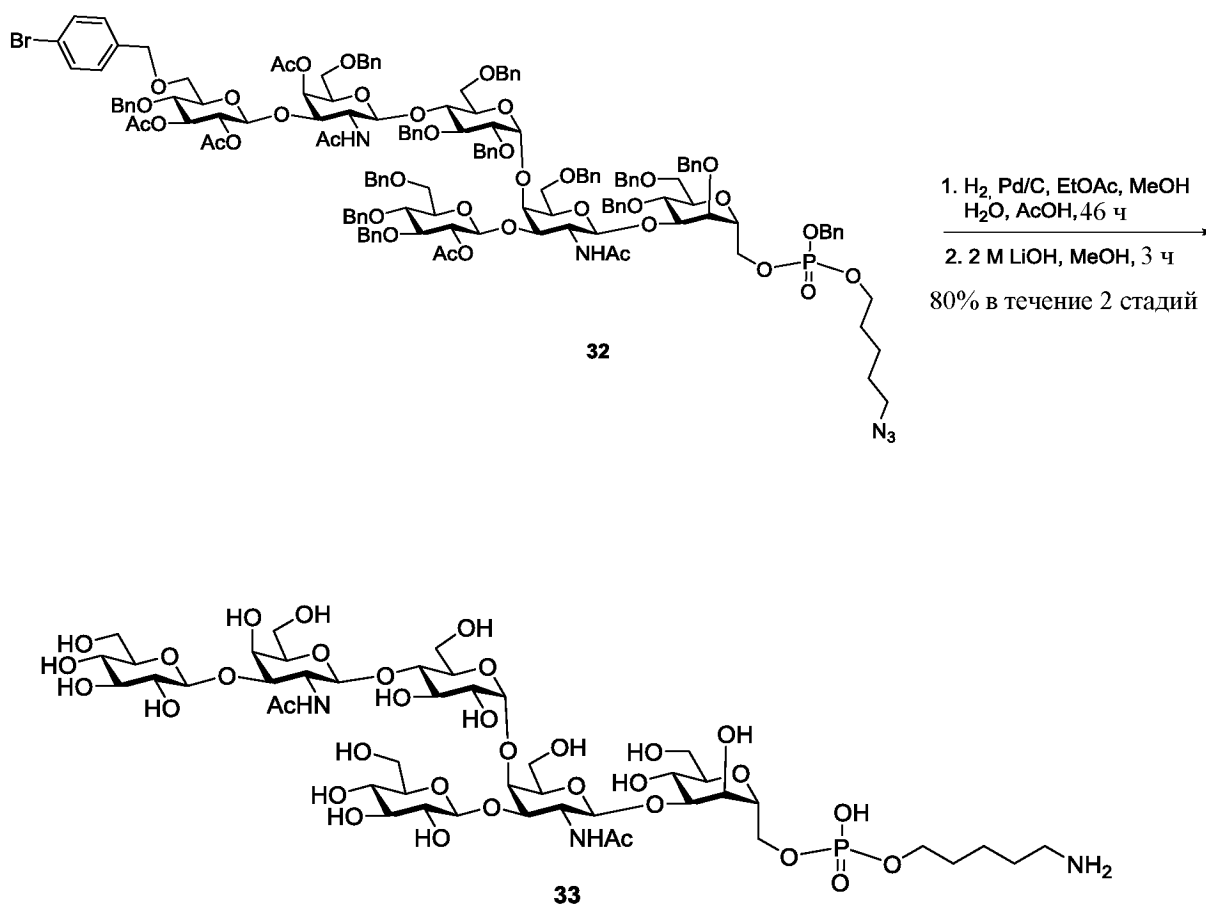
Затем добавляли 5-азидопентанол (8.0 эквив.) и тетразол (9.0 эквив. 0.45 М раствор в CAN) и поддерживали при перемешивании при комнатной температуре в течение 2 ч. Через 2 ч добавляли *трет*-бутилпероксид (6.0 эквив., 5.0 - 6.0 М раствор в декане) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч. Через 1 ч, реакционную смесь

5 разбавляли ДХМ и гасили водн. насыщ. раствором  $\text{NaHCO}_3$ . Водный слой экстрагировали ДХМ. Объединенный органический слой промывали соляным раствором, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали, и фильтрат концентрировали в вакууме с

10 получением сырого продукта. Сырой продукт очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100% EtOAc в циклогексане) с получением желаемого продукта **32** (37% в течение 3 стадий) в виде вязкой жидкости. MALDI рассчитывали для  $\text{C}_{152}\text{H}_{171}\text{N}_5\text{BrO}_{38}\text{PH}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$  2786.0635, было обнаружено 2786.870.

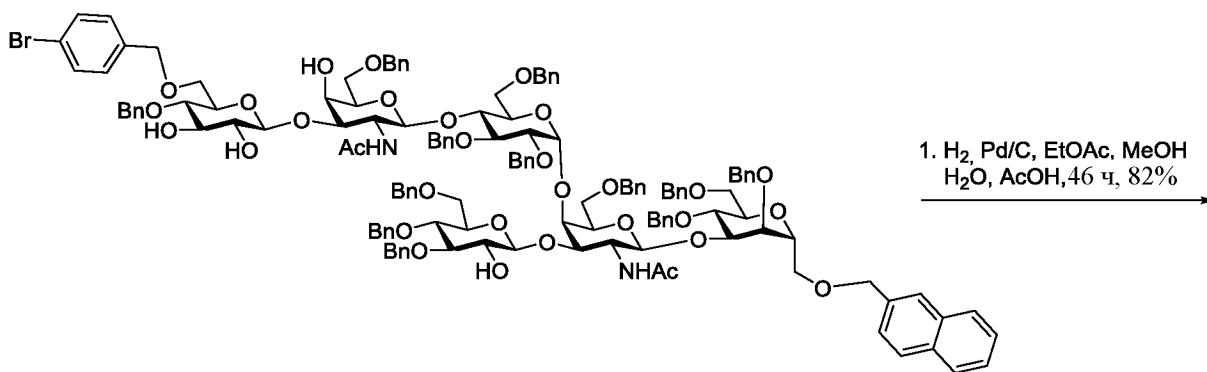
### Синтез соединения 33

15

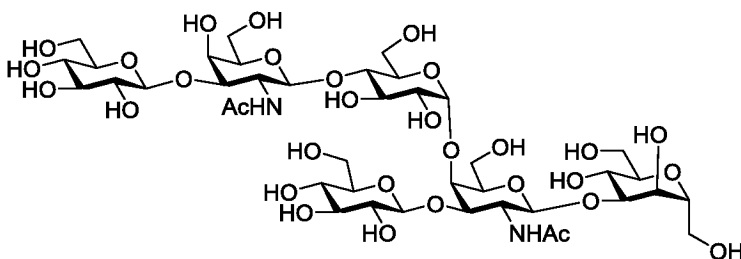


Pd/C (6 мг) добавляли к чистому раствору соединения **32** (6 мг) в  
 EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH. Полученную неоднородную смесь перемешивали в  
 атмосфере водорода при КТ в течение 40 ч. Через 40 ч реакционную смесь фильтровали  
 через PTFE фильтр и концентрировали в вакууме при 30°C температуре бани роторного  
 5 испарителя в течение 10 мин для удаления метанола, EtOAc, AcOH и воды. Сырой  
 продукт, полученный после удаления растворителей, растворяли в MeOH, воде и к  
 этому добавляли LiOH (2н. в воде) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C  
 в течение 3 ч. Через 3 ч, реакционную смесь гасили AcOH (30 мкл) и растворители  
 удаляли при пониженном давлении и полученный сырой остаток очищали с помощью  
 10 C18 колоночной хроматографии с обращенной фазой с использованием воды и  
 ацетонитрила в качестве растворителей с получением желаемого конечного соединения  
**33** (80% в течение 2 стадий) в виде белого твердого вещества. МСВР (ESI+)  
 рассчитывали для C<sub>46</sub>H<sub>82</sub>N<sub>3</sub>PO<sub>34</sub><sup>+</sup> [M-Na+2H]<sup>+</sup> 1252.4551, было обнаружено 1252.4578.

### 15 Синтез соединения 34



29

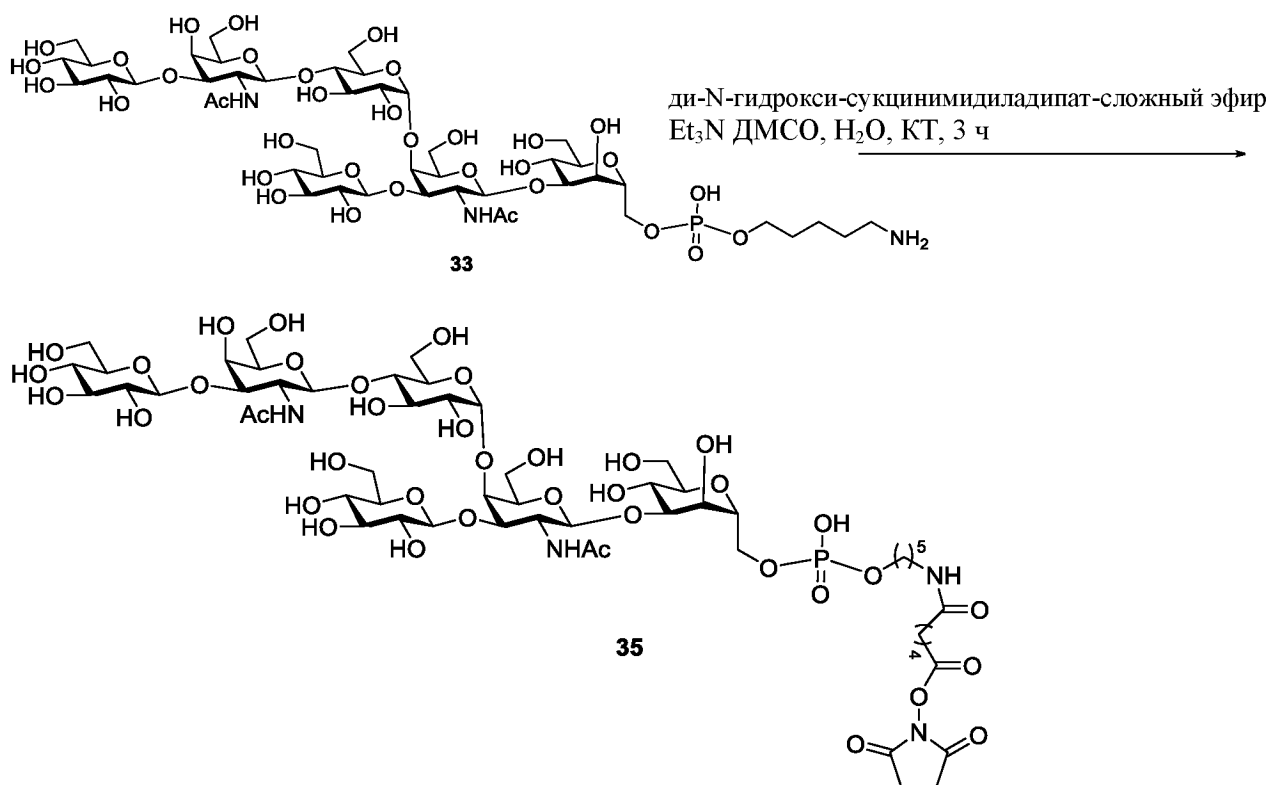


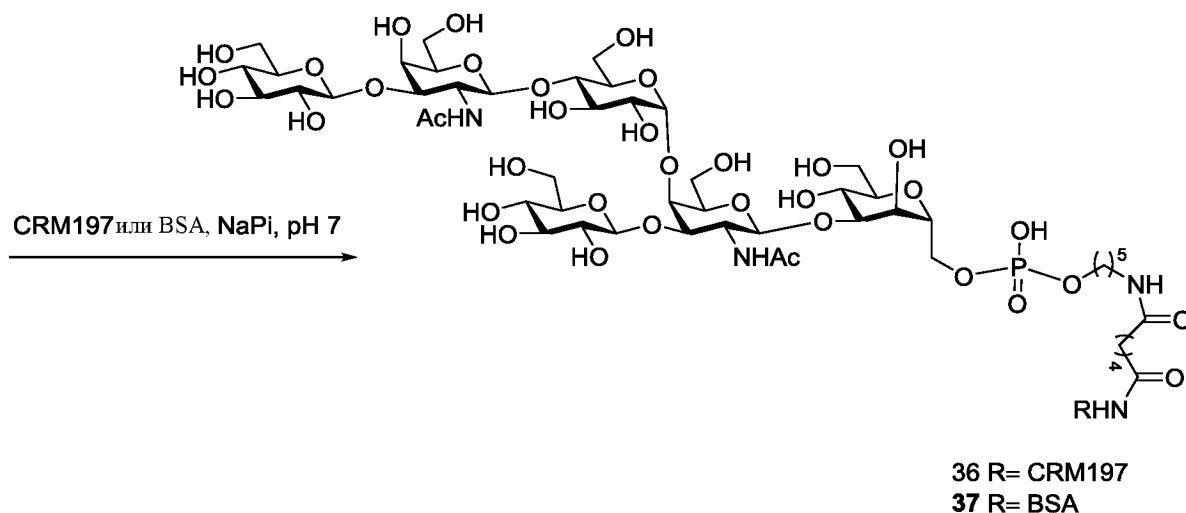
34

Pd/C (2 мг) добавляли к чистому раствору соединения **29** в EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O:AcOH и полученную неоднородную смесь перемешивали в атмосфере водорода при КТ в течение 40 ч. Через 40 ч реакционную смесь фильтровали через PTFE фильтр и концентрировали в вакууме при 30°C температуре бани роторного испарителя в течение 10 мин для удаления метанола, EtOAc, AcOH и воды. Сырой продукт очищали с помощью C18 колоночной хроматографии с обращенной фазой с использованием воды и ацетонитрила в качестве растворителей с получением желаемого конечного соединения **34** (82%) в виде белого твердого вещества. МСВР (ESI+) рассчитывали для C<sub>41</sub>H<sub>70</sub>N<sub>2</sub>O<sub>31</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 1109.3860, было обнаружено 1109.3853.

10

### Конъюгирование соединения **33** с CRM<sub>197</sub> или BSA

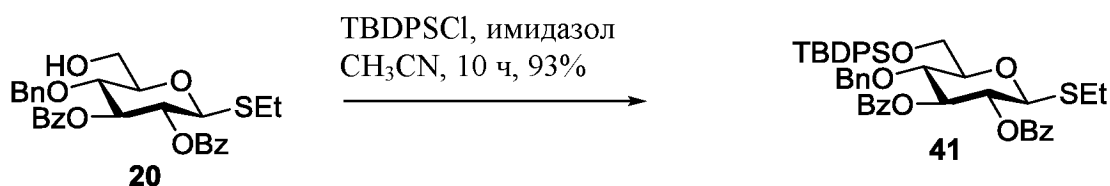




Антиген **33** (1.0 эквив.) растворяли в ДМСО-Н<sub>2</sub>О при КТ в 2 мл сосуде. К этому добавляли триэтиламин (35.0 эквив.). Смесь добавляли к активированному эфиру адипата-NHS (10 эквив.) в ДМСО в сосуде Эппендорфа и перемешивали в течение 3 ч при КТ. Сложный эфир антигена-NHS осаждали посредством добавления 10 объемов EtOAc и центрифугировали, надосадочную жидкость осторожно удаляли. Промывали осадок с помощью EtOAc (1 млX3), сушили и переносили на следующую стадию. 1 мг белка в буфере NaPi (~100 мкл) добавляли по каплям в реакционный сосуд, содержащий сложный эфир антигена-NHS **35** в 50 мкл буфера NaPi (рН 7.0). Сосуд был окончательно промыт 50 мкл буферного раствора и полностью перенесен в реакционный сосуд. Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 22 ч. Конъюгатный раствор антигена-белка переносили в Amicon Ultra-0.5 мл, центрифугировали в течение 6 минут при комнатной температуре. Добавляли 300 мкл буфера в реакционный сосуд, промывали и переносили в фильтр и снова центрифугировали. Дополнительные промывки были осуществлены с использованием 1X PBS раствора еще три раза. После конечной промывки конъюгат сохраняли в 1X PBS растворе при 2-8°C. Конъюгаты анализировали с использованием MALDI, (получали загрузку 4-12 антигенов на белке), SDS-страница, оценка BCA, SEC-HPLC.

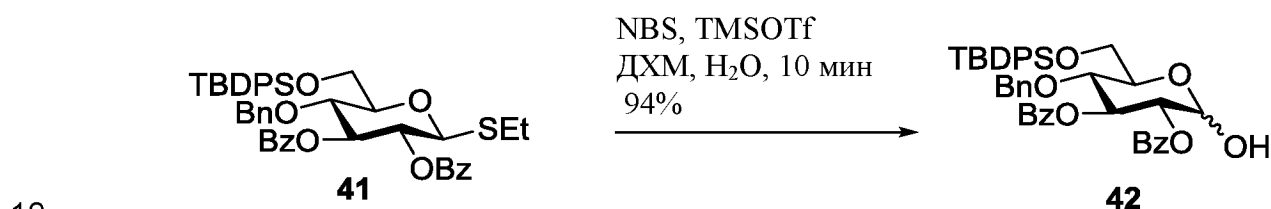
### 20 А.3 Синтез гексасахариды 54

#### Синтез соединения 41



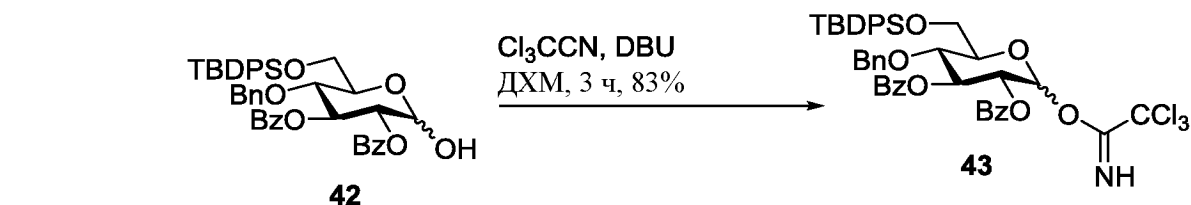
TBDPSCl (1.1 эквив.) и триметиламин (2.8 эквив.) добавляли к чистому раствору соединения **20** в CH<sub>3</sub>CN (10 мл/1 г) и поддерживали при перемешивании при КТ в течение 10 ч. После полного израсходования исходного вещества, растворители удаляли в вакууме и сырой продукт очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100% EtOAc в циклогексане) с получением желаемого продукта **41** (93%) в виде вязкой жидкости. МСВР (ESI+) рассчитывали для C<sub>45</sub>H<sub>48</sub>O<sub>7</sub>SSiNa<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 783.2788, было обнаружено 783.2767.

### Синтез соединения 42



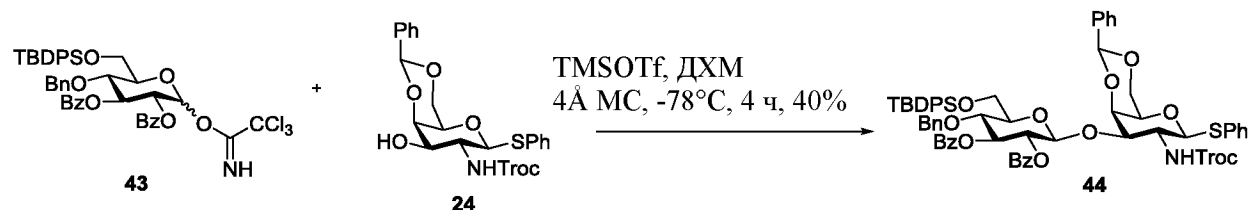
Методику, описанную для синтеза соединения **22**, использовали для синтеза соединения **42** (94%). МСВР (ESI+) рассчитывали для C<sub>43</sub>H<sub>44</sub>O<sub>8</sub>SiNa<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 739.2703, было обнаружено 739.2700.

### Синтез соединения 43



20 К охлажденному раствору соединения **42** в ДХМ при 0°C добавляли трихлорацетонитрил (6.0 эквив.) и DBU (0.2 эквив.). Через 3 ч при 0°C, реакция была завершена, и растворитель упаривали. Сырой продукт очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100% EtOAc в циклогексане) с получением желаемого продукта **43** (83%) в виде вязкой жидкости.

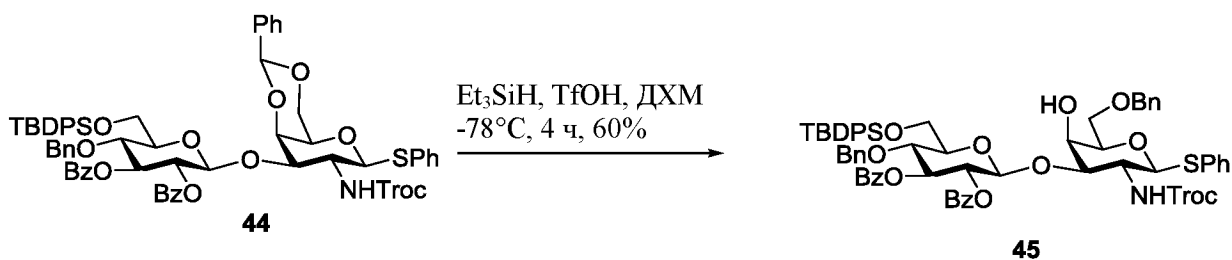
### Синтез соединения 44





Методику, описанную для синтеза соединения **25**, использовали для синтеза соединения **44** (40%). МСБП (ESI+) рассчитывали для  $C_{65}H_{64}O_{13}SiSNCl_3Na^+$   $[M+Na]^+$  1256.2801, было обнаружено 1256.2645.

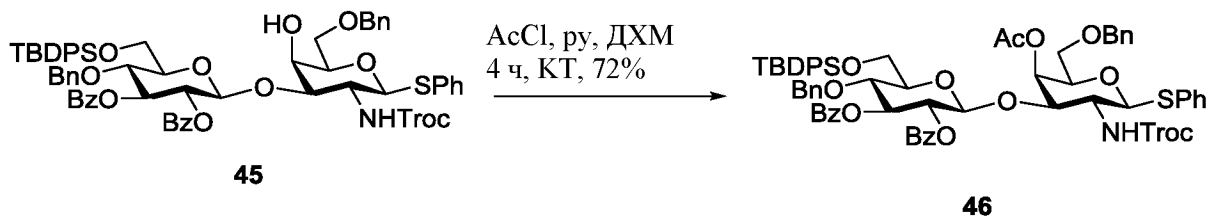
### 5 Синтез соединения 45



Методику, описанную для синтеза соединения **26**, использовали для синтеза соединения **45** (60%). МСБП (ESI+) рассчитывали для  $C_{65}H_{66}O_{13}SiSNCl_3Na^+$   $[M+Na]^+$  1256.2987, было обнаружено 1256.2974.

10

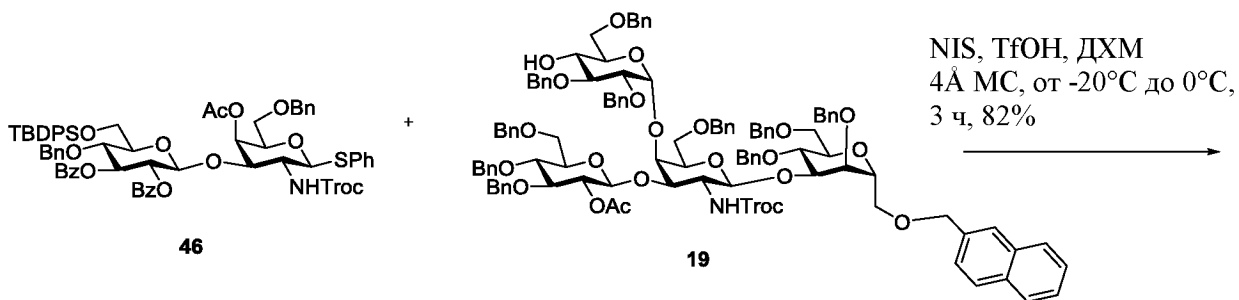
### Синтез соединения 46



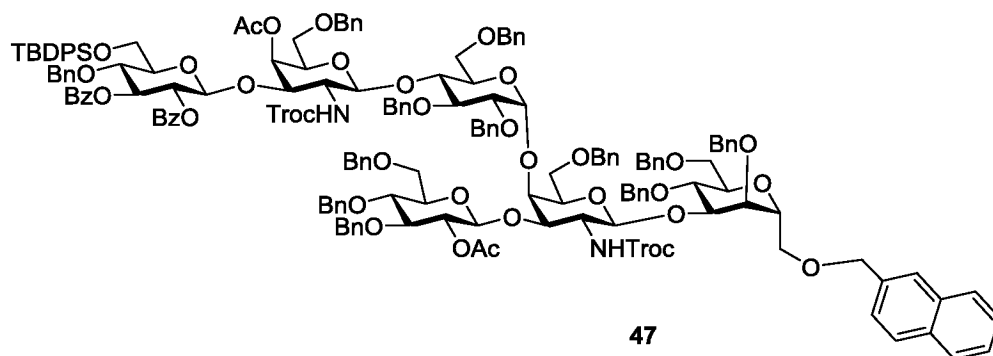
Методику, описанную для синтеза соединения **27**, использовали для синтеза соединения **46** (60%). МСБП (ESI+) рассчитывали для  $C_{67}H_{68}O_{14}SiSNCl_3Na^+$   $[M+Na]^+$  1300.3064, было обнаружено 1300.3090.

15

### Синтез соединения 47

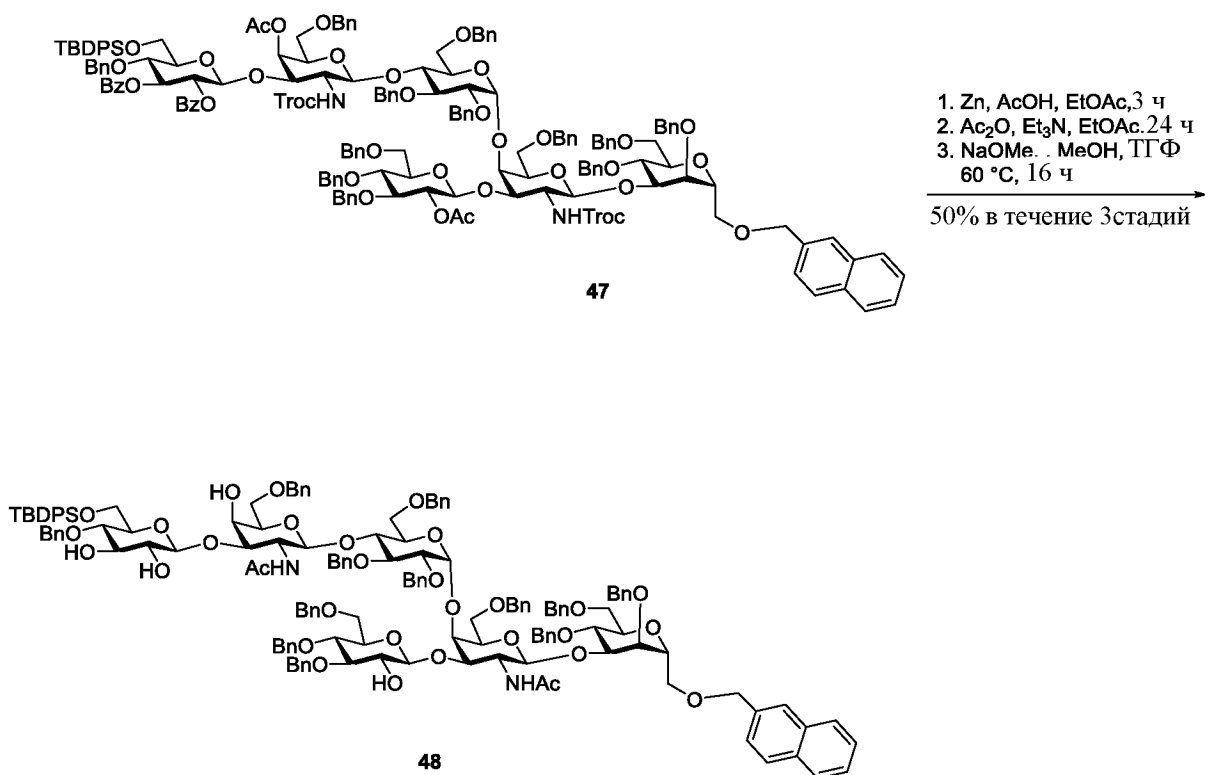


20



Методику, описанную для синтеза соединения **28**, использовали для синтеза соединения **47** (82%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{172}H_{178}O_{37}SiN_2Cl_6Na^+$   $[M+Na]^+$  3127.9728, было обнаружено 3127.9728.

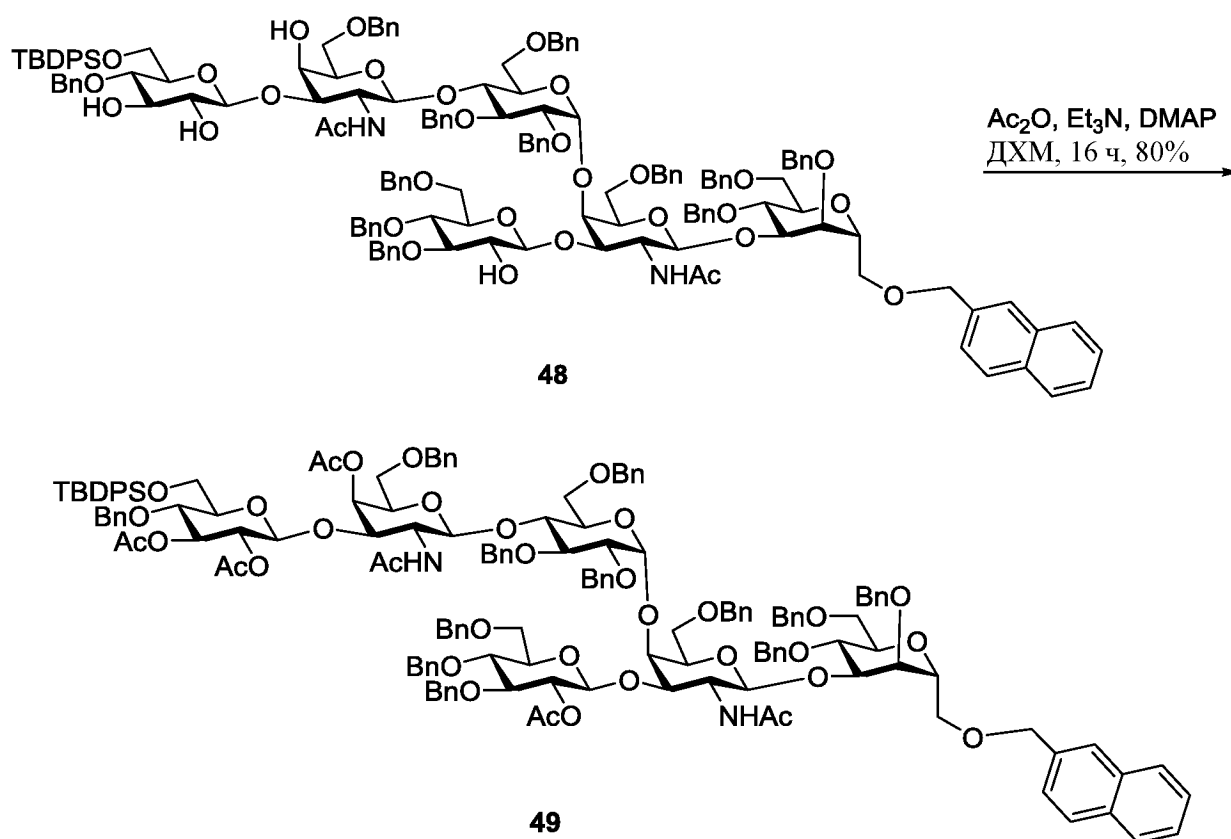
### Синтез соединения 48



10

Методику, описанную для синтеза соединения **29**, использовали для синтеза соединения **48** (50%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{152}H_{168}O_{31}SiN_2Na^+$   $[M+Na]^+$  2568.1298, было обнаружено 2568.1322.

## Синтез соединения 49

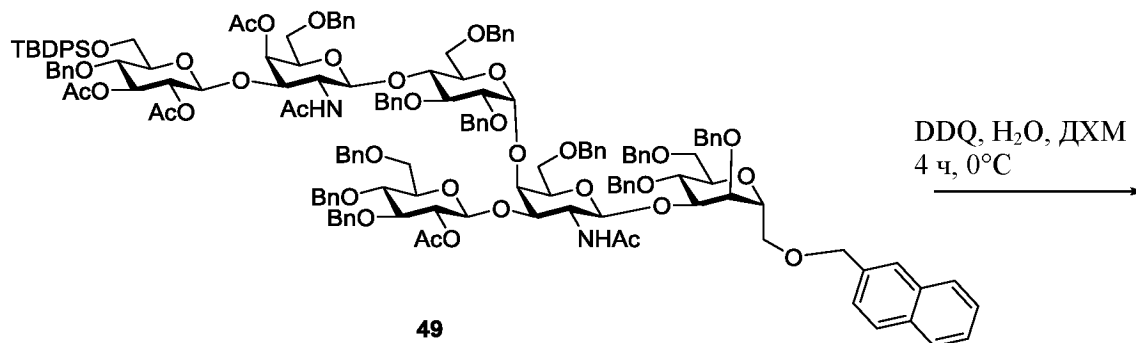


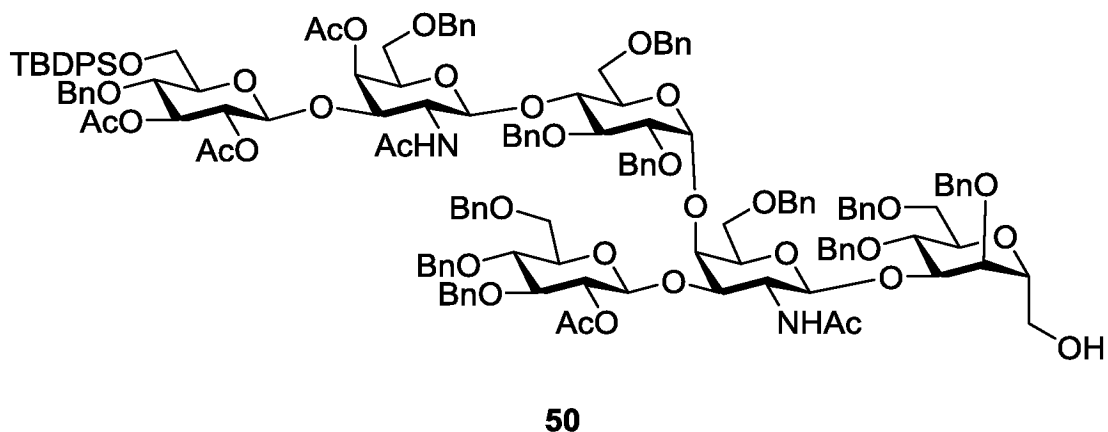
5

Методику, описанную для синтеза соединения **30**, использовали для синтеза соединения **49** (80%). МСВР (ESI<sup>+</sup>) рассчитывали для  $\text{C}_{160}\text{H}_{176}\text{O}_{35}\text{SiN}_2\text{Na}^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  2737.1754, было обнаружено 2737.2001.

10

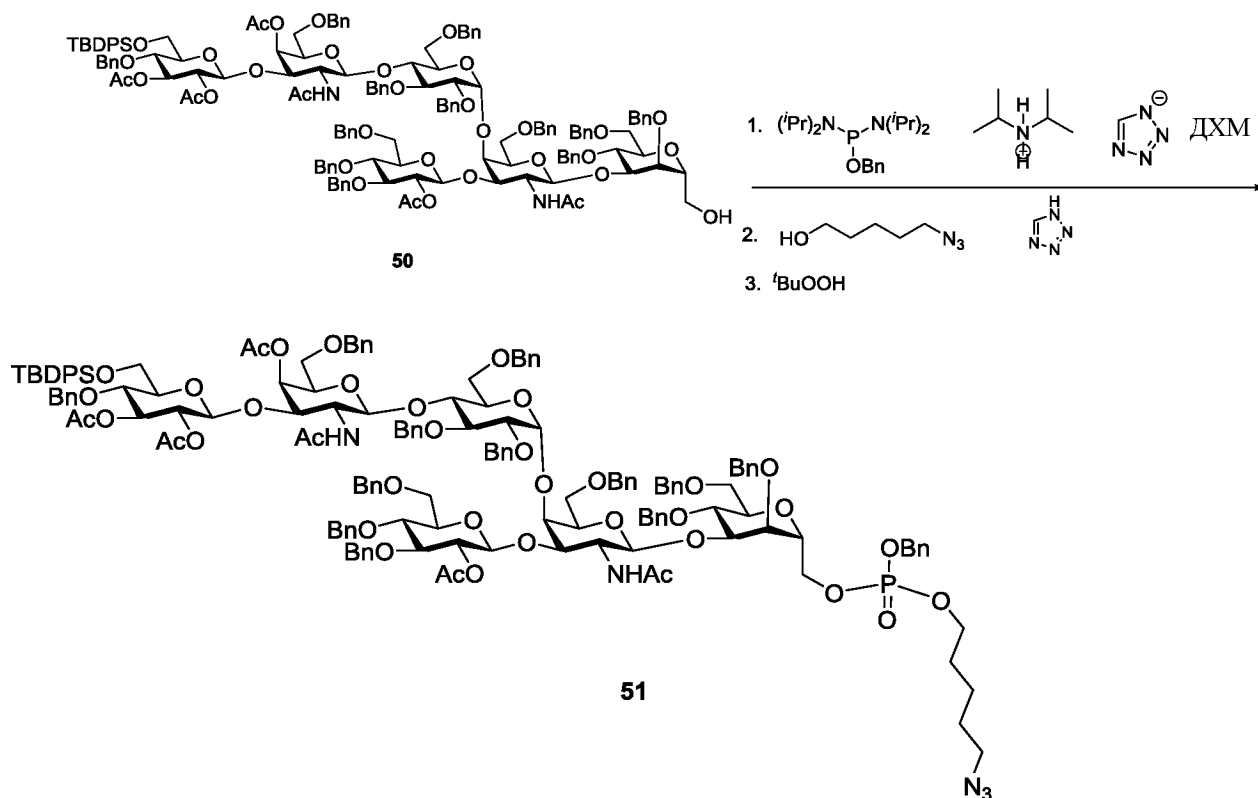
## Синтез соединения 50





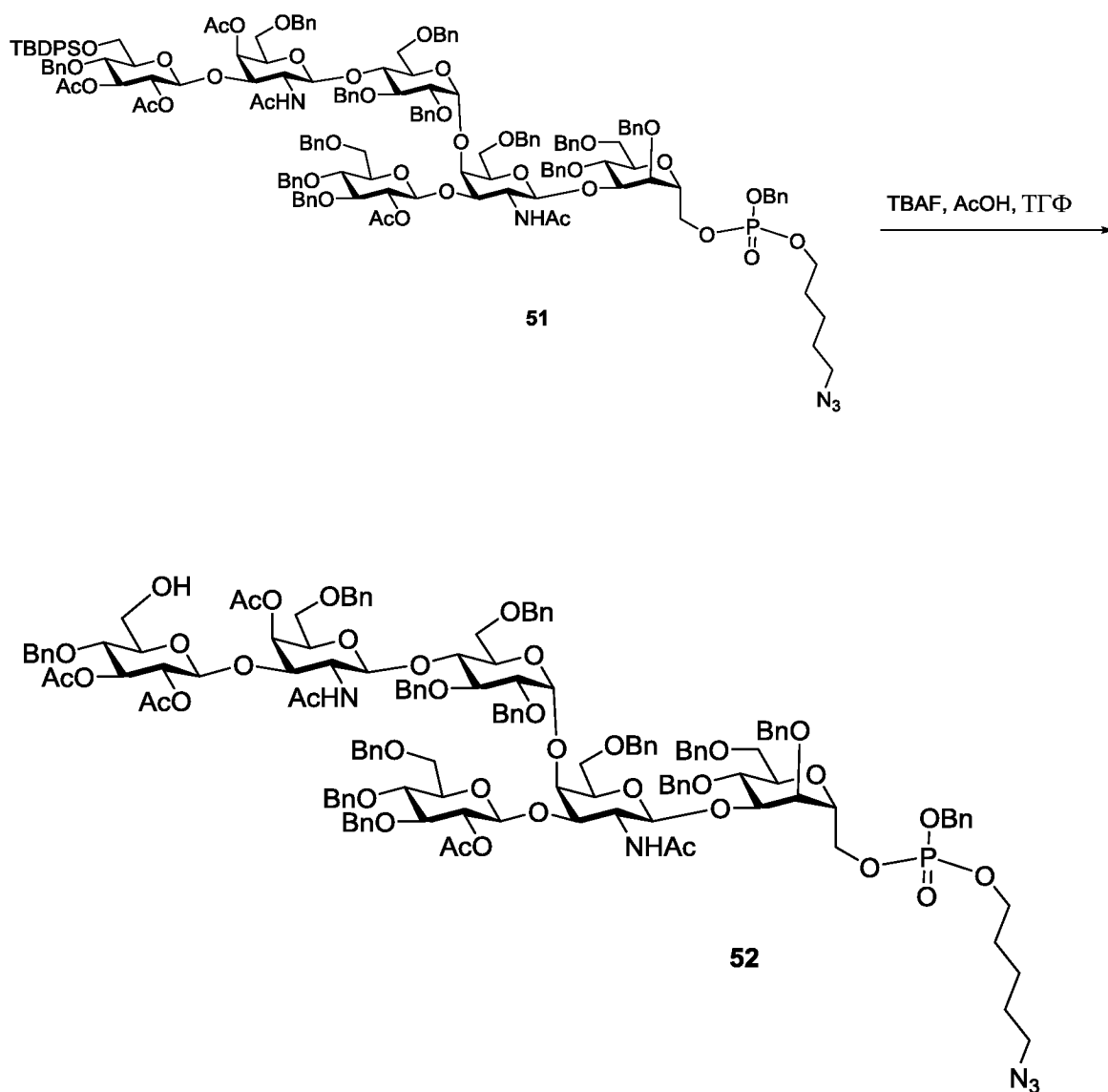
Методику, описанную для синтеза соединения **31**, использовали для синтеза соединения **50** (70%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{149}H_{168}O_{35}SiN_2Na^+$   $[M+Na]^+$  2596.1095, было обнаружено 2595.9954 и 2596.9997.

### 5 Синтез соединения **51**



10 Методику, описанную для синтеза соединения **32**, использовали для синтеза соединения **51**.

## Синтез соединения 52

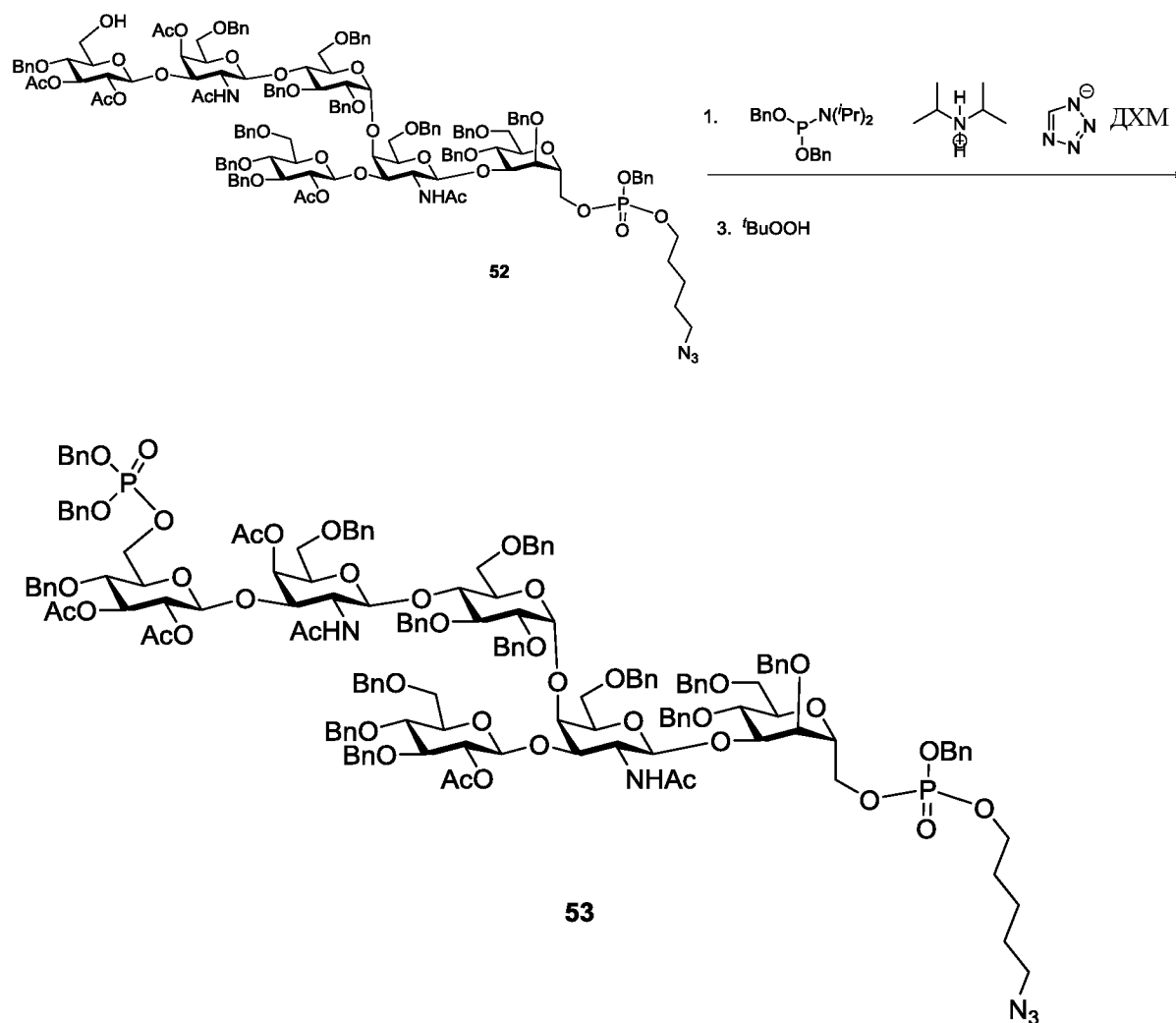


5

Предварительно смешанный раствор TBAF и AcOH добавляли к чистому раствору соединения **51** в THF при КТ и реакционную смесь поддерживали при перемешивании при КТ в течение 3 ч. После полного израсходования исходного вещества, реакционную смесь разбавляли ДХМ и концентрировали в вакууме с получением сырого продукта. Сырой продукт очищали с помощью автоматической колоночной хроматографии на силикагеле с использованием EtOAc в *n*-гексане (градиент, 0 - 100%) в качестве элюента.

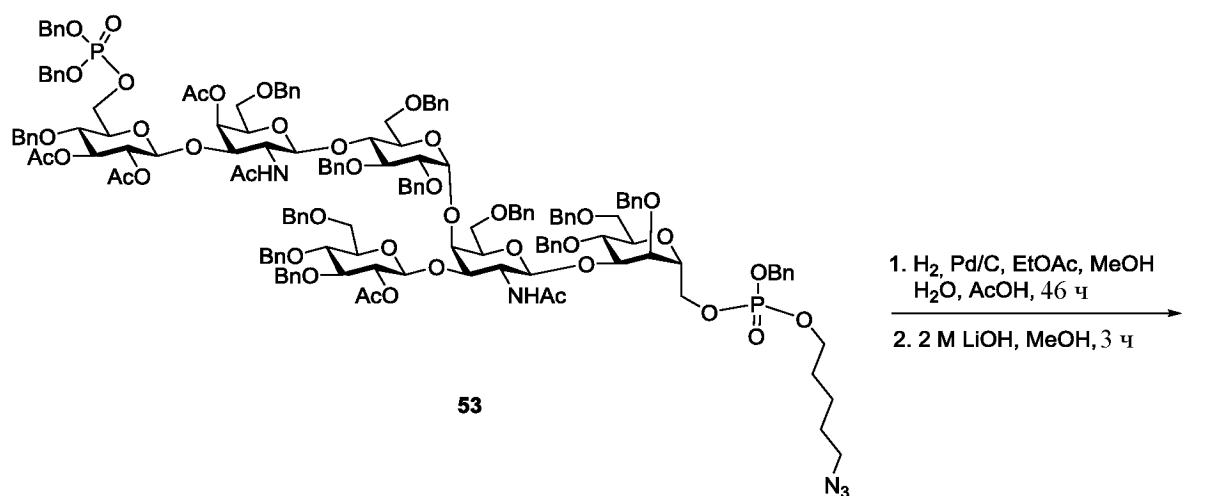
10

## Синтез соединения 53



- 5 К раствору соединения **52** в ДХМ добавляли дибензил N,N-диизопропилфосфорамидит (2.0 эквив.) и тетразолид диизопропиламмония (1.5 эквив.) и раствор перемешивали при КТ в течение 1.5 ч. Затем, добавляли *трет*-бутилпероксид (6.0 эквив., 5.0 - 6.0 М раствор в декане) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч. Через 1 ч реакционную смесь разбавляли ДХМ и гасили водн. насыщ. раствором
- 10  $\text{NaHCO}_3$ . Водный слой экстрагировали ДХМ. Объединенный органический слой промывали соляным раствором, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали, и фильтрат концентрировали в вакууме с получением сырого продукта. Сырой продукт очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100%  $\text{EtOAc}$  в циклогексане) с получением желаемого продукта **53**.

## Синтез соединения 54

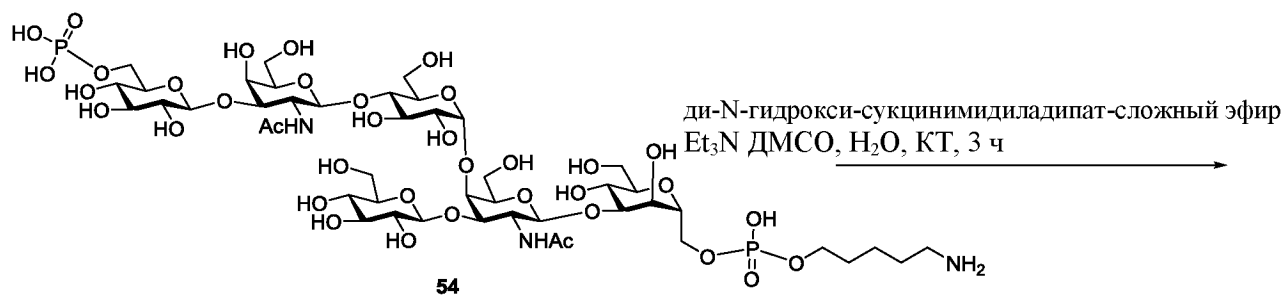


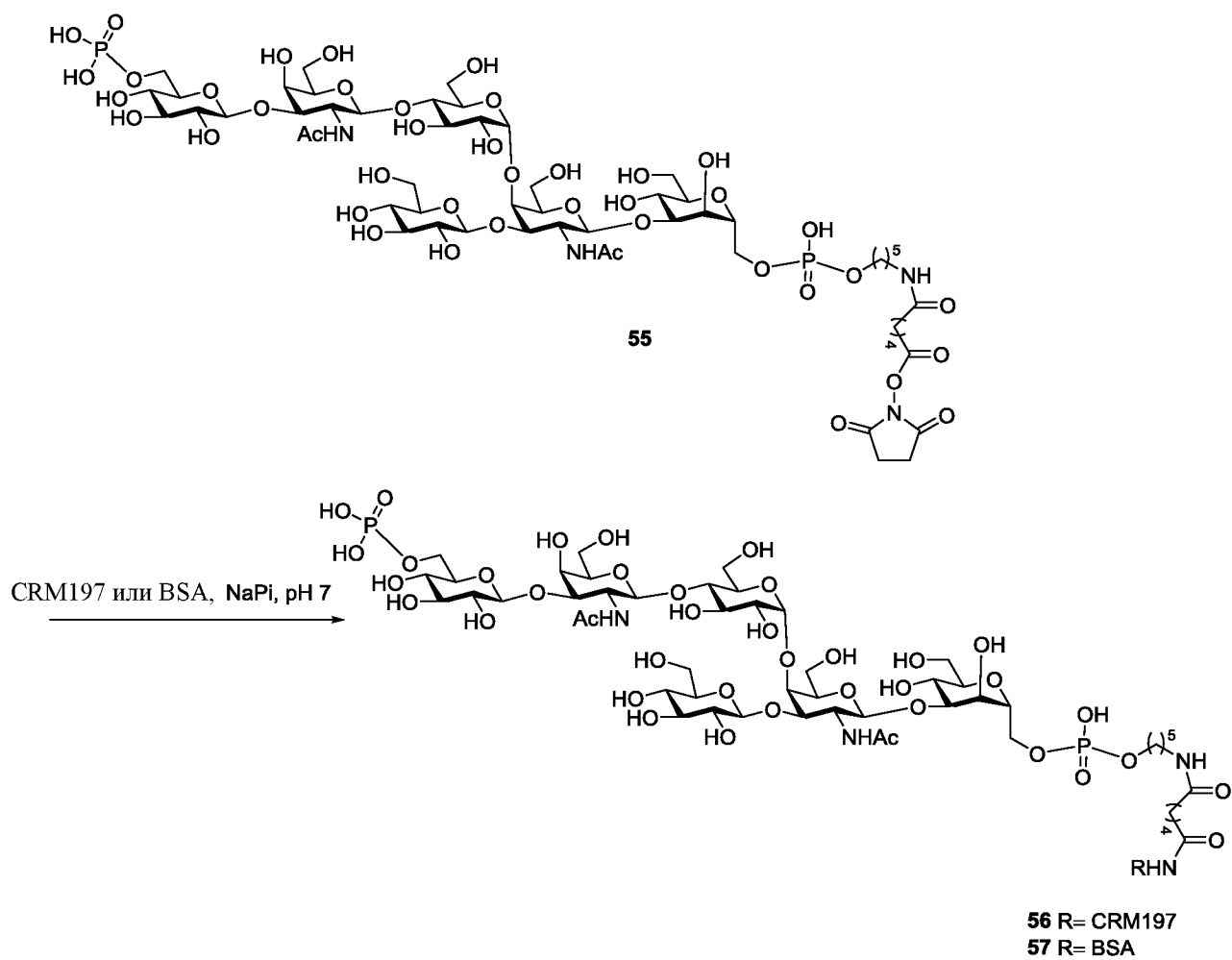
5

Методику, описанную для синтеза соединения **33**, использовали для синтеза соединения **54**.

Конъюгирование соединения 54 с CRM<sub>197</sub> и BSA

10



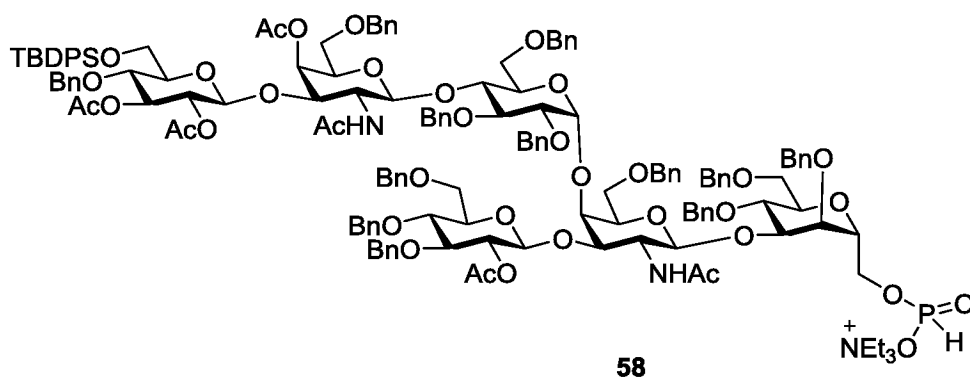
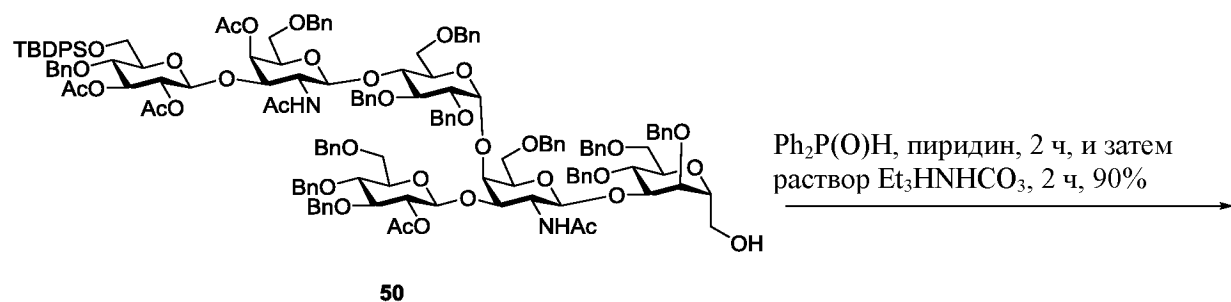


Методику, описанную для синтеза гликоконъюгатов **36** и **37**, также использовали для синтеза соединения **56** и **57**.



#### А.4 Альтернативный синтез гексасахарида 54

##### Синтез соединения 58

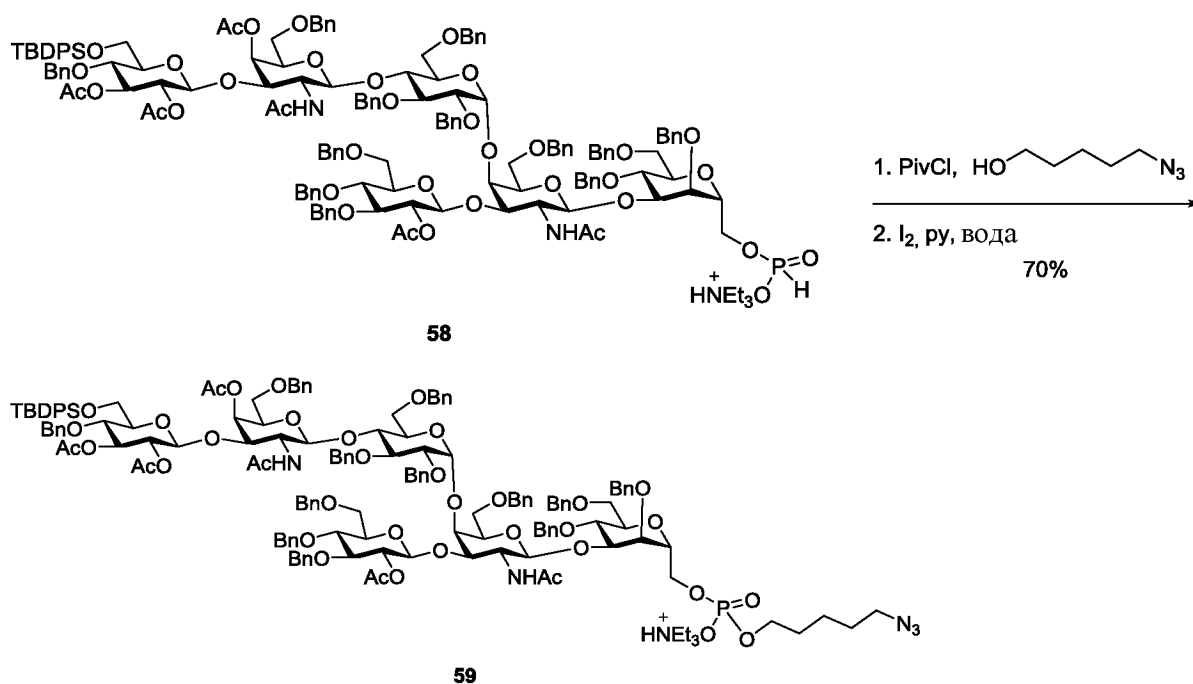


5

Дифенилфосфит добавляли к чистому раствору соединения **48** в пиридине, и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота в течение 2 ч. Через 2 ч, 1 М ТЕАВ раствор добавляли к реакционной смеси при 0°C. Через 5 мин, ледяную баню удаляли и перемешивание продолжали в течение еще 2 ч при КТ. После полного израсходования исходного вещества, реакционную смесь разбавляли ДХМ и органический слой промывали последовательно 1 М ТЕАВ раствором и концентрировали при пониженном давлении. Сырой продукт очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии (ЭА: ДХМ: МеОН с 2% Et<sub>3</sub>N) с получением чистого производного Н-фосфоната **58** (90%) в виде вязкой жидкости. МСВР (ESI<sup>+</sup>) рассчитывали для C<sub>155</sub>H<sub>184</sub>N<sub>3</sub>PSiO<sub>37</sub><sup>+</sup> [M]<sup>+</sup> 2740.2189, было обнаружено 2740.2132.

15

## Синтез соединения 59



5

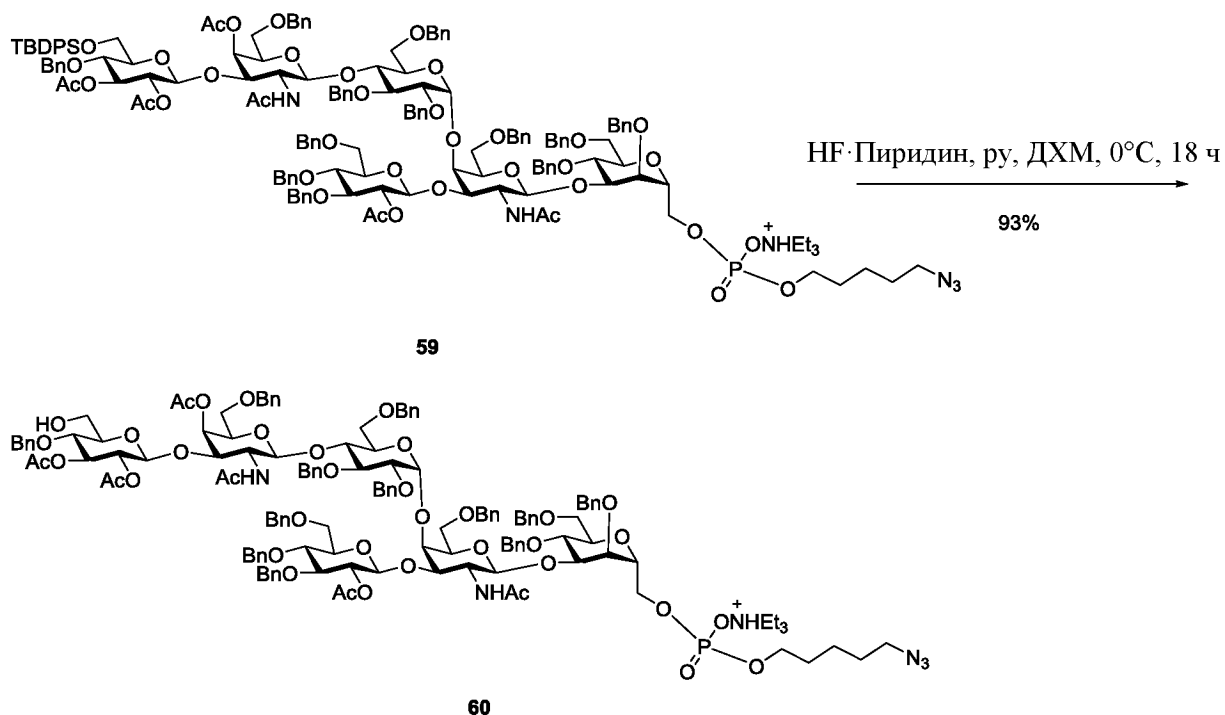
Н-фосфонат **58** (1.0 эквив.) и линкер (4.0 эквив.) упаривали совместно с пиридином и сушили в вакууме в течение 30 мин. После этого, полученное растворяли в py и к этому добавляли PivCl (2.0 эквив.). Реакционную смесь поддерживали при перемешивании при КТ в течение 2 ч. Через 2 ч, реакционную смесь охлаждали до -40 °С, добавляли свежеприготовленный раствор I<sub>2</sub> в Py:H<sub>2</sub>O (20 : 1) и реакционную смесь поддерживали при перемешивании при такой же температуре в течение 1.5 ч и затем доводили до КТ и перемешивали при КТ в течение 15 мин. Затем, TEAB (10 мл) добавляли к смеси и разбавляли дихлорметаном, промывали последовательно 10% водн. раствором тиосульфата натрия, 1 М водн. раствором гидрокарбоната триэтиламония (TEAB), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии (этилацетат:ДХМ:MeOH) вместе с 2% триметиламином в качестве элюентов с получением желаемого продукта **59** (70%) в виде вязкой жидкости. Maldi (ESI+) рассчитывали для C<sub>154</sub>H<sub>178</sub>N<sub>5</sub>PNaSiO<sub>38</sub><sup>+</sup> [M-Et<sub>3</sub>N+Na]<sup>+</sup> 2789.1635, было обнаружено 2788.0.

10

15

20

## Синтез соединения 60



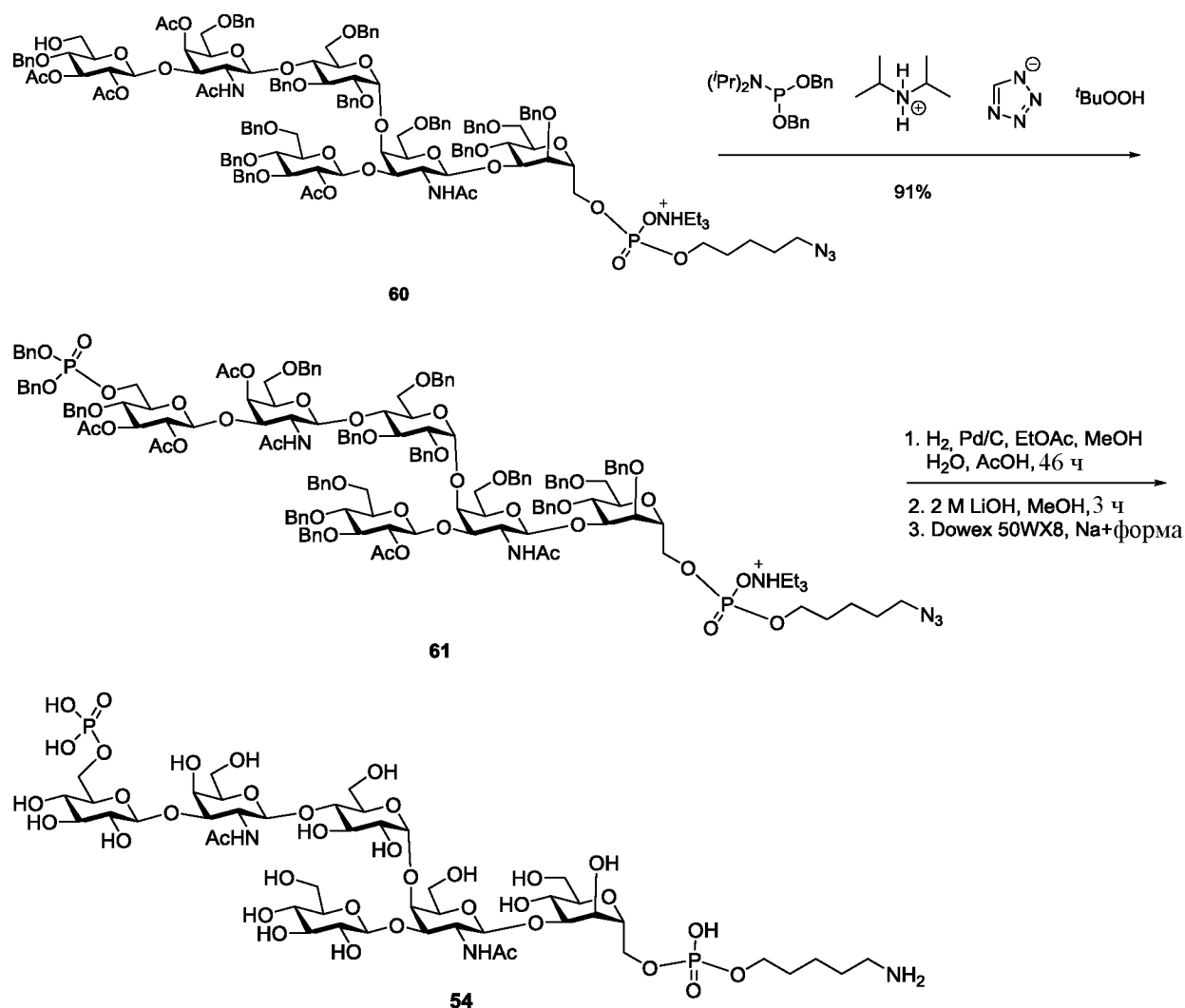
5

К раствору соединения **59** в ДХМ и пиридина при 0 °С по каплям добавляли HF раствор (70% в пиридине, 0.3 мл). Реакционную смесь перемешивали при такой же температуре в течение 18 ч. Затем, реакционную смесь разбавляли ДХМ, промывали насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> и буфером TEAB. Органическую фазу

10 отделяли и сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии (этилацетат:ДХМ:MeOH) вместе с 2% триметиламином в качестве элюентов с

15 получением желаемого продукта **60** в виде вязкой жидкости. Maldi (ESI+) рассчитывали для C<sub>138</sub>H<sub>160</sub>N<sub>5</sub>PNaO<sub>38</sub><sup>+</sup> [M-Et<sub>3</sub>N+Na]<sup>+</sup> 2550.7585, было обнаружено 2549.698.

## Синтез соединения 54



5

К раствору соединения **60** в ДХМ добавляли дибензил диизопропилфосфорамидит (2.0 эквив.) и тетразолид диизопропиламмония (2.0 эквив.) и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1.5 ч. Затем, *трет*-бутилпероксидный 5.0 - 6.0 М раствор в декане (6.0 эквив.) добавляли при комнатной

10 температуре и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч. Реакционную смесь разбавляли ДХМ и промывали водн. насыщ. раствором  $NaHCO_3$  и буфером ТЕАВ. Водный слой экстрагировали ДХМ (2 x 10 мл). Объединенный органический слой сушили над  $Na_2SO_4$  (0.5 г), фильтровали, и фильтрат концентрировали в вакууме с

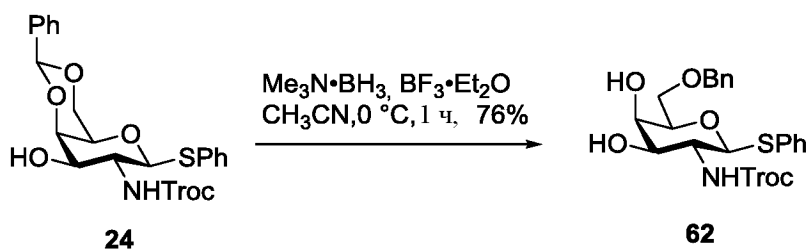
15 получением сырого продукта. Сырой продукт очищали с помощью автоматической флэш-хроматографии с использованием EtOAc:ДХМ:MeOH с 2% триметиламином с получением желаемого продукта **61** в виде вязкого масла (91%). Указанное в заголовке соединение **54** получали с выходом 60% из соединения **61** с помощью методики,

описанной для синтеза соединения **33**. МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{46}H_{83}N_3P_2NaO_{37}^+ [M+Na]^-$  1354.4078, было обнаружено 1354.9623.

### А.5 Альтернативный синтез гексасахарида 54

5

#### Синтез соединения **62**

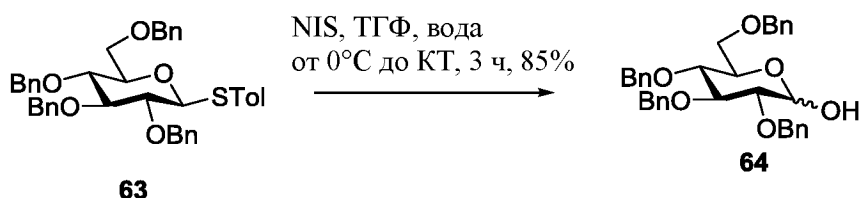


10  $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{BH}_3$  (21.2 г, 291 ммоль, 5.4 эквив.),  $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$  (42.2 мл, 291 ммоль, 5.4 эквив.) добавляли к охлажденному раствору соединения **24** (28.8 г, 54 ммоль) в  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1.5 L) при  $0\text{ }^\circ\text{C}$ . Реакционную смесь перемешивали при такой же температуре в течение 1 ч. После полного израсходования исходного вещества, реакцию гасили  $\text{Et}_3\text{N}$  (30 мл) и  $\text{MeOH}$  (50 мл). Затем реакцию разбавляли  $\text{EtOAc}$  (1 л), промывали 1 М  $\text{HCl}$  (трижды, иногда трудно увидеть 2 слоя, поэтому затем добавляют соляной

15 раствор, чтобы улучшить) и затем водн.  $\text{NaHCO}_3$  до достижения нейтрального pH органического слоя. Отделенный органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Продукт **62** (22 г, 76%) в виде белого твердого вещества использовали чистым на следующей стадии. МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{22}H_{24}Cl_3NO_6\text{SNa}^+ [M+Na]^+$  558.0288, было обнаружено 558.0332.

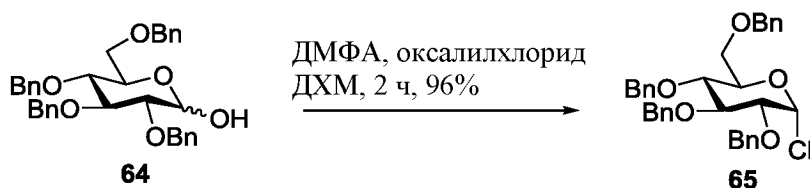
20

#### Синтез соединения **64**



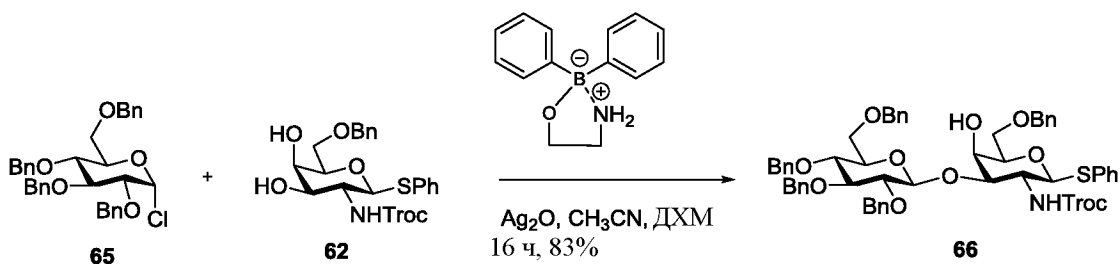
25 Методику, описанную для синтеза соединения **2**, использовали для синтеза соединения **64** (85%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{34}H_{40}O_6\text{N}^+ [M+\text{NH}_4]^+$  558.2856, было обнаружено 558.2976.

## Синтез соединения 65



- 5 К перемешиваемому раствору соединения **64** (24.5 г, 45.3 ммоль) в безводном ДХМ (360 мл), безводном ДМФА (1 мл, 13.6 ммоль, 0.30 эквив.) и  $(\text{COCl})_2$  (10.3 мл, 118.0 ммоль, 2.6 эквив.) добавляли при 0 °С. Через 5 мин реакционную смесь доводили до КТ и перемешивали при КТ в течение 2 ч. После полного израсходования исходного
- 10 вещества реакционную смесь охлаждали до 0 °С и гасили  $\text{Et}_3\text{N}$ . Образованную соль фильтровали через короткий слой целита и промывали ДХМ (не промывайте большим количеством ДХМ, соль растворяется и проходит через целит.). Затем, фильтрат концентрировали при пониженном давлении и очищали с помощью колоночной
- 15 хроматографии на силикагеле с использованием смеси этилацетат:циклогексан (0-40% с 2% $\text{Et}_3\text{N}$ ) с получением желаемого гликозилхлорида **65** (24 г, 96%) в виде вязкой жидкости. МСВР (ESI+) рассчитывали для  $\text{C}_{34}\text{H}_{35}\text{O}_5\text{ClNa}^+ [\text{M}+\text{Na}]^+$  581.2071, было обнаружено 581.2206.

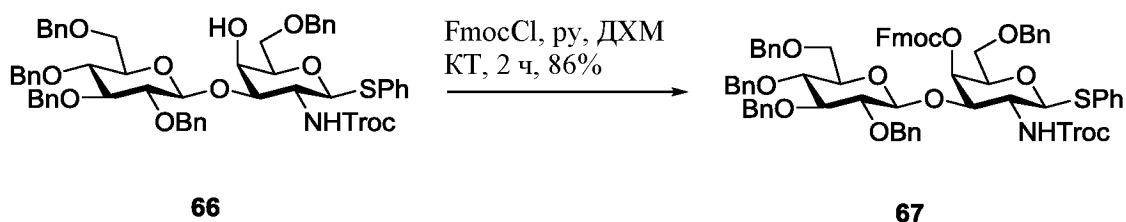
## Синтез соединения 66



- 20 К мутной смеси гликозилхлорида **65** (16.2 г, 28.9 ммоль, 1.15 эквив.) и акцептора **62** (13.5 г, 25.1 ммоль) в ацетонитриле (200 мл) и ДХМ (80 мл), добавляли  $\text{Ag}_2\text{O}$  (8.8 г, 37.7 ммоль, 1.5 эквив., высушенные в вакууме при 80 °С в течение 3 ч перед
- 25 использованием) и 2-аминоэтил дифенилборинат (0.57 г, 2.51 ммоль, 0.1 эквив.). После перемешивания при КТ в течение 16 ч, смесь разбавляли ДХМ (80 мл), ацетоном (80 мл) и фильтровали через целит, песок и промывали ДХМ и ацетоном до тех пор, пока фильтрат не показывал продукт. Все фильтратные фракции объединяли и

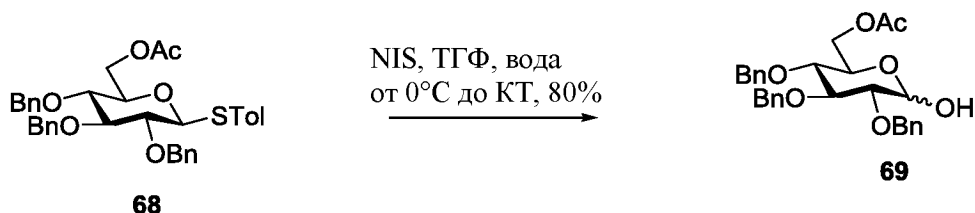
концентрировали. Остаток растворяли в EtOAc (300 мл) и поддерживали при 55 °С до растворения твердого вещества и превращения в чистый раствор. Затем этот чистый раствор фильтровали через фильтровальную бумагу и промывали горячим EtOAc и оставляли для перекристаллизации. Через 1 ч белое твердое вещество кристаллизовали и отделяли от раствора с получением желаемого дисахарида **66** в виде белого твердого вещества (22 г, 83%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{56}H_{58}Cl_3NO_{11}SNa^+ [M+Na]^+$  1080.2696, было обнаружено 1080.2904.

### Синтез соединения **67**



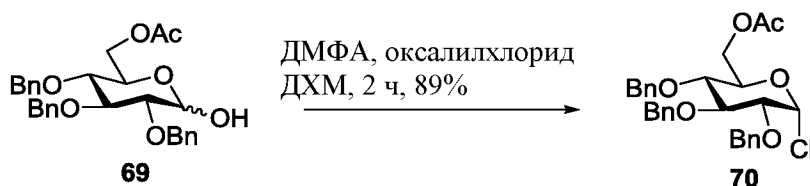
FmocCl (16.87 г, 63.2 ммоль, 2.0 эквив.) и пиридин (7.67 мл, 95.0 ммоль, 3.0 эквив.) добавляли к чистому раствору соединения **66** (33.5 г, 31.6 ммоль) в ДХМ (330 мл) и поддерживали при перемешивании при КТ в течение 2 ч. После полного израсходования исходного вещества, реакционную смесь разбавляли ДХМ и промывали соляным раствором. Органический слой сушили над  $Na_2SO_4$ , фильтровали и концентрировали. Сырой остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100%, EtOAc в циклогексане) с получением желаемого соединения **67** (34.7 г, 86%) в виде белого твердого вещества. МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{71}H_{68}Cl_3NO_{13}SNa^+ [M+Na]^+$  1302.3375, было обнаружено 1302.3694.

### Синтез соединения **69**



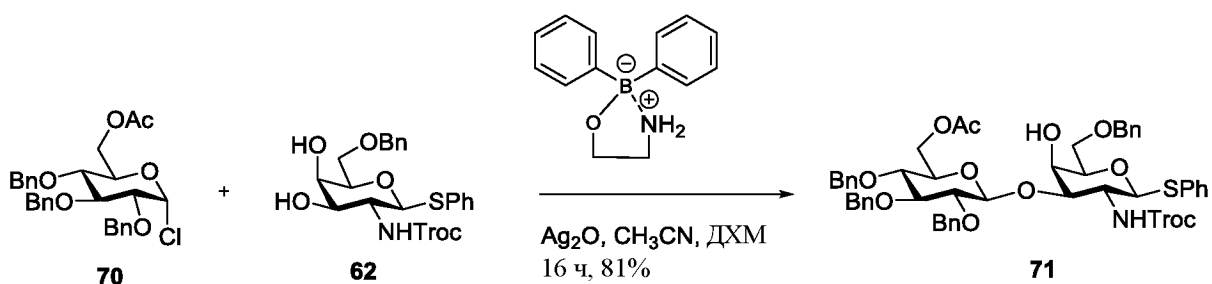
Методику, описанную для синтеза соединения **2**, использовали для синтеза соединения **69** (80%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{29}H_{36}O_7N^+ [M+NH_4]^+$  510.2492, было обнаружено 510.2527.

## Синтез соединения 70



- 5 К перемешиваемому раствору соединения **69** (18.0 г, 36.5 ммоль) в безводном ДХМ (290 мл), безводном ДМФА (0.85 мл, 11.0 ммоль, 0.30 эквив.) и  $(\text{COCl})_2$  (8.3 мл, 95.0 ммоль, 2.6 эквив.) добавляли при 0 °С. Через 5 мин. Реакционную смесь доводили до КТ и перемешивали при КТ в течение 2 ч. После полного израсходования исходного
- 10 вещества реакцию смесь охлаждали до 0 °С гасили  $\text{Et}_3\text{N}$ . Образованную соль фильтровали через короткий слой целита и промывали ДХМ. Затем, фильтрат концентрировали при пониженном давлении и очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с использованием смеси этилацетат:циклогексан (0-40% с 2% $\text{Et}_3\text{N}$ ) с получением желаемого гликозилхлорида **70** (16.7 г, 89%) в виде вязкой
- 15 жидкости. МСВР (ESI+) рассчитывали для  $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{O}_6\text{ClNa}^+ [\text{M}+\text{Na}]^+$  533.1707, было обнаружено 533.1752.

## Синтез соединения 71

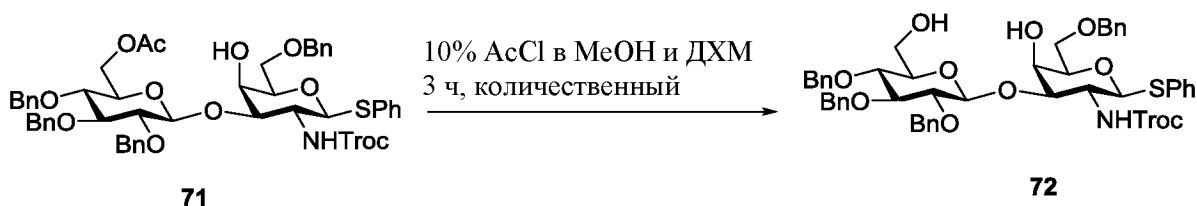


- 20 К мутной смеси гликозилхлорида **70** (16.5 г, 32.3 ммоль, 1.15 эквив.) и акцептора **62** (15.07 г, 28.1 ммоль) в ацетонитриле (200 мл) и ДХМ (80 мл), добавляли  $\text{Ag}_2\text{O}$  (9.76 г, 42.1 ммоль, 1.5 эквив. высушенные в вакууме при 80 °С в течение 3 ч перед использованием) и 2-аминоэтил дифенилборинат (0.63 г, 2.81 ммоль, 0.1 эквив.). После перемешивания при КТ в течение 16 ч, смесь разбавляли ДХМ (80 мл), ацетоном (80 мл) и фильтровали через целит, песок и промывали ДХМ и ацетоном до тех пор, пока
- 25 фильтрат не показывал продукт. Все фильтратные фракции объединяли и концентрировали. Остаток растворяли в  $\text{EtOAc}$  (400 мл) и поддерживали при 55 °С до



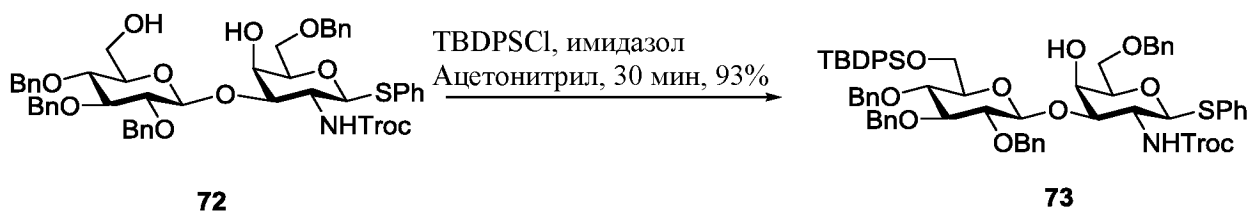
растворения твердого вещества и превращения в чистый раствор. Затем этот чистый раствор фильтровали через фильтровальную бумагу и промывали горячим EtOAc и оставляли для перекристаллизации. Через 1 ч белое твердое вещество кристаллизовали и отделяли от раствора с получением желаемого дисахарида **71** в виде белого твердого вещества (23 г, 81%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{51}H_{54}Cl_3NO_{12}SNa^+$   $[M+Na]^+$  1032.2330, было обнаружено 1032.2423.

### Синтез соединения **72**



АсСl (40 мл) добавляли к мутной смеси **71** (18.87 г, 18.66 ммоль) в MeOH (200 мл) и ДХМ (200 мл) при 0 °С. Через 5 минут, ледяную баню удаляли и поддерживали при КТ для перемешивания. После перемешивания при комнатной температуре в течение 3 ч, реакционную смесь разбавляли ДХМ и промывали водой и водн.  $\text{NaHCO}_3$ . Отделенный органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали на роторном испарителе с выходом желаемого соединения **72** (18.09 г, количественное) в виде белого твердого вещества. МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{49}H_{52}Cl_3NO_{11}SNa^+$   $[M+Na]^+$  990.2224, было обнаружено 990.2301.

### Синтез соединения **73**

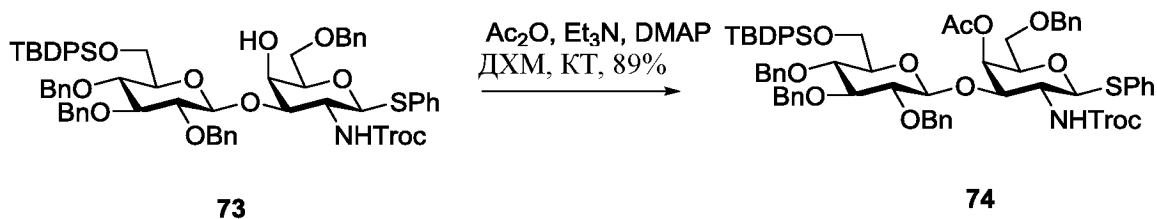


К суспензии **72** (18.05 г, 18.6 ммоль) в ацетонитриле (370 мл) добавляли имидазол (3.56 г, 52.3 ммоль, 2.8 эквив.) и TBDPSCl (7.2 мл, 28.0 ммоль, 1.5 эквив.). Через 5 минут реакционная смесь была полностью чистой и её оставляли для перемешивания при КТ в течение 30 минут. Через 30 минут, реакционную смесь разбавляли EtOAc и промывали соляным раствором. Отделенный органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Сырой остаток, полученный после удаления растворителей, очищали с помощью автоматической флэш-хроматографии на

силикагеле с использованием этилацетата и циклогексана в качестве элюентов с получением желаемого продукта **73** (20.9 г, 93%) в виде твердого вещества. МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{65}H_{70}Cl_3NO_{11}SSiNa^+$   $[M+Na]^+$  1228.3402, было обнаружено 1228.3481.

5

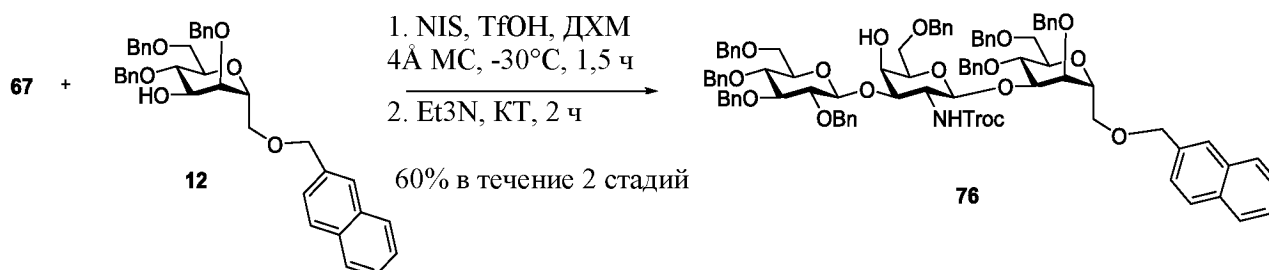
### Синтез соединения **74**



К чистому раствору соединения **73** (18.69 г, 15.47 ммоль) в ДХМ (200 мл) добавляли  $Et_3N$  (19 мл, 139.0 ммоль, 9.0 эквив.), уксусный ангидрид (4.4 мл, 46.4 ммоль, 3.0 эквив.) и DMAP (0.189 г, 1.547 ммоль, 0.1 эквив.) и поддерживали при перемешивании при КТ в течение 18 ч. Через 18 ч, реакционную смесь разбавляли ДХМ и промывали водн.  $NaHCO_3$ . Отделенный органический слой сушили над  $Na_2SO_4$  и концентрировали. Сырой остаток, полученный после удаления растворителей, очищали с помощью автоматической флэш-хроматографии на силикагеле (циклогексан- $EtOAc$ ) с выходом желаемого продукта **74** в виде пены (17.2 г, 89%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{67}H_{72}Cl_3NO_{12}SSiNa^+$   $[M+Na]^+$  1272.3478, было обнаружено 1272.3530.

20

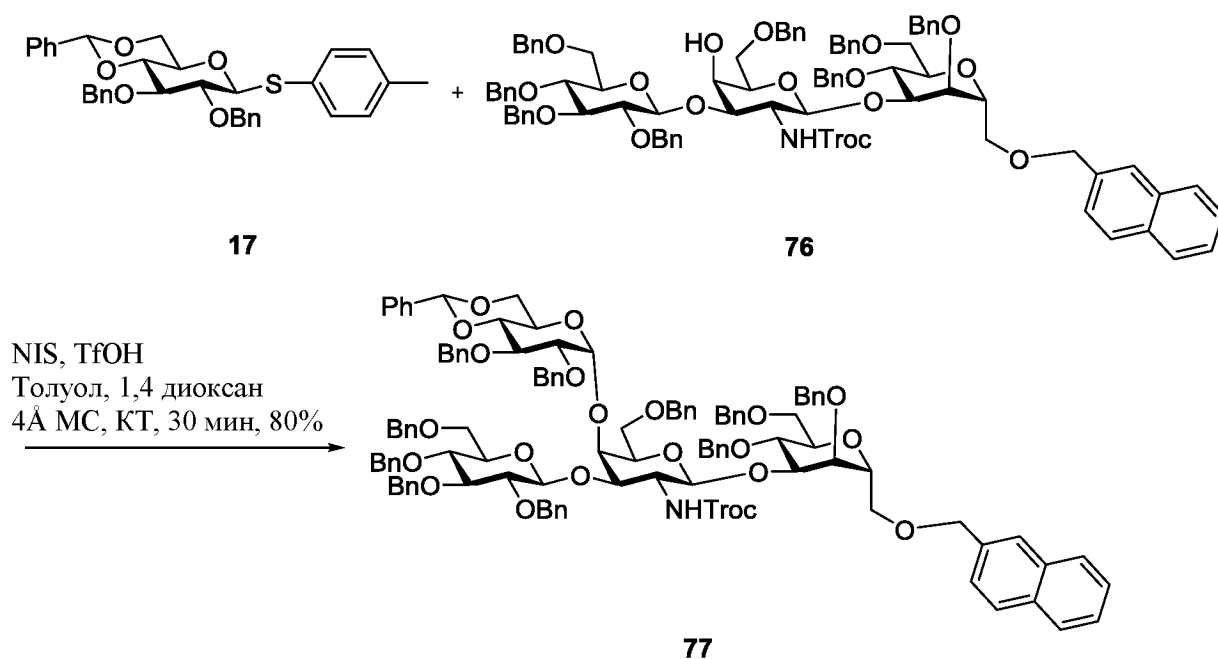
### Синтез соединения **76**



Методику, описанную для синтеза соединения **16**, использовали для синтеза соединения **76** (60% в течение 2 стадий). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{82}H_{86}O_{17}NNaCl_3^+$   $[M+Na]^+$  1574.5329, было обнаружено 1574.5624.

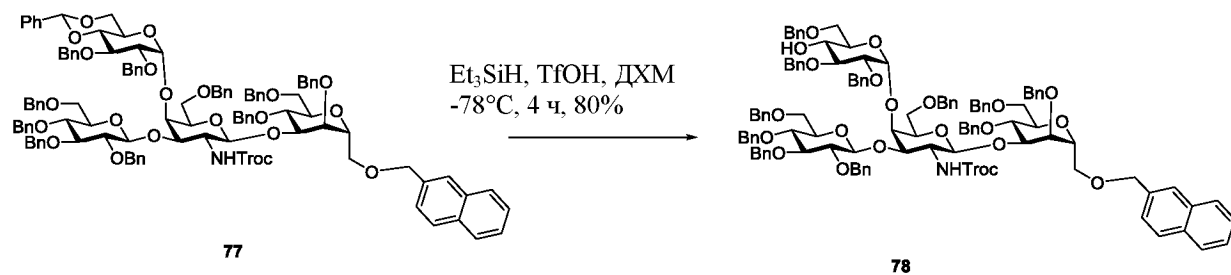
25

## Синтез соединения 77



5 Методику, описанную для синтеза соединения **18**, использовали для синтеза соединения **77** (80%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $\text{C}_{116}\text{H}_{122}\text{O}_{22}\text{N}_2\text{Cl}_3^+ [\text{M}+\text{NH}_4]^+$  2000.7565, было обнаружено 2000.7588.

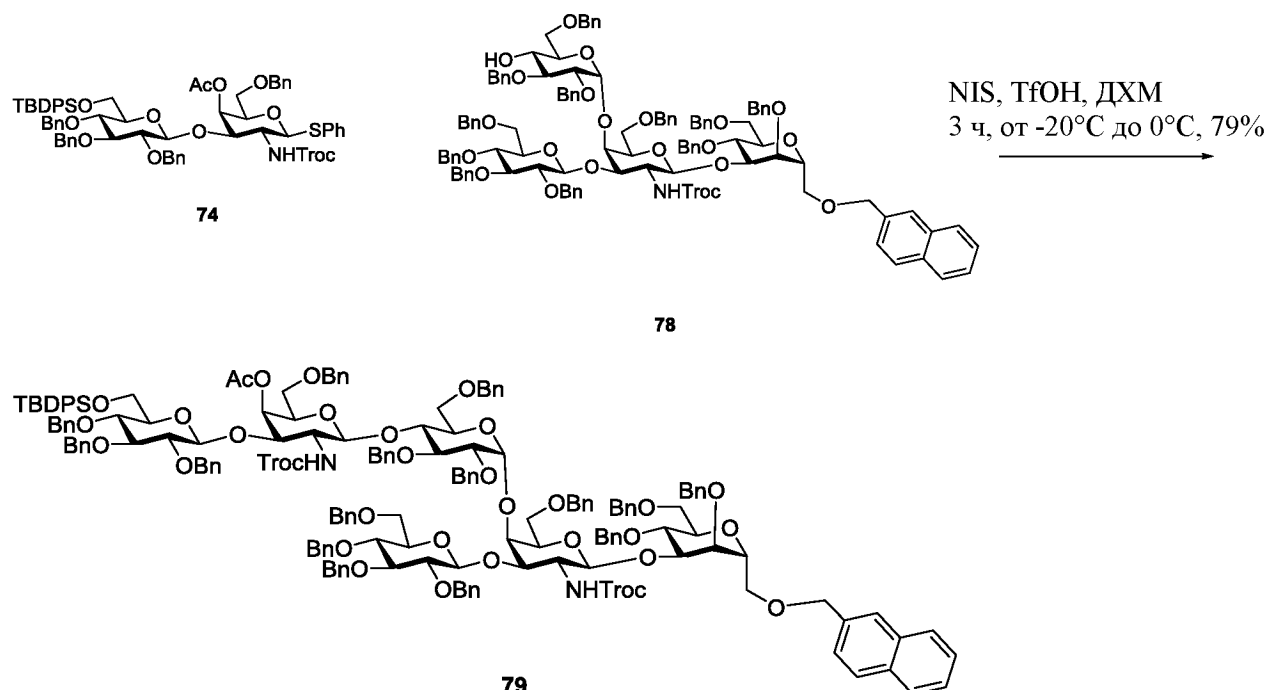
## Синтез соединения 78



10

Методику, описанную для синтеза соединения **19**, использовали для синтеза соединения **78** (80%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $\text{C}_{116}\text{H}_{124}\text{O}_{22}\text{N}_2\text{Cl}_3^+ [\text{M}+\text{NH}_4]^+$  2001.7711, было обнаружено 2001.6469.

## Синтез соединения 79

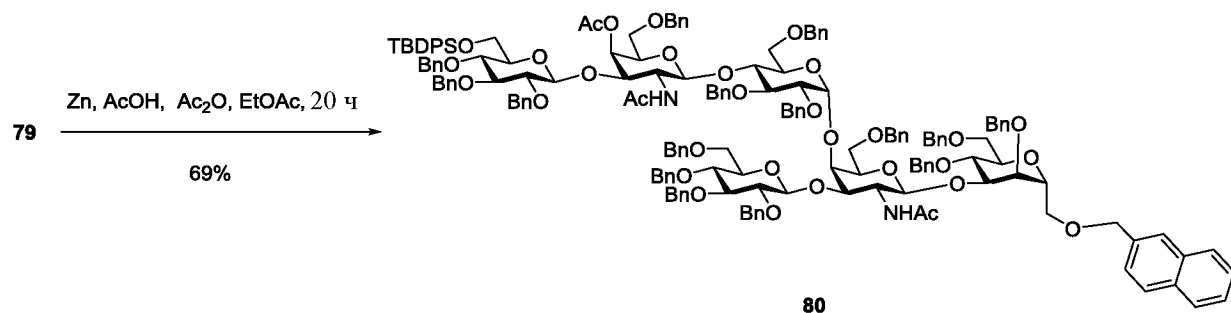


5

Методику, описанную для синтеза соединения **28**, использовали для синтеза соединения **79** (79%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{177}H_{186}O_{34}N_2Cl_6Na^+ [M+Na]^+$  3147.0689, было обнаружено 3147.1184.

10

## Синтез соединения 80



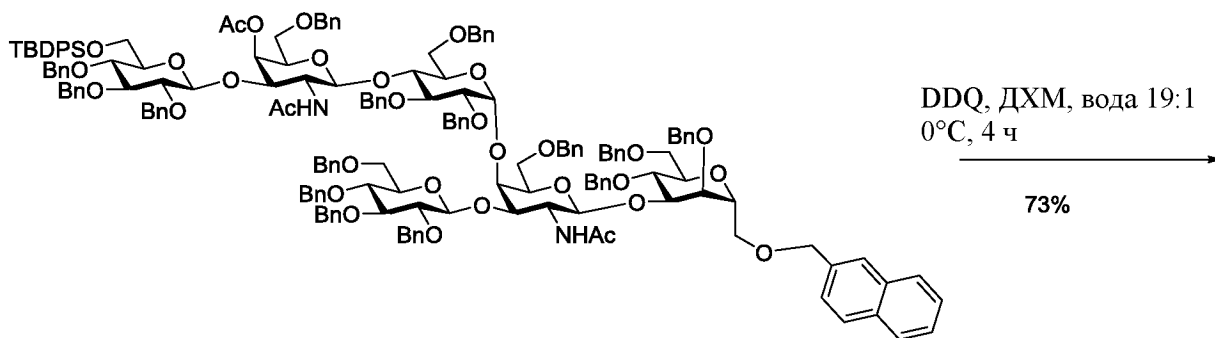
15

К чистому раствору соединения **79** в EtOAc (2.0 mM) добавляли Zn (100 эквив.), AcOH (100 эквив.), Ac<sub>2</sub>O и реакционную смесь поддерживали при перемешивании при комнатной температуре 20 ч. После полного израсходования исходного вещества, реакционную смесь фильтровали через слой целита и концентрировали. Сырой остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100%, EtOAc в циклогексане) с получением желаемого гексасахарида **80** (69%) в

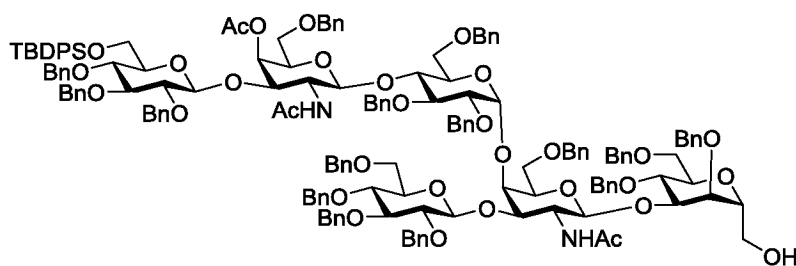
виде белого твердого вещества. МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{175}H_{188}N_2O_{32}Si^+ [M]^+$  2858.2948, было обнаружено 2858.3062.

### Синтез соединения 81

5



80

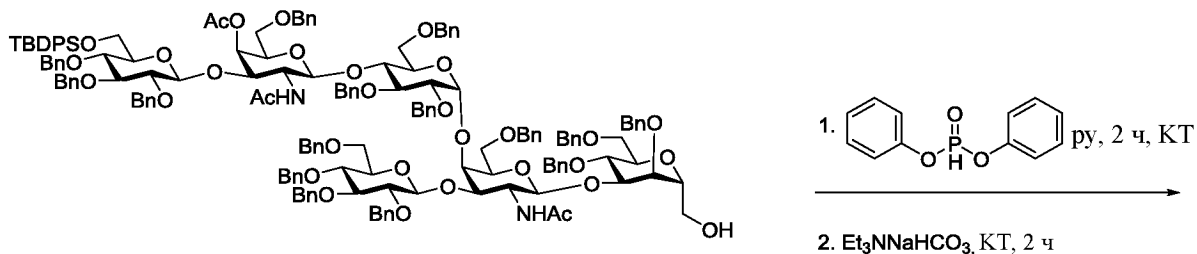


81

Методику, описанную для синтеза соединения **31**, использовали для синтеза соединения **81** (73%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{164}H_{180}O_{32}N_2Si^+ [M]^+$  2718.2322, было обнаружено 2718.2347.

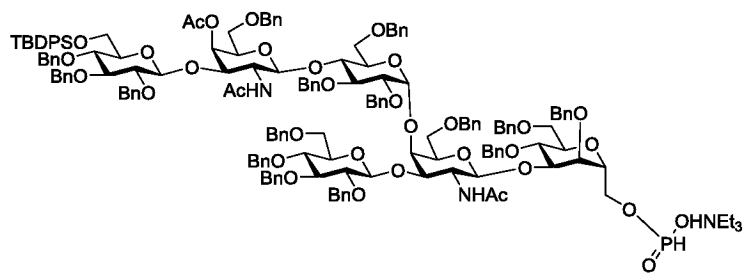
10

### Синтез соединения 82



81

87% в течение 2 стадий

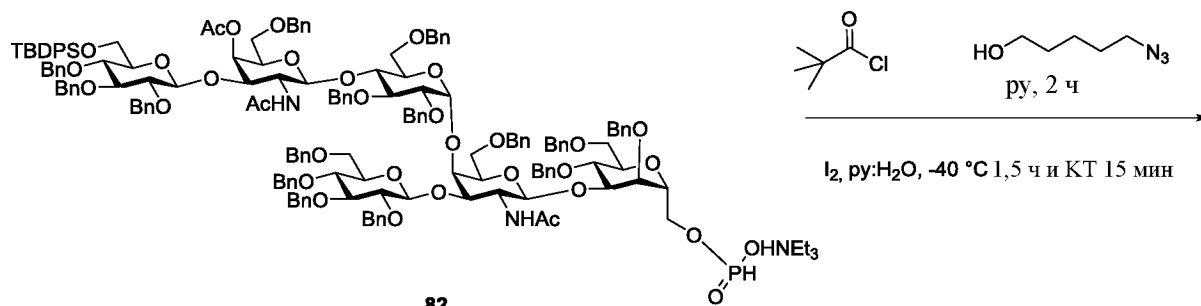


82

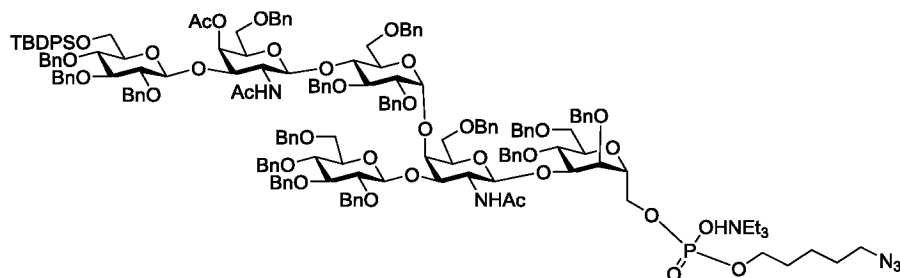
Методику, описанную для синтеза соединения **58**, использовали для синтеза соединения **82** (87%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{164}H_{181}O_{34}N_2SiP^+$   $[M-Et_3N]^+$  2782.2036, было обнаружено 2782.2077.

5

### Синтез соединения 83



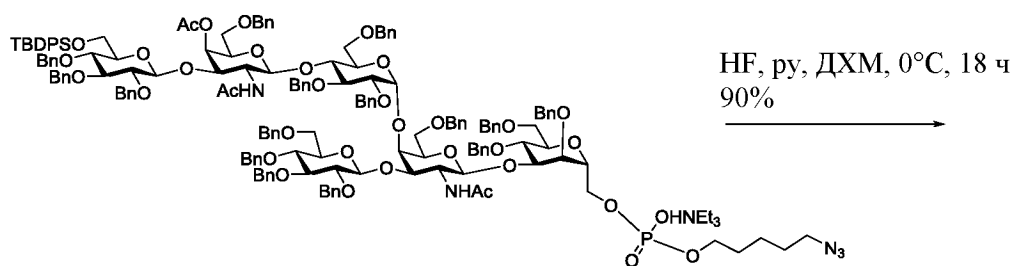
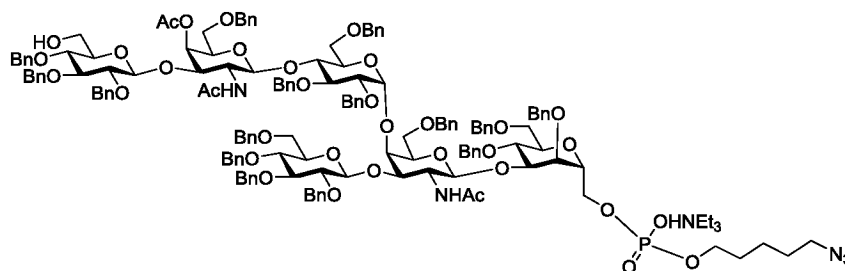
82



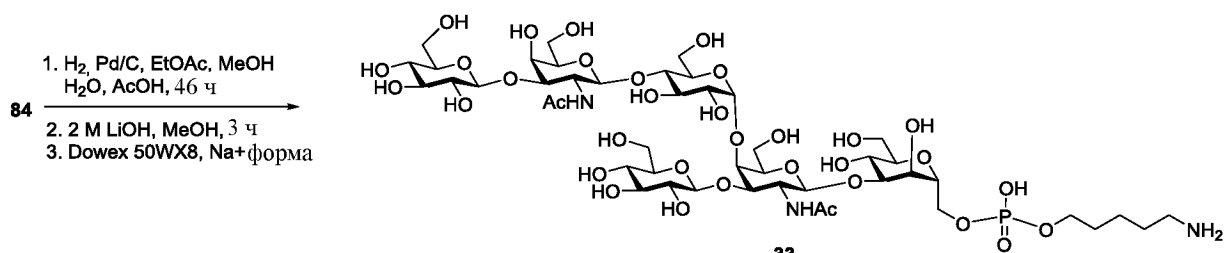
83

88% в течение 2 стадий

10 Методику, описанную для синтеза соединения **59**, использовали для синтеза соединения **83** (88%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{169}H_{190}O_{35}N_5SiP^+$   $[M-Et_3N]^+$  2910.2815, было обнаружено 2910.2841.

Синтез соединения **84****83****84**

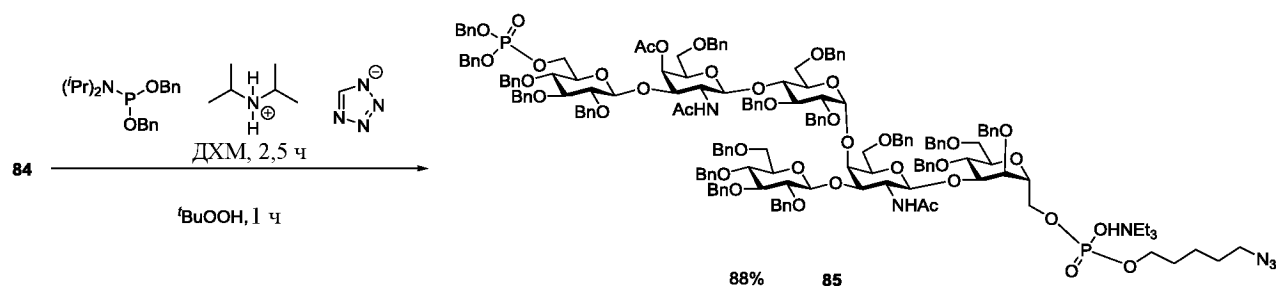
- 5 Методику, описанную для синтеза соединения **60**, использовали для синтеза соединения **84** (90%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{153}H_{172}O_{35}N_5P^+$  [M-Et<sub>3</sub>N]<sup>+</sup> 2672.1638, было обнаружено 2672.1759.

Синтез соединения **33**

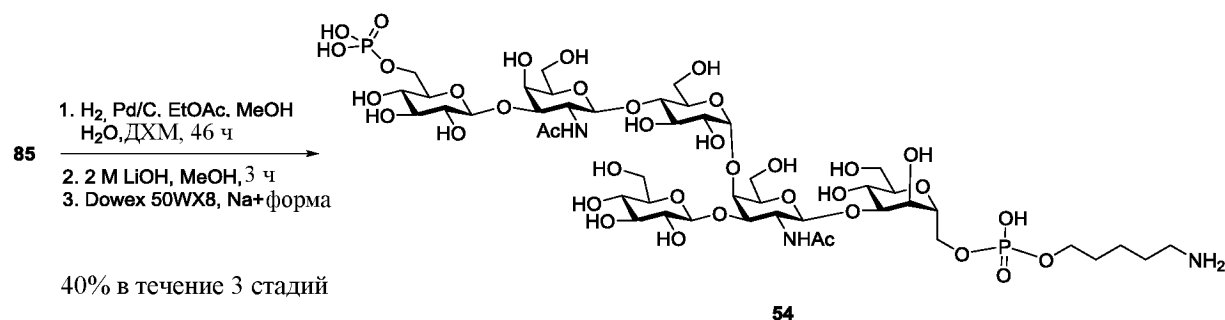
10

55% в течение 3 стадий

- Методику, описанную для синтеза соединения **33** из соединения **32**, использовали для синтеза соединения **33** (55%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{46}H_{82}N_3PO_3^+$  [M-Na+2H]<sup>+</sup> 1252.4551, было обнаружено 1252.4574.

Синтез соединения **85**

К раствору соединения **84** в ДХМ, добавляли дибензил N,N-диизопропилфосфорамидит (2.0 эквив.) и тетразолид диизопропиламмония (1.5 эквив.) и раствор перемешивали при КТ в течение 2.5 ч. Затем добавляли *трет*-бутилпероксид (6.0 эквив., 5.0 - 6.0 М раствор в декане) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч. Через 1 ч реакционную смесь разбавляли ДХМ и гасили водн. насыщ. раствором NaHCO<sub>3</sub>. водный слой экстрагировали ДХМ. Объединенный органический слой промывали соляным раствором, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали, и фильтрат концентрировали в вакууме с получением сырого продукта. Сырой продукт очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии на силикагеле (0-100% EtOAc в циклогексане) с получением желаемого продукта **85** (88%). MСВР (ESI<sup>+</sup>) рассчитывали для C<sub>167</sub>H<sub>185</sub>O<sub>38</sub>N<sub>5</sub>P<sub>2</sub><sup>+</sup> [M-Et<sub>3</sub>N]<sup>+</sup> 2932.2240, было обнаружено 2932.2147.

15 Синтез соединения **54**

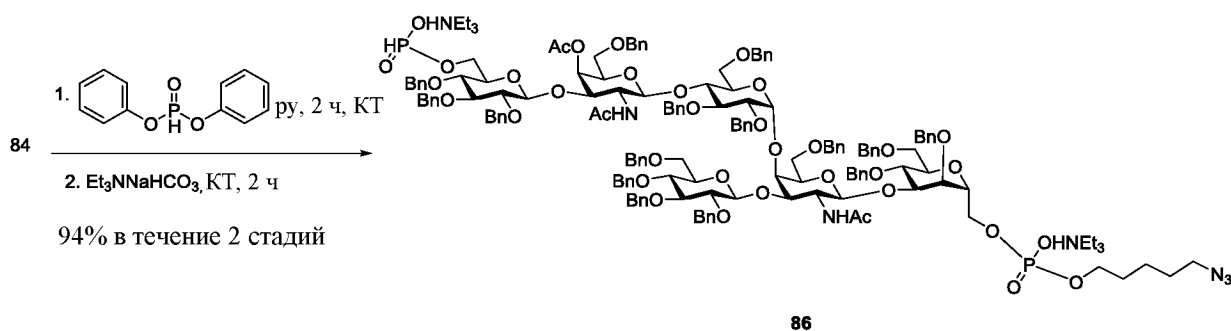
Pd/C (20 мг) добавляли к чистому раствору соединения **85** (20 мг) в EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O:ДХМ. Полученную неоднородную смесь перемешивали в атмосфере водорода при КТ в течение 40 ч. Через 40 ч, реакционную смесь фильтровали через РТФЕ фильтр и концентрировали в вакууме при 30 °С температуре бани роторного испарителя в течение 10 мин для удаления метанола, EtOAc, ДХМ и воды. Сырой продукт, полученный после удаления растворителей, растворяли в MeOH, воде и к этой смеси добавляли LiOH (2н. в воде) при 0 °С. Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 3 ч. Через 3 ч, реакционную смесь гасили AcOH и растворители удаляли



при пониженном давлении и полученный сырой остаток очищали с помощью C18 колоночной хроматографии с обращенной фазой с использованием воды и ацетонитрила в качестве растворителей с получением желаемого конечного соединения **54** в форме соли. Затем соль триэтиламина была заменена смолой Dowex с получением желаемого соединения с натриевой солью (40% в течение 3 стадий) в виде белого твердого вещества. МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{46}H_{83}N_3P_2O_{37}^+ [M-Na+H]^+$  1332.4214, было обнаружено 1332.4242.

### Синтез соединения **86**

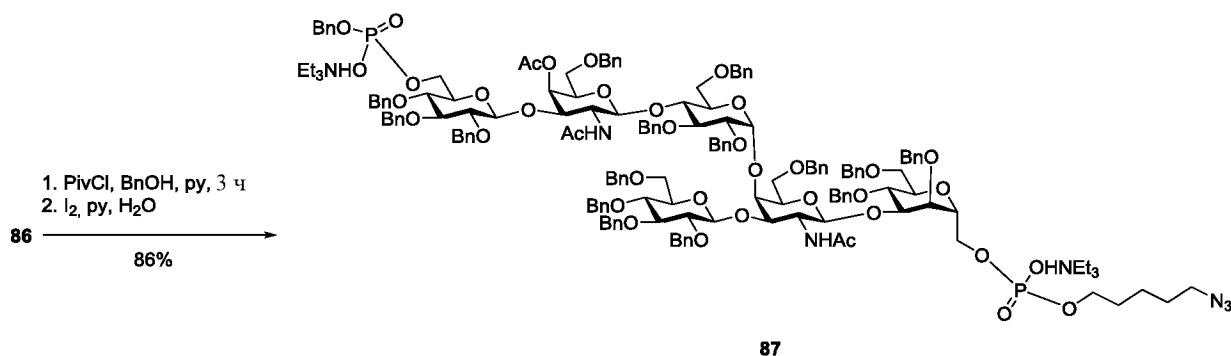
10



Методику, описанную для синтеза соединения **58**, использовали для синтеза соединения **86** (94%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{165}H_{203}O_{37}N_7P_2^+ [M-2xEt_3N+H]^+$  2735.1318, было обнаружено 2735.1356.

15

### Синтез соединения **87**

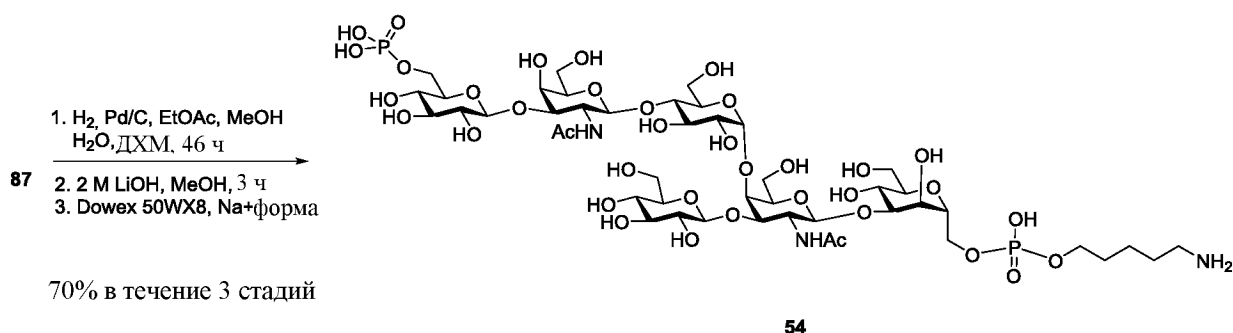


Н-фосфонат **86** (1.0 эквив.) и бензиловый спирт (10.0 эквив.) упаривали совместно с пиридином и сушили в вакууме в течение 30 мин. После этого, полученное растворяли в Py и добавляли PivCl (5.0 эквив.). Реакционную смесь поддерживали при перемешивании при КТ в течение 2 ч. Через 2 ч, реакционную смесь охлаждали до -40 °С, добавляли свежеприготовленный раствор I<sub>2</sub> в Py:H<sub>2</sub>O (20 : 1) и реакционную смесь

20

поддерживали при перемешивании при такой же температуре в течение 1.5 ч и затем доводили до КТ и перемешивали при КТ в течение 15 мин. Затем, ТЕАВ (10 мл) добавляли к смеси и разбавляли дихлорметаном, промывали последовательно 10% водн. раствором тиосульфата натрия, 1 М водн. раствором гидрокарбоната триэтиламония (ТЕАВ), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии (этилацетат:ДХМ:МеОН) вместе с 2% триметиламином в качестве элюентов с получением желаемого продукта **87** (86%) в виде вязкой жидкости. Maldi (ESI+) рассчитывали для  $\text{C}_{160}\text{H}_{179}\text{N}_5\text{P}_2\text{O}_{38}^+ [\text{M}+\text{H}-2\times\text{Et}_3\text{N}]^+$  2842.1770, было обнаружено 2842.1638.

### Синтез соединения **54**



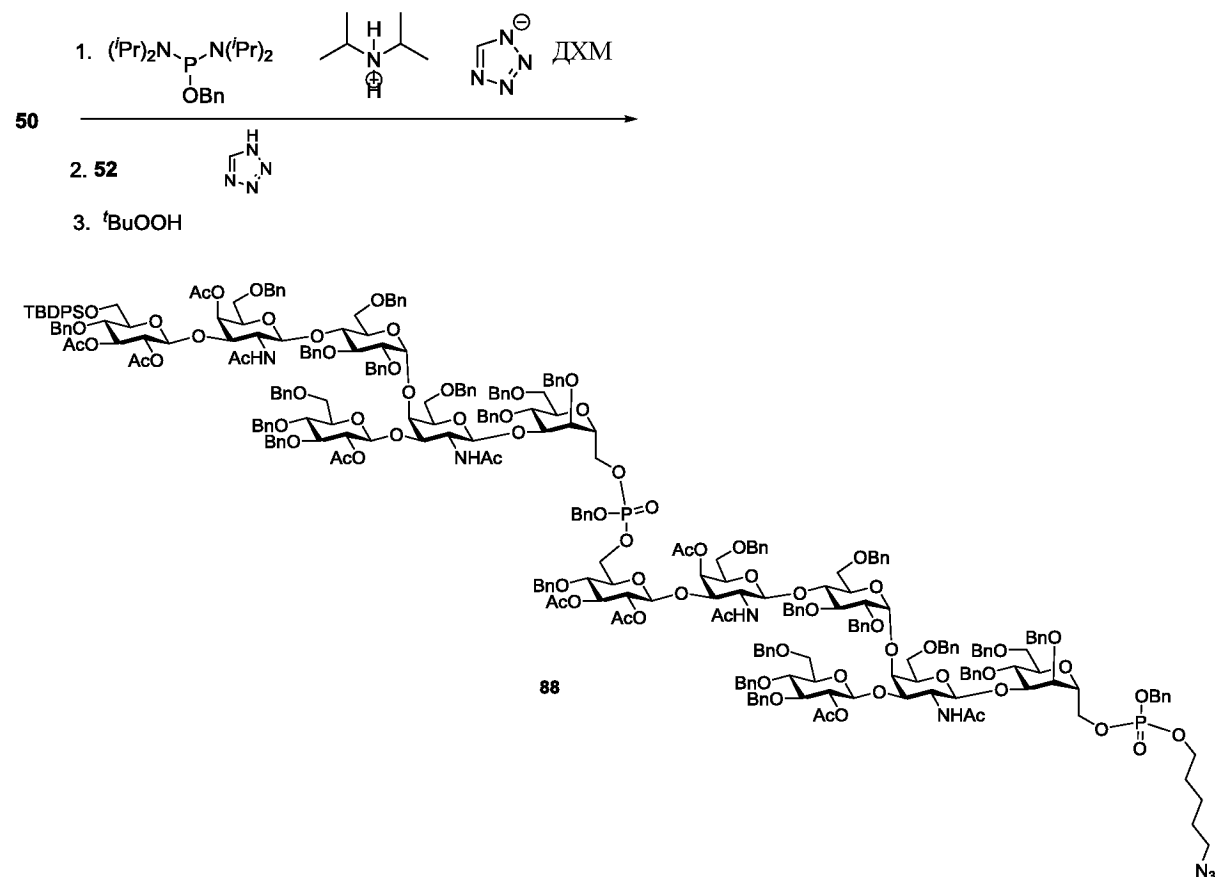
**15** Pd/C (20 мг) добавляли к чистому раствору соединения **87** (20 мг) в EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O:ДХМ. Полученную неоднородную смесь перемешивали в атмосфере водорода при КТ в течение 40 ч. Через 40 ч, реакционную смесь фильтровали через PTFE фильтр и концентрировали в вакууме при 30 °С температуре бани роторного испарителя в течение 10 мин для удаления метанола, EtOAc, ДХМ и воды. Сырой продукт, полученный после удаления растворителей, растворяли в MeOH, воде и к этому добавляли LiOH (2н. в воде) при 0 °С. Реакционную смесь перемешивали при 0°С в течение 3 ч. Через 3 ч, реакционную смесь гасили AcOH и растворители удаляли при пониженном давлении и полученный сырой остаток очищали с помощью C18 колоночной хроматографии с обращенной фазой с использованием воды и

**20**

**25** ацетонитрила в качестве растворителей с получением желаемого конечного соединения **54** в форме соли. Затем соль триэтиламина была заменена смолой Dowex с получением желаемого соединения с натриевой солью (70% в течение 3 стадий) в виде белого твердого вещества. MСВР (ESI+) рассчитывали для  $\text{C}_{46}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{P}_2\text{O}_{37}^+ [\text{M}-3\text{Na}+4\text{H}]^+$  1332.4214, было обнаружено 1332.4232.

## А.6 Синтез додекасахарида 92

### Синтез соединения 88

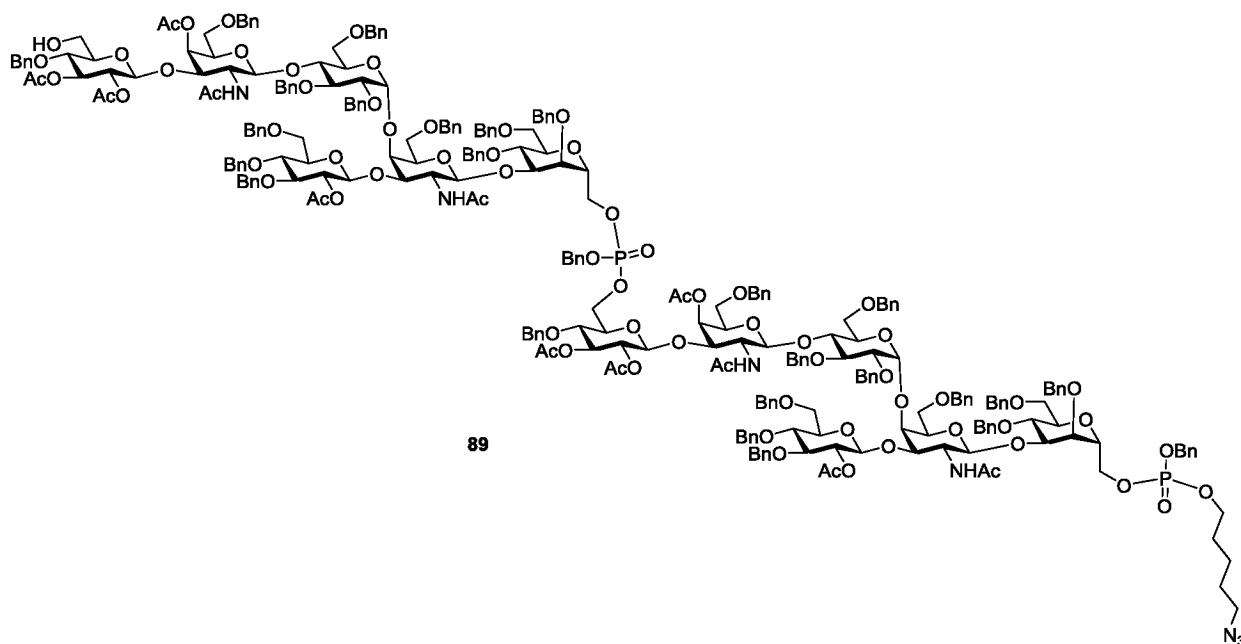


Методику, описанную для синтеза соединения **32**, использовали для синтеза соединения **88**, здесь только присутствует замена, во второй стадии вместо линкера в качестве нуклеофила использовали соединение **52**.

10

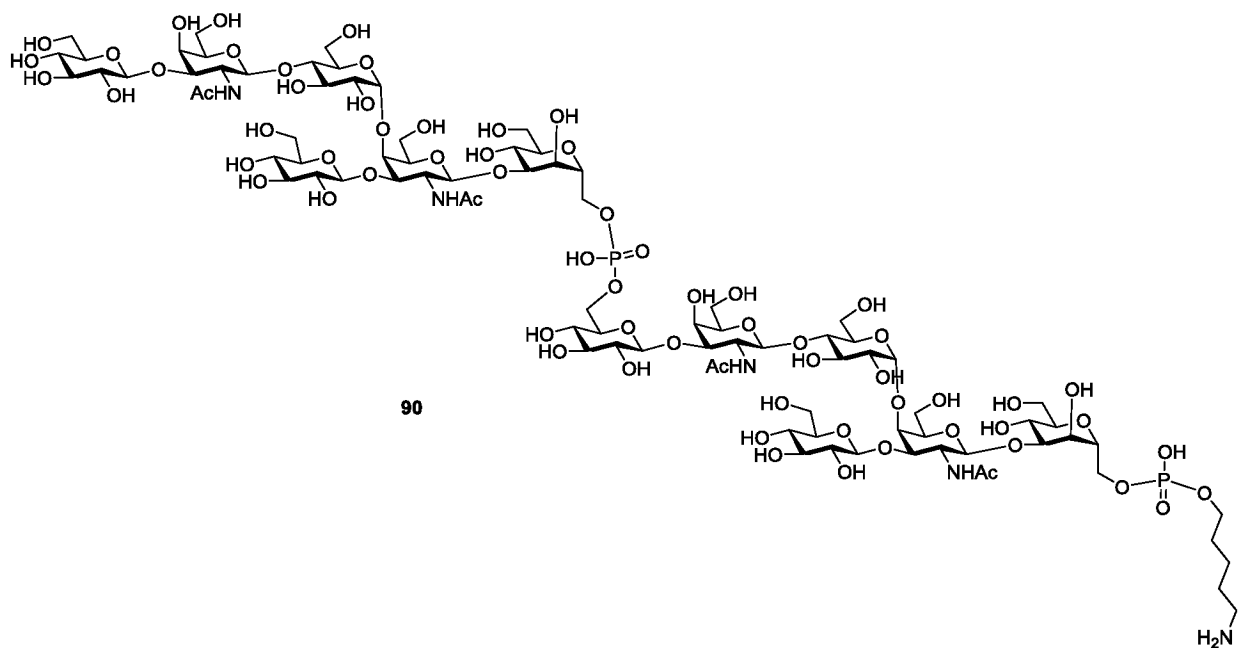
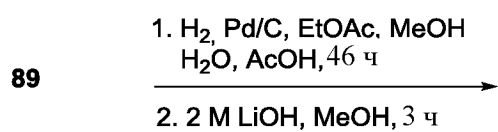
### Синтез соединения 89





Методику, описанную для синтеза соединения **52**, использовали для синтеза соединения **89**.

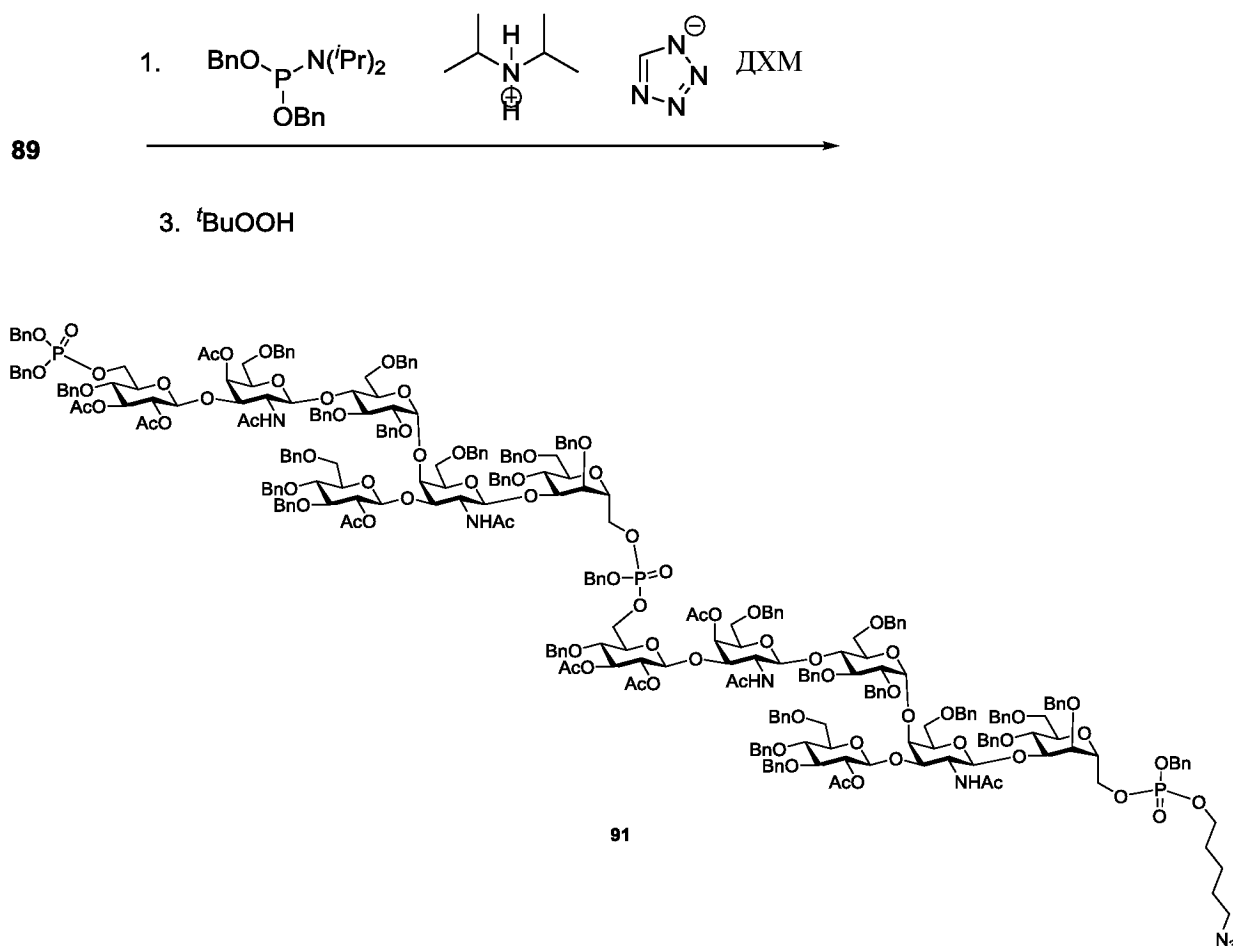
## 5 Синтез соединения 90



Методику, описанную для синтеза соединения **33**, использовали для синтеза соединения **90**.

### Синтез соединения 91

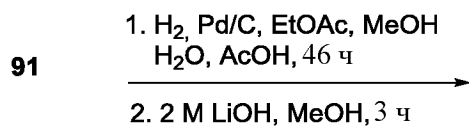
5



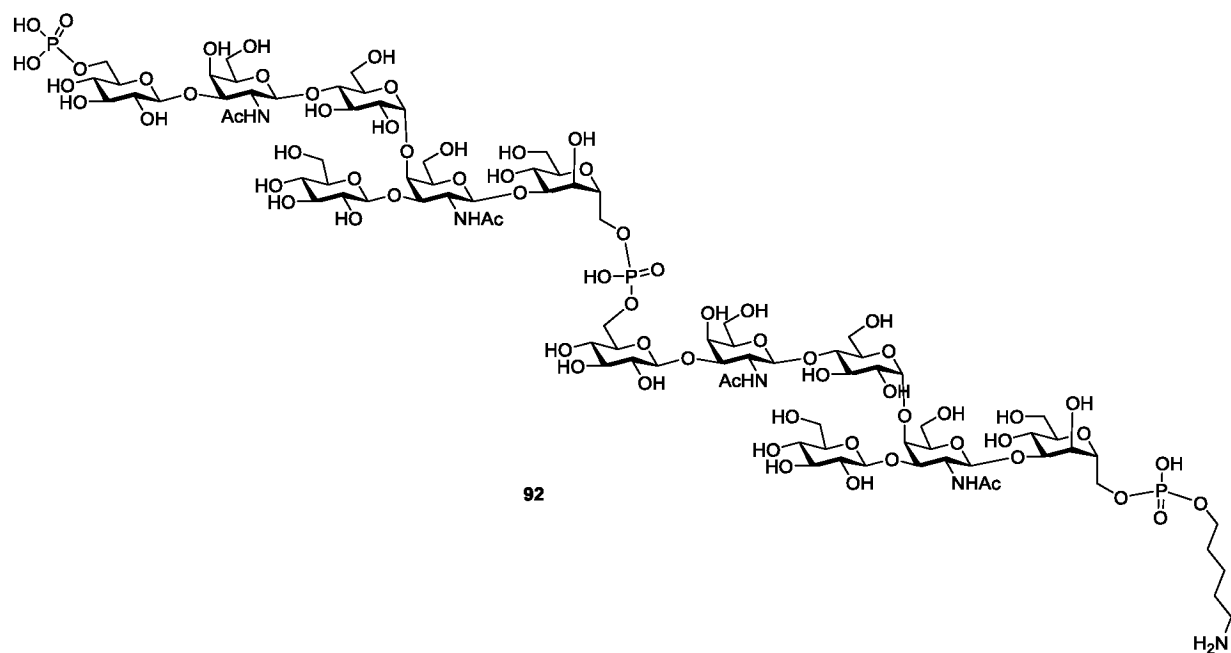
Методику, описанную для синтеза соединения **53**, использовали для синтеза соединения **91**.

10

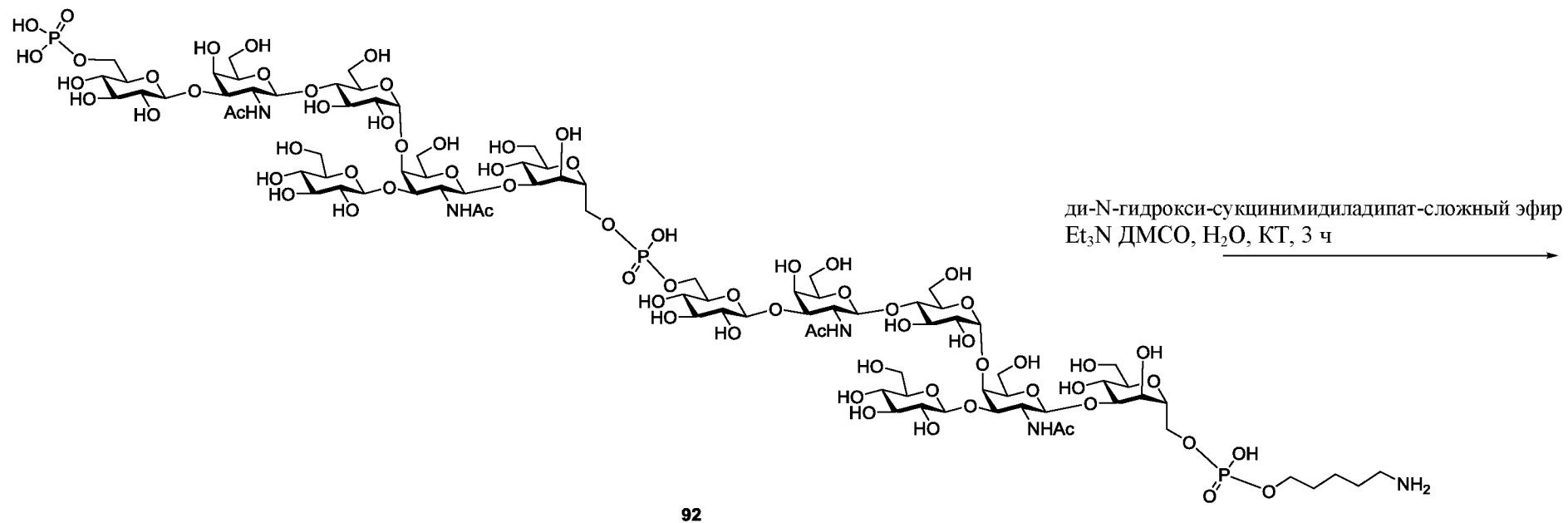
### Синтез соединения 92

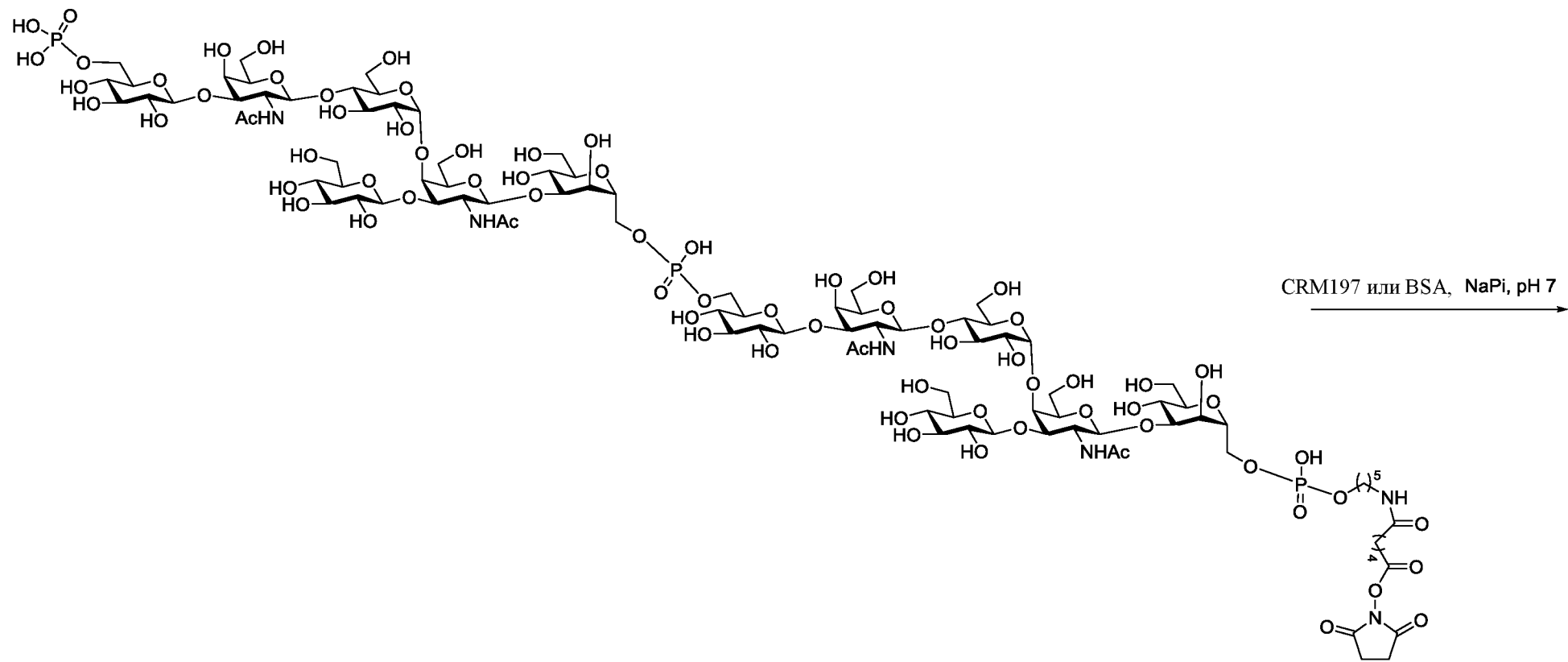


15

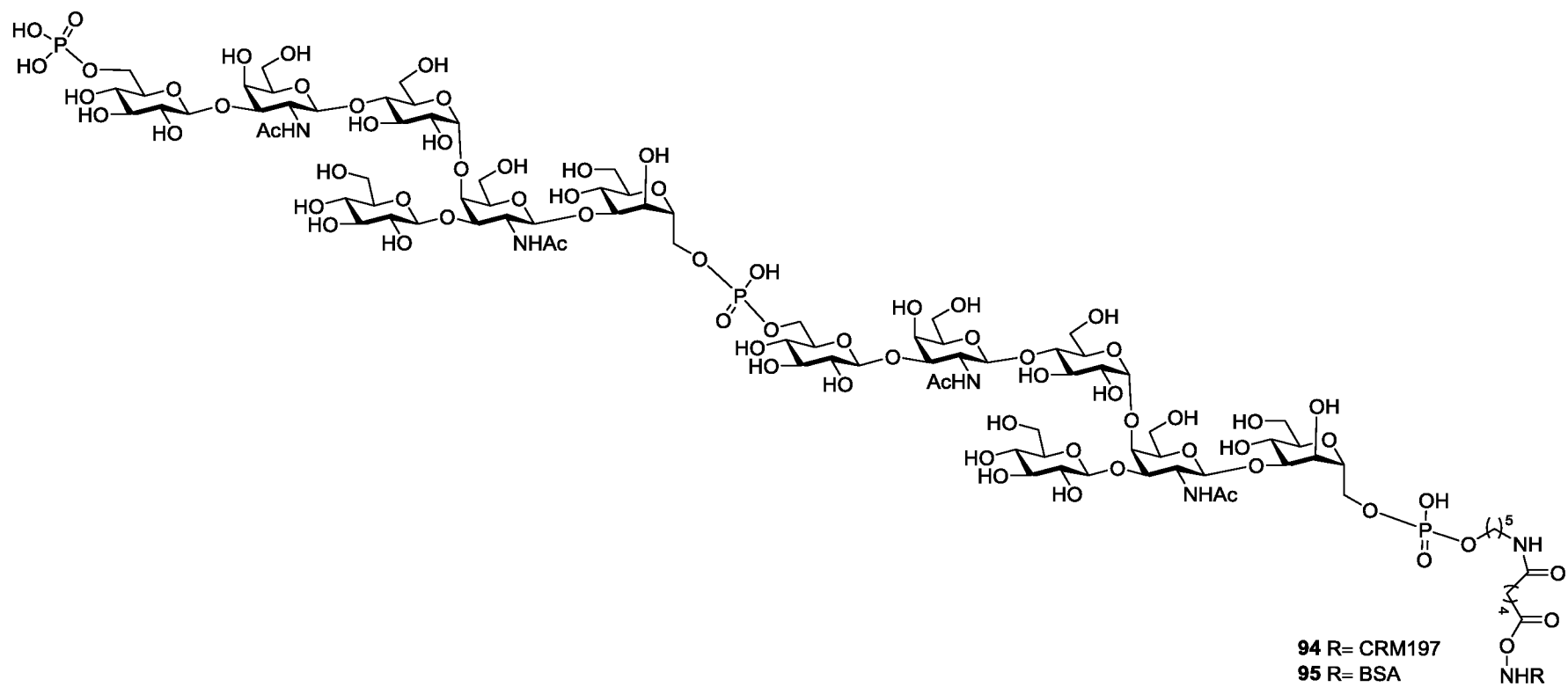


Методику, описанную для синтеза соединения **33**, использовали для синтеза соединения **92** (60%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{87}H_{151}N_5P_2O_{67} [(M-2Na+2H)/2]$  1199.9019, было обнаружено 1199. 8950.

Конъюгирование соединения 92 с CRM<sub>197</sub> и BSA



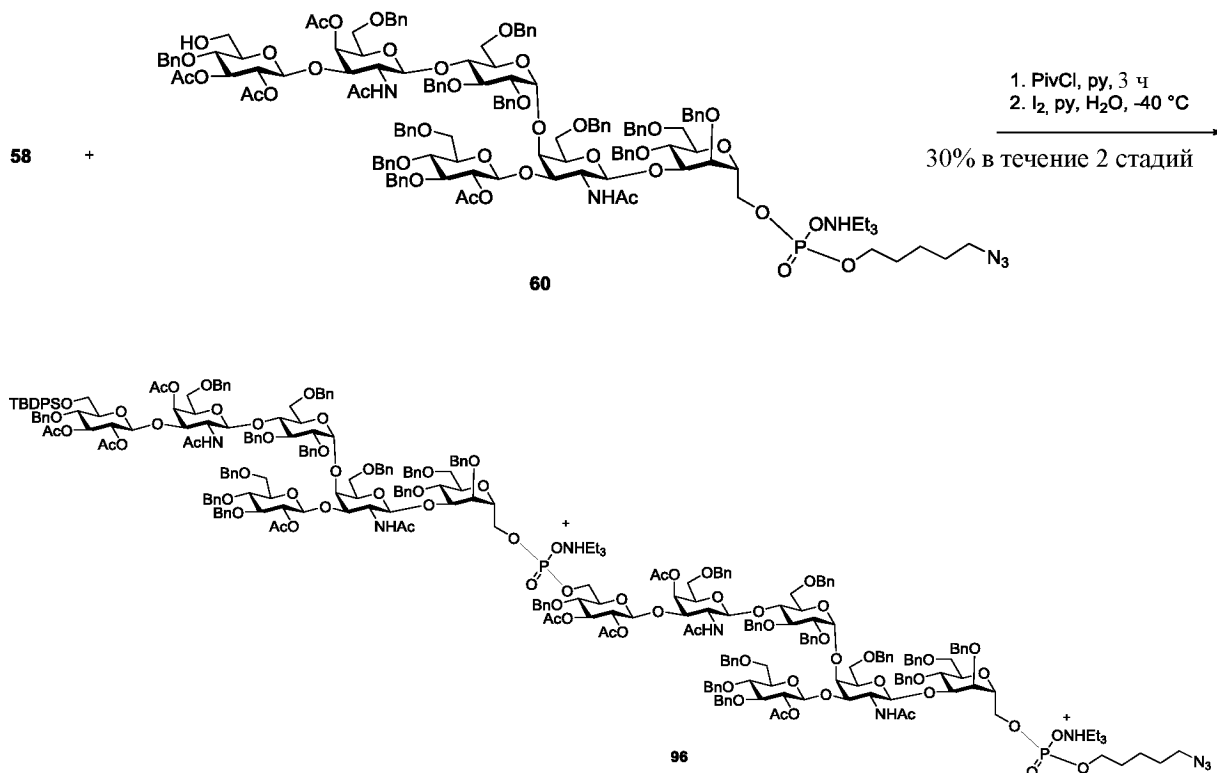




Методику, описанную для синтеза гликоконъюгатов **36** и **37**, использовали для синтеза соединений **94** и **95**.

## А.7 Альтернативный синтез додекасахарида 92

### Синтез соединения 96



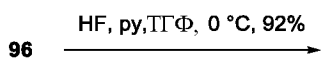
Н-фосфонат **58** (1.2 эквив.) и акцептор **60** (1.0 эквив.) упаривали совместно с пиридином и сушили в вакууме в течение 30 мин. После этого, полученное растворяли в р<sub>у</sub> и к этому добавляли PivCl (1.3 эквив.). Реакционную смесь поддерживали при перемешивании при КТ в течение 3 ч. Через 3 ч, реакционную смесь охлаждали до -40 °С, добавляли свежеприготовленный раствор I<sub>2</sub> в Р<sub>у</sub>:Н<sub>2</sub>О (250 мкл, 20 : 1) и реакционную смесь поддерживали при перемешивании при такой же температуре в течение 1.5 ч и затем доводили до КТ и перемешивали при КТ в течение 15 мин. Затем, ТЕАВ (10 мл) добавляли к смеси и разбавляли дихлорметаном, промывали последовательно 10% водн. раствором тиосульфата натрия, 1 М водн. раствором гидрокарбоната триэтиламмония (ТЕАВ), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии (этилацетат:ДХМ:МеОН) вместе с 2% триметиламином в качестве элюентов с получением желаемого продукта **96** (70%) в виде вязкой жидкости. MALDI (ESI<sup>+</sup>) рассчитывали для C<sub>287</sub>H<sub>325</sub>K<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>75</sub>P<sub>2</sub>Si<sup>+</sup> [M-2Et<sub>3</sub>N+2K]<sup>+</sup> 5237.0351, было обнаружено 5237.718.

10

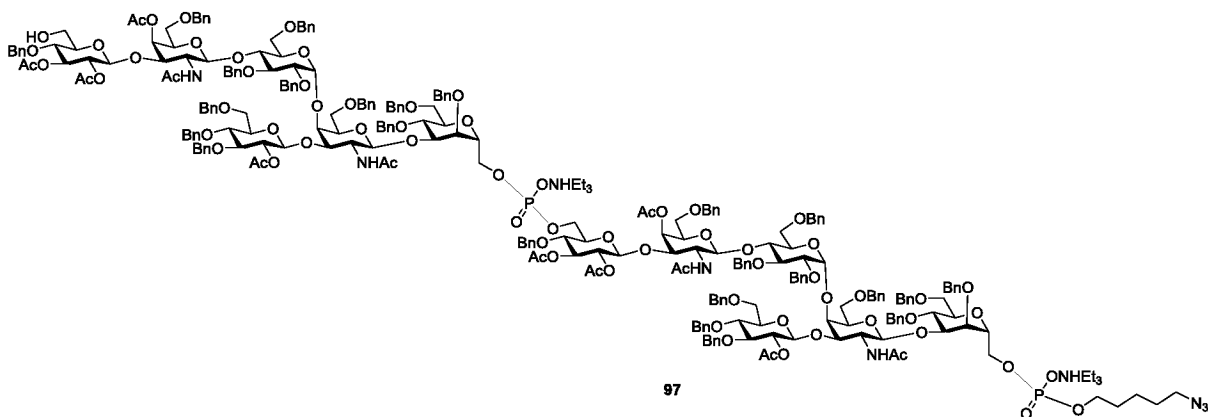
15

20

## Синтез соединения 97



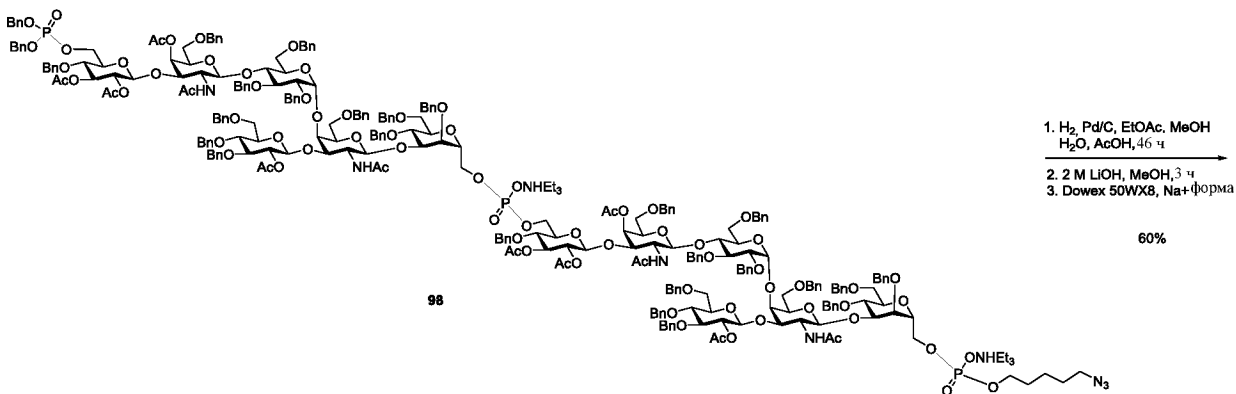
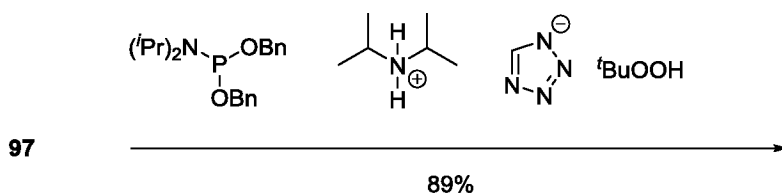
5



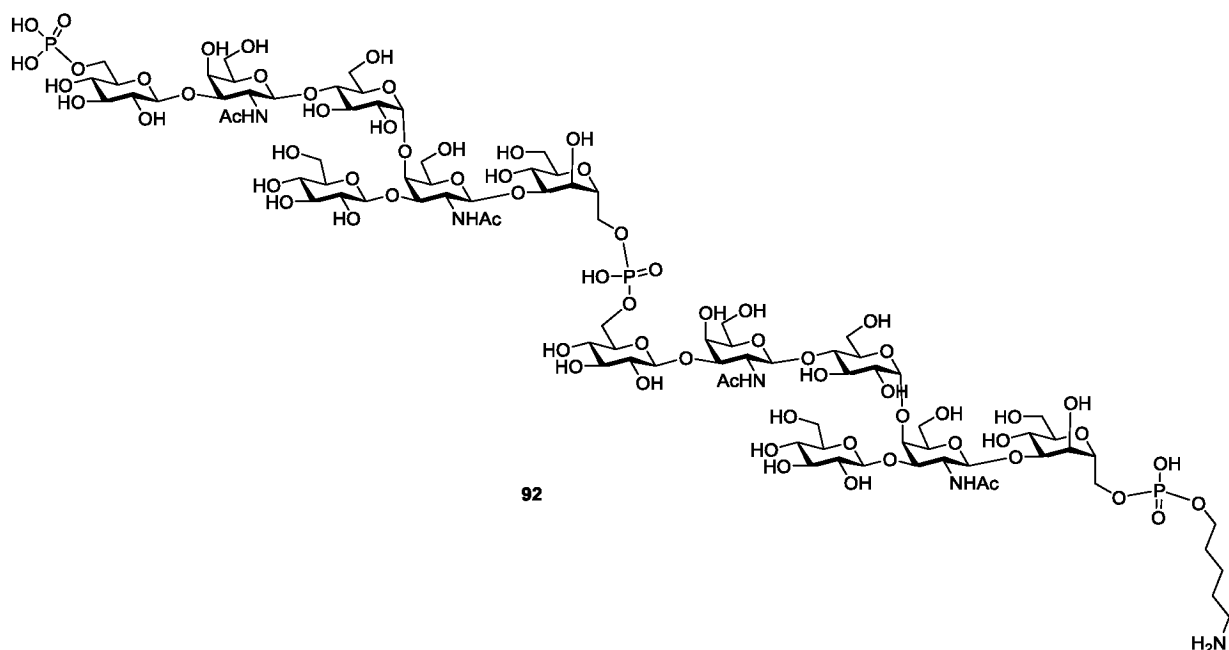
Методику, описанную для синтеза соединения **60**, использовали для синтеза соединения **97** (70%). Maldi (ESI+) рассчитывали для  $C_{271}H_{309}N_7O_{75}P_2^+ [M]^+$  4926.3745, было обнаружено 4926.323.

10

## Синтез соединения 92



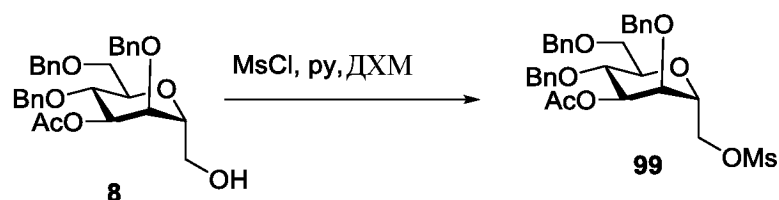
15



Методику, описанную для синтеза соединения **61**, использовали для синтеза соединения **98** (89%). Методику, описанную для синтеза соединения **54**, использовали для синтеза соединения **92** (60%). МСВР (ESI+) рассчитывали для  $C_{87}H_{152}N_5P_3NH_4O_{70}^-$  [(M+ NH<sub>4</sub>-2H)/2]<sup>-</sup> 1247.8944, было обнаружено 1247.8791.

#### A.8 Синтез гексасахариды 112

##### Синтез соединения 99

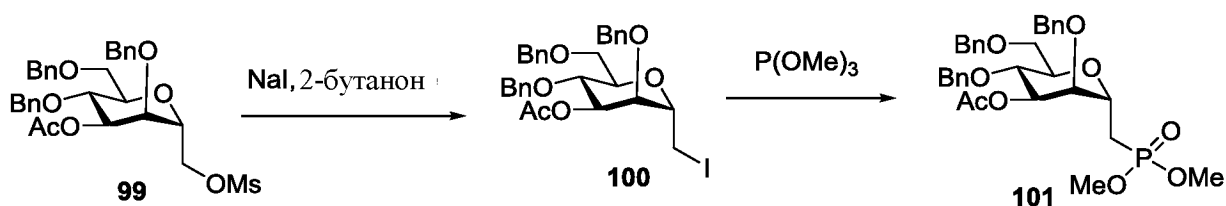


10

MsCl и пиридин (py) добавляли к чистому раствору соединения **8** в ДХМ при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и затем разбавляли ДХМ, промывали водн. раствором NaHCO<sub>3</sub>, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали с получением сырого продукта. Остаток очищали с помощью автоматической хроматографии на силикагеле (гексан/AcOEt) с получением соединения **99**.

15

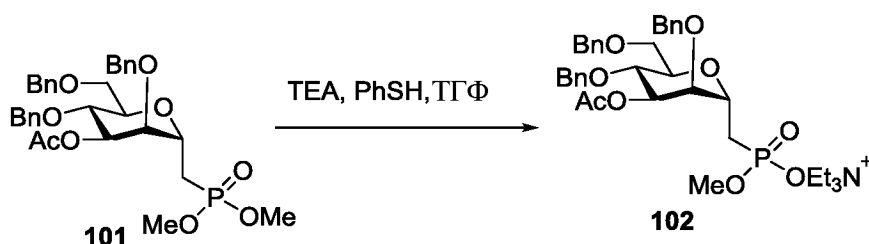
## Синтез соединения 100 и 101



Йодид натрия добавляли к чистому раствору соединения **99** в 2-бутаноне и реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение ночи. Затем, растворитель удаляли, и сырой остаток растворяли в ДХМ, промывали водн. NaHSO<sub>3</sub>, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали с получением йодметильного производного **100**. Это йодопроизводное растворяли в свежедистиллированном триметилфосфите и раствор нагревали до 100°C в вакууме (водяной насос) в течение 48 ч. После концентрирования и хроматографии на силикагеле получали фосфонатное производное **101**.

10

## Синтез соединения 102

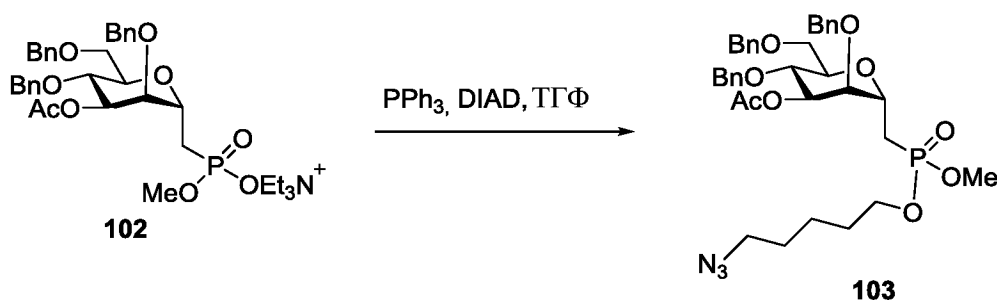


TEA и тиофенол добавляли к чистому раствору соединения **101** в ТГФ.

Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. После полного израсходования исходного вещества, реакционную смесь разбавляли TEA и концентрировали с получением сырого остатка, и очищали с помощью хроматографии на силикагеле с получением **102**.

15

## Синтез соединения 103

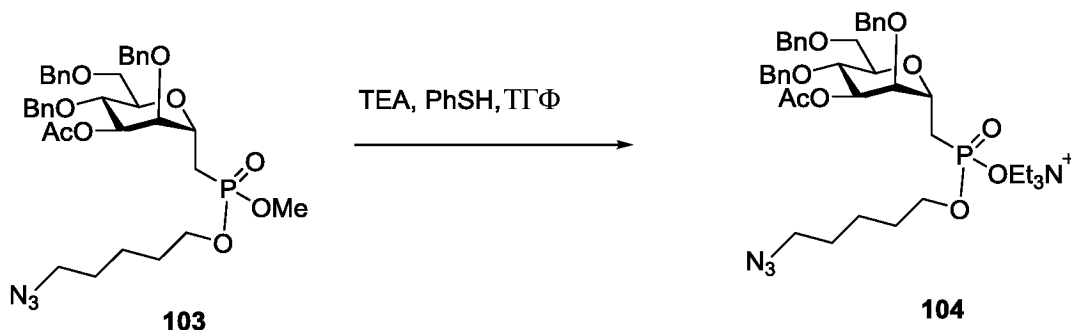


20

Фосфонат **102**, линкер и трифенилфосфин растворяли в ТГФ и раствор охлаждали до 0°C и к этому добавляли DIAD. Смесь перемешивали при комнатной температуре в

течение 24 ч. Через 24 ч, раствор концентрировали и сырой продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле с получением **103**.

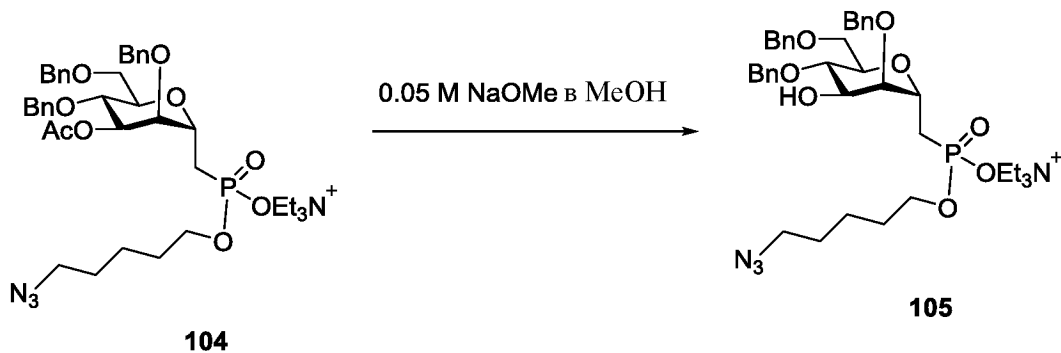
#### Синтез соединения **104**



ТЕА и тиофенол добавляли к чистому раствору соединения **103** в ТГФ.

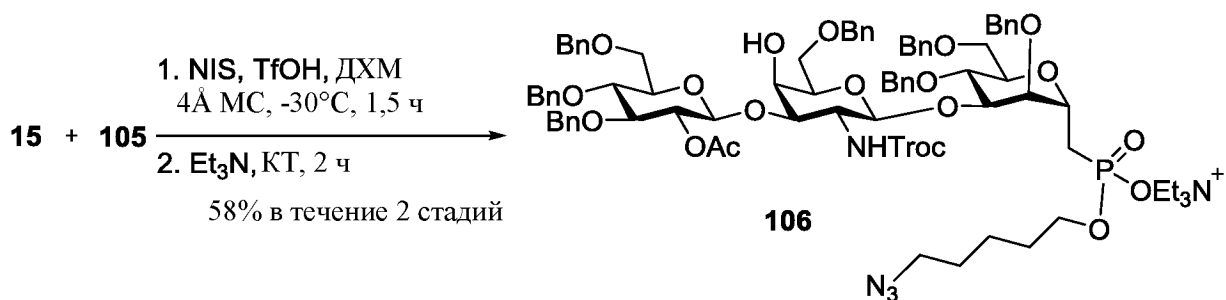
10 Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. После полного израсходования исходного вещества, реакционную смесь разбавляли ТЕА и концентрировали с получением сырого остатка, и очищали с помощью хроматографии на силикагеле с получением **104**.

#### Синтез соединения **105**



15 Фосфонатное производное **104** растворяли в 0.05 М растворе NaOMe в MeOH и перемешивали при КТ в течение 10 мин. Затем реакционную смесь гасили AcOH и растворители удаляли в вакууме. Полученный сырой остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле с получением соединения **105**.

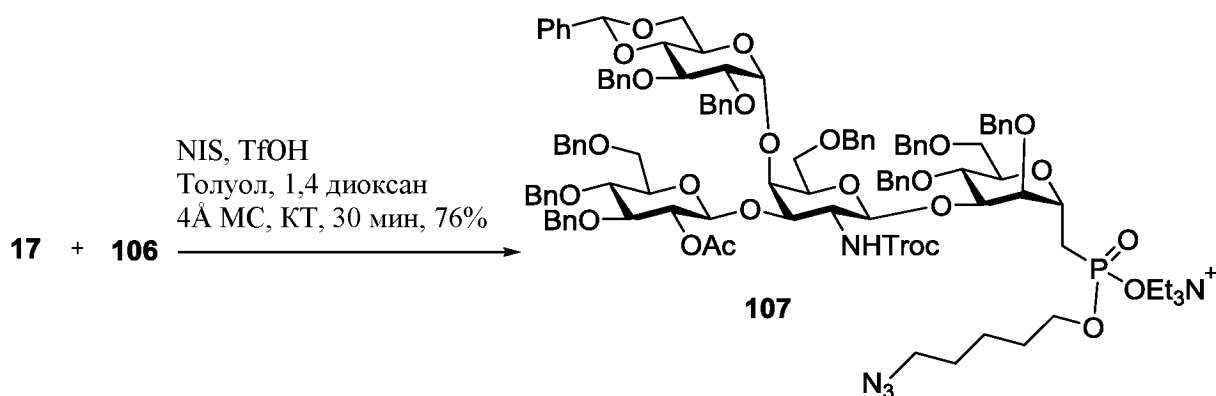
## Синтез соединения 106



Реакцию проводили в соответствии с синтезом соединения 16.

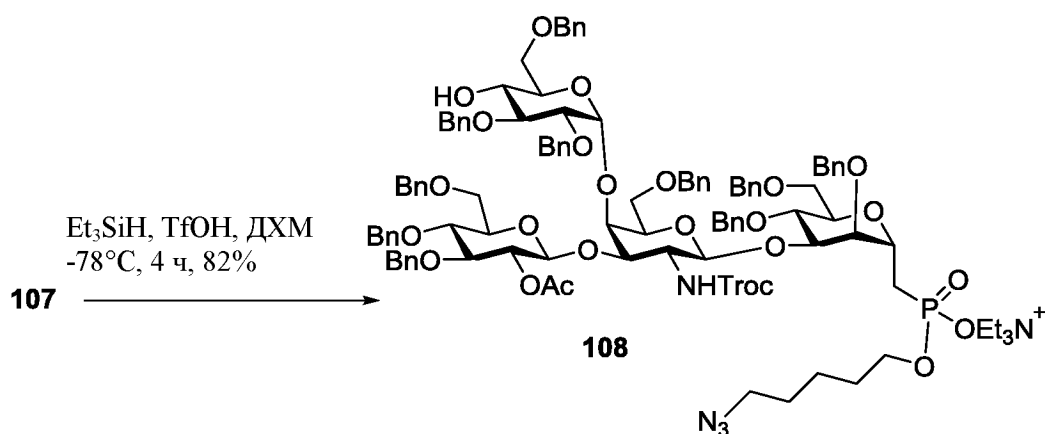
5

## Синтез соединения 107



Реакцию проводили в соответствии с синтезом соединения 18.

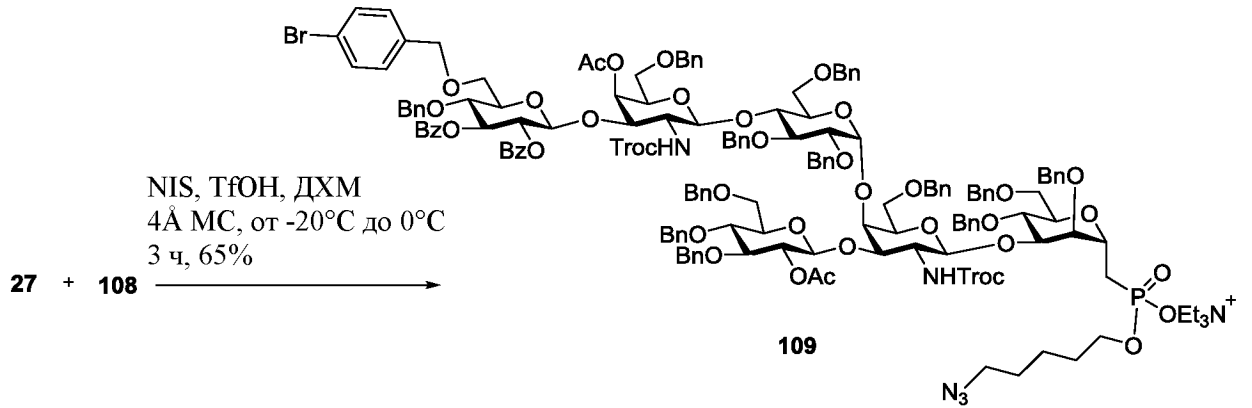
## Синтез соединения 108



10

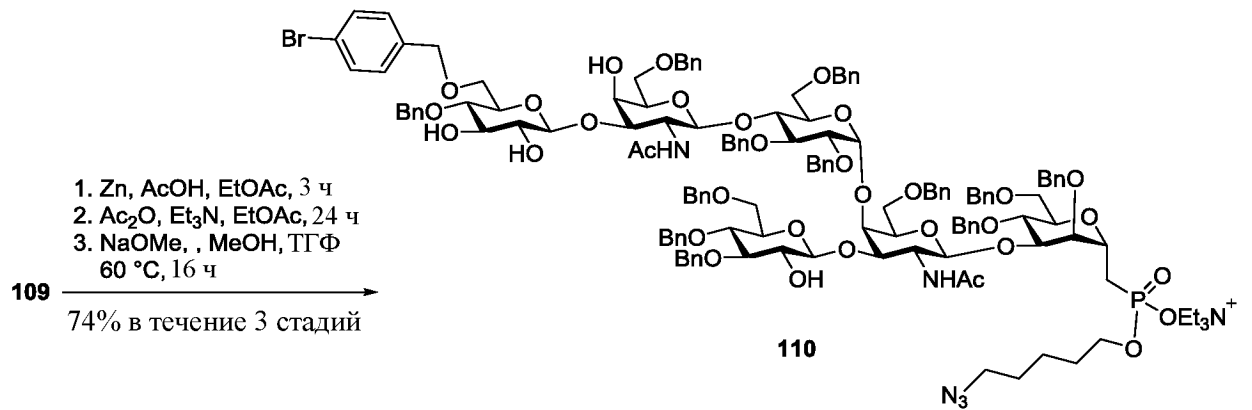
Реакцию проводили в соответствии с синтезом соединения 19.

## Синтез соединения 109



Реакцию проводили в соответствии с синтезом соединения 28.

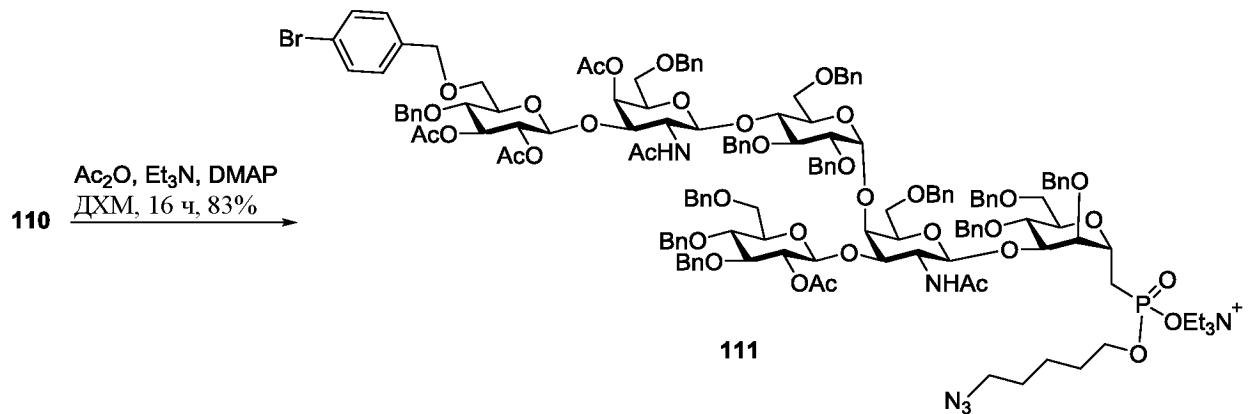
## 5 Синтез соединения 110



Реакцию проводили в соответствии с синтезом соединения 29.

## Синтез соединения 111

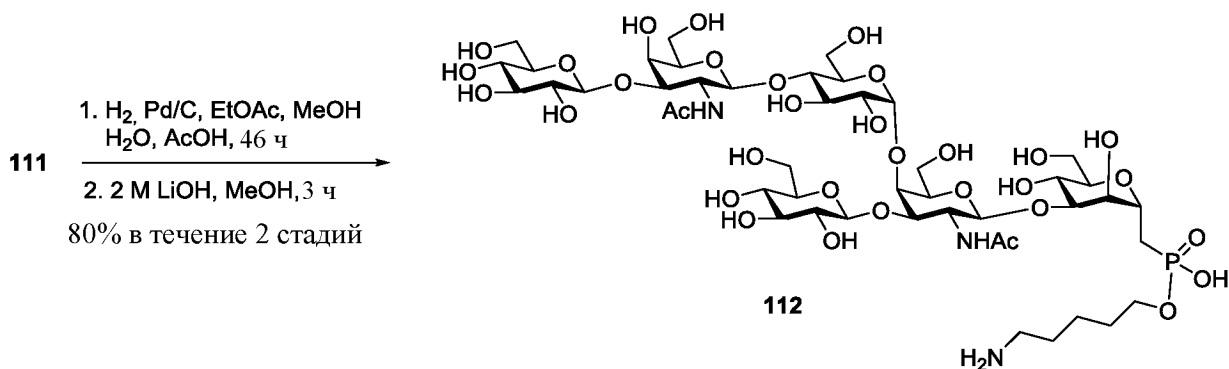
10



Реакцию проводили в соответствии с синтезом соединения 30.



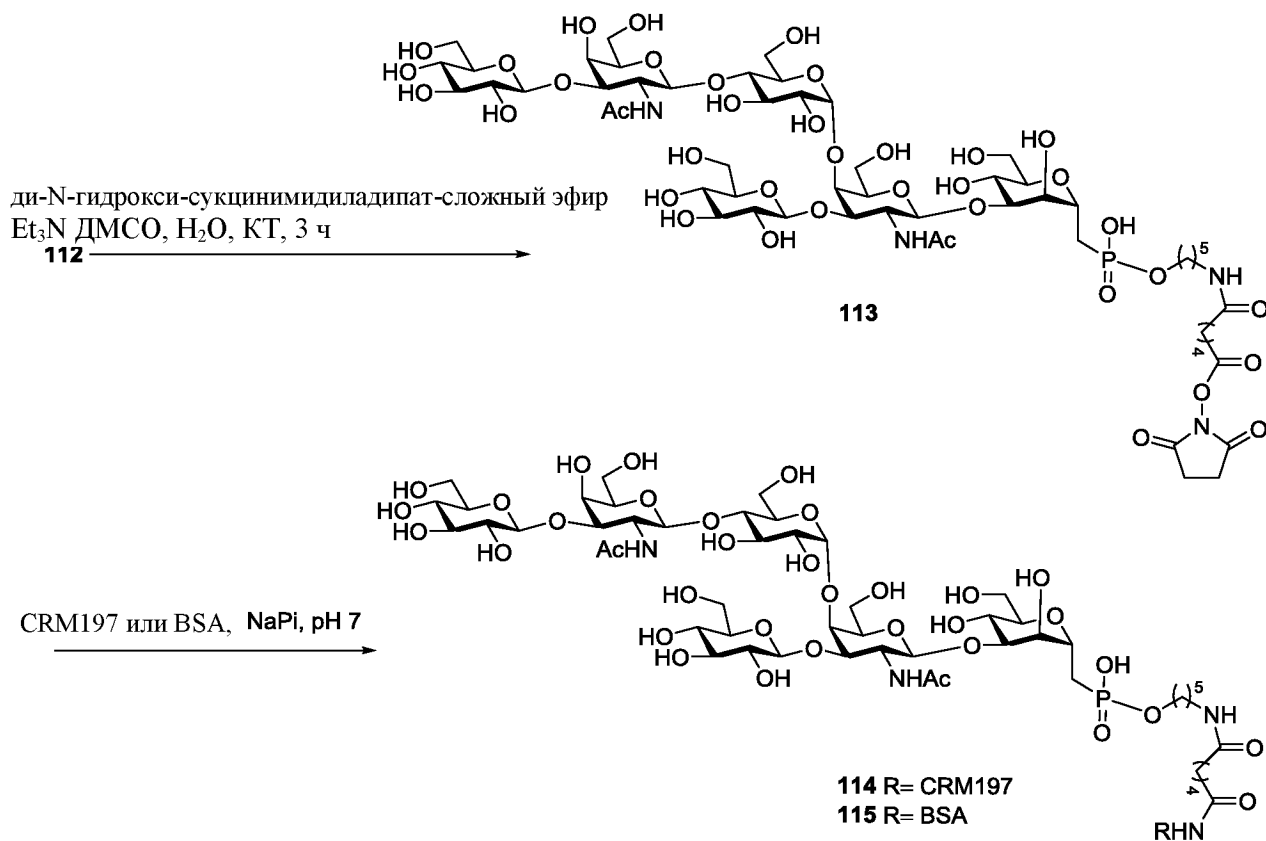
## Синтез соединения 112



Реакцию проводили в соответствии с синтезом соединения 33.

5

## Конъюгирование соединения 112 с CRM197 или BSA

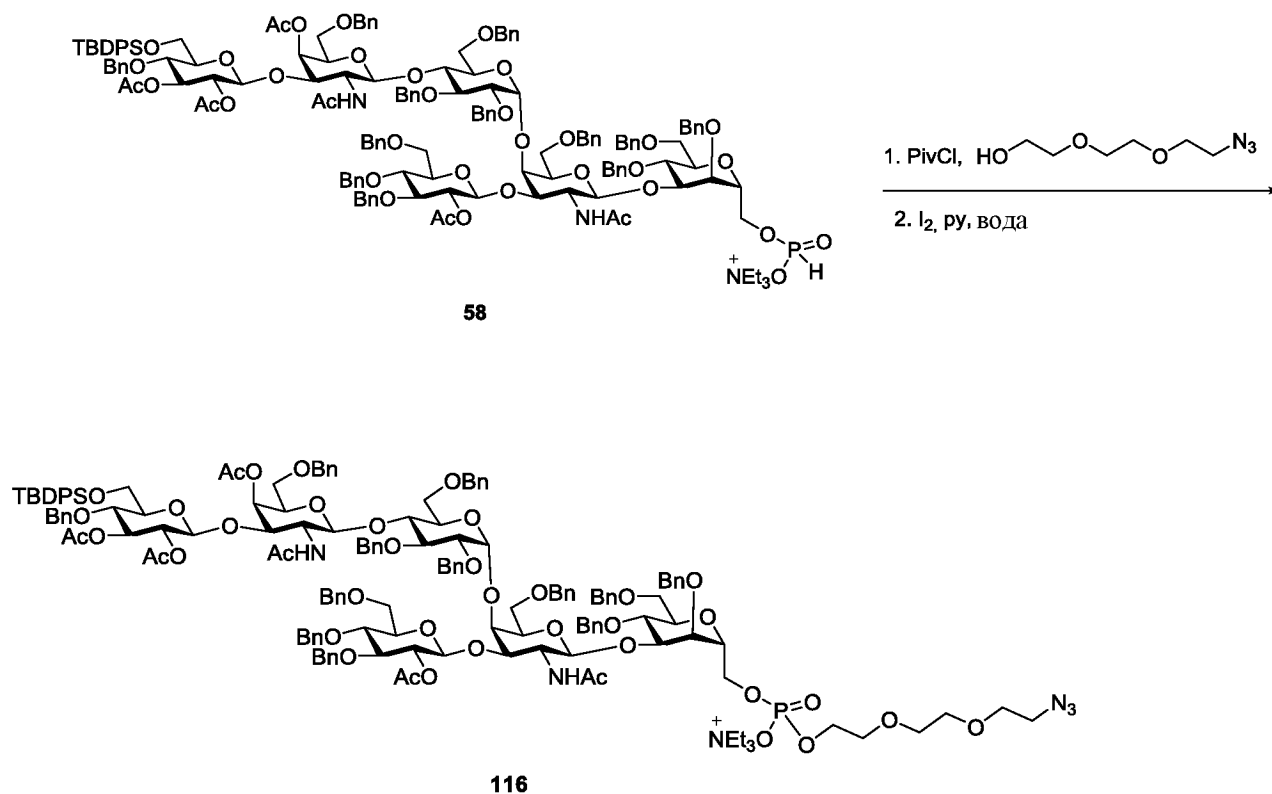


Реакцию проводили в соответствии с конъюгированием соединения 33.

10

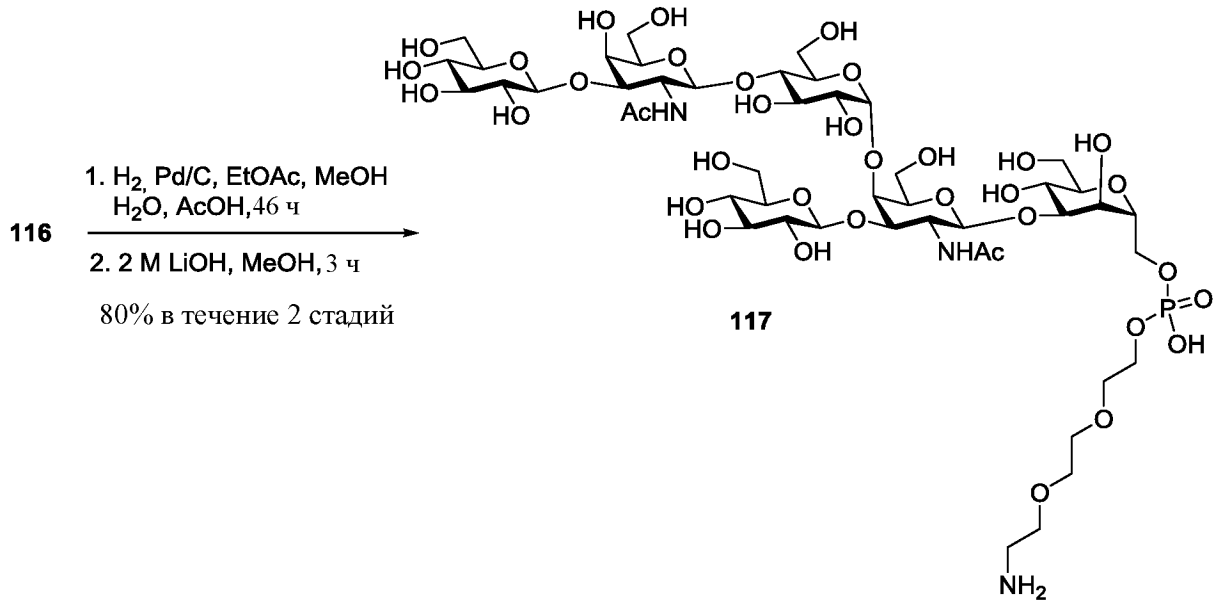
## A.8 Синтез гексасахарида 117

### Синтез соединения 116



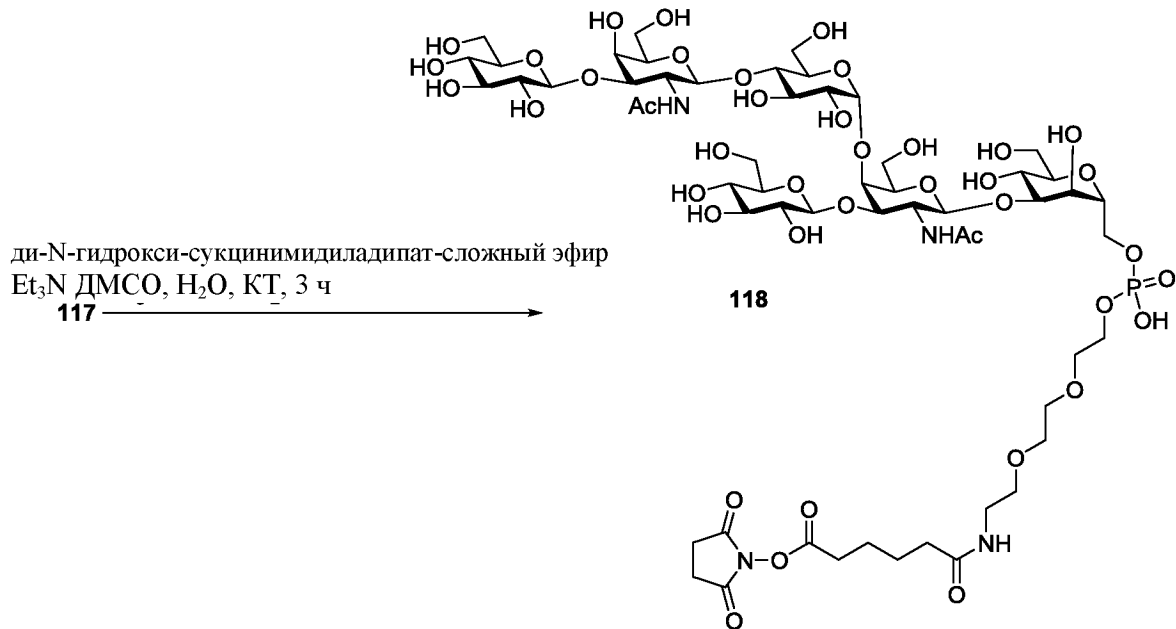
5 Н-фосфонат **58** и линкер упаривали совместно с пиридином и сушили в вакууме в течение 30 мин. После этого, полученное растворяли в пиridине и к этому добавляли PivCl. Реакционную смесь поддерживали при перемешивании при КТ в течение 2 ч. Через 2 ч, реакционную смесь охлаждали до  $-40^{\circ}\text{C}$ , добавляли свежеприготовленный раствор  $\text{I}_2$  в пиридин: $\text{H}_2\text{O}$  (20 : 1) и реакционную смесь поддерживали при перемешивании при такой же температуре в течение 1.5 ч и затем доводили до КТ и перемешивали при КТ в течение 15 мин. Затем, ТЕАВ (10 мл) добавляли к смеси и разбавляли дихлорметаном, промывали последовательно 10% водн. раствором тиосульфата натрия, 1 М водн. раствором гидрокарбоната триэтиламмония (ТЕАВ), 15 сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии (этилацетат : ДХМ : MeOH) вместе с 2% триметиламином в качестве элюентов с получением желаемого продукта **116** в виде вязкой жидкости.

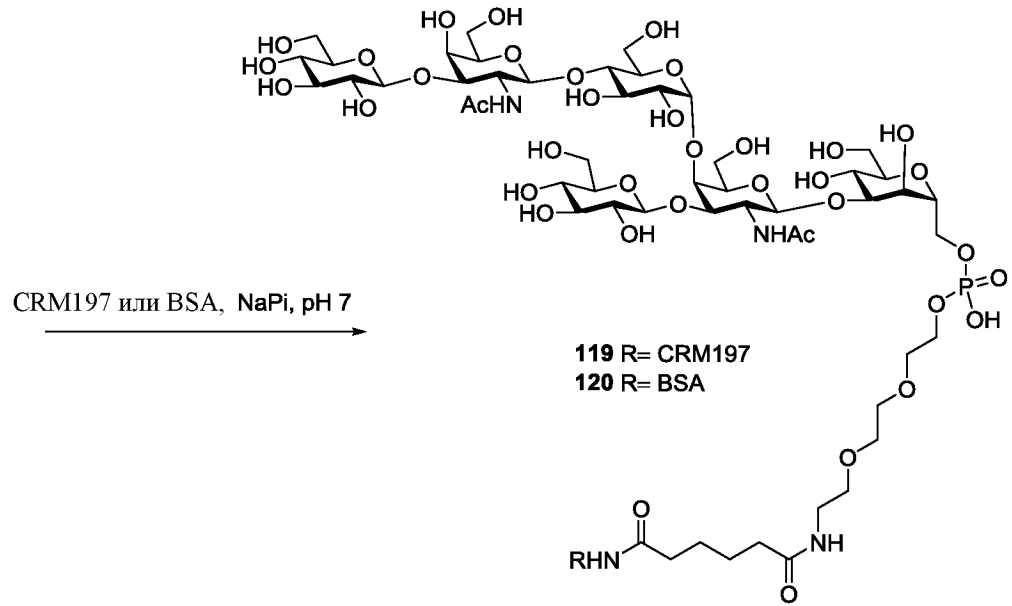
## Синтез соединения 117



Реакцию проводили в соответствии с синтезом соединения 31.

5

Конъюгирование соединения 117 с CRM<sub>197</sub> или BSA

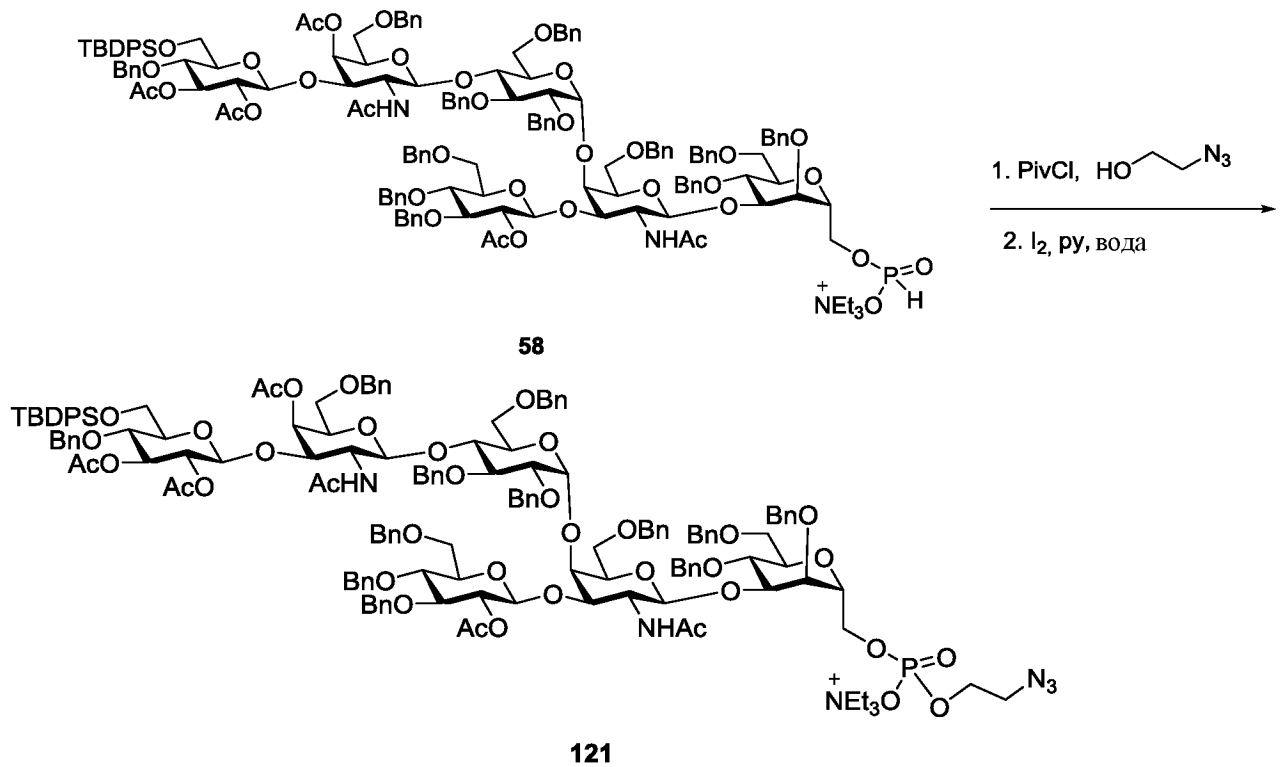


Реакцию проводили в соответствии с конъюгированием соединения **33**.

5

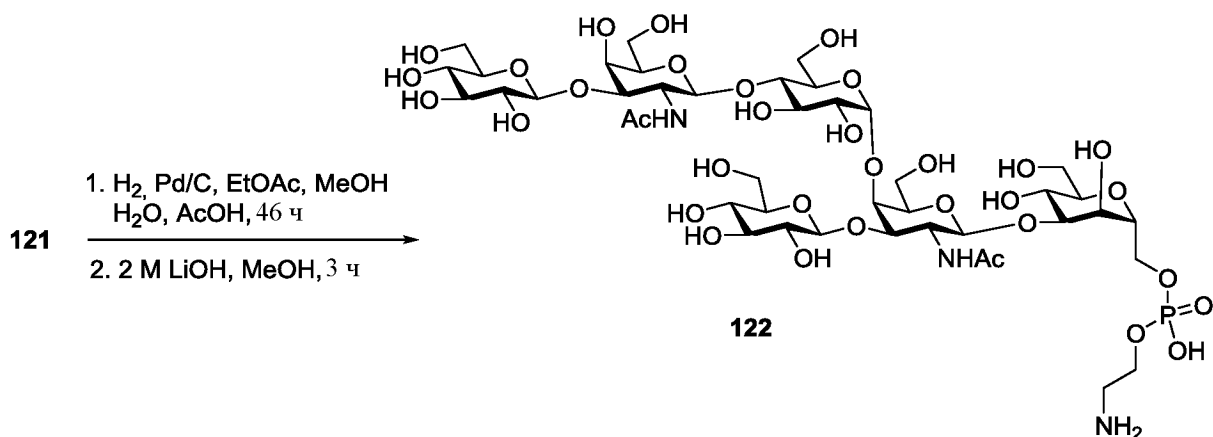
### A.9 Синтез гексасахарида 122

#### Синтез соединения 121



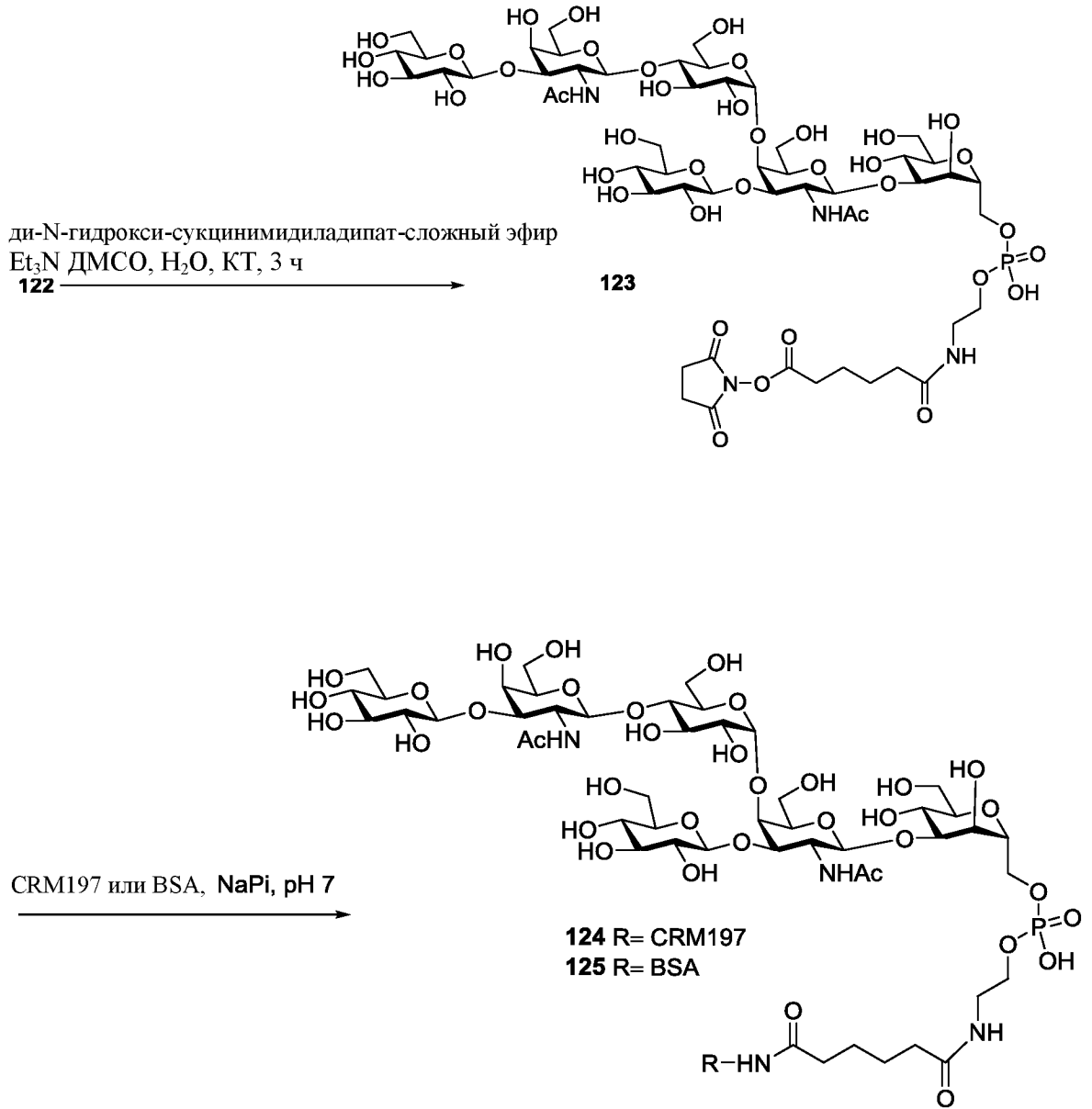
Н-фосфонат **58** и линкер упаривали совместно с пиридином и сушили в вакууме в течение 30 мин. После этого, полученное растворяли в пиridине и к этому добавляли  $\text{PivCl}$ . Реакционную смесь поддерживали при перемешивании при КТ в течение 2 ч. Через 2 ч, реакционную смесь охлаждали до  $-40^\circ\text{C}$ , добавляли свежеприготовленный раствор  $\text{I}_2$  в пиридин: $\text{H}_2\text{O}$  (20 : 1) и реакционную смесь поддерживали при перемешивании при такой же температуре в течение 1.5 ч и затем доводили до КТ и перемешивали при КТ в течение 15 мин. Затем, TEAB (10 мл) добавляли к смеси и разбавляли дихлорметаном, промывали последовательно 10% водн. раствором тиосульфата натрия, 1 М водн. раствором гидрокарбоната триэтиламмония (TEAB), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии (этилацетат : ДХМ : MeOH) вместе с 2% триметиламином в качестве элюентов с получением желаемого продукта **121** в виде вязкой жидкости.

#### 15 Синтез соединения **122**



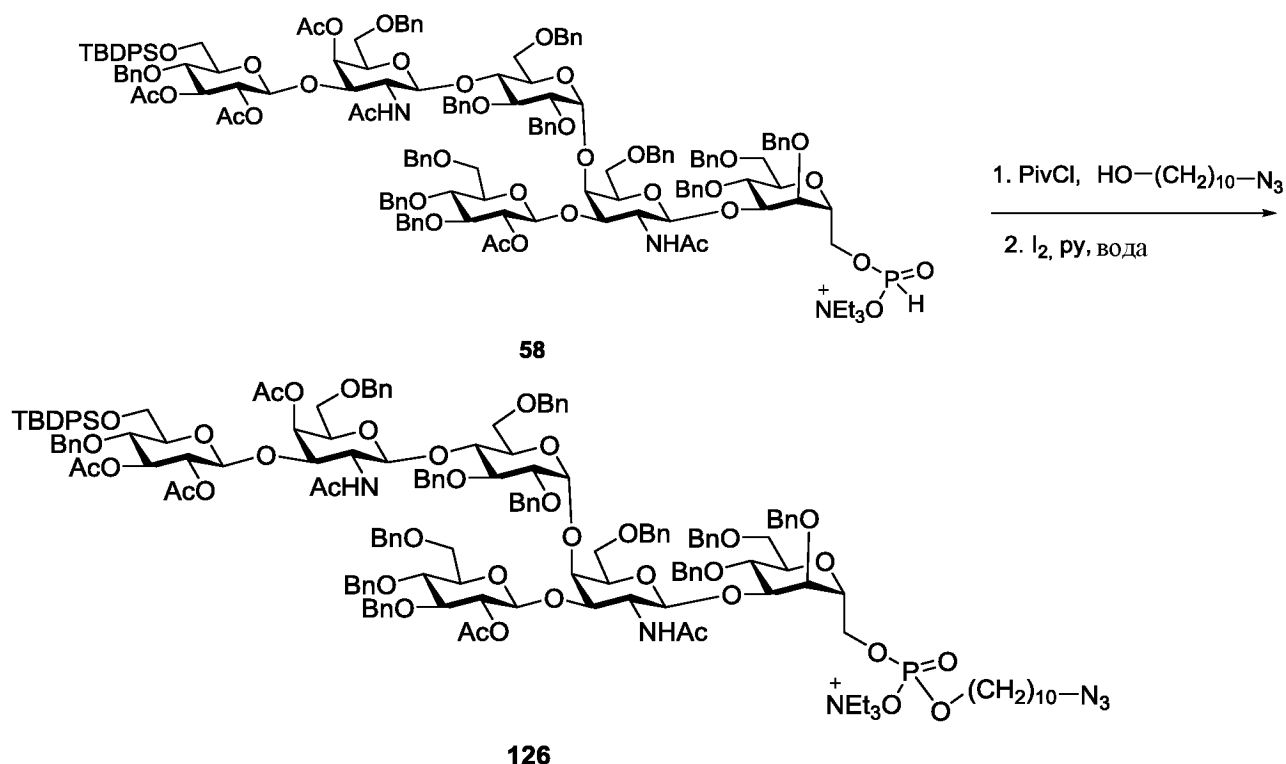
Реакцию проводили в соответствии с синтезом соединения **33** и стадией снятия защиты TBS.

### Конъюгирование соединения 122 с CRM<sub>197</sub> или BSA



5

Реакцию проводили в соответствии с конъюгированием соединения **33**.

**A.10 Синтез гексасахарида 127****Синтез соединения 126**

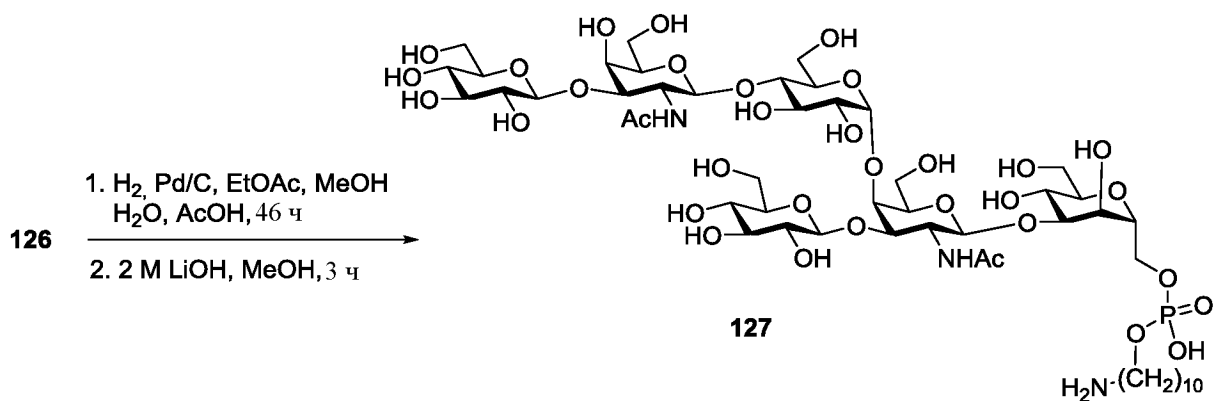
5

Н-фосфонат **58** и линкер упаривали совместно с пиридином и сушили в вакууме в течение 30 мин. После этого, полученное растворяли в пиridине и к этому добавляли PivCl. Реакционную смесь поддерживали при перемешивании при КТ в течение 2 ч. Через 2 ч, реакционную смесь охлаждали до -40°C, добавляли свежеприготовленный

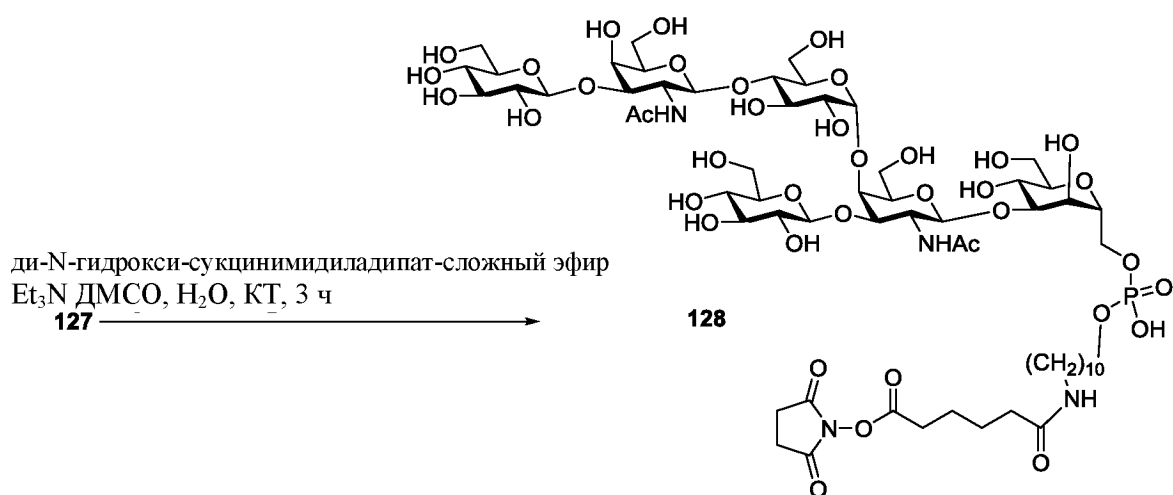
10 раствор I<sub>2</sub> в пиридин:H<sub>2</sub>O (20 : 1) и реакционную смесь поддерживали при перемешивании при такой же температуре в течение 1.5 ч и затем доводили до КТ и перемешивали при КТ в течение 15 мин. Затем, ТЕАВ (10 мл) добавляли к смеси и разбавляли дихлорметаном, промывали последовательно 10% водн. раствором тиосульфата натрия, 1 М водн. раствором гидрокарбоната триэтиламмония (ТЕАВ),

15 сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии (этилацетат : ДХМ : MeOH) вместе с 2% триметиламином в качестве элюентов с получением желаемого продукта **126** в виде вязкой жидкости.

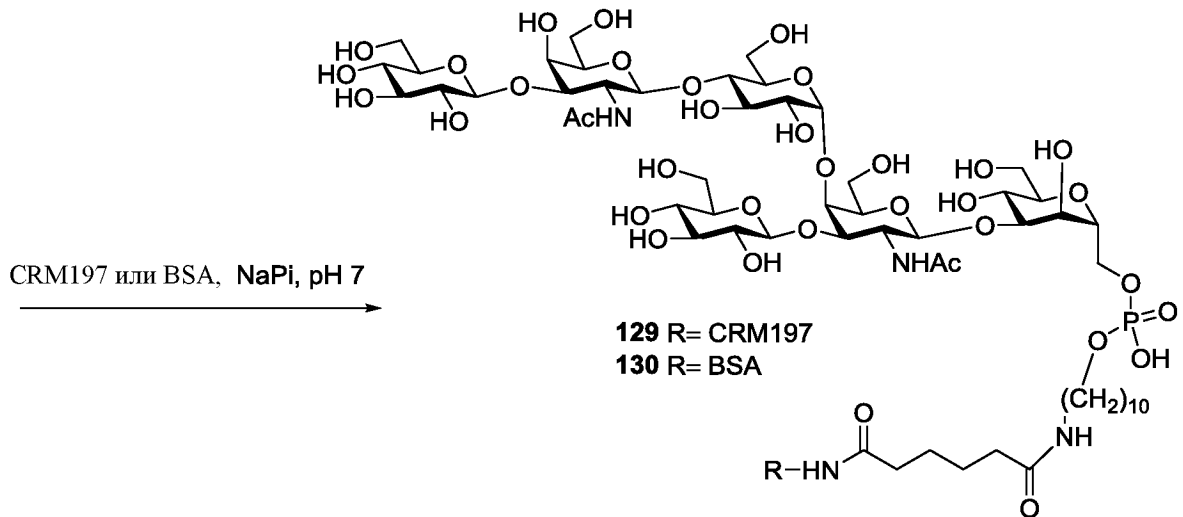
## Синтез соединения 127



5 Реакцию проводили в соответствии с синтезом соединения **33** и стадией снятия защиты TBS.

Конъюгирование соединения 127 с CRM<sub>197</sub> или BSA

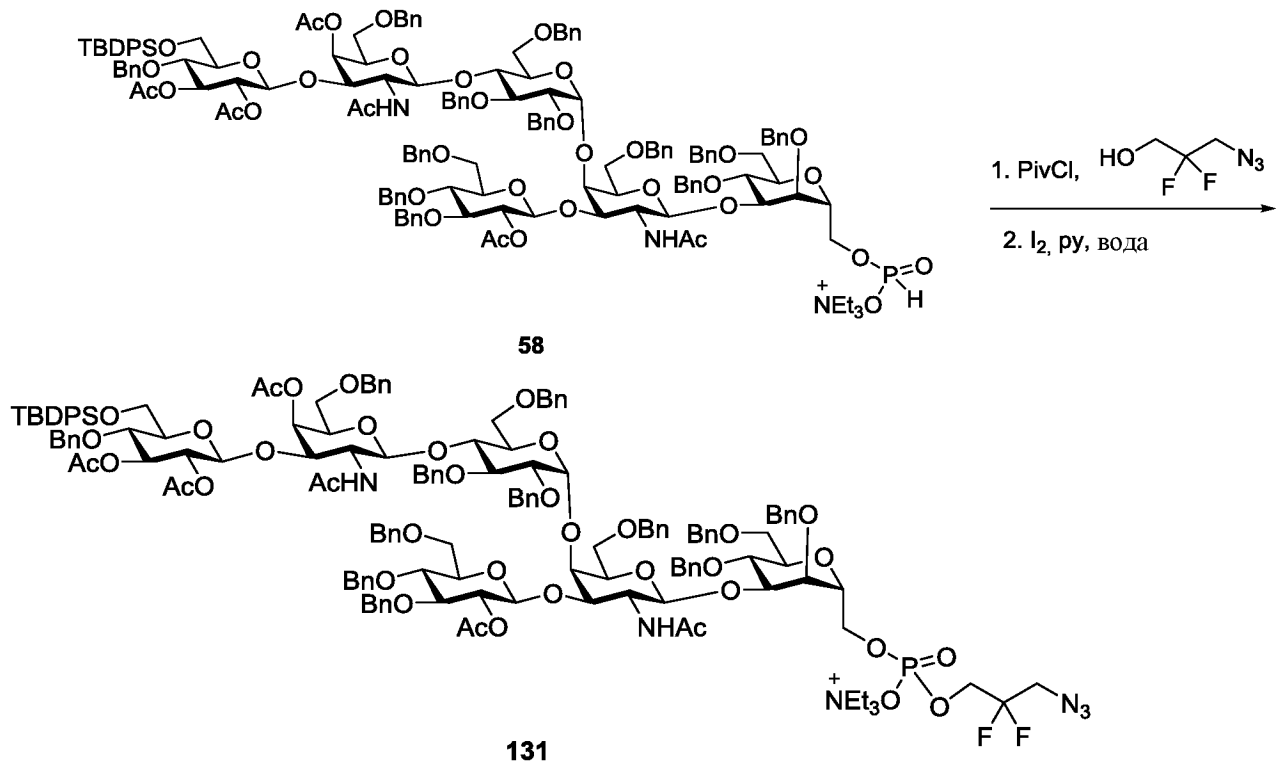




Реакцию проводили в соответствии с конъюгированием соединения **33**.

## 5 A.11 Синтез гексасахарида 132

### Синтез соединения 131

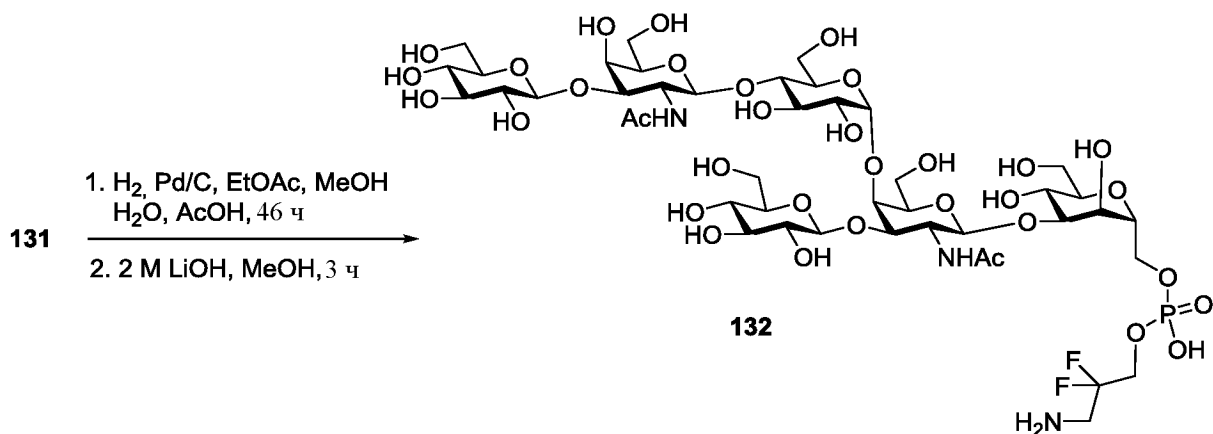


- 10 Н-фосфонат **58** и линкер упаривали совместно с пиридином и сушили в вакууме в течение 30 мин. После этого, полученное растворяли в пиridине и к этому добавляли PivCl. Реакционную смесь поддерживали при перемешивании при КТ в течение 2 ч. Через 2 ч, реакционную смесь охлаждали до  $-40^\circ\text{C}$ , добавляли свежеприготовленный

раствор  $I_2$  в пиридин: $H_2O$  (20 : 1) и реакционную смесь поддерживали при перемешивании при такой же температуре в течение 1.5 ч и затем довели до КТ и перемешивали при КТ в течение 15 мин. Затем, TEAB (10 мл) добавляли к смеси и разбавляли дихлорметаном, промывали последовательно 10% водн. раствором тиосульфата натрия, 1 М водн. раствором гидрокарбоната триэтиламония (TEAB), сушили над  $Na_2SO_4$ , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии (этилацетат : ДХМ : MeOH) вместе с 2% триметиламином в качестве элюентов с получением желаемого продукта **131** в виде вязкой жидкости.

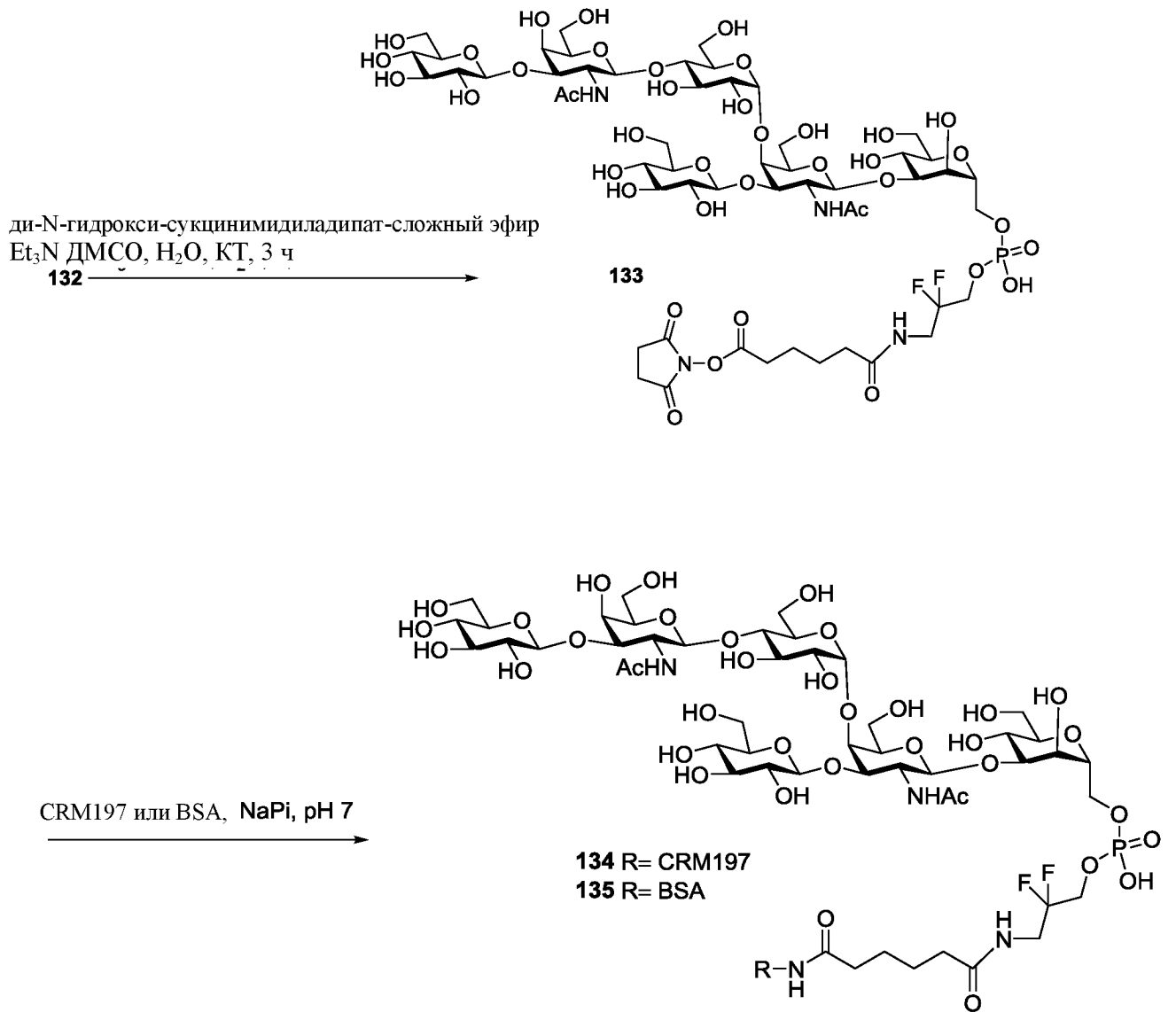
10

### Синтез соединения **132**

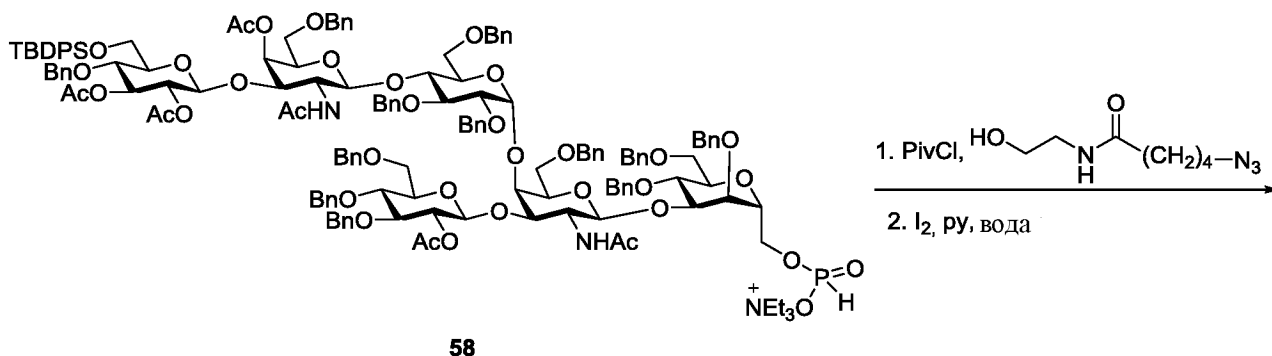


15 Реакцию проводили в соответствии с синтезом соединения **33** и стадией снятия защиты TBS.

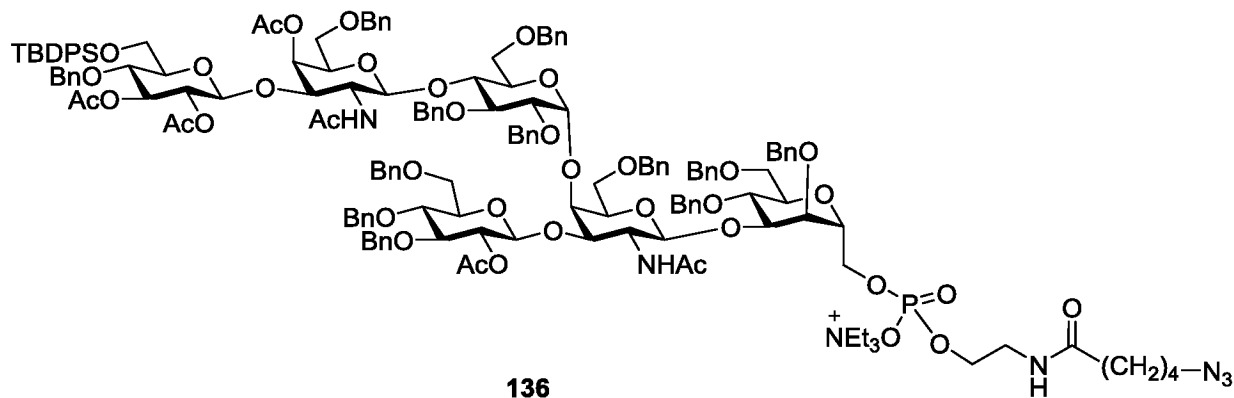
### Конъюгирование соединения 132 с CRM<sub>197</sub> или BSA



5 Реакцию проводили в соответствии с конъюгированием соединения **33**.

**A.12 Синтез гексасахарида 137****Синтез соединения 136**

5



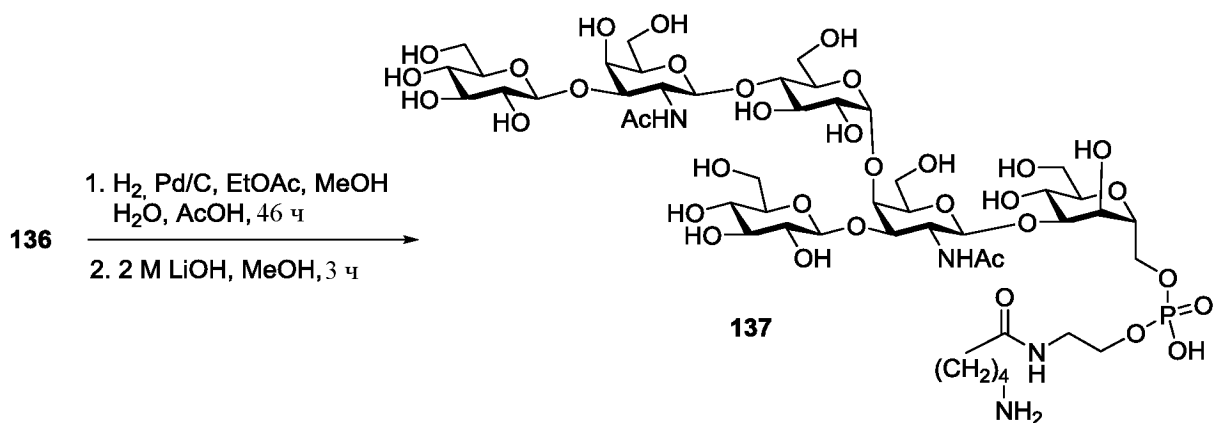
Н-фосфонат **58** и линкер упаривали совместно с пиридином и сушили в вакууме в течение 30 мин. После этого, полученное растворяли в пиridине и к этому добавляли PivCl. Реакционную смесь поддерживали при перемешивании при КТ в течение 2 ч.

10 Через 2 ч, реакционную смесь охлаждали до -40°C, добавляли свежеприготовленный раствор I<sub>2</sub> в пиридин:H<sub>2</sub>O (20 : 1) и реакционную смесь поддерживали при перемешивании при такой же температуре в течение 1.5 ч и затем доводили до КТ и перемешивали при КТ в течение 15 мин. Затем, TEAB (10 мл) добавляли к смеси и разбавляли дихлорметаном, промывали последовательно 10% водн. раствором

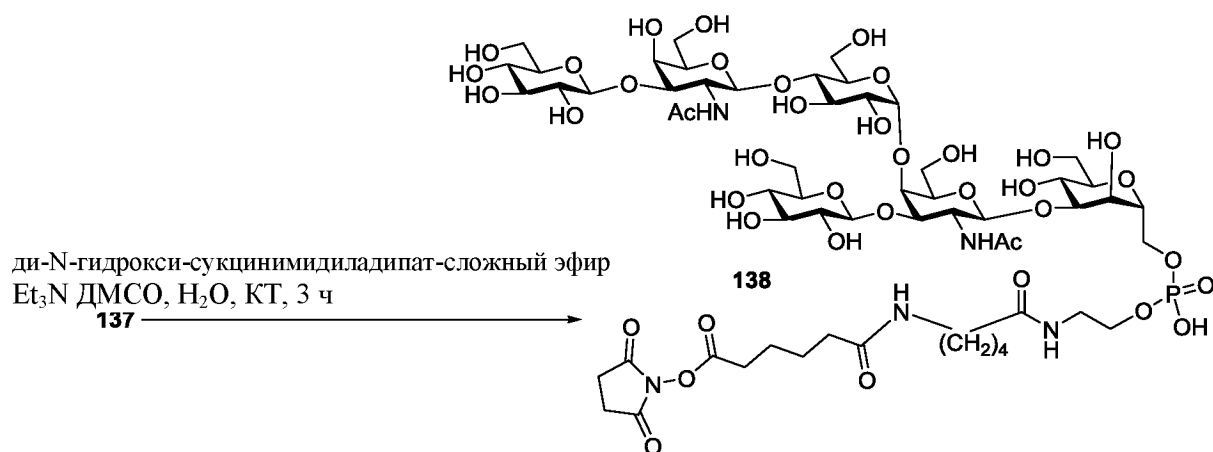
15 тиосульфата натрия, 1 М водн. раствором гидрокарбоната триэтиламония (TEAB), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии (этилацетат : ДХМ : MeOH) вместе с 2% триметиламином в качестве элюентов с получением желаемого продукта **136** в виде вязкой жидкости.

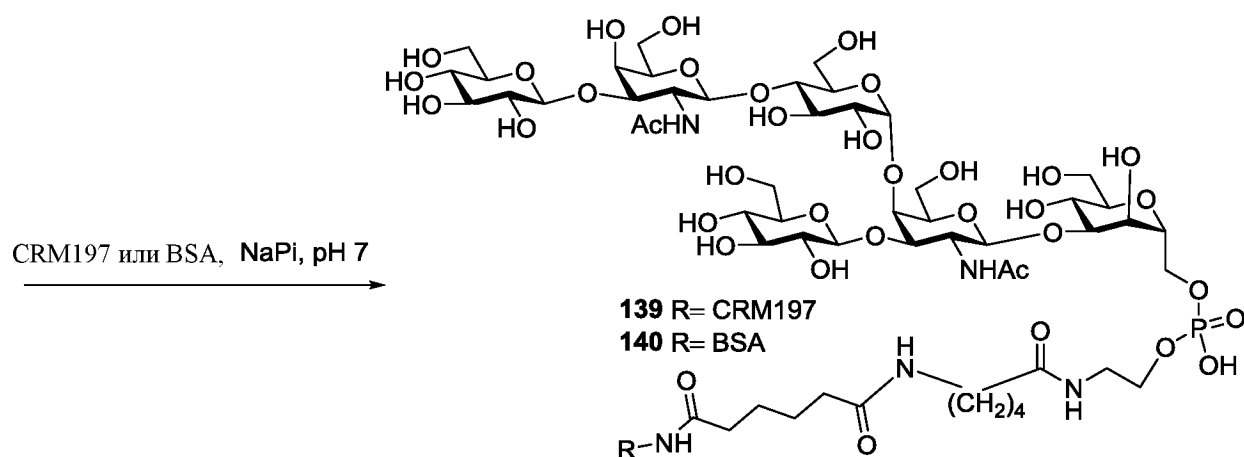
20

## Синтез соединения 137



5 Реакцию проводили в соответствии с синтезом соединения **33** и стадией снятия защиты TBS.

Конъюгирование соединения 137 с CRM<sub>197</sub> или BSA

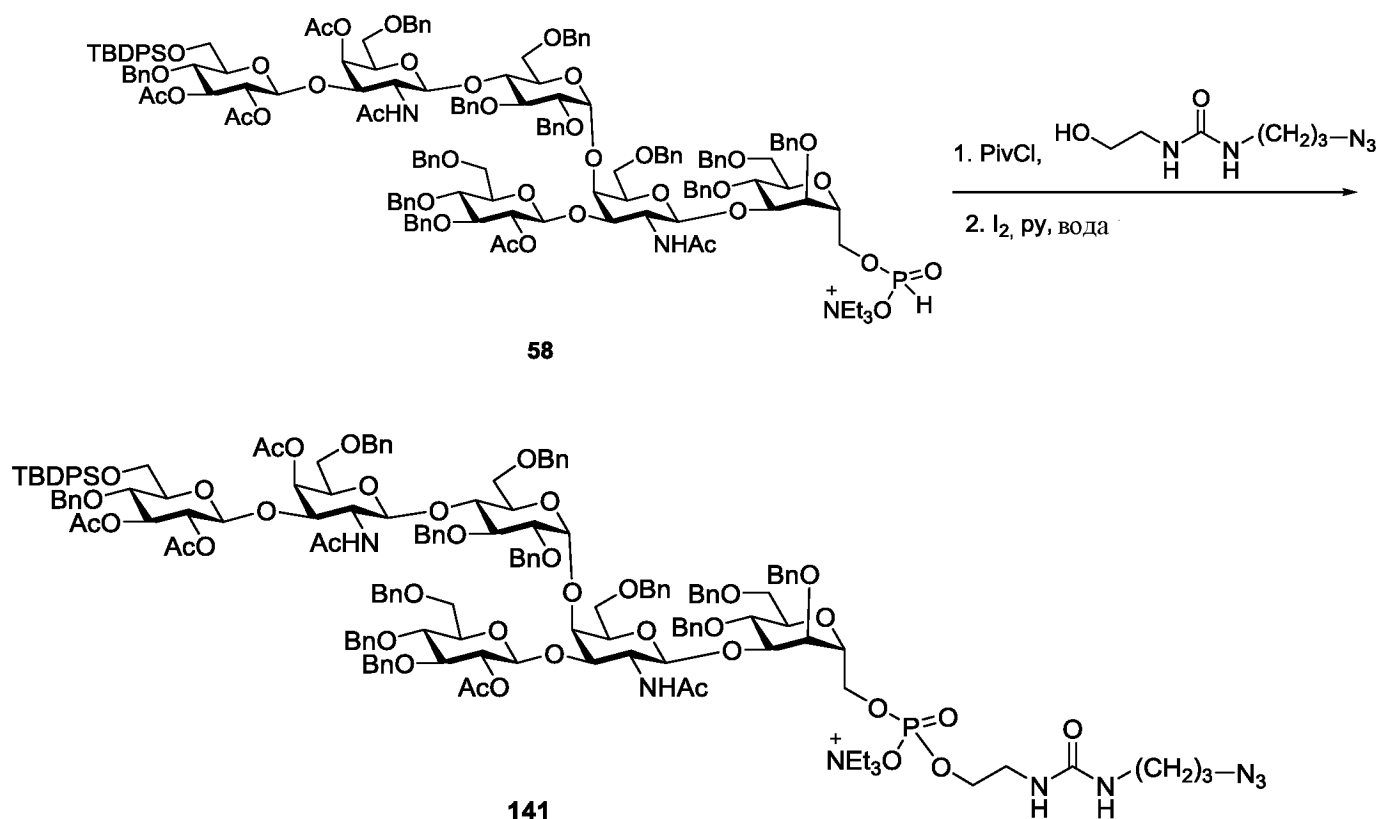


Реакцию проводили в соответствии с конъюгированием соединения **33**.

### A.13 Синтез гексасахарида 142

5

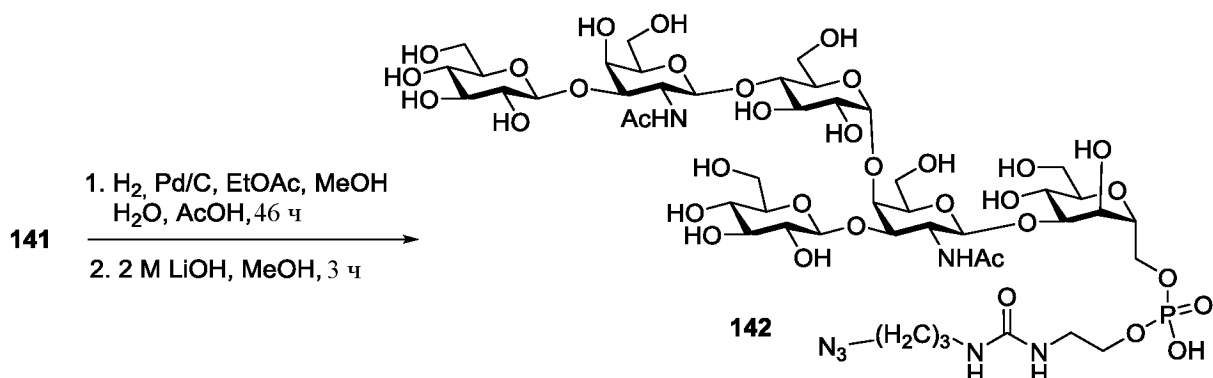
#### Синтез соединения 141



10 Н-фосфонат **58** и линкер упаривали совместно с пиридином и сушили в вакууме в течение 30 мин. После этого, полученное растворяли в пиridине и к этому добавляли PivCl. Реакционную смесь поддерживали при перемешивании при КТ в течение 2 ч. Через 2 ч, реакционную смесь охлаждали до -40°C, добавляли свежеприготовленный раствор I<sub>2</sub> в пиридин:H<sub>2</sub>O (20 : 1) и реакционную смесь поддерживали при

перемешивании при такой же температуре в течение 1.5 ч и затем доводили до КТ и перемешивали при КТ в течение 15 мин. Затем, TEAB (10 мл) добавляли к смеси и разбавляли дихлорметаном, промывали последовательно 10% водн. раствором тиосульфата натрия, 1 М водн. раствором гидрокарбоната триэтиламония (TEAB), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии (этилацетат : ДХМ : MeOH) вместе с 2% триметиламином в качестве элюентов с получением желаемого продукта **141** в виде вязкой жидкости.

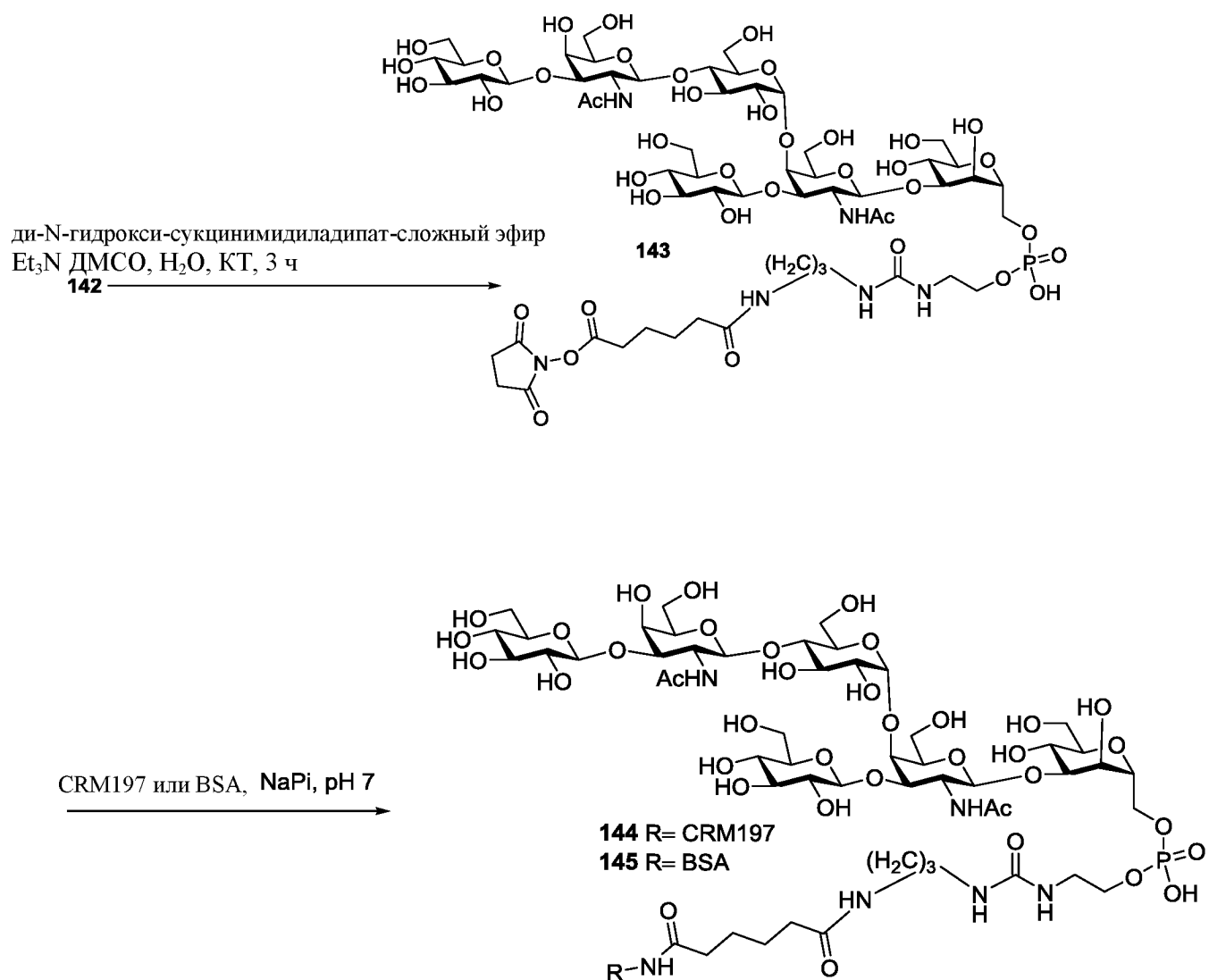
## 10 Синтез соединения **142**



Реакцию проводили в соответствии с синтезом соединения **33** и стадией снятия защиты TBS.

15

### Конъюгирование соединения 142 с CRM<sub>197</sub> или BSA



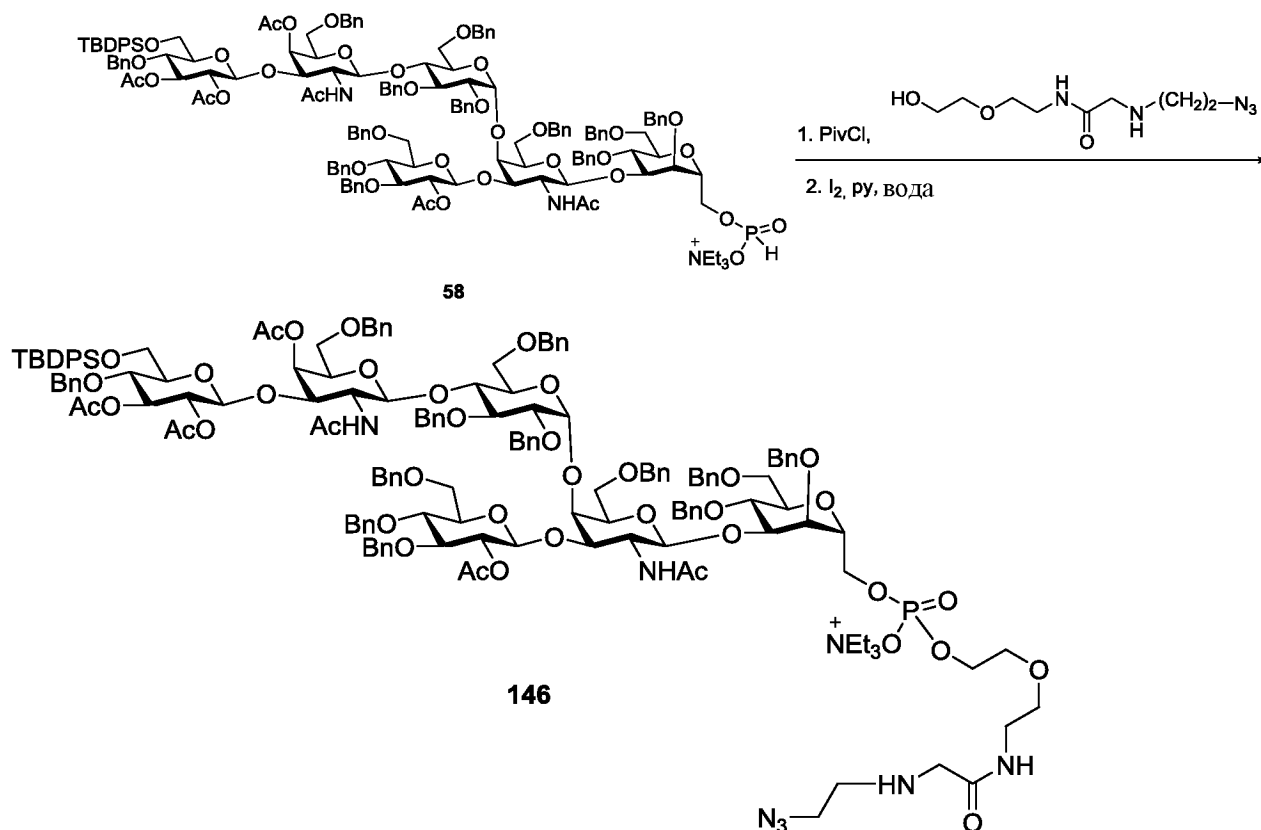
5

Реакцию проводили в соответствии с конъюгированием соединения **33**.



## A.14 Синтез гексасахарида 147

### Синтез соединения 146



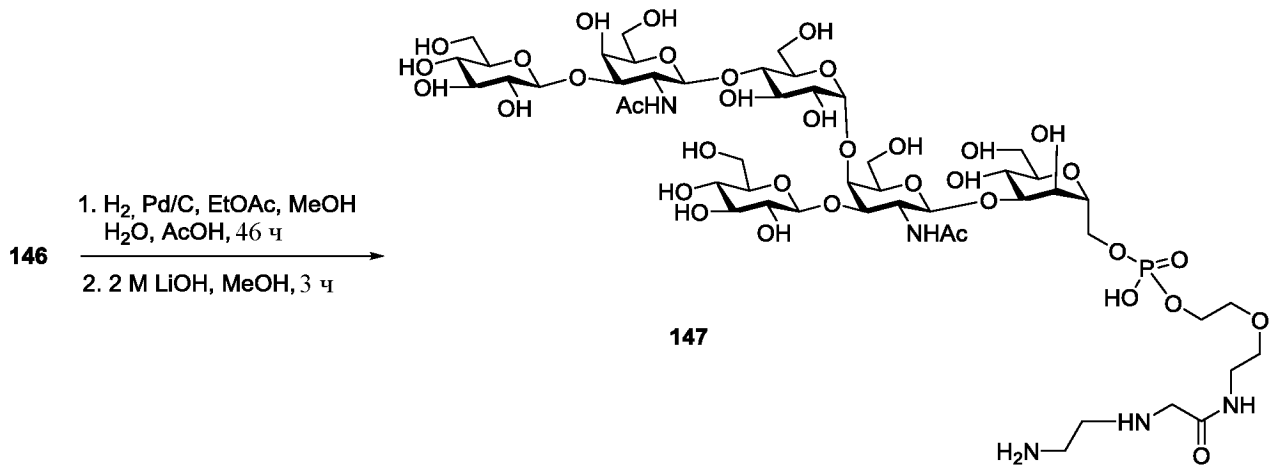
5

10

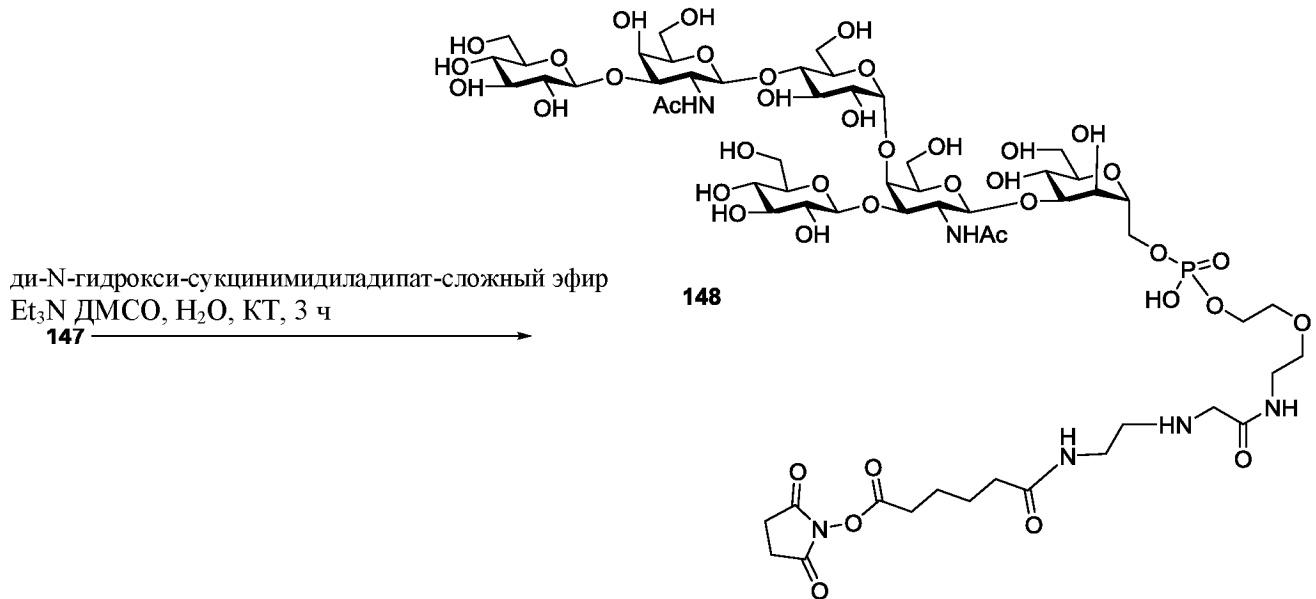
15

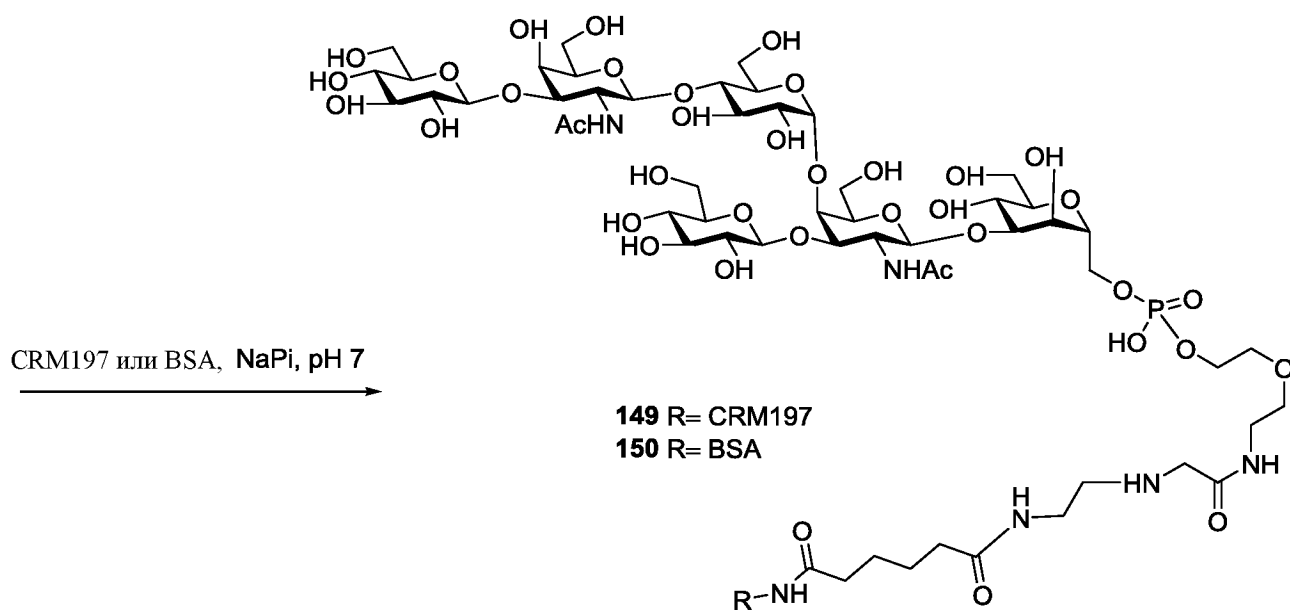
Н-фосфонат **58** и линкер упаривали совместно с пиридином и сушили в вакууме в течение 30 мин. После этого, полученное растворяли в пиridине и к этому добавляли PivCl. Реакционную смесь поддерживали при перемешивании при КТ в течение 2 ч. Через 2 ч, реакционную смесь охлаждали до -40°C, добавляли свежеприготовленный раствор I<sub>2</sub> в пиридин:H<sub>2</sub>O (20 : 1) и реакционную смесь поддерживали при перемешивании при такой же температуре в течение 1.5 ч и затем доводили до КТ и перемешивали при КТ в течение 15 мин. Затем, ТЕАВ (10 мл) добавляли к смеси и разбавляли дихлорметаном, промывали последовательно 10% водн. раствором тиосульфата натрия, 1 М водн. раствором гидрокарбоната триэтиламмония (ТЕАВ), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии (этилацетат : ДХМ : MeOH) вместе с 2% триметиламинном в качестве элюентов с получением желаемого продукта **146** в виде вязкой жидкости.

## Синтез соединения 142



5 Реакцию проводили в соответствии с синтезом соединения **33** и и стадией снятия защиты TBS.

Конъюгирование соединения 147 с CRM<sub>197</sub> или BSA

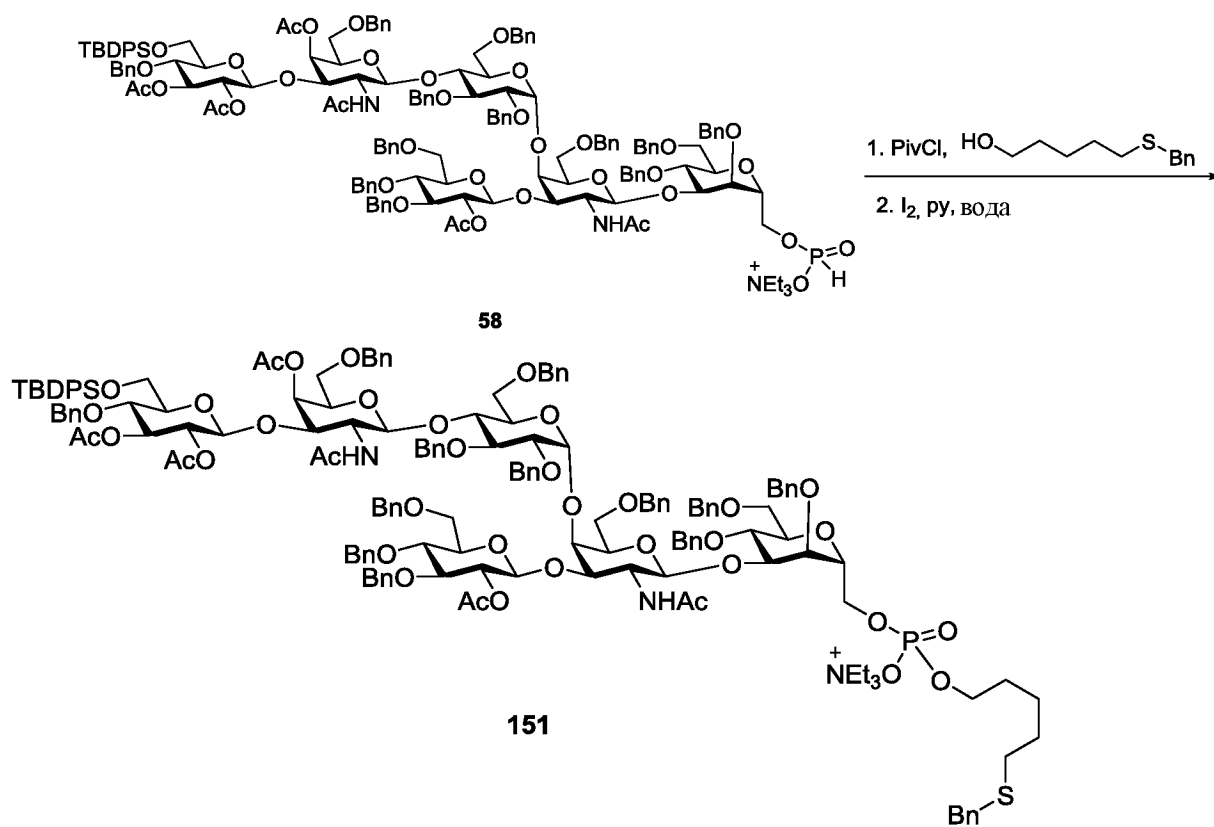


Реакцию проводили в соответствии с конъюгированием соединения **33**.

### A.15 Синтез гексасахарида 152

5

#### Синтез соединения 151

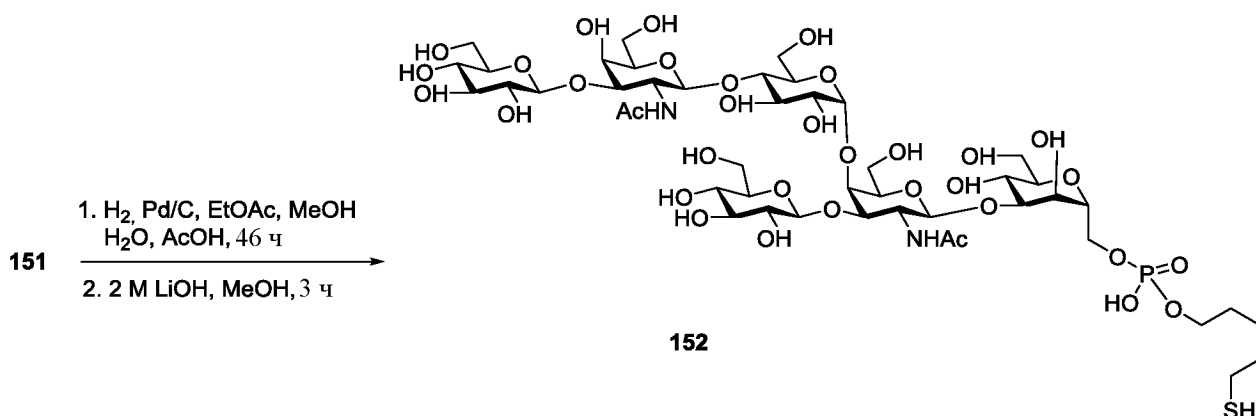


Н-фосфонат **58** и линкер упаривали совместно с пиридином и сушили в вакууме в течение 30 мин. После этого, полученное растворяли в пиridине и к этому добавляли

10

PivCl. Реакционную смесь поддерживали при перемешивании при КТ в течение 2 ч.  
 Через 2 ч, реакционную смесь охлаждали до  $-40^{\circ}\text{C}$ , добавляли свежеприготовленный  
 раствор  $\text{I}_2$  в пиридин: $\text{H}_2\text{O}$  (20 : 1) и реакционную смесь поддерживали при  
 перемешивании при такой же температуре в течение 1.5 ч и затем довели до КТ и  
 5 перемешивали при КТ в течение 15 мин. Затем, ТЕАВ (10 мл) добавляли к смеси и  
 разбавляли дихлорметаном, промывали последовательно 10% водн. раствором  
 тиосульфата натрия, 1 М водн. раствором гидрокарбоната триэтиламония (ТЕАВ),  
 сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью  
 10 автоматической колоночной флэш-хроматографии (этилацетат : ДХМ : MeOH) вместе с  
 2% триметиламином в качестве элюентов с получением желаемого продукта **151** в виде  
 вязкой жидкости.

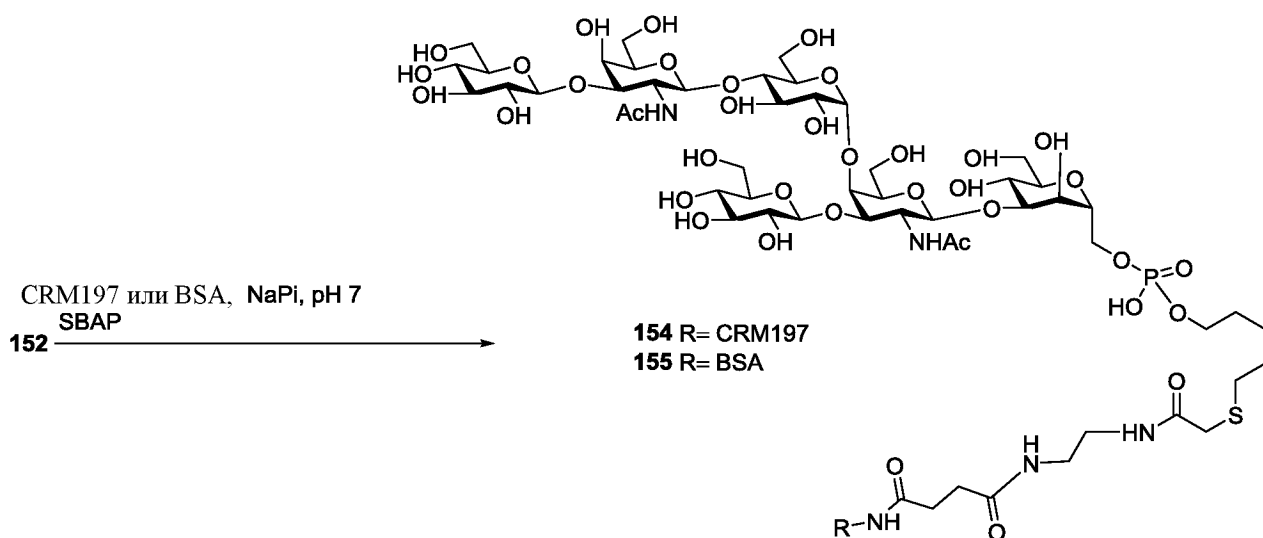
### Синтез соединения 152



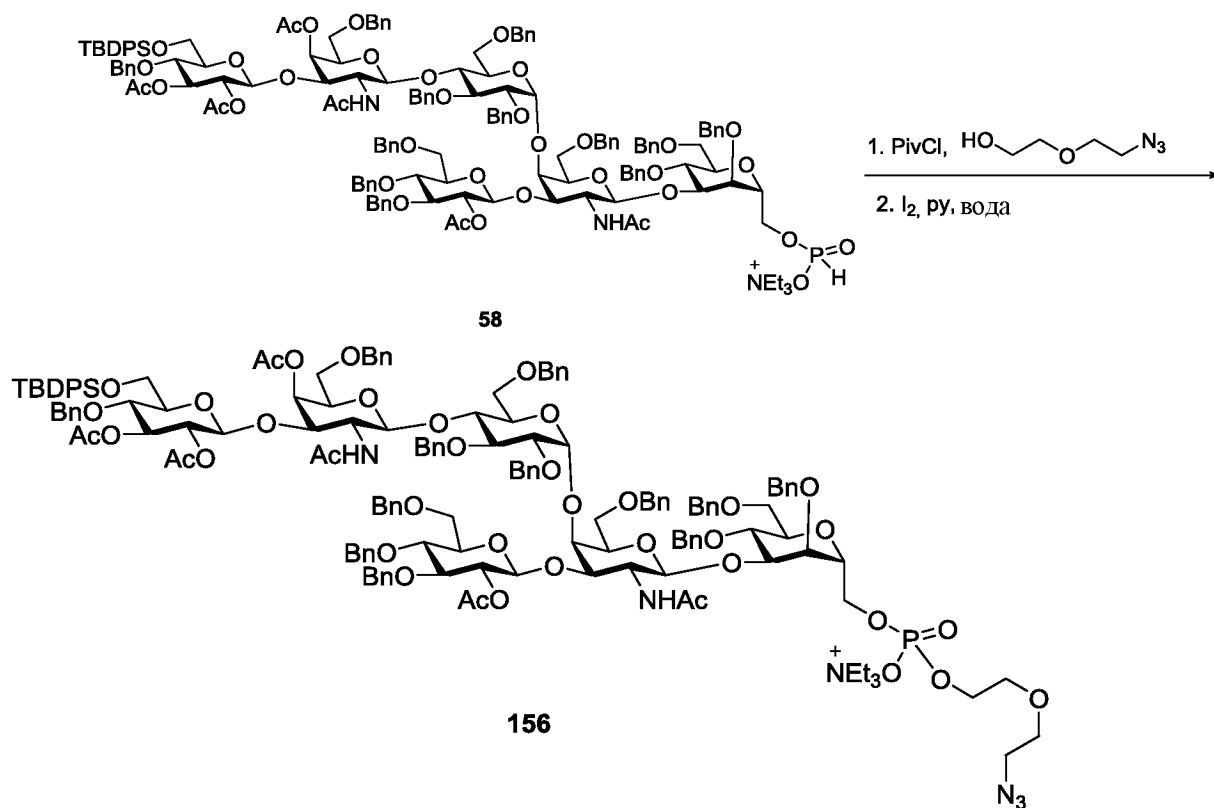
15

Реакцию проводили в соответствии с синтезом соединения **33** и стадией снятия  
 защиты TBS.

### Конъюгирование соединения **152** с CRM<sub>197</sub> или BSA



- 5 SBAP (*N*-сукцинимидил-3-(бромацетамидо)пропионат) добавляли к перемешиваемому раствору белка в натрий-фосфатном буфере (NaPi, pH 7.4) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение одного часа при комнатной температуре и после этого концентрировали с помощью мембранной фильтрации и ребуферировали в NaPi (pH 8.0). Раствор соединения **152** в NaPi
- 10 добавляли к раствору активированного белка и перемешивали при КТ в течение 16 часов. Гликоконъюгат затем промывали стерильной водой и обрабатывали l-цистеином в стерильной воде. Очистку гликоконъюгата достигали путем мембранной фильтрации.

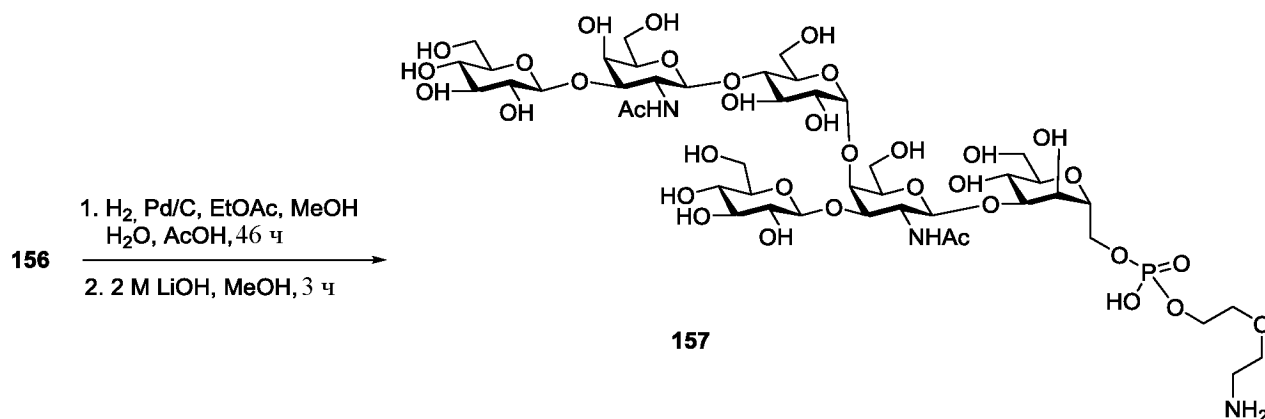
**A.16 Синтез гексасахарида 157****Синтез соединения 156**

5 Н-фосфонат **58** и линкер упаривали совместно с пиридином и сушили в вакууме в течение 30 мин. После этого, полученное растворяли в пиridине и к этому добавляли PivCl. Реакционную смесь поддерживали при перемешивании при КТ в течение 2 ч. Через 2 ч, реакционную смесь охлаждали до  $-40^{\circ}\text{C}$ , добавляли свежеприготовленный

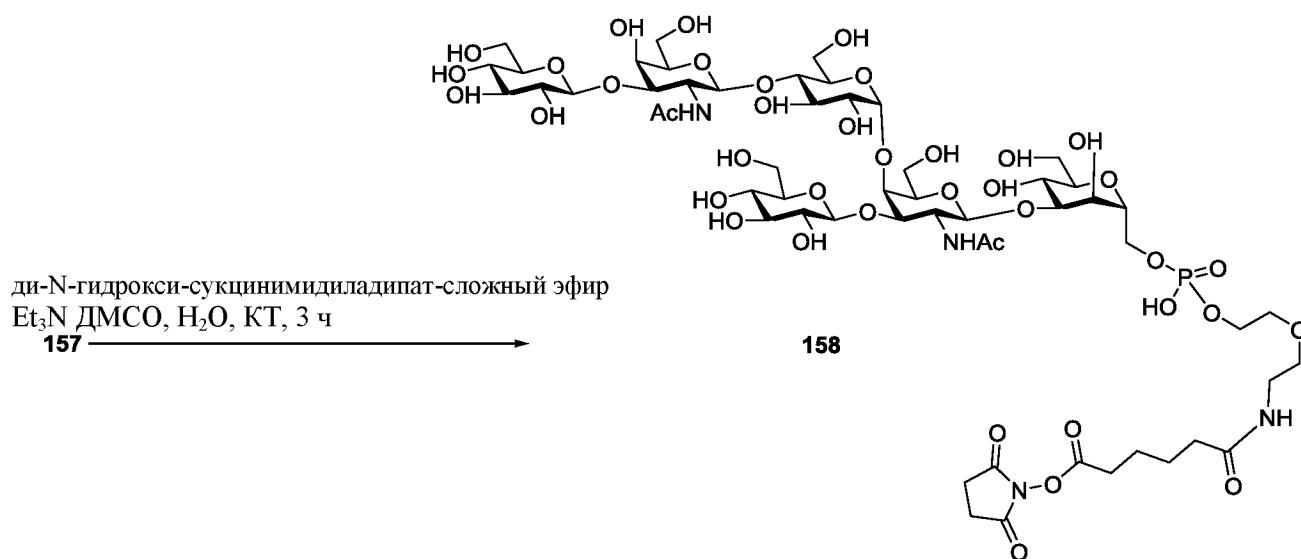
10 раствор  $\text{I}_2$  в пиридин: $\text{H}_2\text{O}$  (20 : 1) и реакционную смесь поддерживали при перемешивании при такой же температуре в течение 1.5 ч и затем довели до КТ и перемешивали при КТ в течение 15 мин. Затем, TEAB (10 мл) добавляли к смеси и разбавляли дихлорметаном, промывали последовательно 10% водн. раствором тиосульфата натрия, 1 М водн. раствором гидрокарбоната триэтиламмония (TEAB),

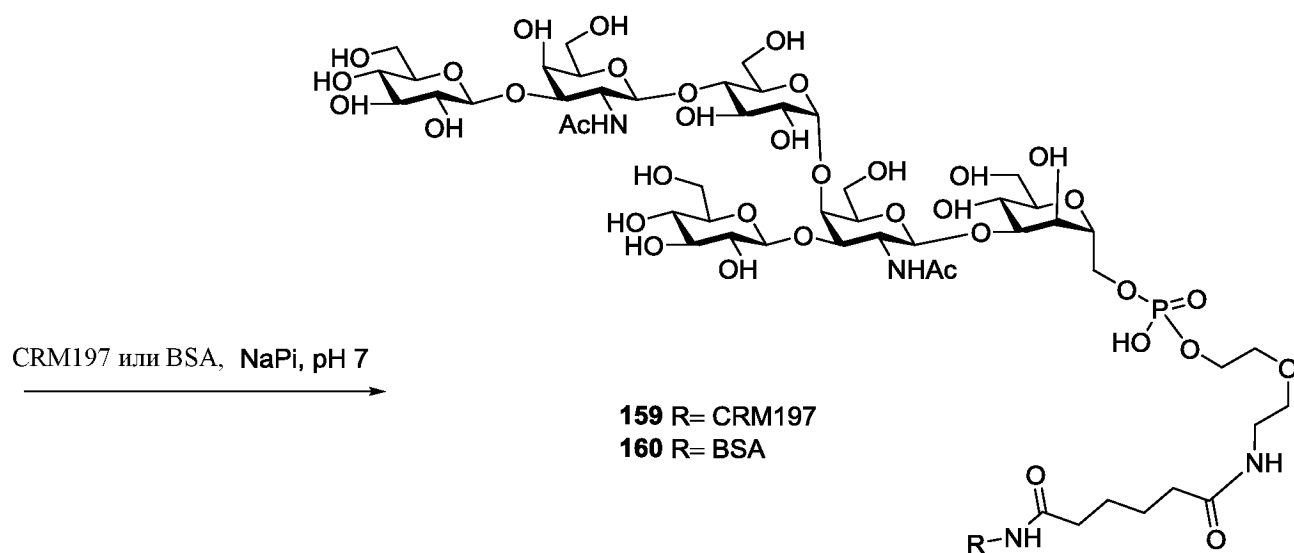
15 сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью автоматической колоночной флэш-хроматографии (этилацетат : ДХМ : MeOH) вместе с 2% триметиламином в качестве элюентов с получением желаемого продукта **156** в виде вязкой жидкости.

## Синтез соединения 157



5 Реакцию проводили в соответствии с синтезом соединения **33** и стадией снятия защиты TBS.

Конъюгирование соединения 157 с CRM<sub>197</sub> или BSA

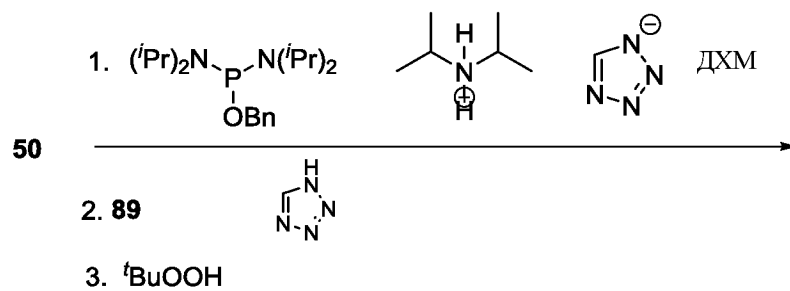


Реакцию проводили в соответствии с конъюгированием соединения **33**.

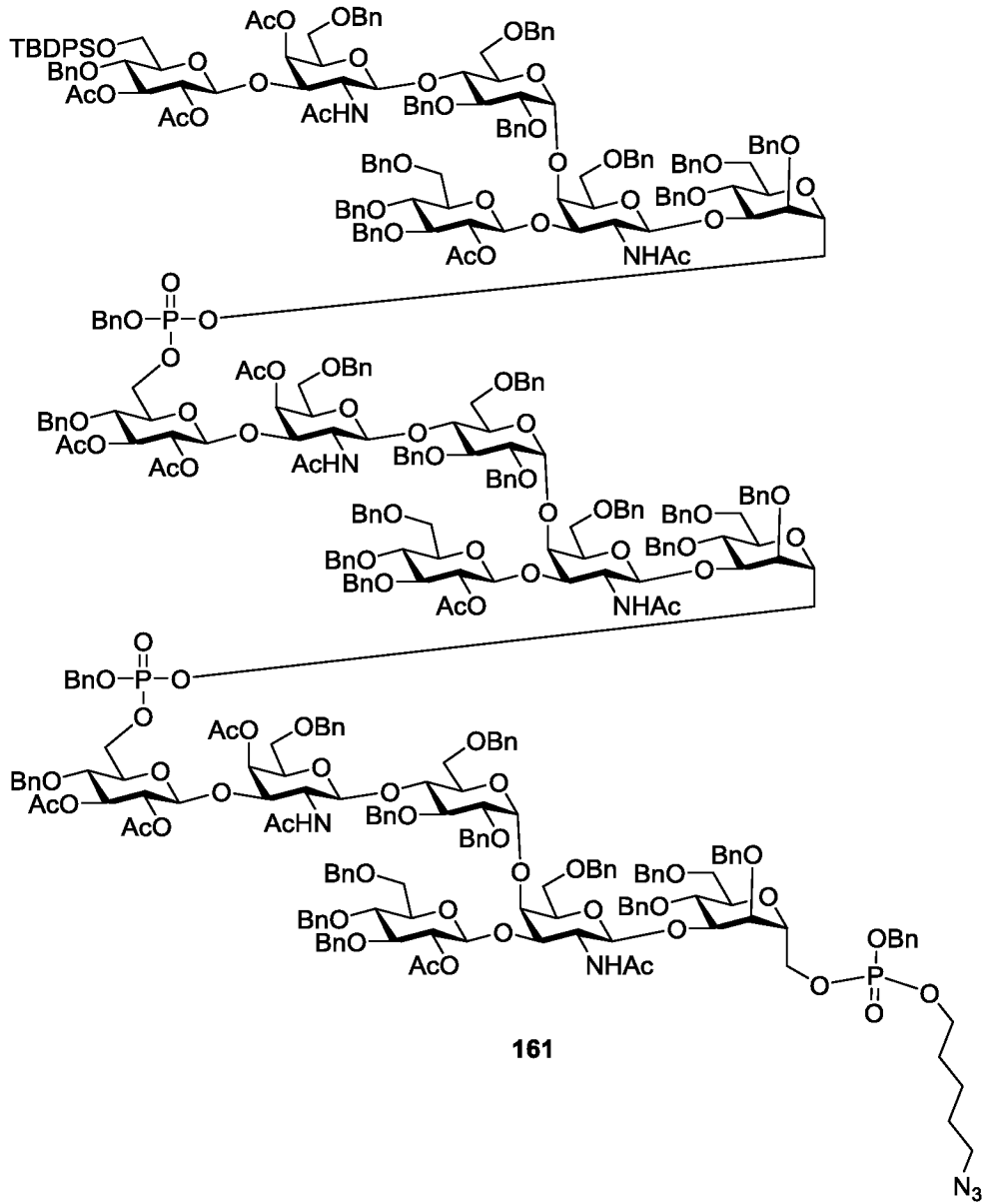
### A.17 Синтез октадекасахаридов 162, 163, 164 и 165

5

#### Синтез соединения **161**

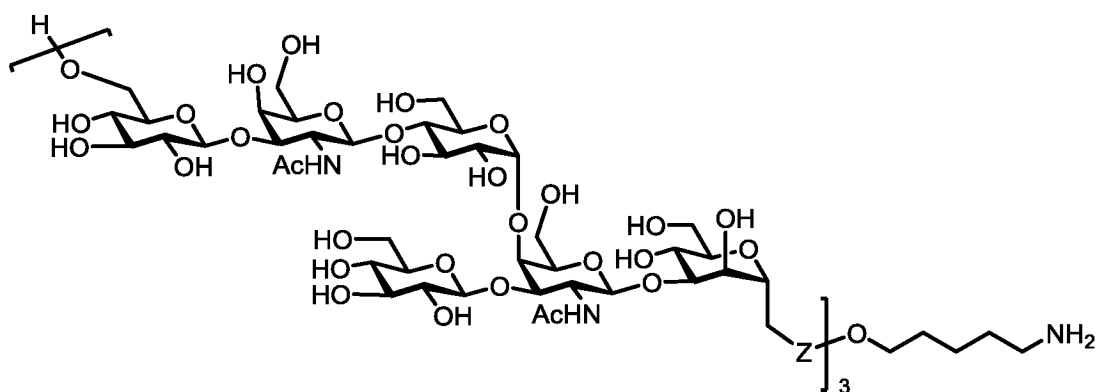




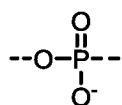


Методику, описанную для синтеза соединения **32**, использовали для синтеза соединения **161**, здесь только с изменением, что во второй стадии вместо линкера в качестве нуклеофила использовали соединение **89**.

## Синтез соединения 162



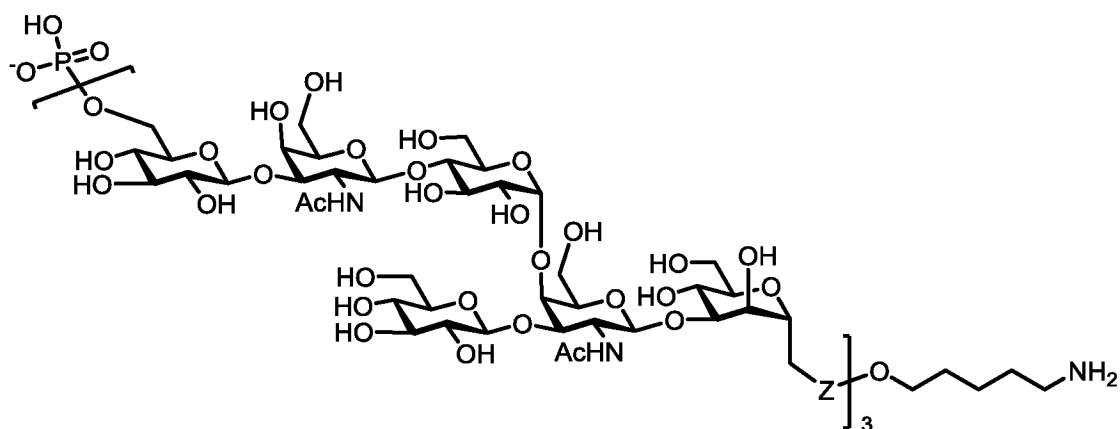
где **Z** представляет собой



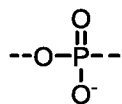
Соединение **162** синтезировали из соединения **161**, как описано для соединения **89** (удаление защитной группы TBDPS), и затем как описано для соединения **90**.

5

## Синтез соединения 163

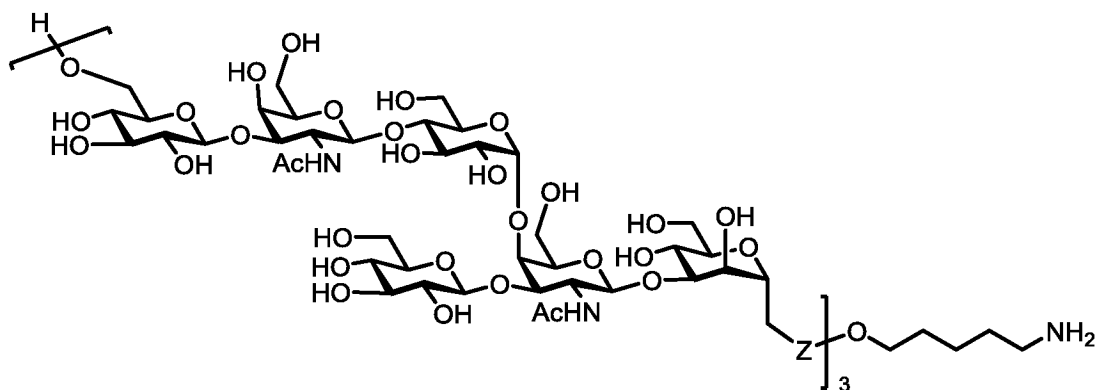


где **Z** представляет собой

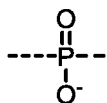


Соединение **163** синтезировали из соединения **161**, как описано для соединения **89** (удаление защитной группы TBDPS), и затем как описано для соединений **91** и **92**.

10

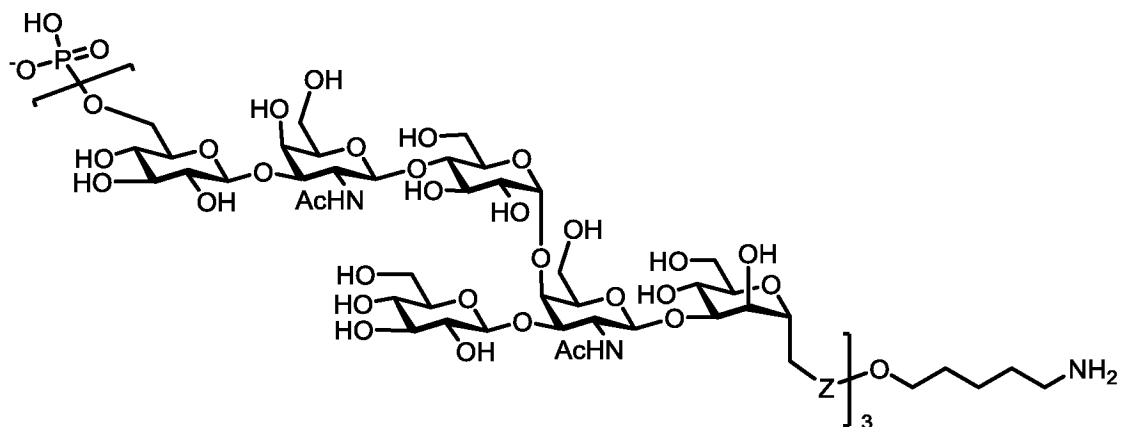
**Синтез соединения 164**

где **Z** представляет собой

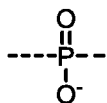


Фосфонатное соединение **164** синтезировали, как описано для соединения **162**.

5

**Синтез соединения 165**

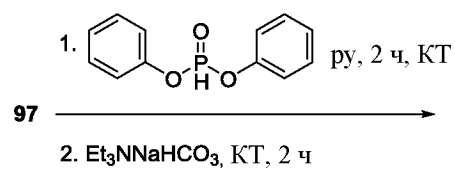
где **Z** представляет собой

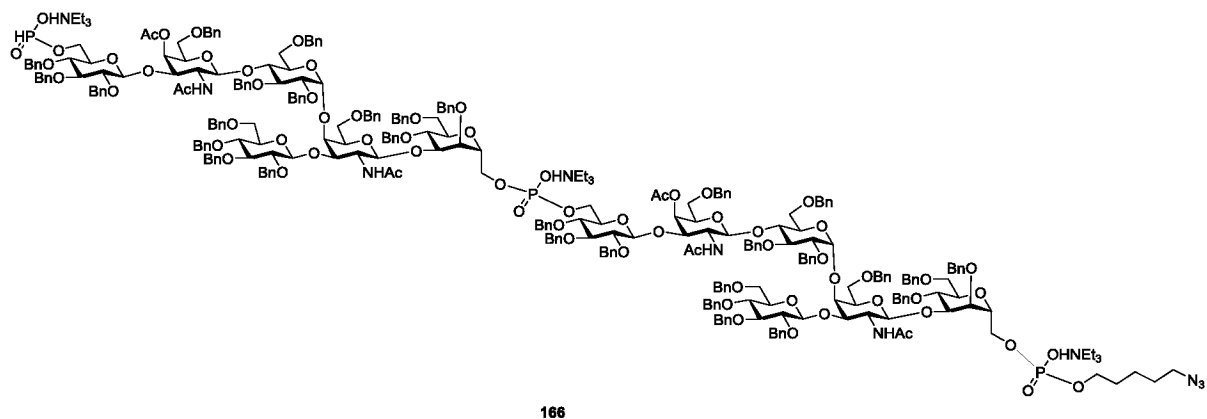


Фосфонатное соединение **165** синтезировали, как описано для соединения **163**.

**А.18 Альтернативный синтез октадекасахаридов 162 и 163**

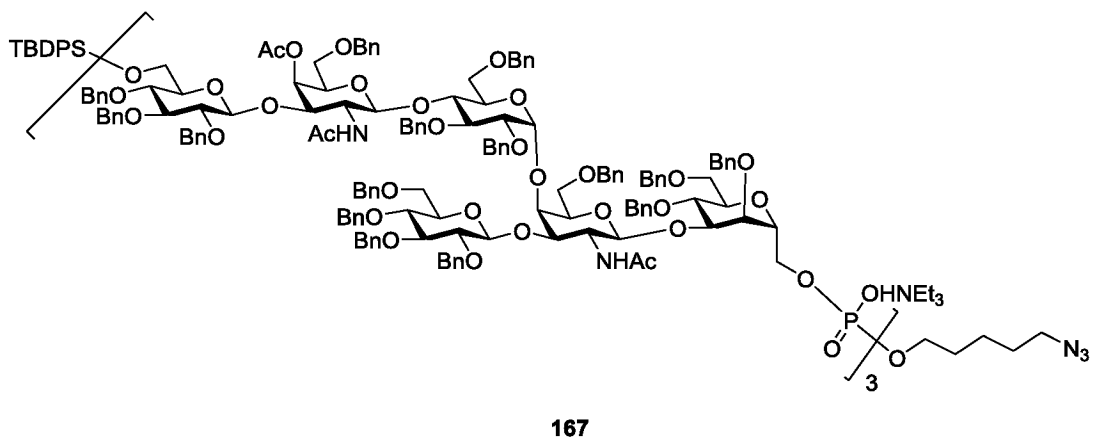
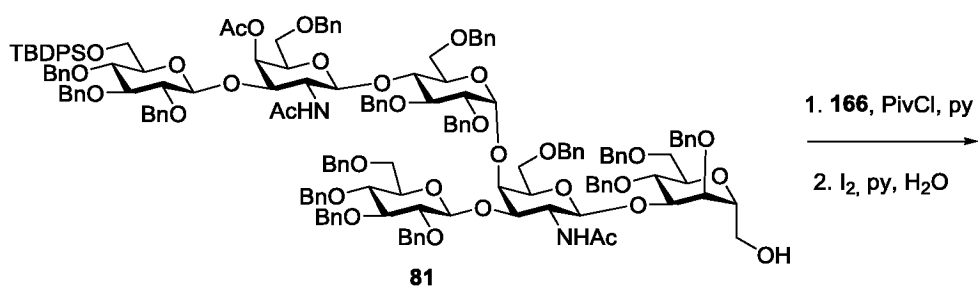
10

**Синтез соединения 166**



Методику, описанную для синтеза соединения **86**, использовали для синтеза соединения **166**.

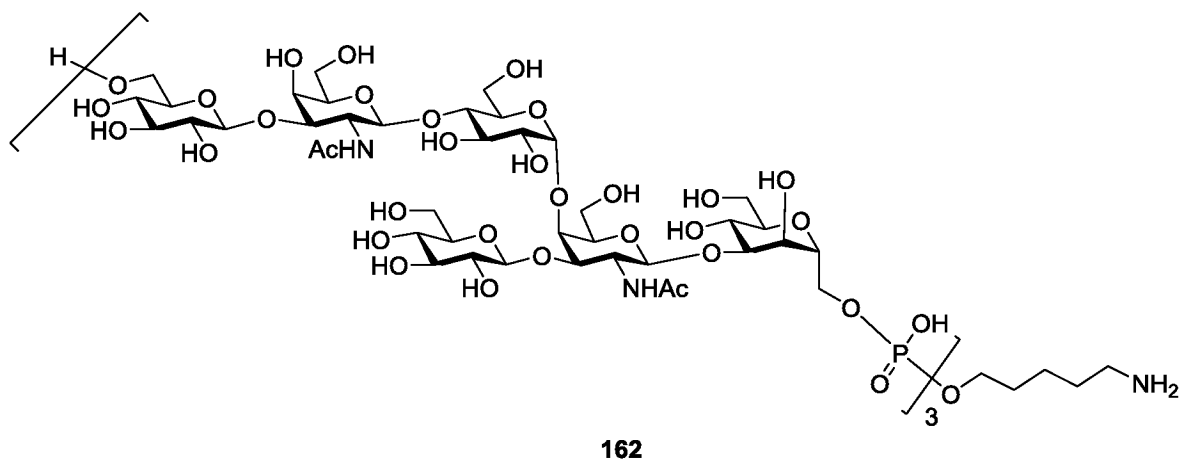
## 5 Синтез соединения 167



10

Методику, описанную для синтеза соединения **96**, использовали для синтеза соединения **167**.

## Синтез соединения 162

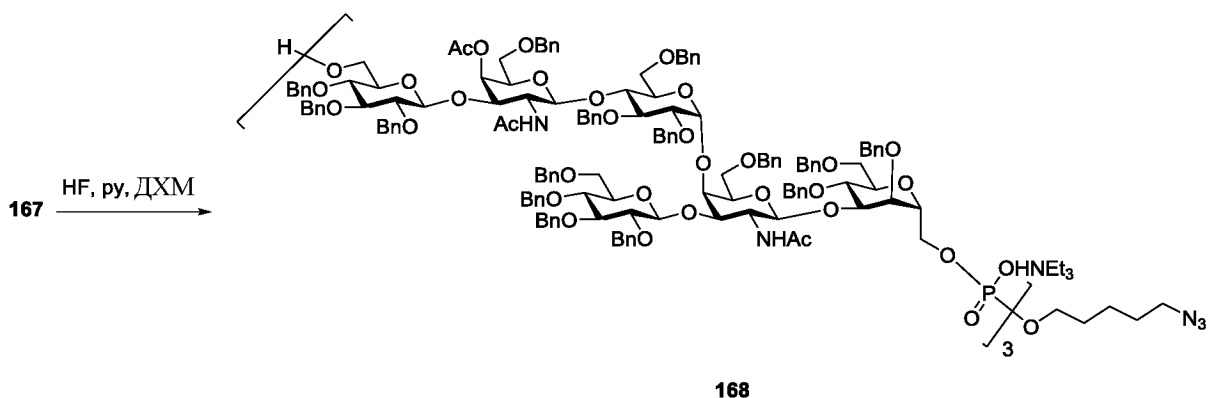


Соединение **162** синтезировали из соединения **167**, как описано для соединения

**33.**

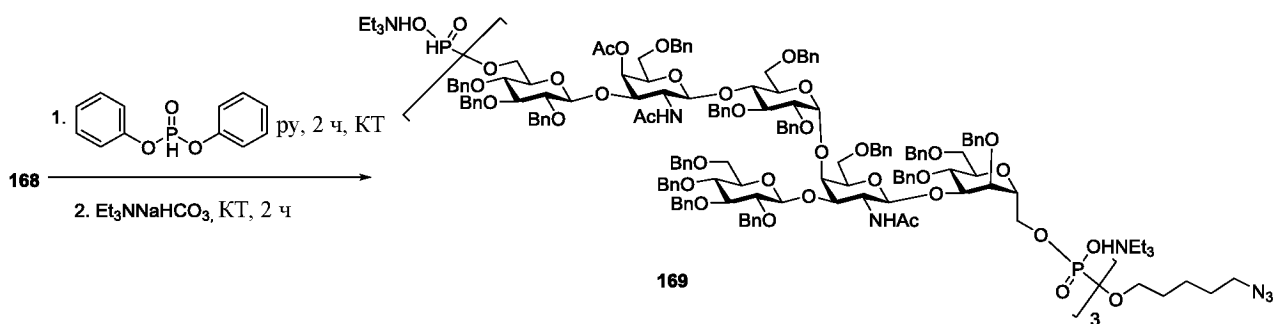
5

## Синтез соединения 168



10 Методику, описанную для синтеза соединения **60**, использовали для синтеза соединения **168**.

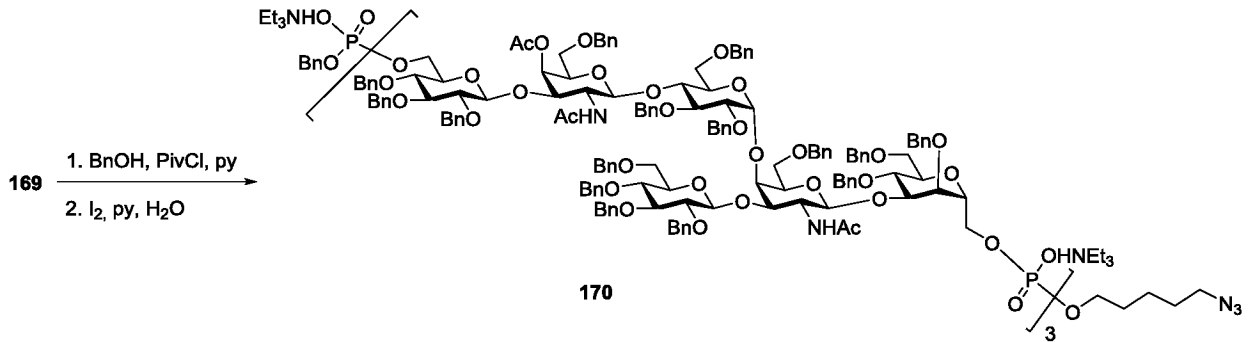
## Синтез соединения 169



Методику, описанную для синтеза соединения **86**, использовали для синтеза соединения **169**.

### Синтез соединения 170

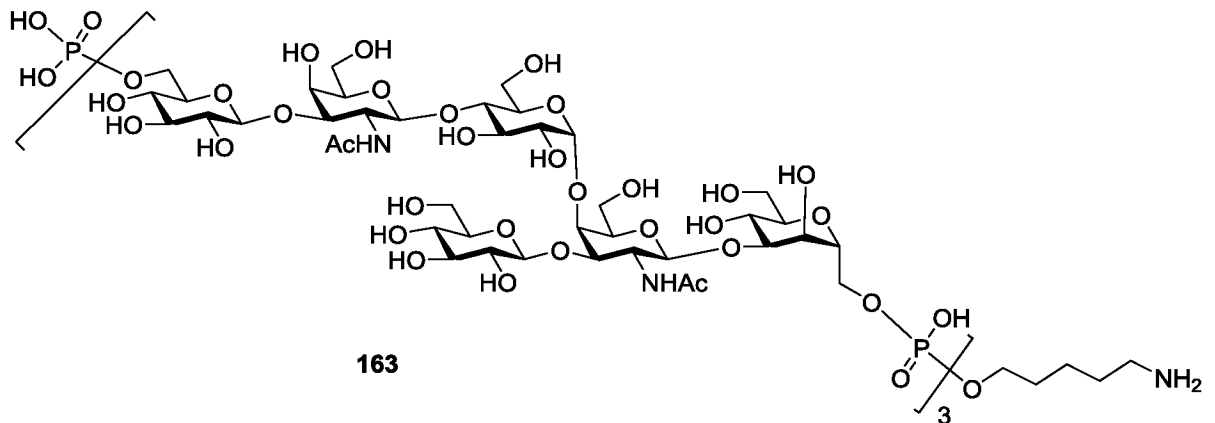
5



Методику, описанную для синтеза соединения **87**, использовали для синтеза соединения **170**.

10

### Синтез соединения 163

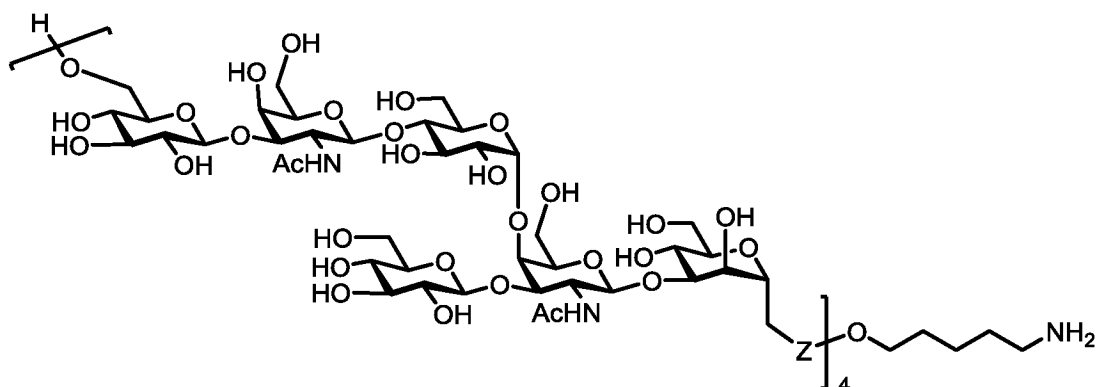


Соединение **163** синтезировали из соединения **170**, как описано для соединения

54.

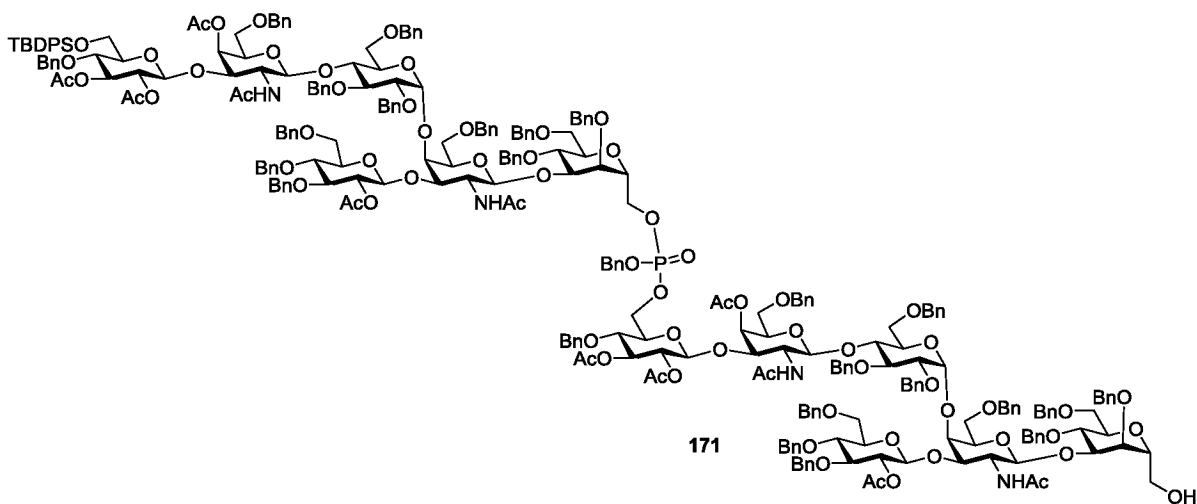
### A.19 Синтез тетракозасахаридов 172 и 173

#### Синтез соединения 172



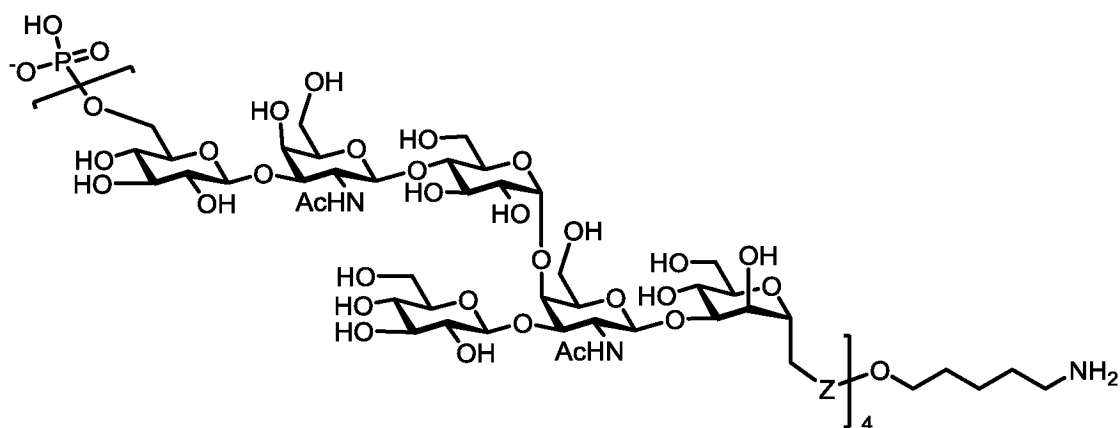
где **Z** представляет собой

- 5 Соединение **172** синтезировали из додекасахарида **89**, который был присоединен к додекасахариду **171**

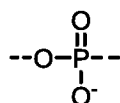


- 10 в соответствии с методикой, описанной для соединения **88**, с последующим снятием защиты TBDPS группы, как описано для соединения **89**, и впоследствии полным снятием защиты, как описано для соединения **90**.

## Синтез соединения 173



где **Z** представляет собой

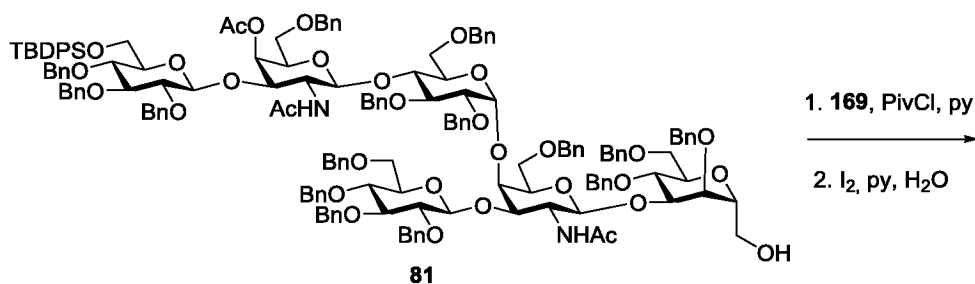


Соединение **173** синтезировали из додекасахарида **89**, который был присоединен к додекасахариду **171**, в соответствии с методикой, описанной для соединения **88** с последующим снятием защиты TBDPS группы, как описано для соединения **89**, фосфорилированием, как описано для соединения **91**, и впоследствии полным снятием защиты, как описано для соединения **92**.

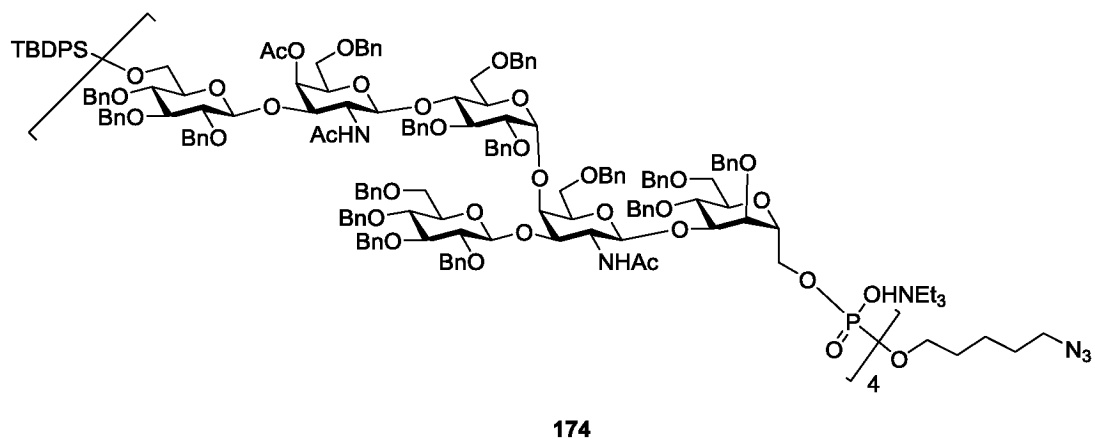
А.20 Альтернативный синтез тетракозасахаридов 172 и 173

10

## Синтез соединения 174



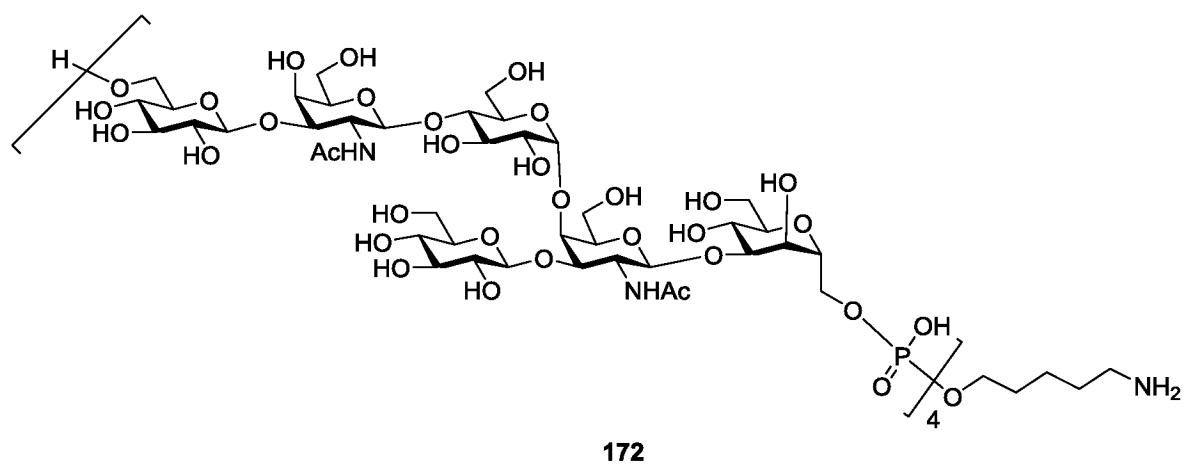




Методику, описанную для синтеза соединения **96**, использовали для синтеза соединения **174**.

5

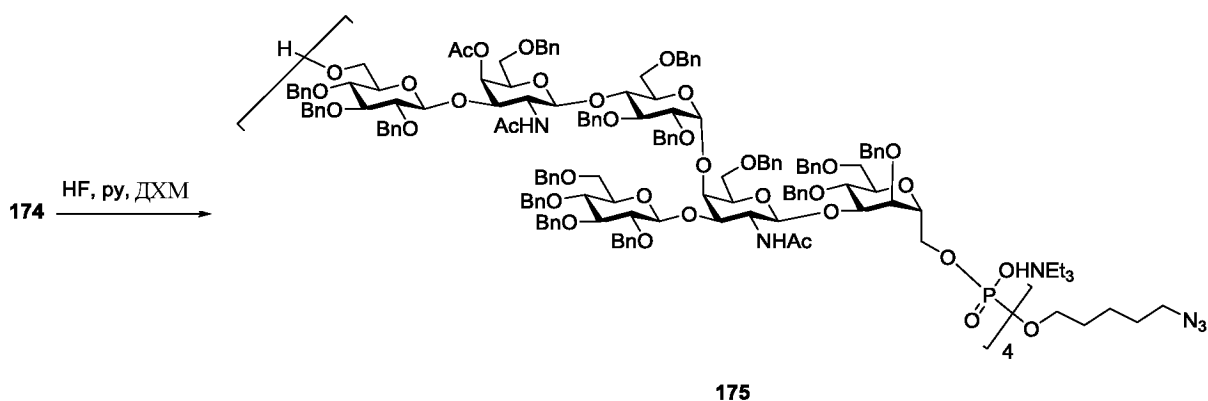
### Синтез соединения 172



Соединение **172** синтезировали из соединения **174**, как описано для соединения

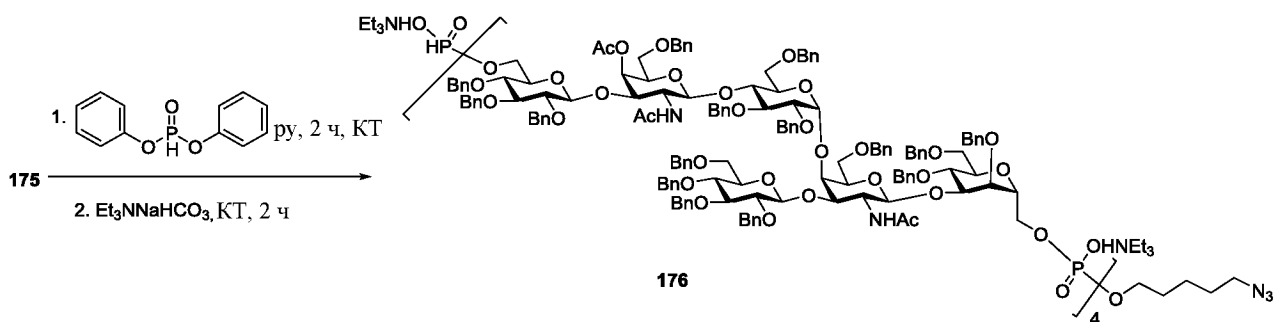
10 33.

## Синтез соединения 175



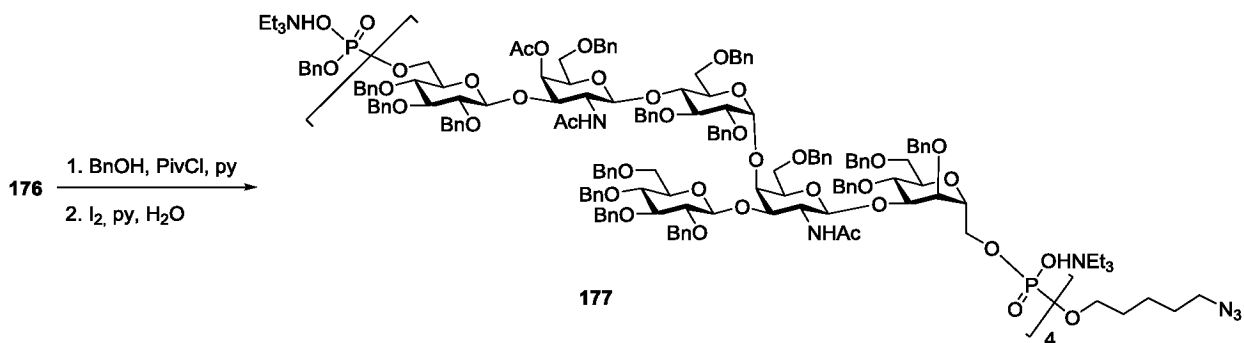
- 5 Методику, описанную для синтеза соединения **60**, использовали для синтеза соединения **175**.

## Синтез соединения 176



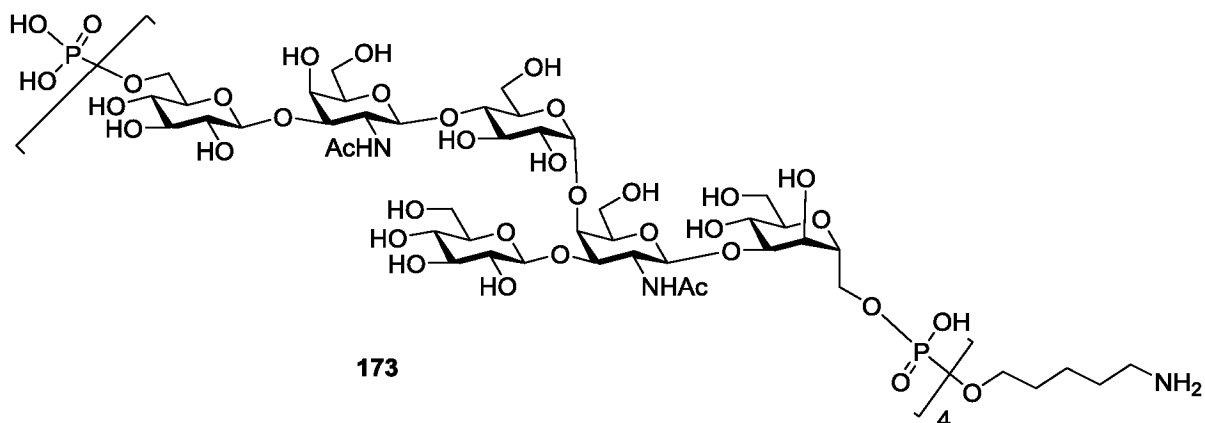
- 10 Методику, описанную для синтеза соединения **86**, использовали для синтеза соединения **176**.

## Синтез соединения 177



- 15 Методику, описанную для синтеза соединения **87**, использовали для синтеза соединения **177**.

## Синтез соединения 173

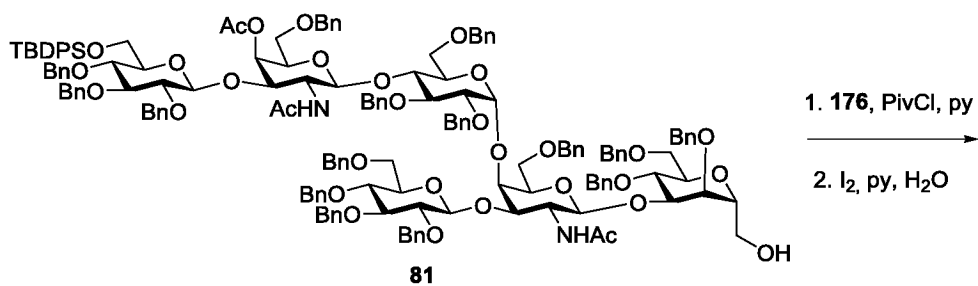


Соединение 173 синтезировали из соединения 177, как описано для соединения

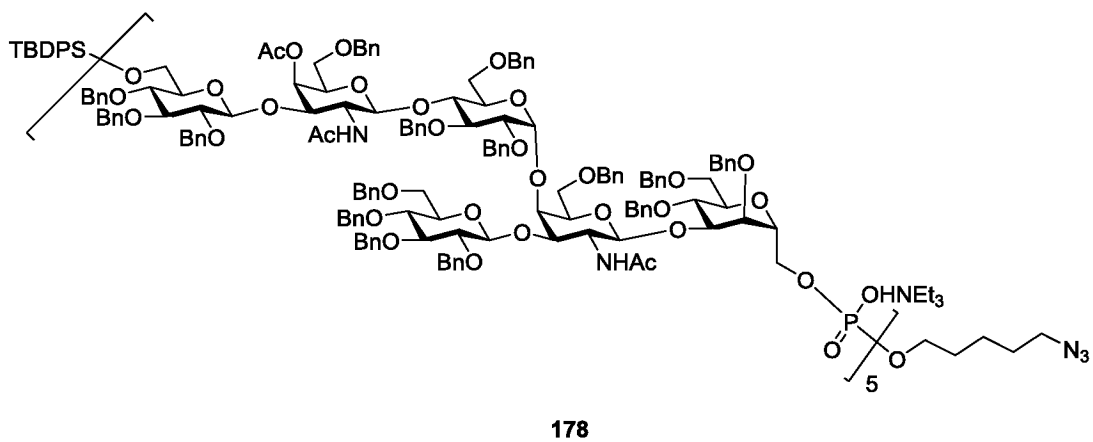
5 54.

## A.21 Синтез триаконтасахаридов 179 и 183

## Синтез соединения 178



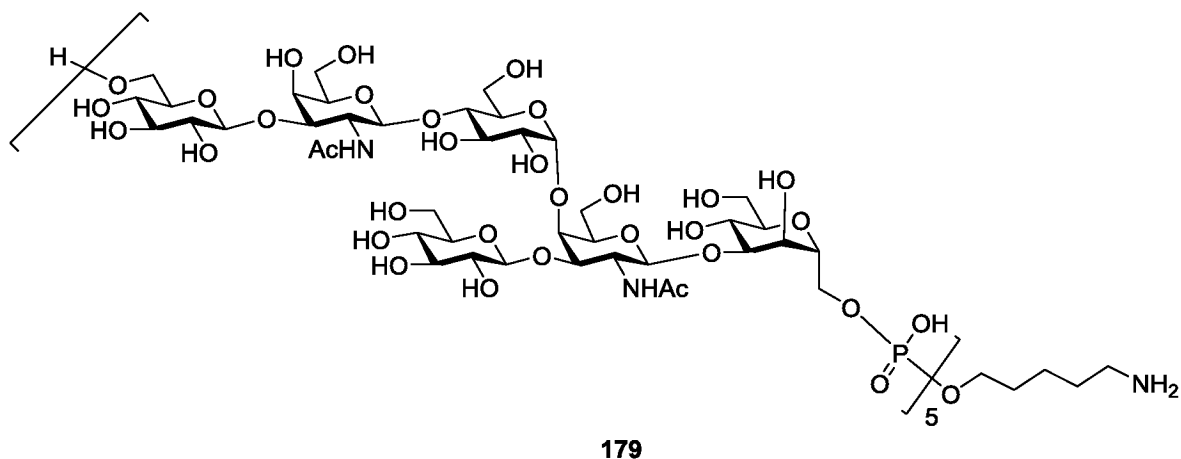
10



Методику, описанную для синтеза соединения 96, использовали для синтеза

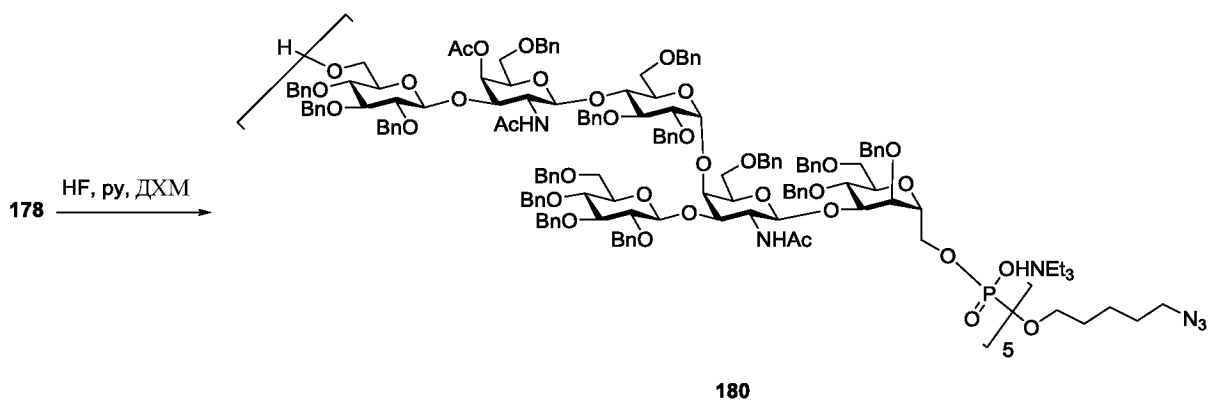
15 соединения 178.

## Синтез соединения 179



Соединение 179 синтезировали из соединения 178 как описано для соединения 33.

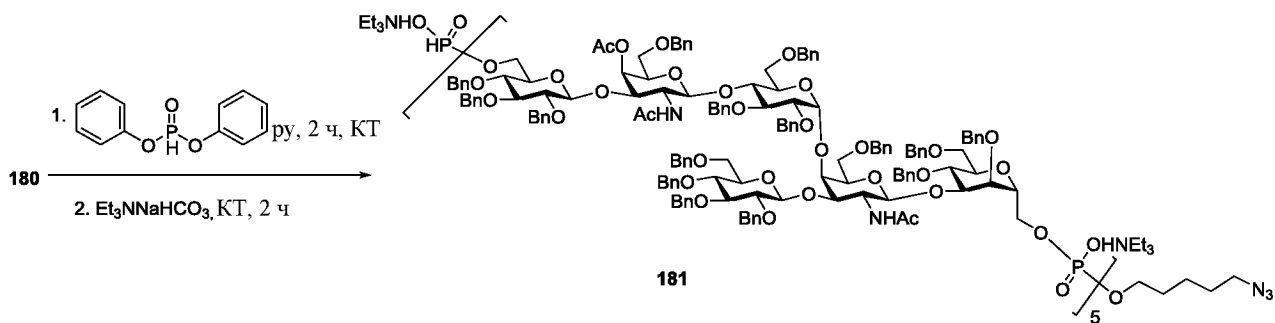
## 5 Синтез соединения 180



Методику, описанную для синтеза соединения 60, использовали для синтеза соединения 180.

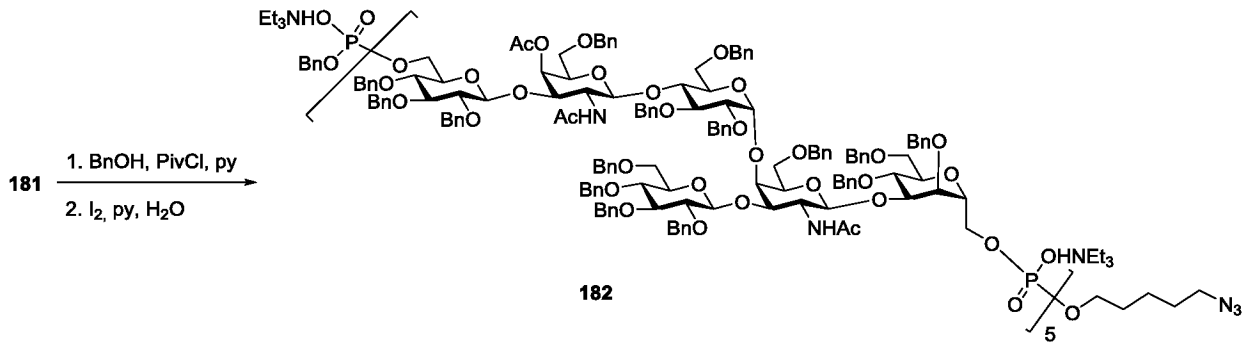
10

## Синтез соединения 181



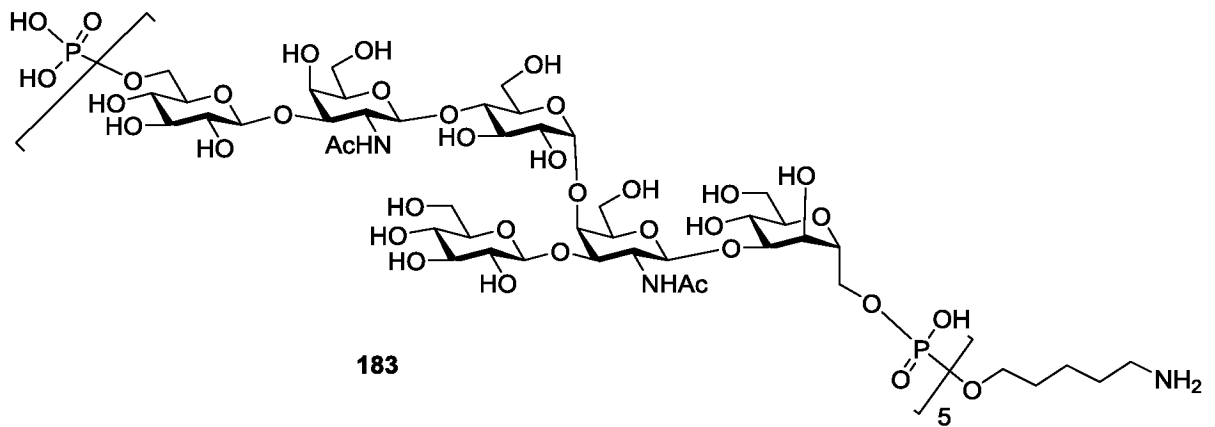
Методику, описанную для синтеза соединения 86, использовали для синтеза соединения 181.

## Синтез соединения 182



- 5 Методику, описанную для синтеза соединения **87**, использовали для синтеза соединения **182**.

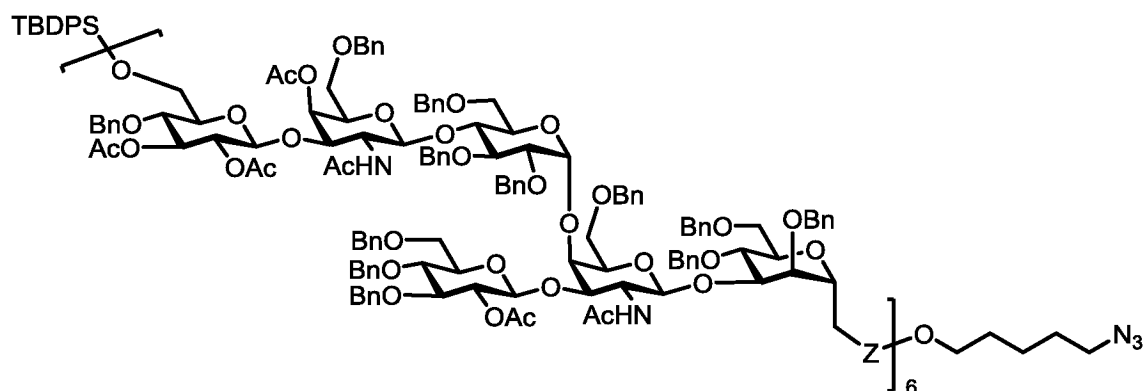
## Синтез соединения 183



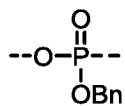
- 10 Соединение **183** синтезировали из соединения **182**, как описано для соединения **54**.

## A.22 Синтез гексатриаконтазахаридов 186 и 187

### Синтез соединения 185



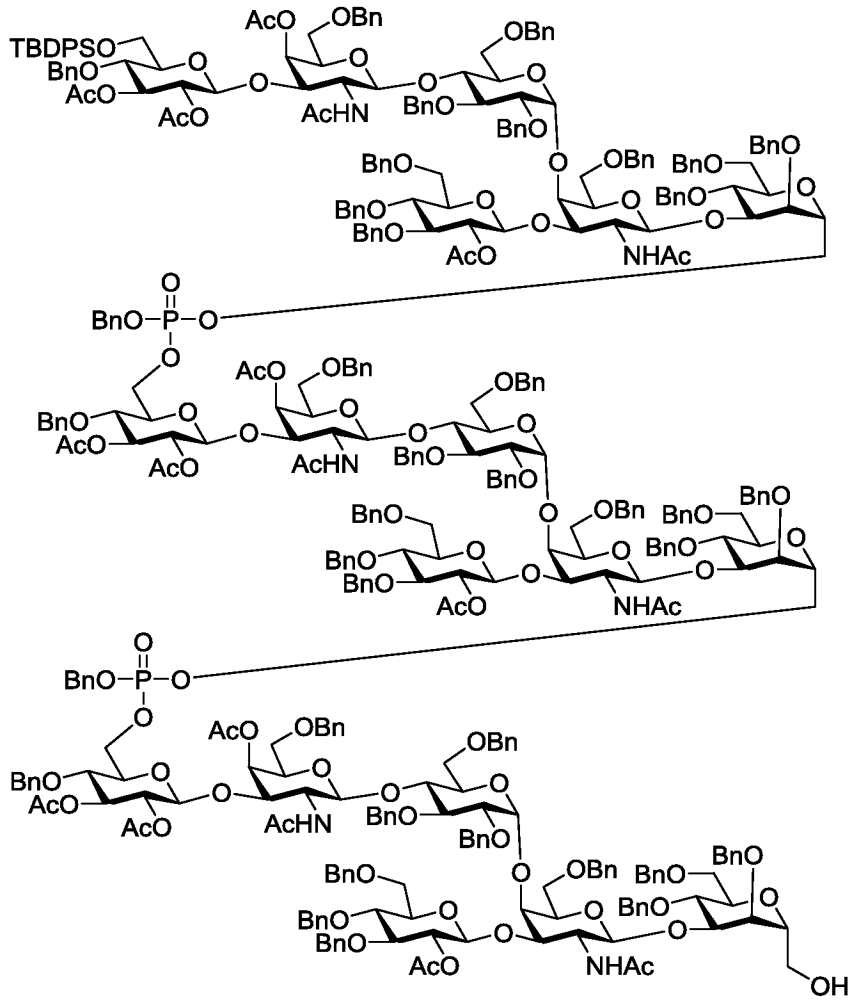
где **Z** представляет собой



5

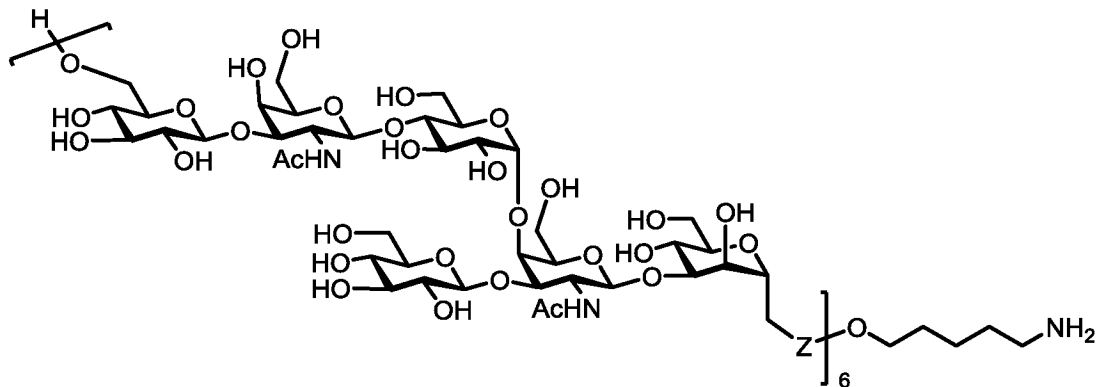
Соединение **185** синтезировали из октадекасахарида **161**, из которого селективно удаляли защитную группу TBDPS в соответствии с методикой, описанной для соединения **89**. Затем трисахарид, с которого сняли защитную группу TBDPS, вводили в реакцию с соединением **184**

10



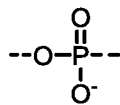
для получения сахара 185.

### Синтез соединения 186



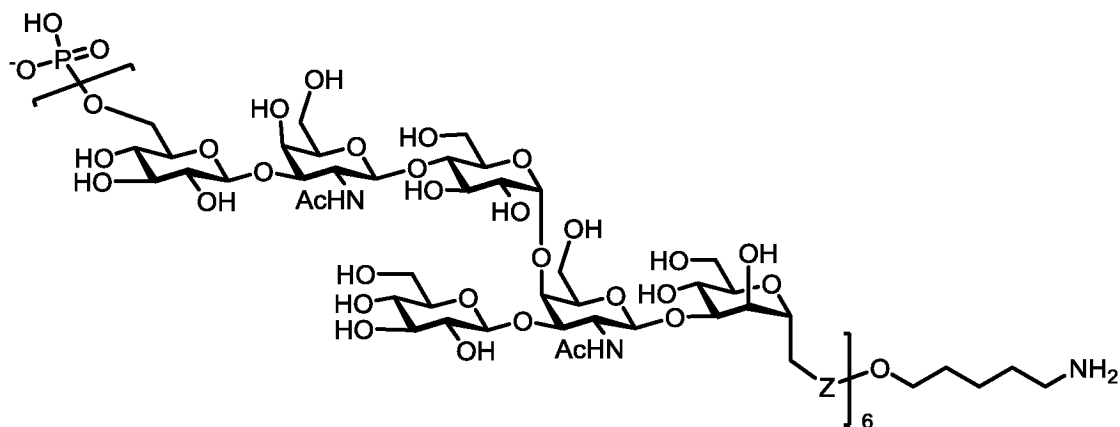
5

где **Z** представляет собой



Соединение **186** синтезировали из сахара **185**, который превращали в соответствии с методиками, описанными для соединения **89** (удаление защитной группы TBDPS) и затем для соединения **90** (удаление защитной группы TBDPS).

### 5 Синтез соединения **187**



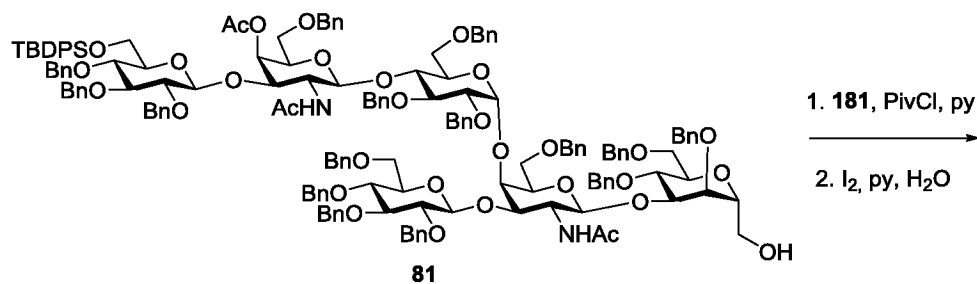
где **Z** представляет собой

Соединение **187** синтезировали из сахара **185**, который превращали в соответствии с методиками, описанными для соединения **89** (удаление защитной группы TBDPS), фосфорилированием, как описано для соединения **91**, и впоследствии полным снятием защитной группы, как описано для соединения **92**.

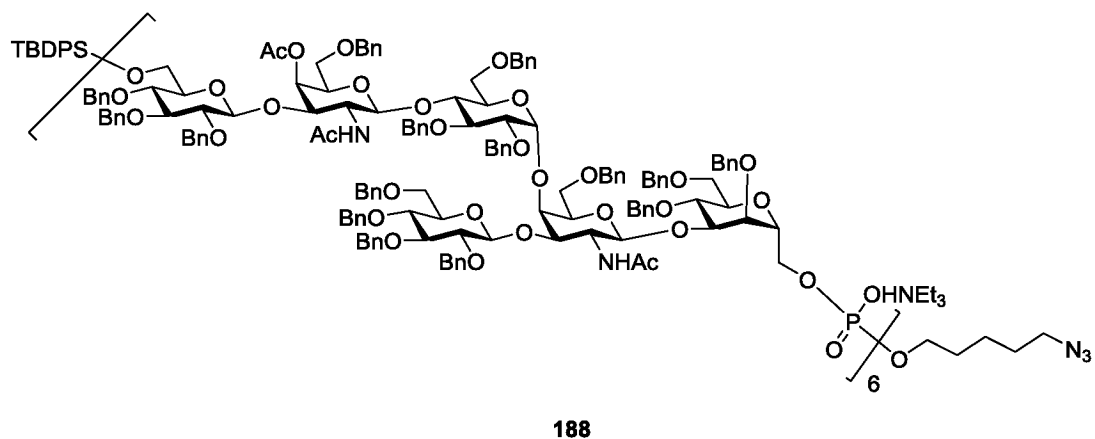
### А.23 Альтернативный синтез гексатриаконтазасхаридов **186** и **187**

15

#### Синтез соединения **188**



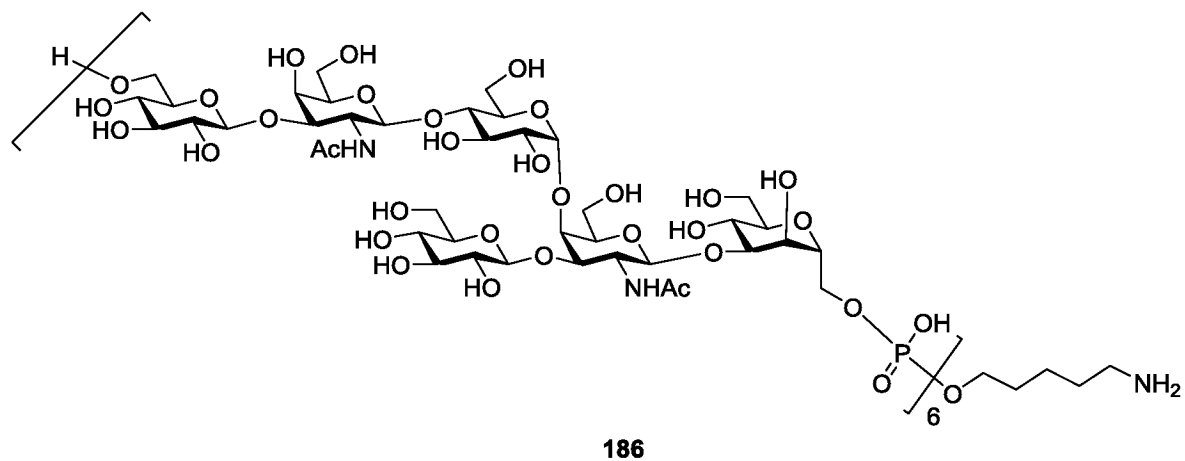




Методику, описанную для синтеза соединения **96**, использовали для синтеза соединения **188**.

5

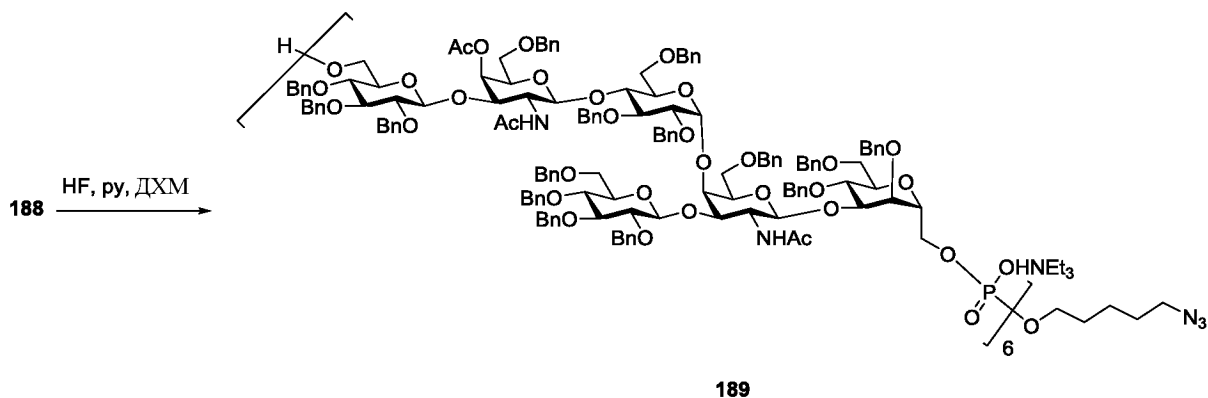
### Синтез соединения **186**



Соединение **186** синтезировали из соединения **188**, как описано для соединения

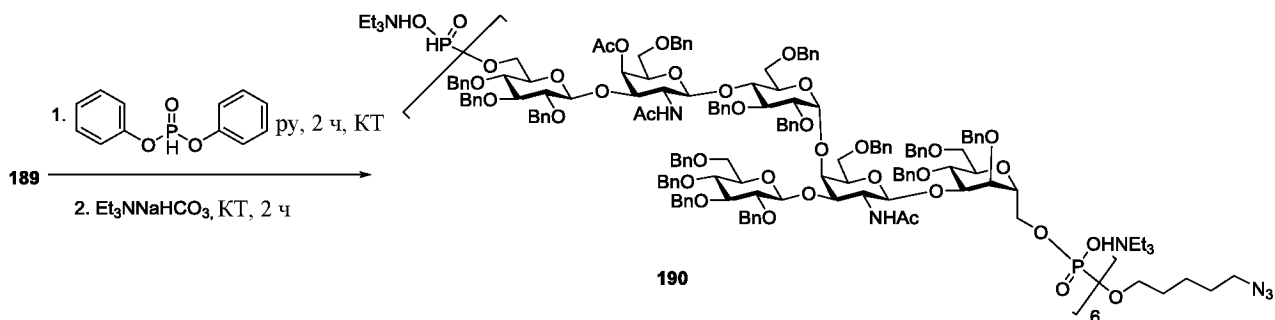
10 33.

## Синтез соединения 189



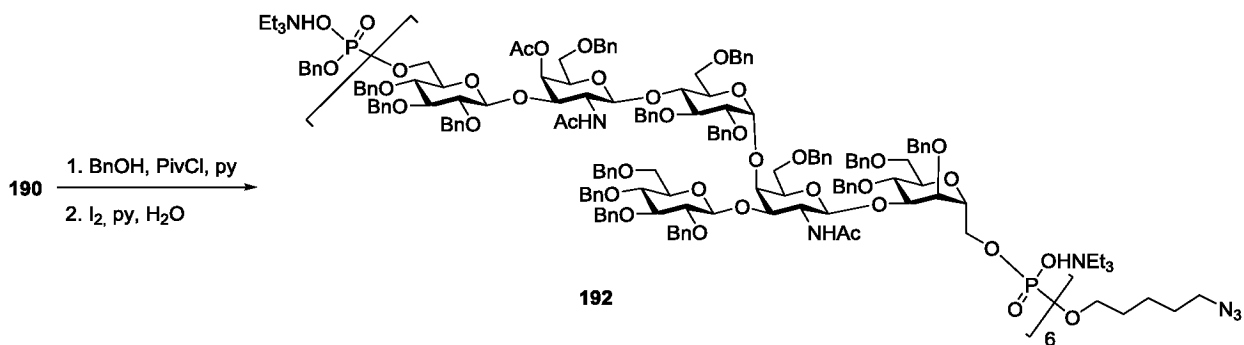
- 5 Методику, описанную для синтеза соединения 60, использовали для синтеза соединения 189.

## Синтез соединения 190



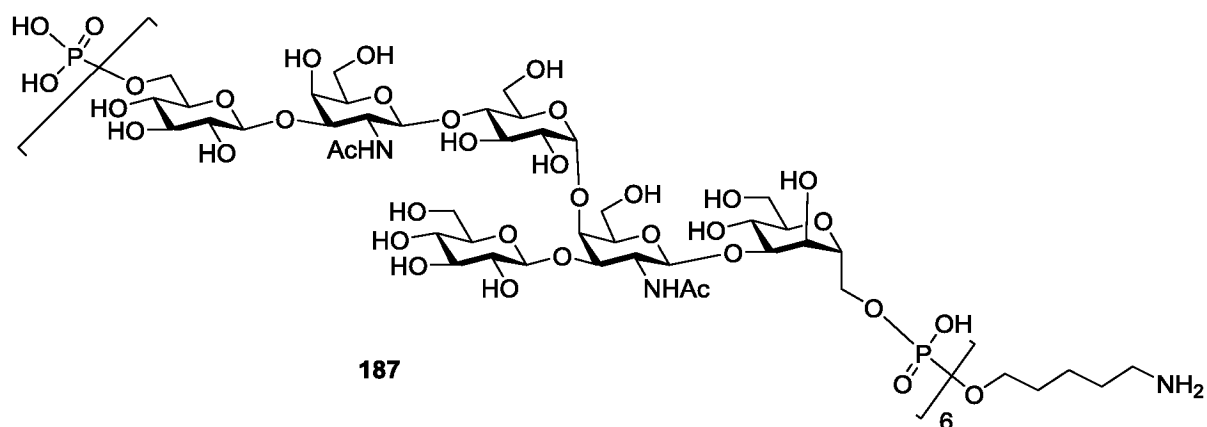
- 10 Методику, описанную для синтеза соединения 86, использовали для синтеза соединения 190.

## Синтез соединения 191



- 15 Методику, описанную для синтеза соединения 87, использовали для синтеза соединения 191.

## Синтез соединения 187



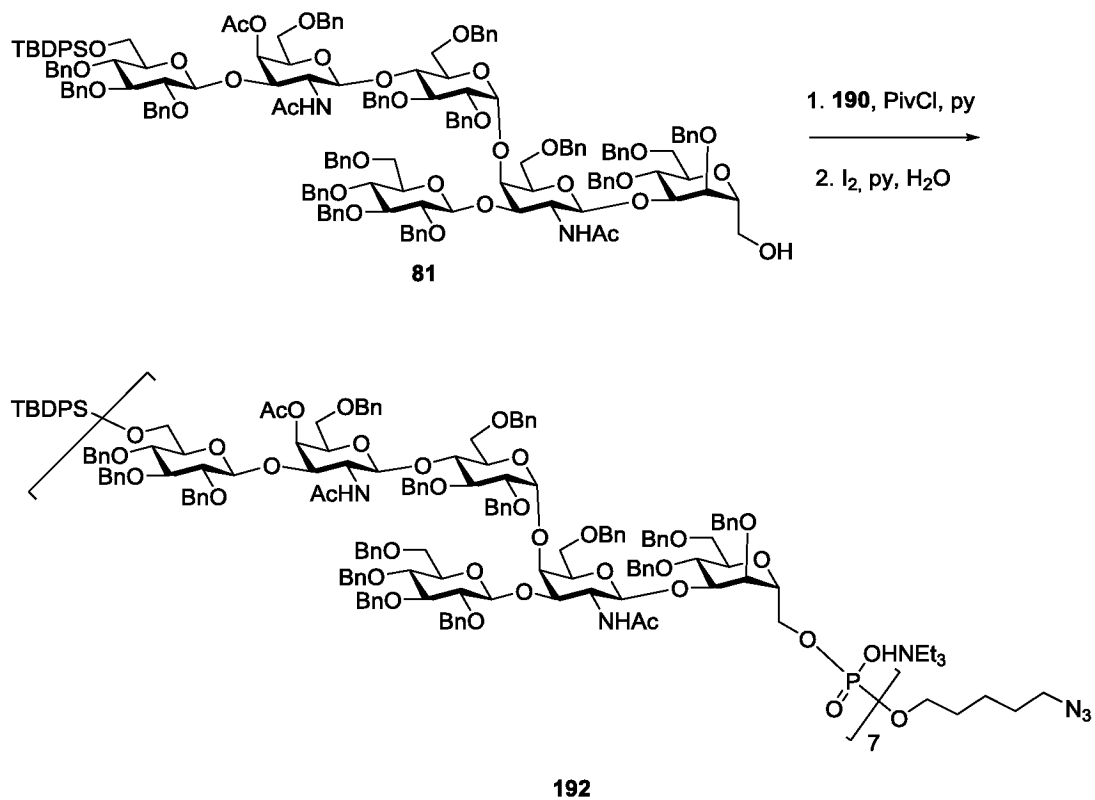
Соединение 187 синтезировали из соединения 191, как описано для соединения

5 54.

А.24 Синтез олигосахаридов 193 и 197

## Синтез соединения 192

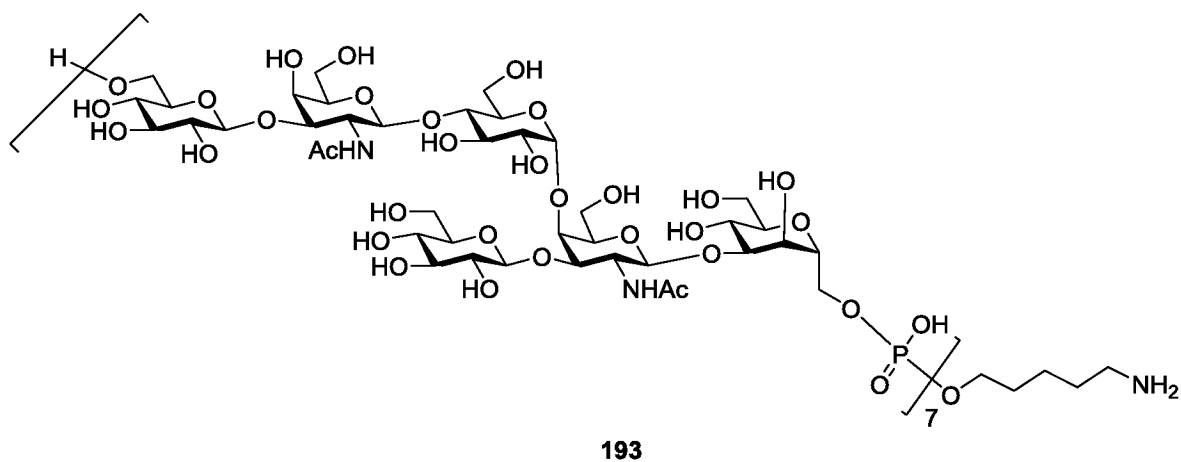
10



Методику, описанную для синтеза соединения **96**, использовали для синтеза соединения **192**.

### Синтез соединения **193**

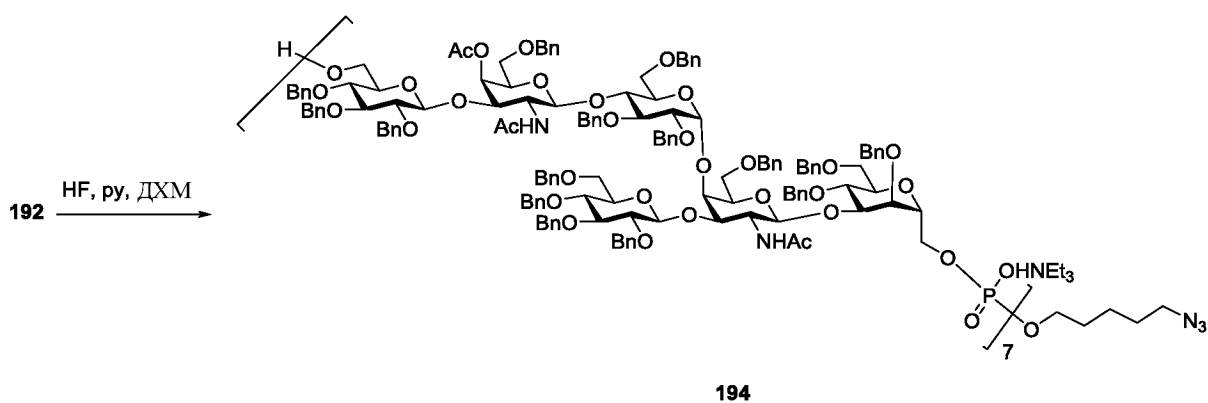
5



Соединение **193** синтезировали из соединения **192**, как описано для соединения **33**.

10

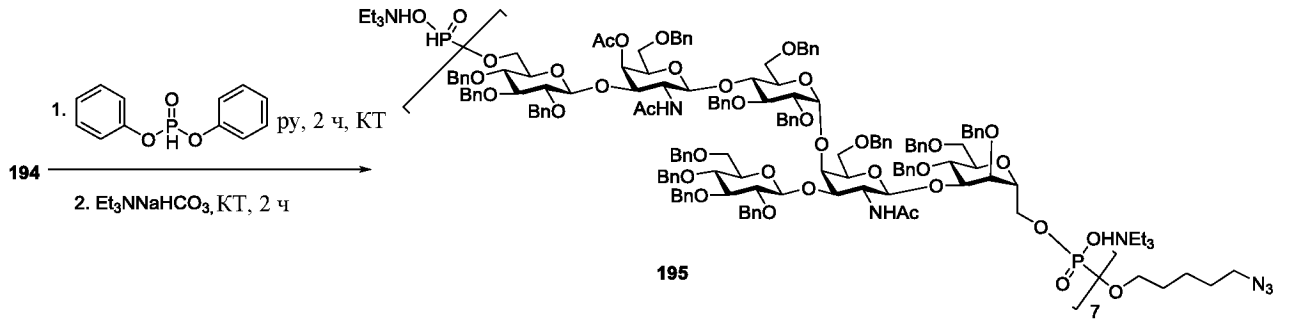
### Синтез соединения **194**



Методику, описанную для синтеза соединения **60**, использовали для синтеза соединения **194**.

15

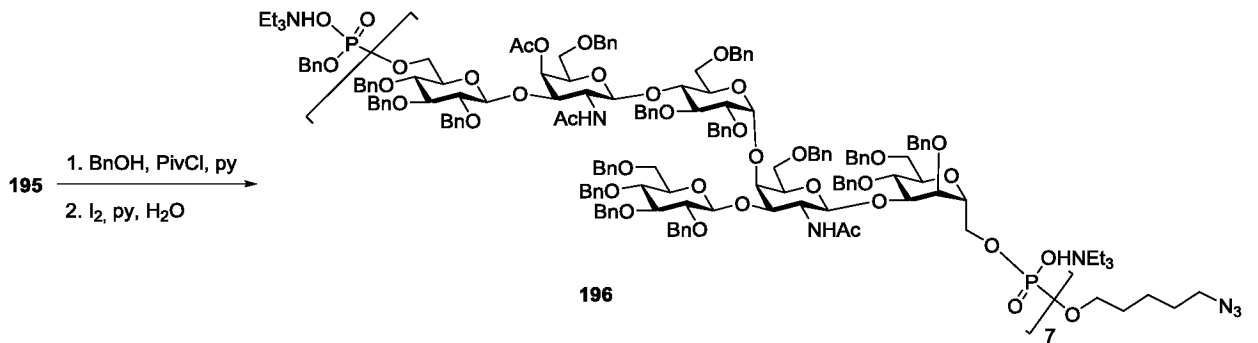
## Синтез соединения 195



Методику, описанную для синтеза соединения **86**, использовали для синтеза соединения **195**.

5

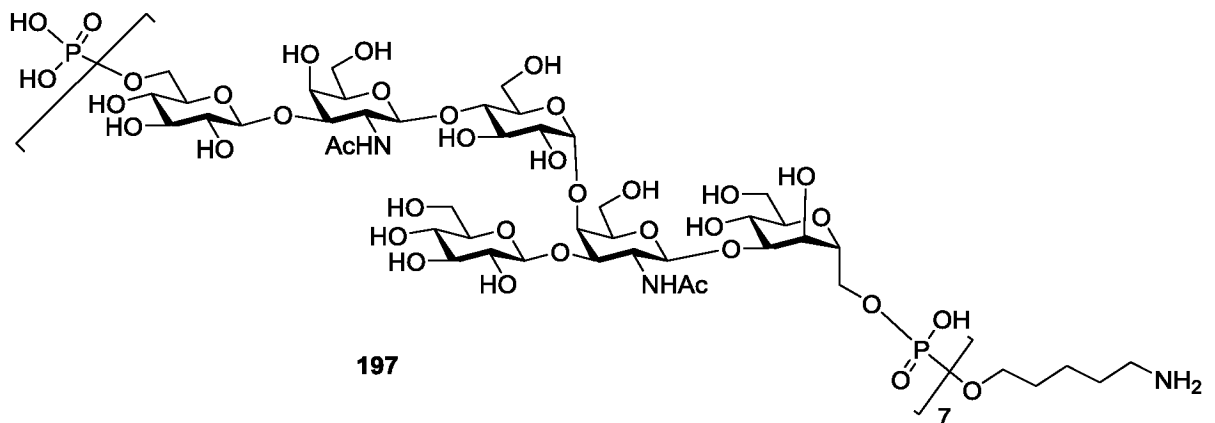
## Синтез соединения 196



Методику, описанную для синтеза соединения **87**, использовали для синтеза соединения **196**.

10

## Синтез соединения 197

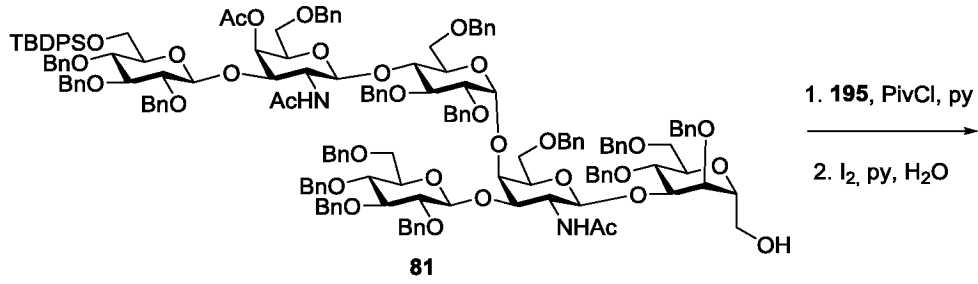


Соединение **197** синтезировали из соединения **196**, как описано для соединения

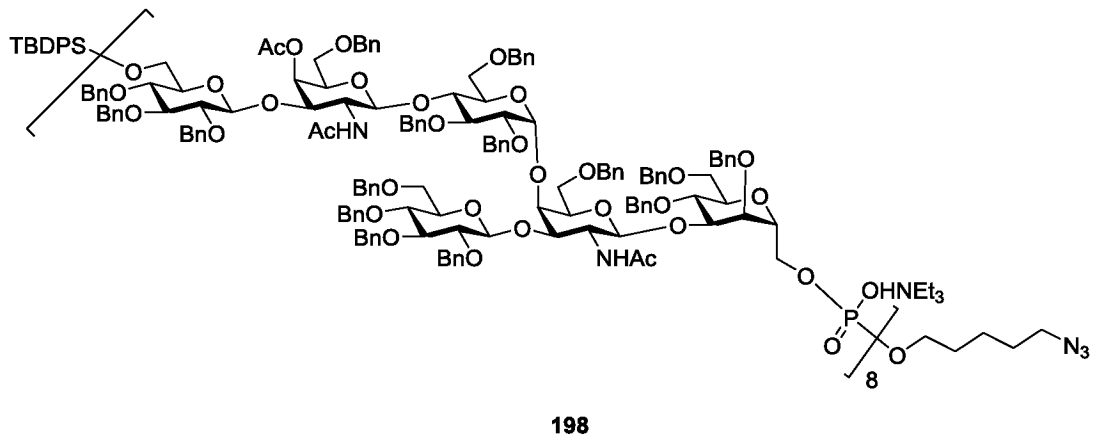
15 54.

## A.25 Синтез олигосахаридов 199 и 203

### Синтез соединения 198



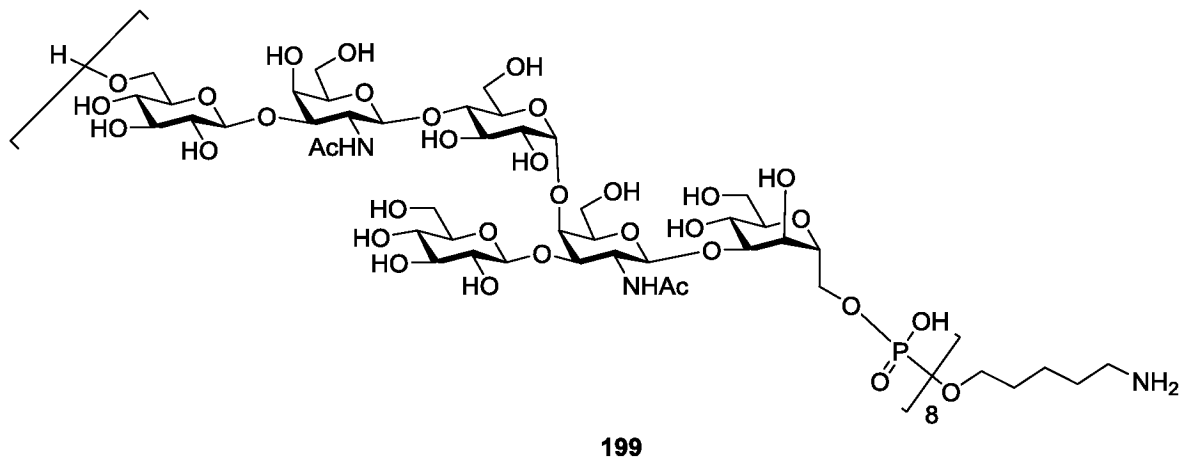
5



Методику, описанную для синтеза соединения **96**, использовали для синтеза соединения **198**.

10

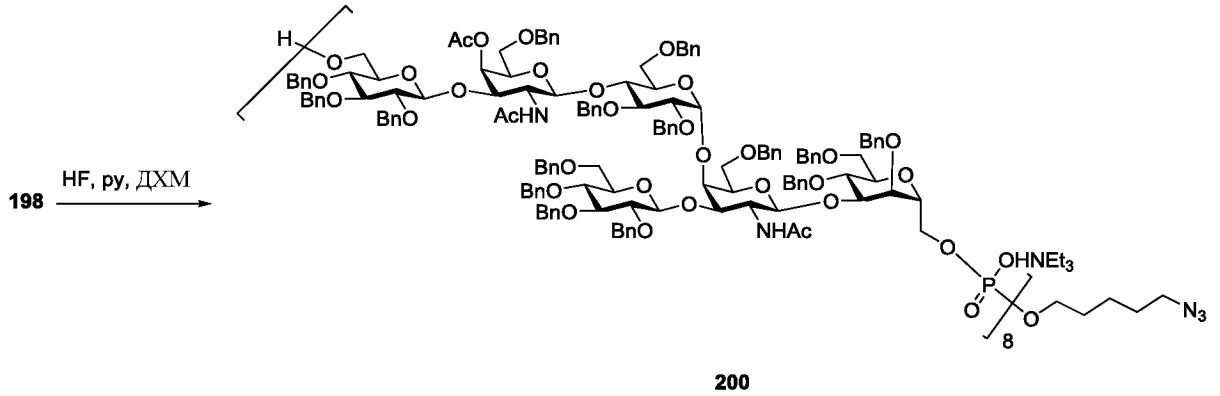
### Синтез соединения 199



Соединение **199** синтезировали из соединения **198**, как описано для соединения **33**.

### Синтез соединения **200**

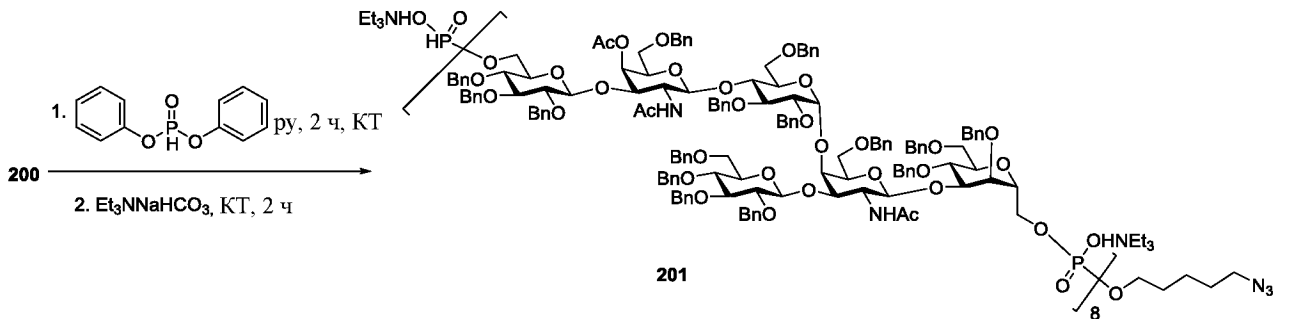
5



Методику, описанную для синтеза соединения **60**, использовали для синтеза соединения **200**.

10

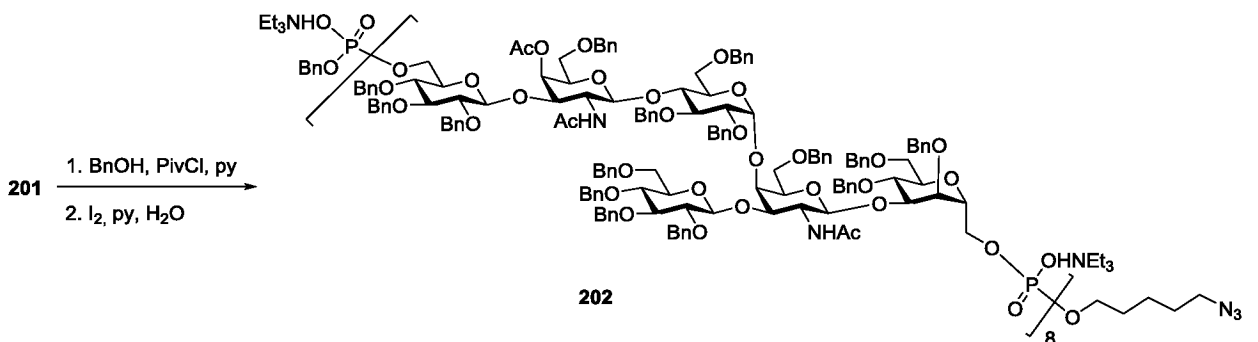
### Синтез соединения **201**



Методику, описанную для синтеза соединения **86**, использовали для синтеза соединения **201**.

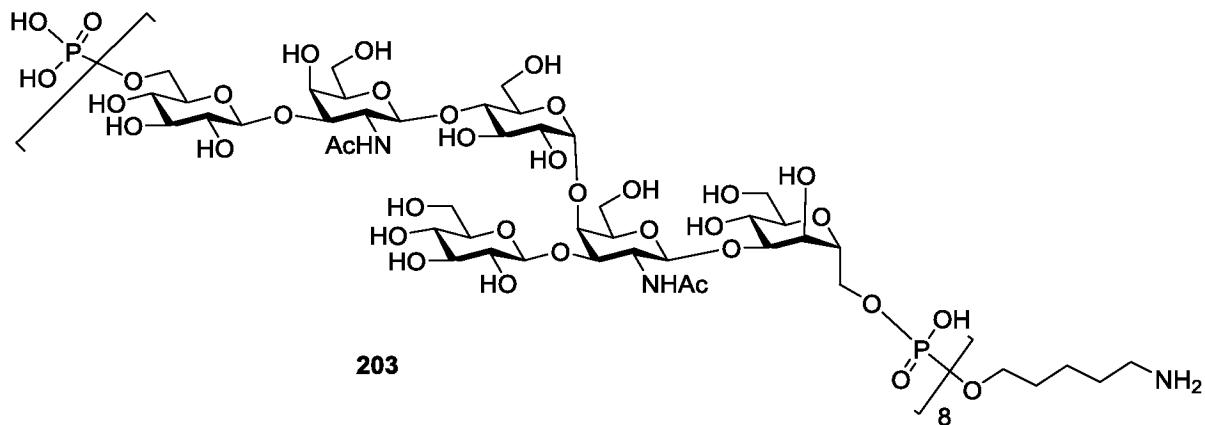
15

### Синтез соединения **202**



Методику, описанную для синтеза соединения **87**, использовали для синтеза соединения **202**.

### Синтез соединения **203**



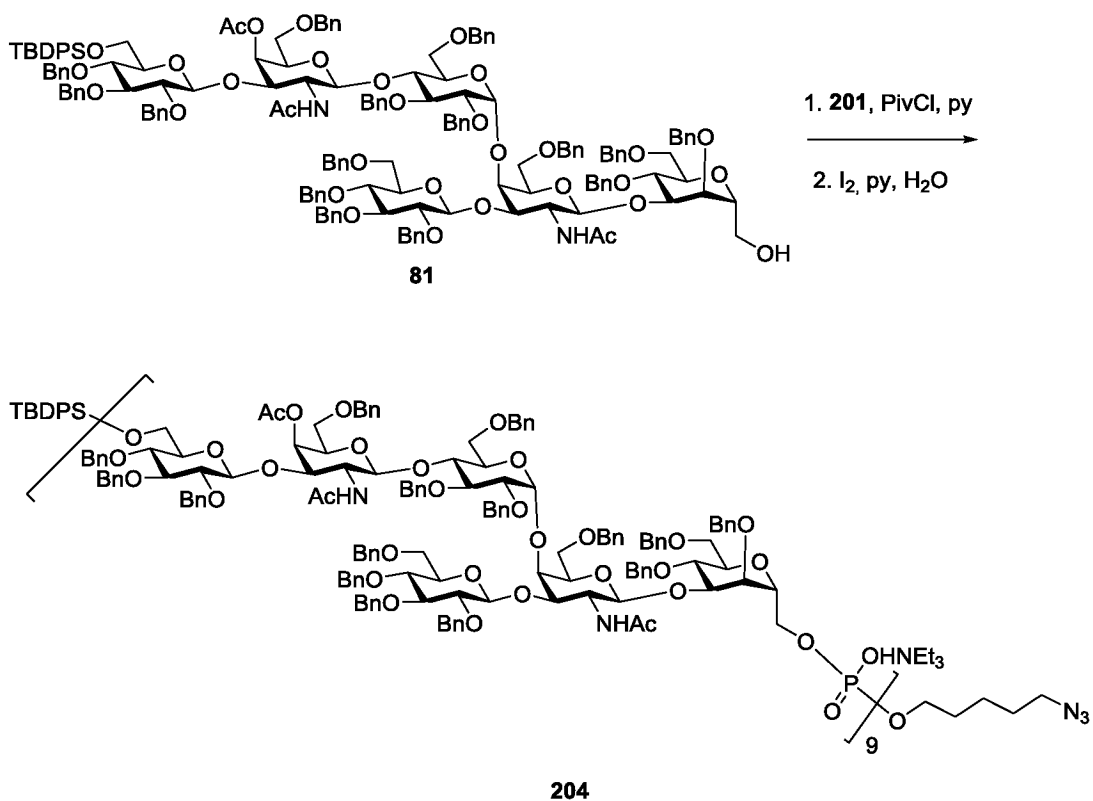
5

Соединение **203** синтезировали из соединения **202**, как описано для соединения **54**.

### A.26 Синтез олигосахаридов **205** и **209**

10

### Синтез соединения **204**



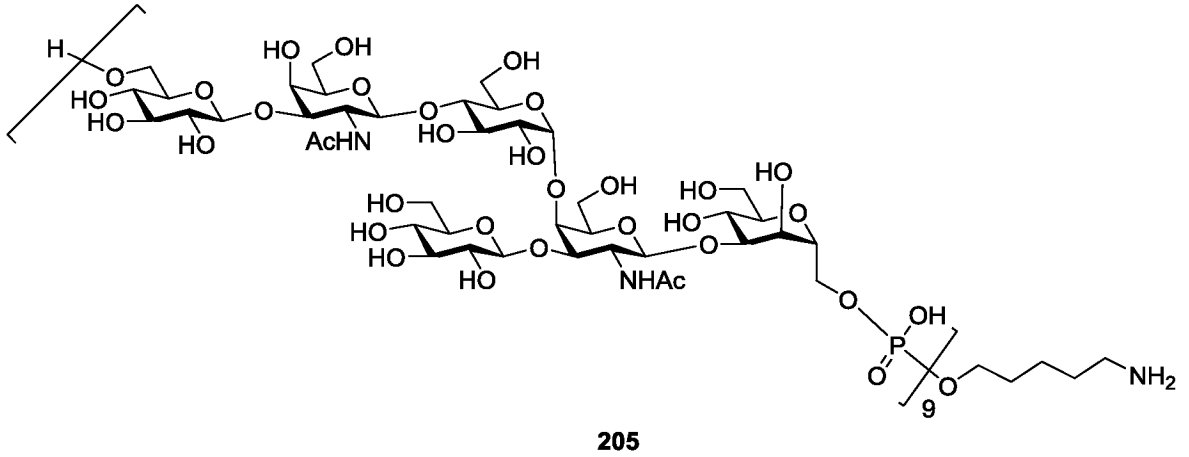
15



Методику, описанную для синтеза соединения **96**, использовали для синтеза соединения **204**.

### Синтез соединения **205**

5

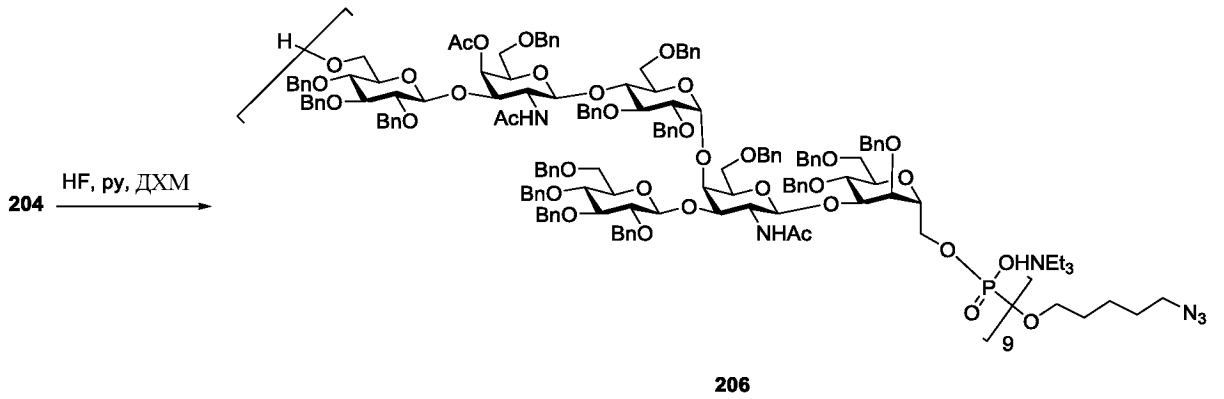


Соединение **205** синтезировали из соединения **204**, как описано для соединения

33.

### Синтез соединения **206**

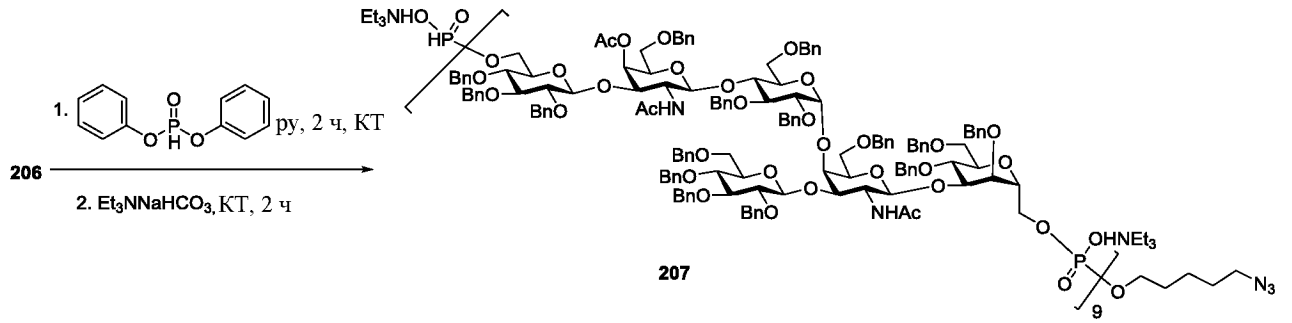
10



Методику, описанную для синтеза соединения **60**, использовали для синтеза соединения **206**.

15

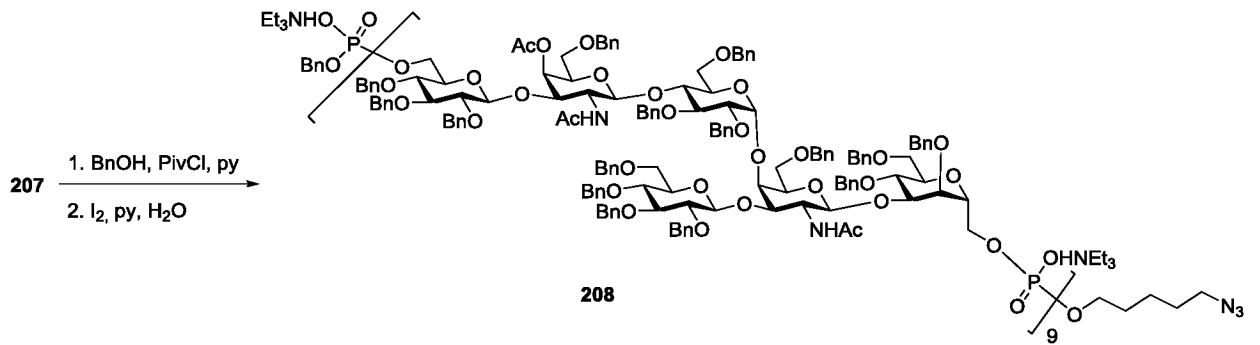
## Синтез соединения 207



Методику, описанную для синтеза соединения **86**, использовали для синтеза соединения **207**.

5

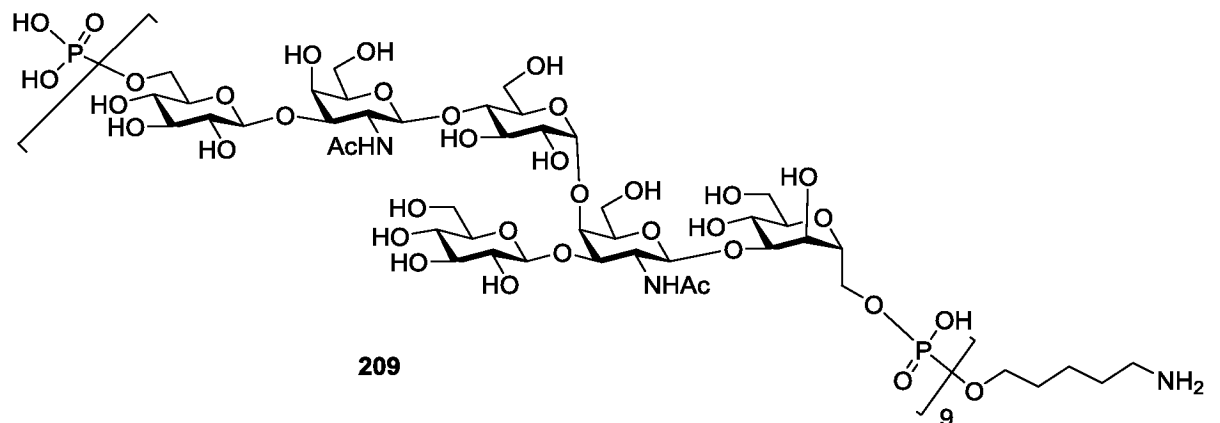
## Синтез соединения 208



Методику, описанную для синтеза соединения **87**, использовали для синтеза соединения **208**.

10

## Синтез соединения 209



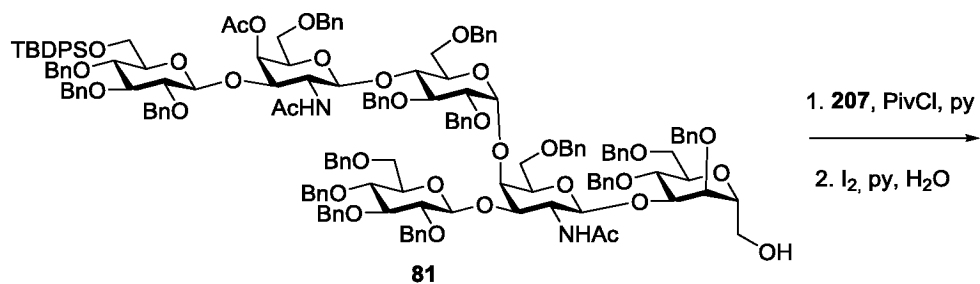
Соединение **209** синтезировали из соединения **208**, как описано для соединения

54.

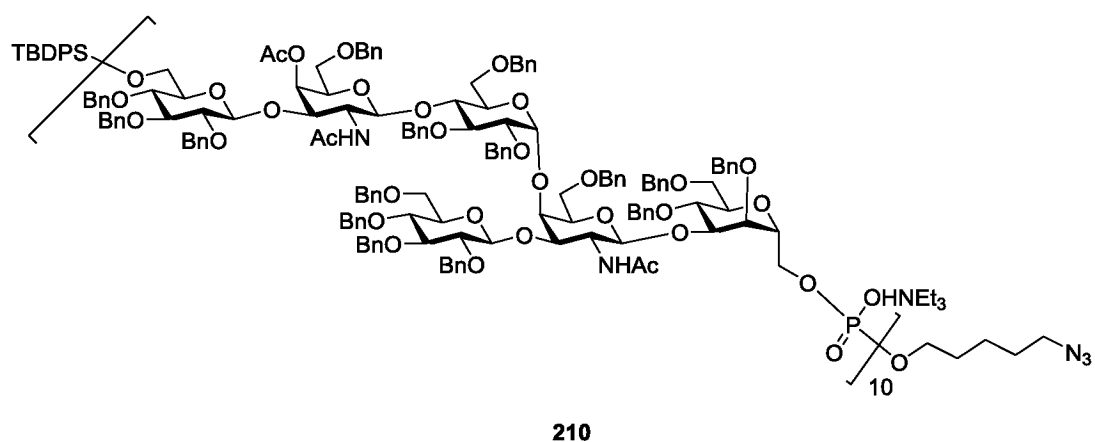
15

## A.27 Синтез олигосахаридов 211 и 215

### Синтез соединения 210



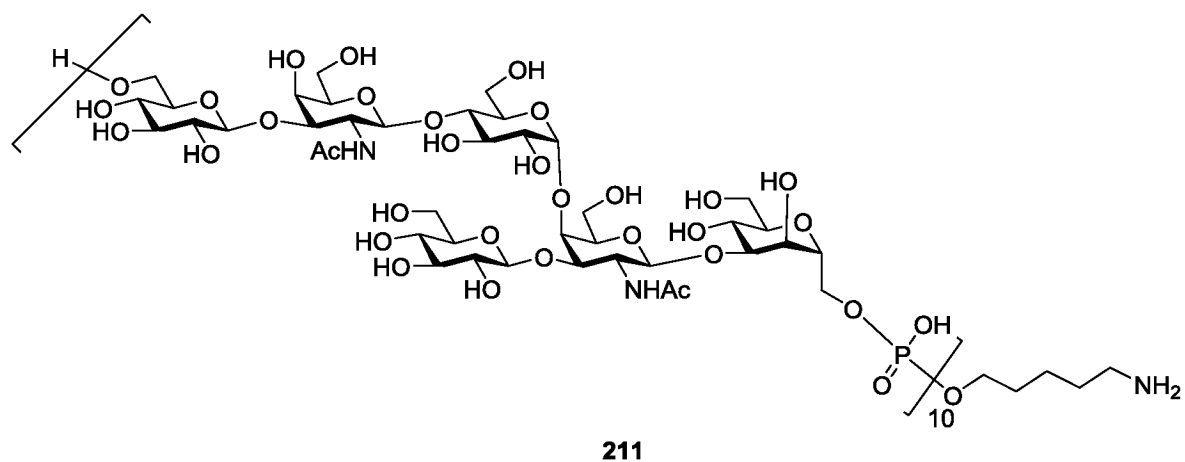
5



Методику, описанную для синтеза соединения **96**, использовали для синтеза соединения **210**.

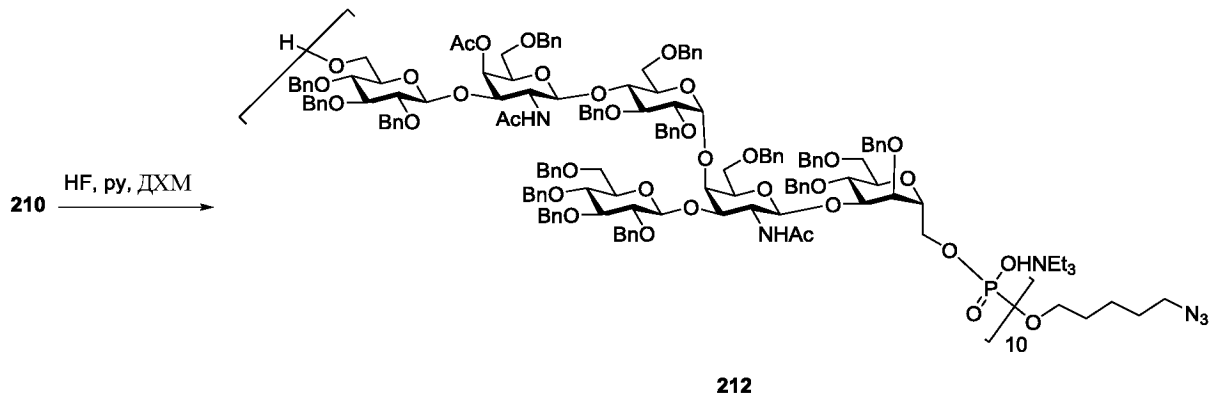
10

### Синтез соединения 211



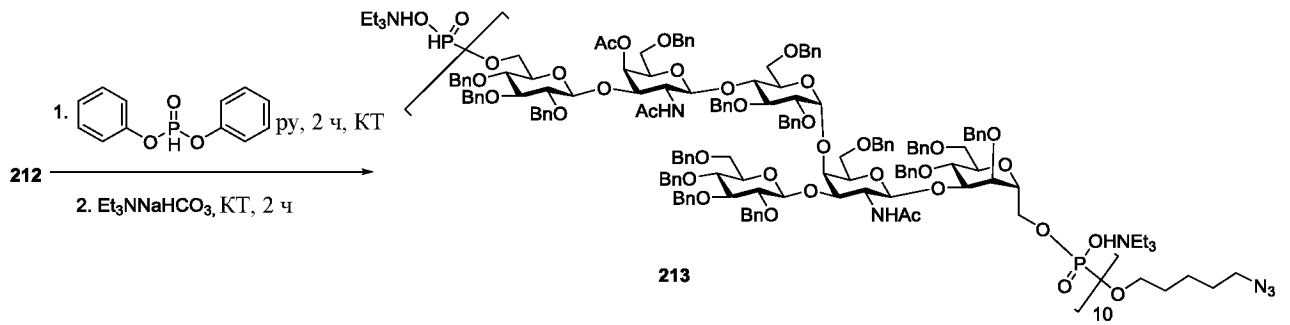
Соединение **211** синтезировали из соединения **210** как описано для соединения **33**.

## Синтез соединения 212



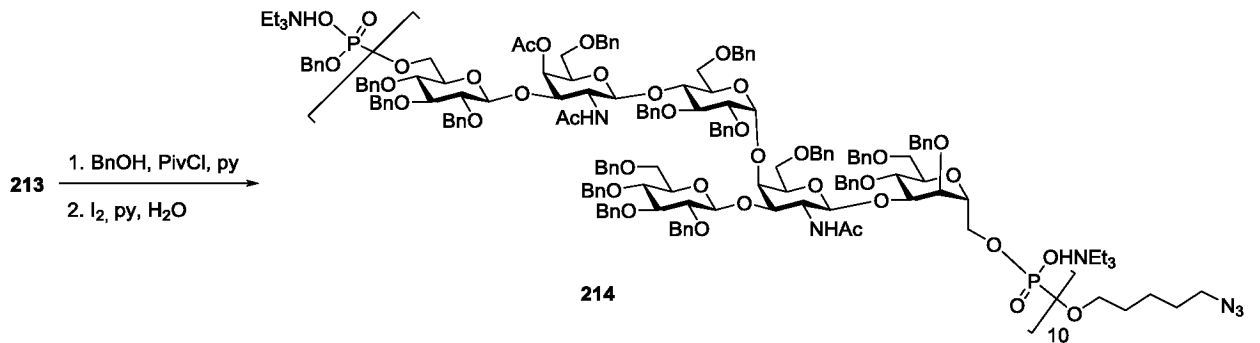
5 Методику, описанную для синтеза соединения **60**, использовали для синтеза соединения **212**.

## Синтез соединения 213

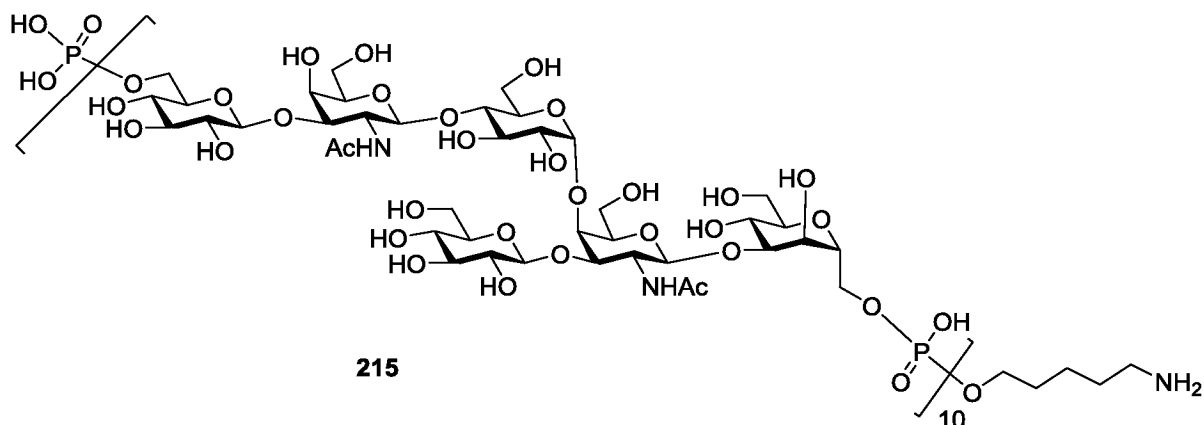


10 Методику, описанную для синтеза соединения **86**, использовали для синтеза соединения **213**.

## Синтез соединения 214



15 Методику, описанную для синтеза соединения **87**, использовали для синтеза соединения **214**.

**Синтез соединения 215**

Соединение **215** синтезировали из соединения **214**, как описано для соединения

5 54.

**В. Исследования стабильности****Расщепление фосфатной связи в соединении 33 с помощью NaOH**

10 Далее была протестирована и оценена стабильность соединений в соответствии с настоящим изобретением. Задача состояла в том, чтобы выяснить, насколько стабильны соединения 33, 54, 90, 92, 112, 117, 162, 163, 164, 165, 172 и 173 в условиях

15 составления. Для получения стабильности в Алгидрогеле, буфере PBS и воде соединение 33 обрабатывали 0,1 М гидроксидом натрия при комнатной температуре. В данном случае было обнаружено, что соединение 33 расщепляется очень медленно

20 только в очень основных условиях. Однако даже через 4 дня (10 мкг соединения 33 на 200 мкл) в этих жестких условиях расщеплялось только 50% соединения 33 и по-прежнему наблюдалось, что 50% соединения 33 оставались интактными на хроматограммах ВЭЖХ (Фиг. 6 и 7).

**20 Стабильность соединения 33 в Алгидрогеле в PBS, PBS и воде:**

Далее была тщательно исследована стабильность соединения 33 в условиях

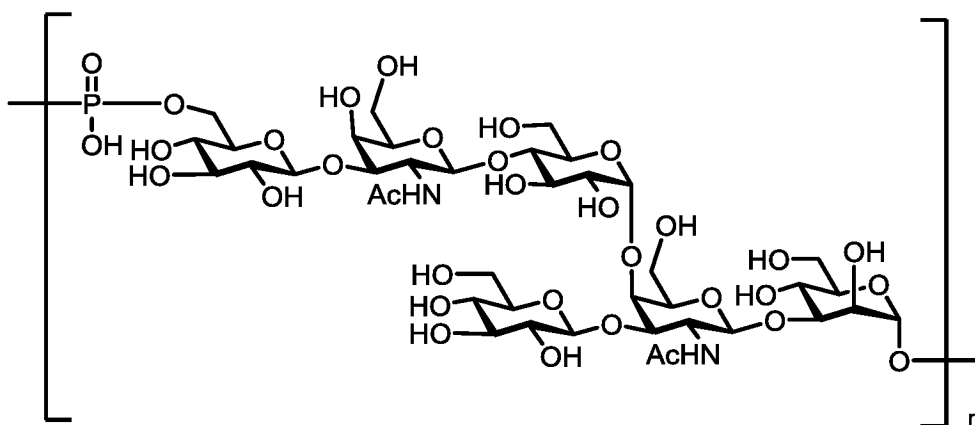
составления. Каждый сосуд для состава содержит 30 мкг соединения 33 в : i) Алгидрогеле в PBS или ii) только PBS или iii) воде (общий объем раствора составляет 500 мкл). NaPi используется в данном случае как синоним PBS. Для каждого

25 эксперимента использовали 60 мкл Алгидрогеля, содержащего 0,6 мг алюминия. Эти три приготовленных раствора выдерживали при 37°C, 25°C и 2-8°C в течение 14 дней.

Через каждые 24 ч по 50 мкл раствора из каждого сосуда i) Алгидрогеля в PBS, ii) только PBS и iii) воды при 37°C, 25°C и 2-8°C отбирали на аликвоты и анализировали с помощью ВЭЖХ (Фигуры 8, 9, 10). Из этих исследований очевидно, что соединение 33 стабильно во всем диапазоне температур от 2 °C до 37 °C. На Фигуре 8 показана стабильность при 2-8°C через 4 дня, на Фигуре 9 при 2-8°C через 14 дней, на Фигуре 10 при 25°C через 4 дня, на Фигуре 11 при 25°C через 14 дней, на Фигуре 12 при 37°C через 4 дня, на Фигуре 13 при 37°C через 14 дней.

По сравнению с природным полисахаридом PSII *Clostridium difficile* было обнаружено, что соединения 33, 54, 90, 92, 112, 117, 162, 163, 164, 165, 172 и 173 являются достаточно стабильными в условиях составления, описанных выше.

Также было обнаружено, что природный полисахарид PSII *Clostridium difficile*, состоящий из повторяющихся единиц гексагликозилфосфата, как показано ниже,



является нестабильным при обработке NaOH, нестабильным в кислотных условиях, таких как уксусная кислота, а также нестабильным в растворе при 2-8 °C, 25°C и 37°C. Было обнаружено, что в этих условиях природный ФСII быстро распадается до продуктов распада, которые больше не вызывают иммунологического эффекта.

Следовательно, эксперименты по стабильности, приведенные выше, недвусмысленно демонстрируют, что соединения в соответствии с настоящим изобретением являются стабильными в условиях, когда природный PSII распадается на фрагменты, больше не пригодные для использования в качестве вакцины, в то время как соединения, описанные в данном документе, являются стабильными в растворе и не требуют лиофилизации и повторного растворения, холодного хранения, и не требуют производства и отгрузки с применением дорогостоящей работающей системы холодильной цепи.

### **С. Биологические эксперименты**

#### **Анализ SDS-PAGE.**

Образцы смешивали в микроцентрифужной пробирке и нагревали в течение 5 мин при 95 °С на термоциклере. После охлаждения до комнатной температуры в течение 5 мин образцы в количестве приблизительно 2,5 мкг загружали в соответствующие лунки с 10% полиакриламидным гелем вместе с 10 мкл маркера. Образцы были испытаны при постоянном напряжении 120 В в течение 1 ч. Окрашивание проводили с использованием красителя GelCode™ Blue Safe Protein в соответствии с инструкциями производителя. Гели промывали деионизированной водой в течение ночи и сканировали с помощью системы документации гелей.

#### **Эксклюзионная хроматография (SEC) гликоконъюгатов.**

Гликоконъюгаты, используемые для исследований иммунизации, анализировали с помощью SEC для выявления разницы в массе между конъюгированным и неконъюгированным CRM-белком. Образцы разбавляли в 50 мМ Трис, 20 мМ NaCl, при значении pH 7,2, и прогоняли на системе ВЭЖХ Agilent 1100, снабженной колонкой Tosoh TSK G2000 (SWxl, 7,8 мм x 30 см, 5 мкм) и Tosoh TSKgel® Guard Column (SWxl 6,0 мм x 4 см, 7 мкм). Скорость потока поддерживали при 1 мл/мин.

#### **Получение гликоконъюгата**

Синтетические антигены PS-II *C. difficile* конъюгировали с белком-носителем CRM<sub>197</sub> для экспериментов по иммунизации и с бычьим сывороточным альбумином (BSA) в качестве покрывающего антигена для ELISA (см. А. Химический синтез). Полученные конъюгаты стерильно фильтровали с использованием 0,2 мкм мембранного фильтра перед использованием. Конъюгаты анализировали с помощью анализа MALDI. Загрузка сахара на белок-носитель была специально рассчитана путем вычитания массы между конъюгатом и неконъюгатом белка с использованием анализа MALDI. Содержание белков оценивали с использованием метода микро-BCA, следуя протоколу производства.

## Характеристика гликоконъюгатов 36 (33-CRM<sub>197</sub>), 56 (54-CRM<sub>197</sub>) и 94 (92-CRM<sub>197</sub>)

5 Антиген-гликоконъюгаты *C. difficile* 36, 56 и 94, использованные для исследований иммунизации, анализировали на эффективность конъюгирования и содержание антигена. Анализ MALDI-TOF MS гликоконъюгатов выявил хорошую эффективность конъюгирования. Разница в массе между конъюгированным и неконъюгированным белком CRM<sub>197</sub> приводила к загрузке приблизительно 7,5 (56) и приблизительно 5 (94) антигенов на молекулу CRM<sub>197</sub>.

10 Гликоконъюгаты также анализировали с помощью 10% SDS-PAGE и SEC, которые выявили явный сдвиг массы по сравнению с неконъюгированным белком CRM<sub>197</sub> (Фигуры 24 и 25).

### Исследования иммунизации

15 **Исследование I - Иммунологическая оценка полусинтетических гликоконъюгатов антигена PS-II *C. diff*, иммунизированных у кроликов.**

#### 1. Цель исследования:

Оценка ответа антител IgG у кроликов, иммунизированных вакциной 36 полусинтетического CRM<sub>197</sub> конъюгата антигена PS-II *C. diff*.

#### 20 2. Материалы:

- планшеты ELISA (высокое связывание, планшет EIA/RIA, 96-луночный, плоское дно с крышкой для низкого уровня испарения, компания: costar® 3361)
- Обнаружение антител: Конъюгат пероксидазы с козым анти-кроличьим IgG (Sigma, #A4914)
- 25 • Блокирующий раствор: 1 % FCS (об./об.) в PBS
- Разбавитель антител: PBS+1% BSA (масс./об.).
- Промывочный буфер: PBS+0.1% Tween 20 (PBS-T)
- Проявляющий раствор: 1 step<sup>TM</sup> Ultra TMB-ELISA проявитель. (ThermoScientific, Cat #: 34028)
- 30 • Останавливающий раствор: 2M серная кислота (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Считыватель планшетов: Anthos ht 2.
- Программное обеспечение: WinRead 2.36 для измерения оптической плотности и GraphPad Prism 7 для построения и анализа данных.



- Неполный адъювант Фрейнда (IFA). InvivoGen; Cat: vac-ifa-10, Batch#: IFA-39-03; Exp Dt: Sept 2019
- Набор для анализа QuantiPro™ BCA Assay Kit (SIGMA) Product: QPBCA-1KT; Lot#: SLBR7451V; Pcode: 1002296464

5

### 3. Методы:

#### Составление вакцин для иммунизации

Гликоконъюгат **36 PS-II** *C. difficile* был составлен в виде неполного адъюванта Фрейнда (IFA) для иммунизации кроликов. Неполный адъювант Фрейнда (IFA) от InvivoGen использовался для разработки вакцин для исследований иммунизации кроликов. Протокол соблюдался в соответствии с производством. Антиген: Концентрацию IFA поддерживали при соотношении 1: 1. Дозу антигена на одно животное поддерживали при 2,5 мкг/200 мкл/животное (100 мкл антигена + 100 мкл IFA). IFA при желаемом рассчитанном объеме (50% от конечного объема иммунизации) вносили в 15 мл стерильный флакон. Рассчитанное количество разбавленного раствора антигена (объем, доведенный PBS до 50% от конечного объема иммунизации) вносили в 3 мл стерильный шприц, снабженный иглой 20 G. Раствор DS добавляли в флакон, содержащий IFA, и немедленно встряхивали в течение 15 секунд (5X). Цвет состава изменяется от бледно-желтого до молочно-белого при встряхивании, что свидетельствует об образовании стабильной эмульсии. Полученный состав вакцины ненадолго встряхивали и аликвотировали в 2 мл стерильные пробирки с желаемыми объемами доз. Перед иммунизацией пробирки, содержащие составы вакцины, встряхивали и затем вводили животным.

25

#### График иммунизации

Иммунизацию кроликов проводили в определенных условиях, свободных от патогенов, и им давали пищу и воду *ad libitum*. Кроликов (n = 4) иммунизировали подкожно составами вакцины при объеме инъекции 200 мкл/кролика. Дозу антигена для кролика поддерживали при 2,5 мкг/животное антигена PS-II или соответствующего объема PBS для отрицательного контроля. Кроликов иммунизировали на 0, 14 и 35 день. На 0, 7 и 42 день брали кровь для определения титров антител.

30

**4. Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) сывороток с использованием планшетов, покрытых антигеном собственного производства**

**Покрывание планшетов антигеном**

Антиген-BSA конъюгаты использовали в качестве покрывающего антигена.

- 5 Антиген-BSA конъюгаты растворяли при концентрации 5 мкг/мл в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) при значении pH 7,4. Покрывали 100 мкл на лунку и инкубировали в течение ночи при 4 °С, чтобы получить концентрацию антигена 0,5 мкг/лунку.

10 **Промывка**

После адсорбции антигена в течение ночи планшеты промывали 1 раз посредством PBS-T (200 мкл/лунку) и избыток жидкости на лунку удаляли, перевернув планшет и постукивая по чистому сухому тканевому полотенцу.

15 **Блокировка**

Планшеты блокировали с использованием 200 мкл коммерческого блокирующего раствора и инкубировали 2 ч при КТ.

**Промывка**

- 20 После блокировки планшеты промывали 3 раза PBS-T (200 мкл/лунку) и избыток жидкости на лунку удаляли, перевернув планшет и постукивая по чистому сухому тканевому полотенцу.

**Разбавление сывороток и инкубация**

- 25 Смешанные сыворотки (n = 4 кролика) из разных временных точек различных экспериментальных групп разбавляли до их соответствующих разведений в разбавителе антител (PBS + 1% BSA). 100 мкл разбавленных образцов сывороток из различных экспериментальных групп добавляли в дубликатах в соответствующие лунки и инкубировали на шейкере при 250 об/мин в течение 2 ч при КТ. 100 мкл/лунку
- 30 разбавителя антител (PBS + 1% BSA) составляли бланк эксперимента. После инкубации с сывороткой планшеты промывали 4 раза PBS-T (200 мкл/лунку), и избыток жидкости на лунку удаляли, переворачивая планшет и постукивая по чистому сухому тканевому полотенцу.

### **Инкубация (обнаружение антител)**

Соответствующее детектирующее антитело, HRP конъюгат с анти-кроличьим IgG разбавляли в соотношении 1: 10 000 в разбавителе антител (PBS + 1% BSA) и добавляли 100 мкл/лунку и инкубировали на шейкере при 250 об/мин в течение 1 часа при КТ. После инкубации с детектирующими антителами планшеты промывали 5 раз посредством PBS-T (200 мкл/лунку), и избыток жидкости на лунку удаляли, переворачивая планшет и постукивая по чистому сухому тканевому полотенцу.

### **Добавление субстрата**

В каждую лунку добавляли 100 мкл готового к применению субстрата ТМВ (нормализованного до КТ от 4°C) и инкубировали в темноте в течение 15 мин. Синюю окраску ферментативной реакции прекращали добавлением 50 мкл/лунку 2М раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, в результате чего получали раствор желтого цвета. Абсорбцию окрашенного в желтый цвет раствора измеряли при 450 нм с помощью планшет-ридера.

### **Результаты**

Значения абсорбции анализировали путем построения графика с использованием программного обеспечения Graphpad Prism.

Данные ELISA ясно показывают, что сыворотка из иммунизированных конъюгата 36 PS-II *C. difficile* кроликов, распознает соответствующие антигены (см. Фиг. 15).

### **Исследование II - Иммунологическая оценка полусинтетических гликоконъюгатов антигена PS-II *C. diff*, иммунизированных у кроликов и мышей**

#### **1. Цель исследования:**

Оценка ответа антител IgG у кроликов и мышей, иммунизированных вакцинами 56 и 94 полусинтетического CRM<sub>197</sub> конъюгата антигена PS-II *C. diff*.

#### **2. Материалы:**

- планшеты ELISA (высокое связывание, планшет EIA/RIA, 96-луночный, плоское дно с крышкой для низкого уровня испарения, компания: costar® 3361)

- Обнаружение антител: Конъюгат пероксидазы с козьим анти-кроличьим IgG (Sigma, #A4914) и античеловеческие IgG (H + L) -HRP, Nordic Immunology, Lot#:6276
- Блокирующий раствор: Roche, Ref: 11112589001; Lot: 21495200, Exp.Dt: июль 2019.
- Разбавитель антител: PBS+1% BSA (масс./об.)
- Промывочный буфер: PBS+0.1% Tween 20 (PBS-T)
- Проявляющий раствор: 1 step™ Ultra TMB-ELISA проявитель. (ThermoScientific, Cat #: 34028)
- Останавливающий раствор: 2M серная кислота (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Считыватель планшетов: Anthos ht 2
- Программное обеспечение: WinRead 2.36 for absorbance measurements и GraphPad Prism 7 для построения и анализа данных
- Alum: Адъювант гель гидроксида алюминия (Алгидрогель 2%), Brenntag, Batch #:5447 Exp Dt: Feb 2020
- Набор для анализа QuantiPro™ BCA Assay Kit (SIGMA) Product: QPBCA-1KT; Lot#: SLBR7451V; Pcode: 1002296464
- Mini-PROTEAN® TGX™ Gels- 10 %, 10 лунок (30 мкл/лунку) Контроль №:64175708
- Precision Plus Dual Color, Cat: 1610374; Контроль №: 641798899
- Gel Code™ Blue Safe Protein Stain; ThermoScientific; Ref: 1860957; Lot#: TA260266
- Планшеты для ELISA с покрытием *C.diff* для штаммов 630 (tgc BIOMICS Lot#: 630-43411) и R20291 (tgc BIOMICS Lot#: R20291-43559) Exp.Dt: 05/2020.
- *C.diff*-положительная плазма пациента.

### 3. Методы

#### 30 Составление вакцин для иммунизации в адъюванте гидроксида алюминия (Alum)

Все составы были приготовлены в стерильных условиях. Гликоконъюгаты 56 и 94 (лекарственные вещества; DS) и PBS смешивали в соответствующем предварительно рассчитанном соотношении в пробирке Falcon™ объемом 50 мл, который

соответствует окончательному объему состава, без учета необходимого объема Alum (0,25 мг/мл). Это образовывало смесь DS-PBS. Дозу антиген/DS в перерасчете на животное поддерживала при 2,5 мкг/500 мкл/животное или 10 мкг/500 мкл/животное (исследования на кроликах) или 0,5 мкг/100 мкл/животное или 2 мкг/100 мкл/животное (исследования на мышах). Смеси DS-PBS осторожно перемешивали (5X) с помощью серологической пипетки. К смесям DS-PBS добавляли соответствующий объем исходного Alum (10 мг/мл), чтобы получить конечное соотношение Alum 1:40 или 0.250 мг/мл. Смеси немедленно смешивали осторожным пипетированием (20X) с использованием серологической пипетки объемом 5 мл. Пробирки Falcon™ закрывали крышками, оборачивали Parafilm® и позволяли перемешаться на шейкере при 250 об/мин в течение 2 ч при комнатной температуре (КТ). После инкубации в течение 2 ч составы помещали на чистый стол, делили на аликвоты и хранили при 4 °С до дальнейшего использования. Гликоконъюгаты, в составе Alum, характеризовали для определения конечной концентрации Alum и pH составов.

#### **График иммунизации**

Иммунизацию мышей и кроликов проводили в определенных условиях, свободных от патогенов, и им давали пищу и воду *ad libitum*. Мышей (n=7 или 8 в перерасчете на испытываемую группу) и кроликов (n=4 в перерасчете на испытываемую группу) иммунизировали подкожно составами вакцины при объеме инъекции 100 мкл/мышь, и 500 мкл/кролика с разными дозами антигена. Мышей иммунизировали на 0, 14 и 28 день, кровь собирали на 21 и 35 день. Кроликов иммунизировали на 0, 14, 28 и 77 день, а кровь собирали на 0, 7, 21, 35, 77 и 84 день. Сыворотка была приготовлена из образцов крови для анализа сывороточных антител.

#### **4. Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) сывороток с использованием планшетов, покрытых антигеном собственного производства**

##### **Покрытие планшетов антигеном:**

Конъюгаты 54-BSA и 92-BSA использовали в качестве покрывающих антигенов. Соответствующие конъюгаты разбавляли до концентрации 5 мкг/мл в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS), pH 7,4. Покрывали 100 мкл на лунку и инкубировали в течение ночи при 4 °С, чтобы получить концентрацию антигена 0,5 мкг/лунку. Для нанесения покрытия на выделенный полисахарид PS-II полисахарид

разбавляли до 50 мкг/мл в PBS посредством 10 мМ имидазола и наносили 100 мкл на лунку при 50 °С в течение 5 часов.

#### **Промывка**

- 5 После адсорбции антигена планшеты промывали 1 раз посредством PBS-T (200 мкл/лунку) и избыток жидкости на лунку удаляли, перевернув планшет и постукивая по чистому сухому тканевому полотенцу.

#### **Блокировка**

- 10 Планшеты блокировали с использованием 200 мкл коммерческого блокирующего раствора и инкубировали 2 ч при КТ.

#### **Промывка**

- 15 После блокировки планшеты промывали 3 раза PBS-T (200 мкл/лунку) и избыток жидкости на лунку удаляли, перевернув планшет и постукивая по чистому сухому тканевому полотенцу.

#### **Разбавление сывороток и инкубация**

- 20 Смешанные сыворотки (n = 4 кролика или n = 7-8 мышей/группу) из разных временных точек различных экспериментальных групп разбавляли до их соответствующих разведений в разбавителе антител (PBS + 1% BSA). 100 мкл разбавленных образцов сывороток из различных экспериментальных групп добавляли в дубликатах в соответствующие лунки и инкубировали на шейкере при 250 об/мин в течение 2 ч при КТ. Для проведения конкурентных экспериментов ELISA разбавленные сыворотки инкубировали на льду в течение 30 мин с 10 или 50 мкг выделенного полисахарида PS-II или с PBS перед добавлением в планшеты для ELISA. 100 мкл/лунку разбавителя антител (PBS + 1% BSA) составляли бланк эксперимента. После инкубации с сывороткой планшеты промывали 4 раза PBS-T (200 мкл/лунку), и избыток жидкости на лунку удаляли, переворачивая планшет и постукивая по чистому сухому тканевому полотенцу.
- 30

#### **Инкубация с обнаружением антител**

Соответствующее детектирующее антитело, HRP конъюгат с анти-кроличьим или анти-мышинным IgG HRP разбавляли в соотношении 1: 10 000 в разбавителе антител

(PBS + 1% BSA) и добавляли 100 мкл/лунку и инкубировали на шейкере при 250 об/мин в течение 30 мин при КТ. После инкубации с детектирующим антителом планшеты промывали 5 раз посредством PBS-T (200 мкл/лунку), и избыток жидкости на лунку удаляли, переворачивая планшет и постукивая по чистому сухому тканевому полотенцу.

#### **Добавление субстрата**

В каждую лунку добавляли 100 мкл готового к применению ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) субстрата (нормализованного до КТ от 4°C) и инкубировали в темноте в течение 15 мин. Синюю окраску ферментативной реакции прекращали добавлением 50 мкл/лунку 2М раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, в результате чего получали раствор желтого цвета. Абсорбцию окрашенного в желтый цвет раствора измеряли при 450 нм с помощью планшет-ридера.

#### **15 Результаты**

Значения абсорбции анализировали путем построения графика с использованием программного обеспечения Graphpad Prism.

#### **20 5. Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) сывороток с использованием коммерческих планшетов с предварительно нанесенным покрытием**

Эта процедура была идентична описанному выше протоколу ELISA, за исключением того, что стадия покрытия была опущена.

#### **Результаты:**

Сывороточный IgG из иммунизированных кроликов распознает иммуноген (Фигура 20), выделенный полисахарид PS-II (Фигуры 19В и 19С) и штаммы *C. difficile* 630 (Фигуры 16 и 17), R20291 (Фигура 18) и VPI10463 (Фигура 19А). Сывороточный IgG из иммунизированных мышей распознает соответствующие иммуногены (Фигура 23) и штаммы *C. difficile* 630 (Фигура 21) и R20291 (Фигура 22).

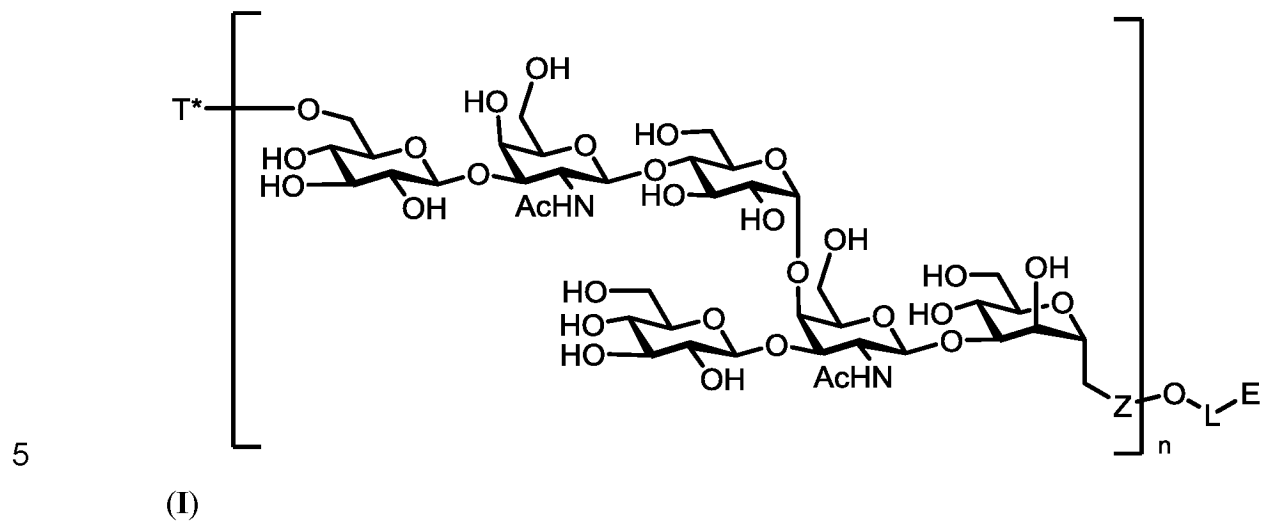
Приведенные в данном документе данные демонстрируют, что после иммунизации конъюгатом в соответствии с настоящим изобретением, особенно конъюгатами 56 и 94, функциональные антитела к олигосахаридам в соответствии с настоящим изобретением, а также к природному полисахариду PS-II *C. difficile*,  
5 выделенному и на поверхности бактерии, были выявлены у кроликов и мышей. Эти данные указывают на способность этих антител обеспечивать защиту от инфекций, вызванных *C. difficile*.

Данные ELISA дополнительно доказывают, что конъюгаты в соответствии с настоящим изобретением являются иммуногенными и индуцируют высокие титры  
10 антител. Следовательно, анализ ELISA показывает, что сахараиды в соответствии с настоящим изобретением являются иммуногенными у кроликов и мышей и генерируют перекрестно-реакционноспособные антитела.



## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сахарид общей формулы (I)



где

$n$  представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

10  $T^*$ — представляет собой H— или фосфатную группу;

$Z$  представляет собой



$L$  представляет собой линкер; и

$E$  представляет собой  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{N}_3$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{O}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ,  $-\text{Br}$ ,  $-\text{Cl}$ ,  $-\text{I}$ ,  $-\text{CO}_2\text{R}'$ ,  $-\text{CONH}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{OH}$  или  $-\text{SAc}$ ;

15  $R'$  представляет собой  $-\text{H}$ ,  $-\text{Me}$ ,  $-\text{Et}$ , 4-нитрофенил, пентафторфенил, или  $N$ -сукцинимидил;

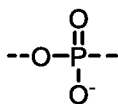
или его диастереоизомер или фармацевтически приемлемая соль.

2. Сахарид по п. 1, где  $T^*$ — представляет собой фосфатную группу.

20

3. Сахарид по п. 1 или п. 2,

где **Z** представляет собой



4. Сахарид по любому из пп. 1 - 3, где

$\text{-L-}$  представляет собой  $\text{-L}^{\text{a-}}$ ,  $\text{-L}^{\text{a-L}^{\text{e-}}}$ ,  $\text{-L}^{\text{a-L}^{\text{b-L}^{\text{e-}}}}$ , или  $\text{-L}^{\text{a-L}^{\text{d-L}^{\text{e-}}}$ ;

$\text{-L}^{\text{a-}}$  представляет собой  $\text{-(CH}_2\text{)}_o\text{-}$ ,  $\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_o\text{-C}_2\text{H}_4\text{-}$ , или  $\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_o\text{-}$

5  $\text{CH}_2\text{-}$ ;

$\text{-L}^{\text{b-}}$  представляет собой  $\text{-O-}$ ;

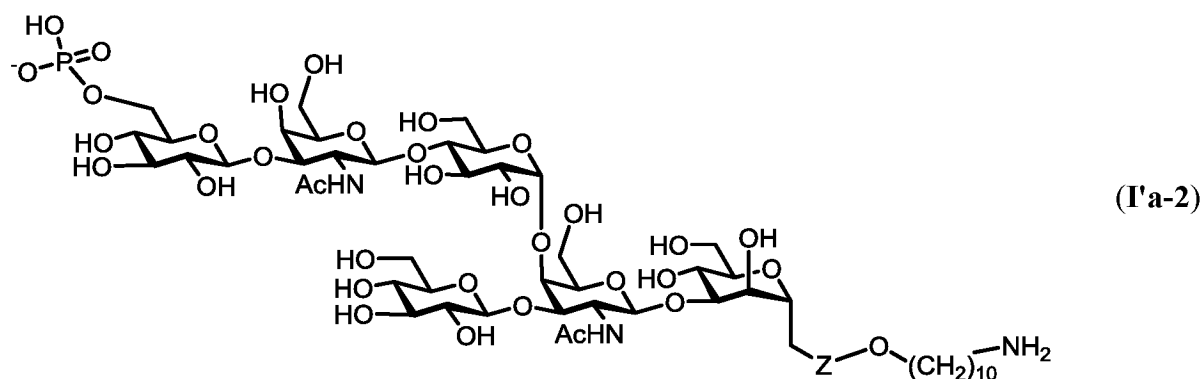
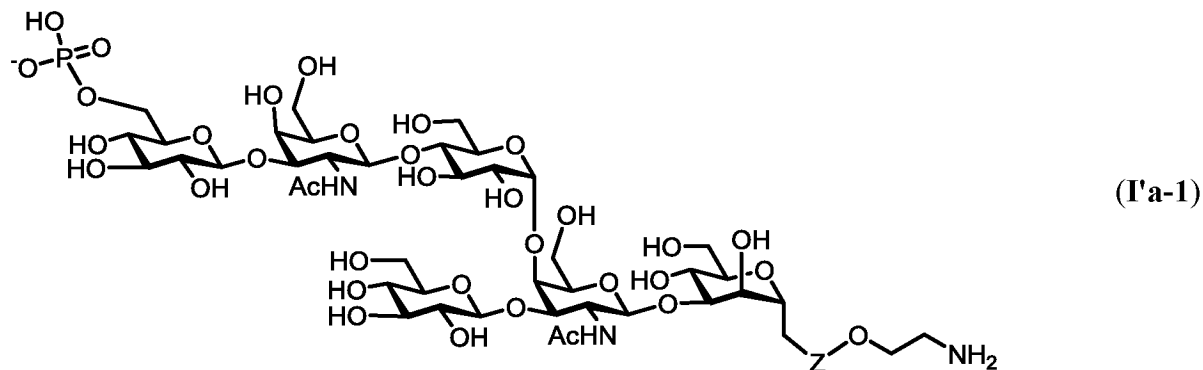
$\text{-L}^{\text{d-}}$  представляет собой  $\text{-(CH}_2\text{)}_q\text{-}$ ,  $\text{-(CH(OH))}_q\text{-}$ ,  $\text{-(CF}_2\text{)}_q\text{-}$ ,  $\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_q\text{-C}_2\text{H}_4\text{-}$ , или  $\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_q\text{-CH}_2\text{-}$ ;

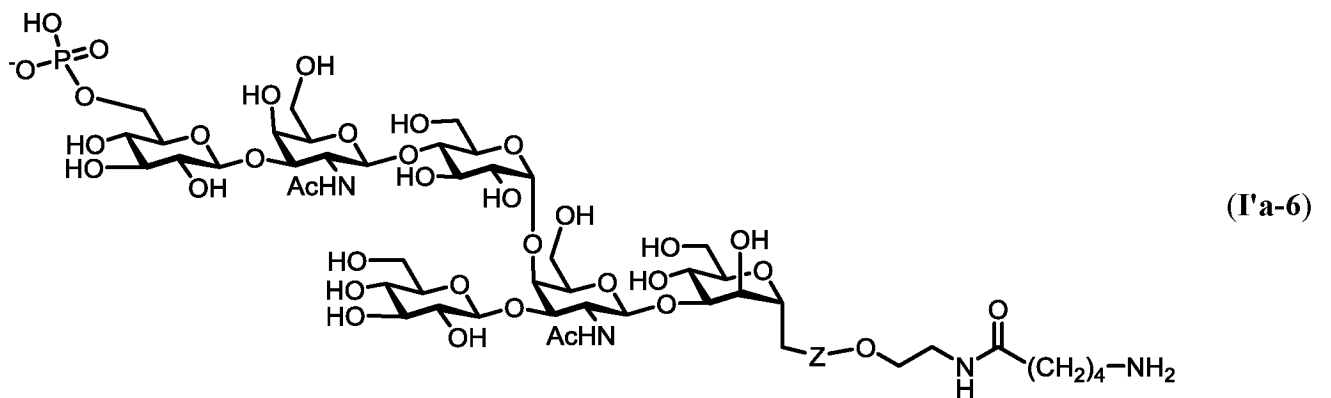
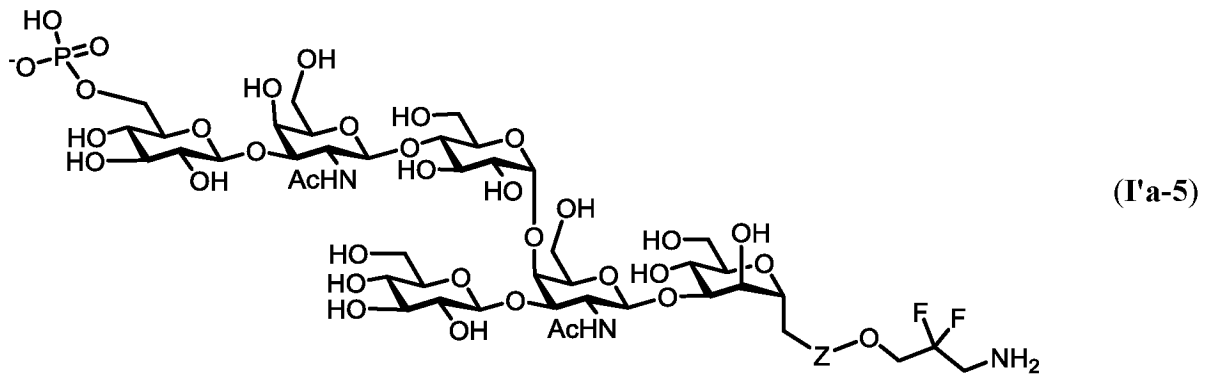
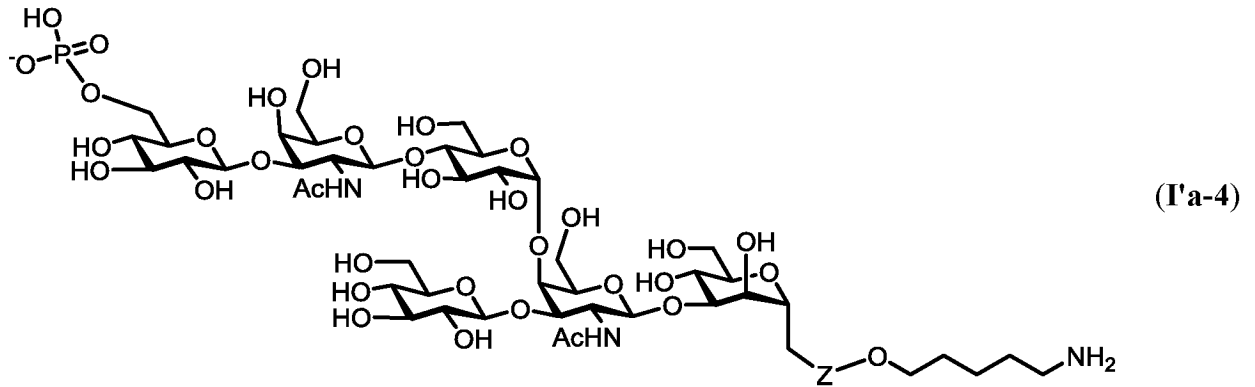
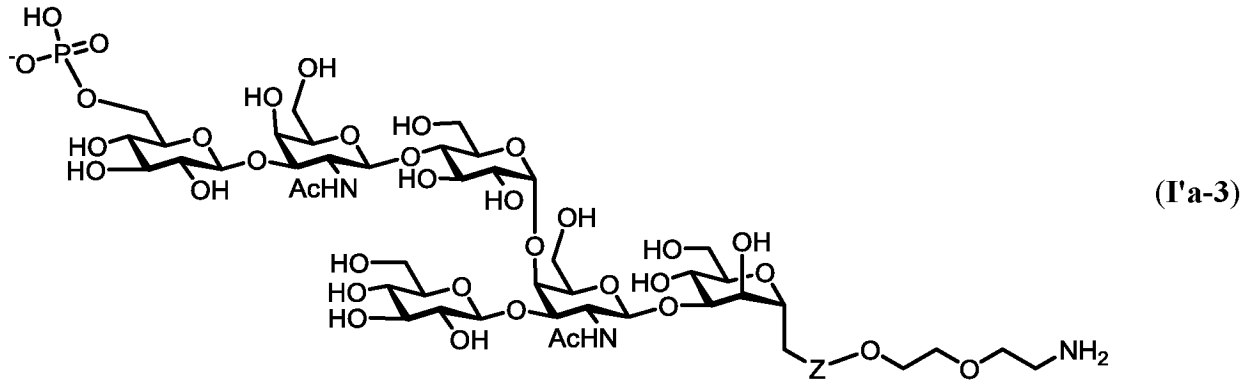
$\text{-L}^{\text{e-}}$  представляет собой  $\text{-(CH}_2\text{)}_{p1}\text{-}$ ,  $\text{-(CF}_2\text{)}_{p1}\text{-}$ ,  $\text{-C}_2\text{H}_4\text{-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_{p1}\text{-}$ ,

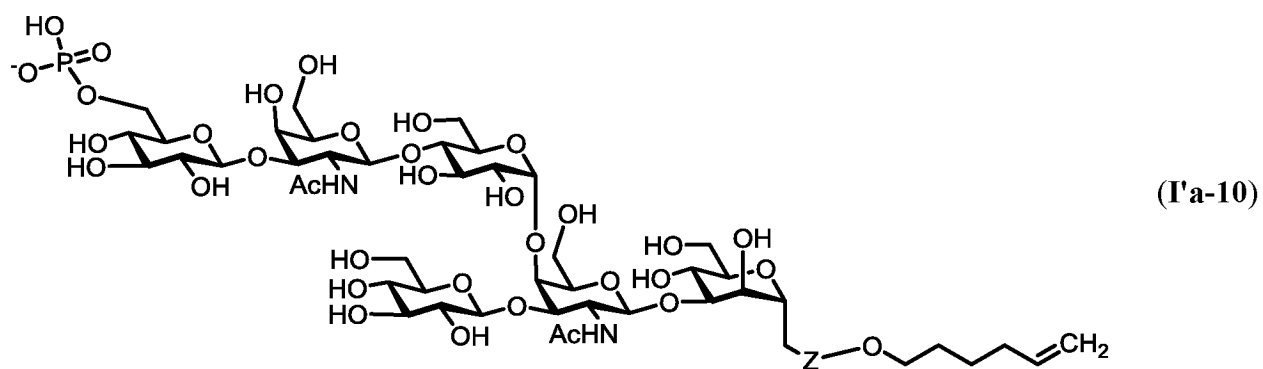
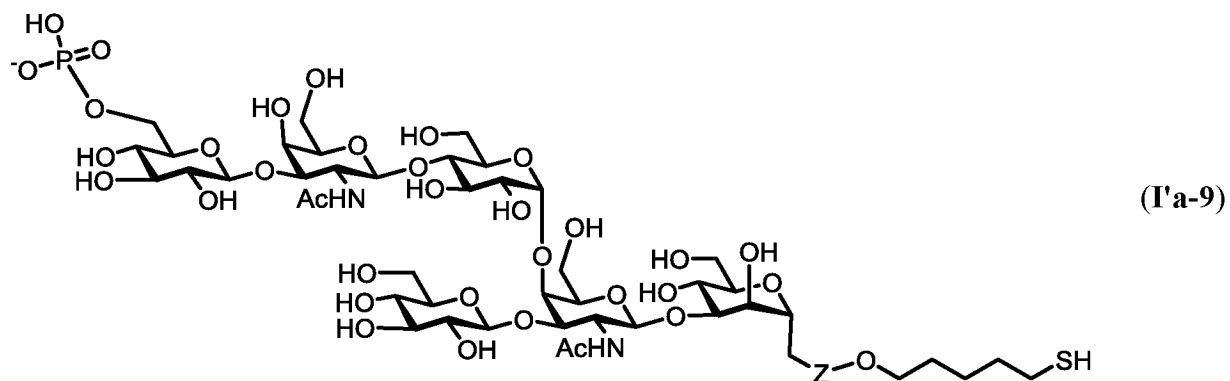
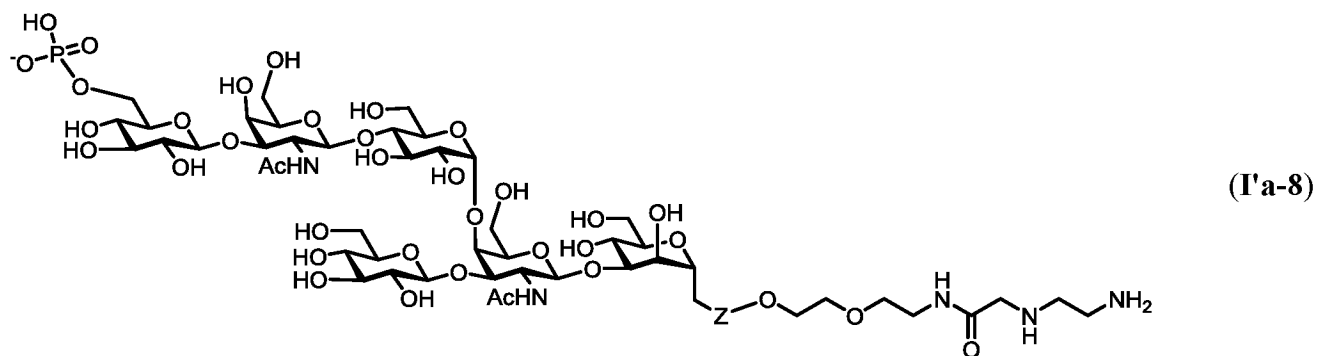
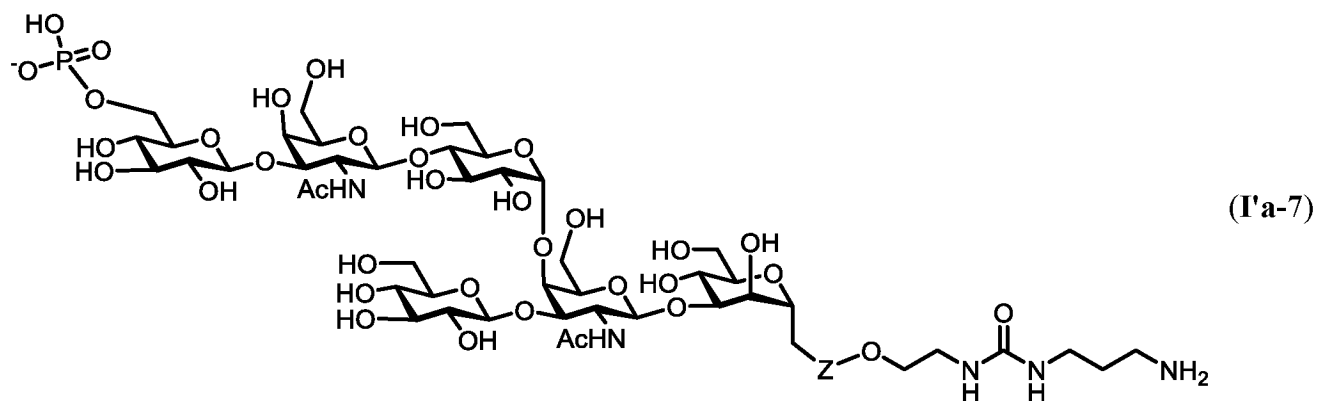
10  $\text{-CH}_2\text{-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_{p1}\text{-}$  или  $\text{-(CH}_2\text{)}_{p1}\text{-O-(CH}_2\text{)}_{p2}\text{-}$ ; и

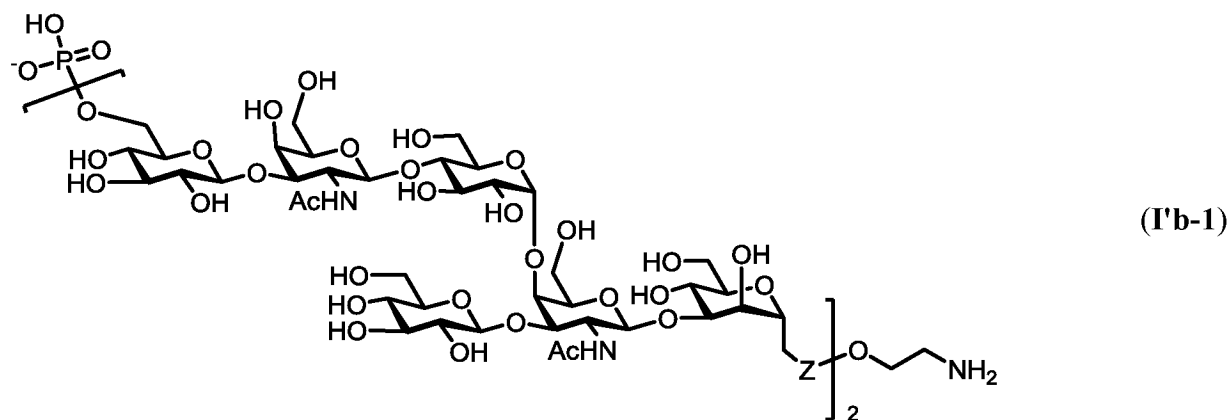
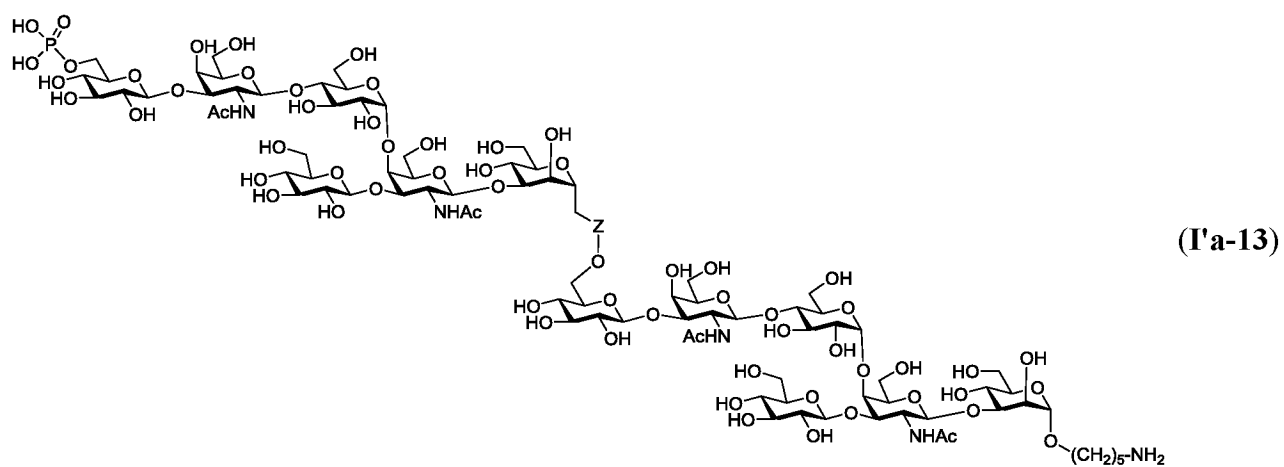
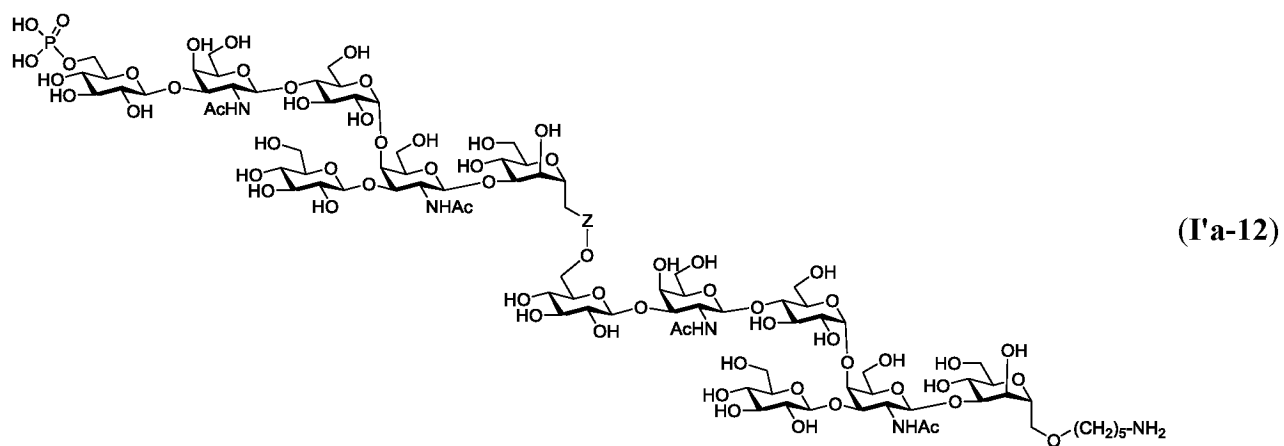
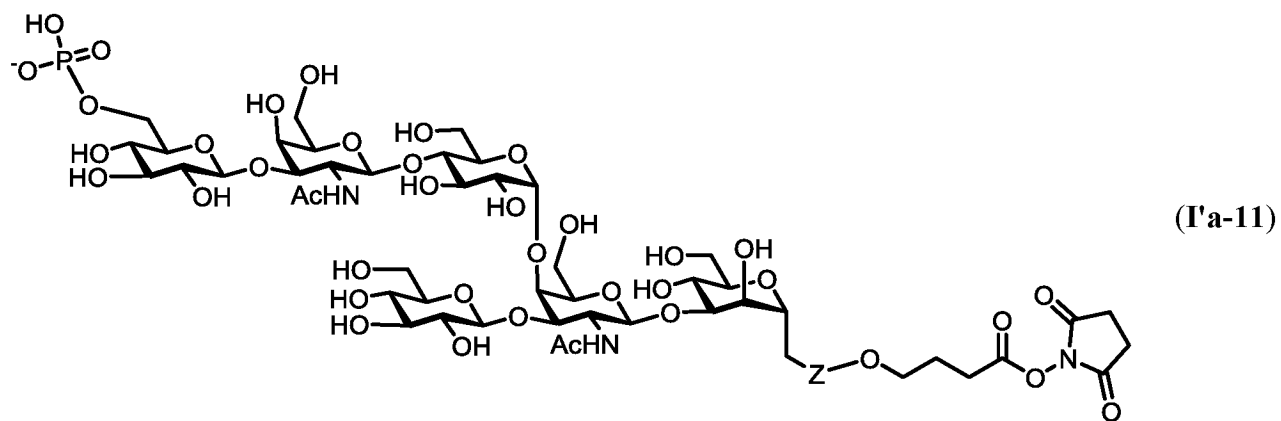
**o**, **q**, **p1** и **p2** представляют собой независимо друг от друга целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, и 6.

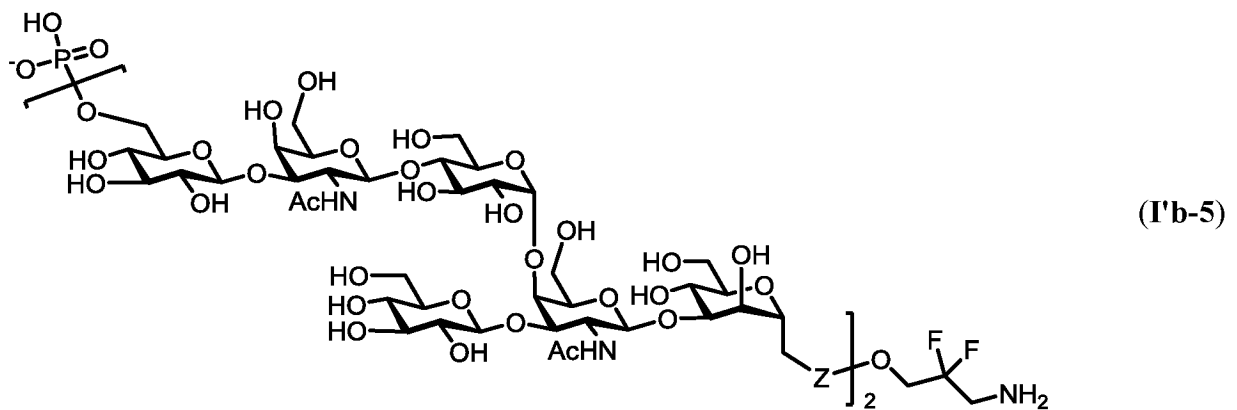
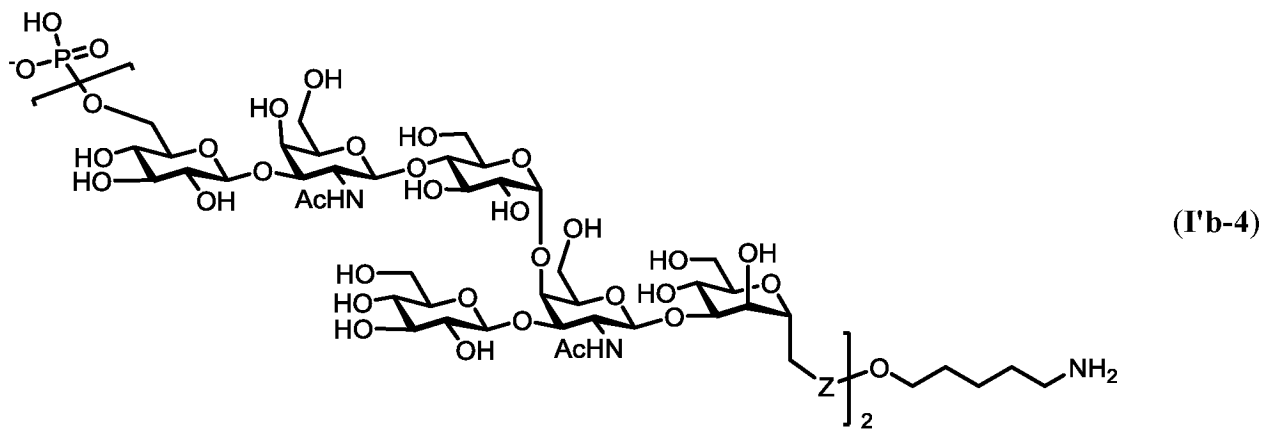
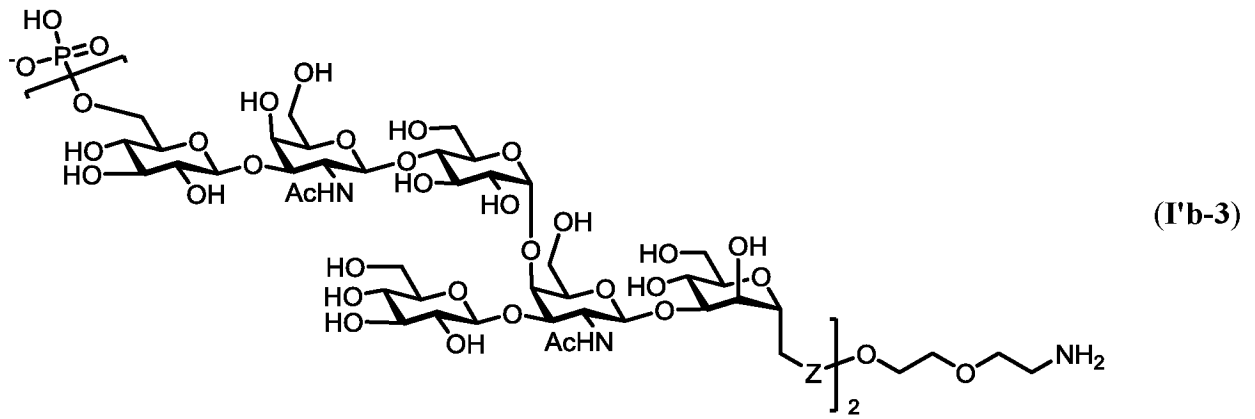
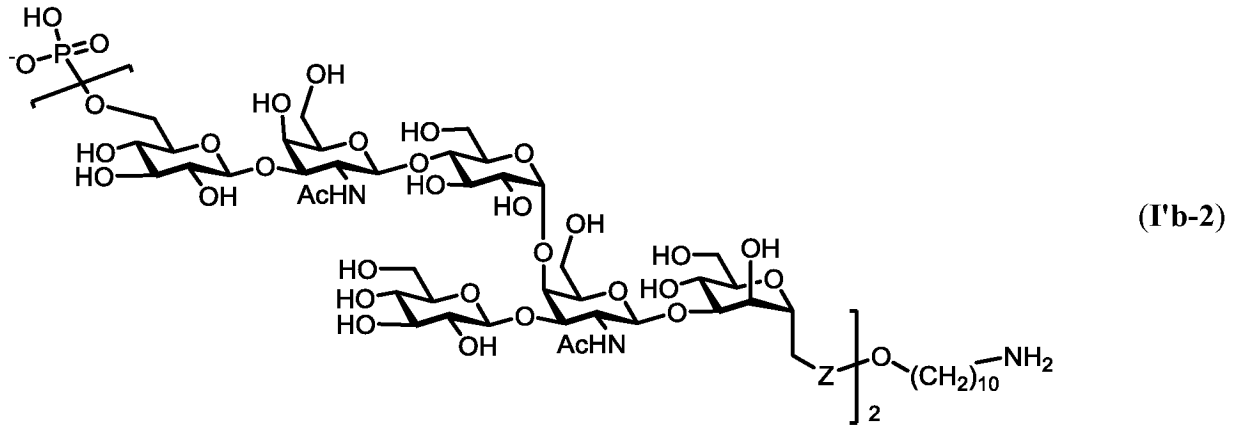
5. Сахарид по п. 1, выбранный из группы, которая состоит из:

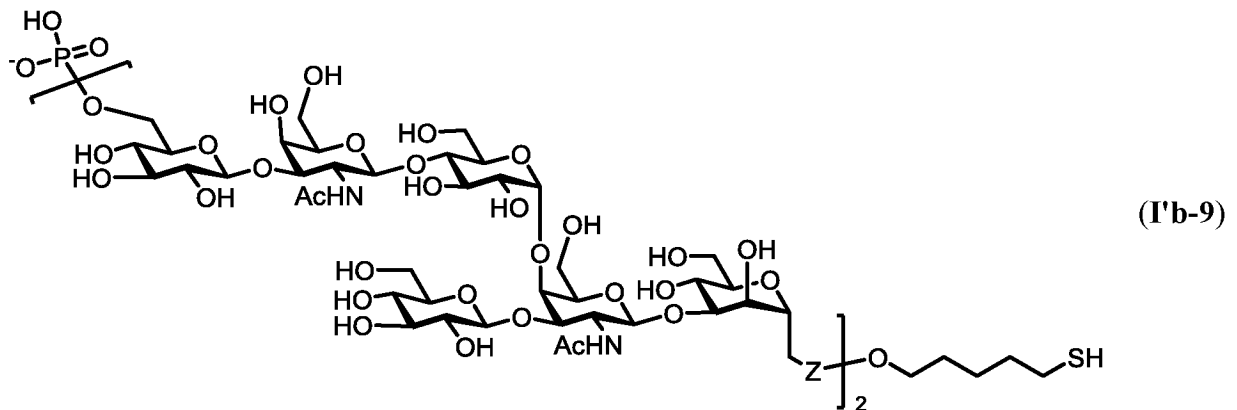
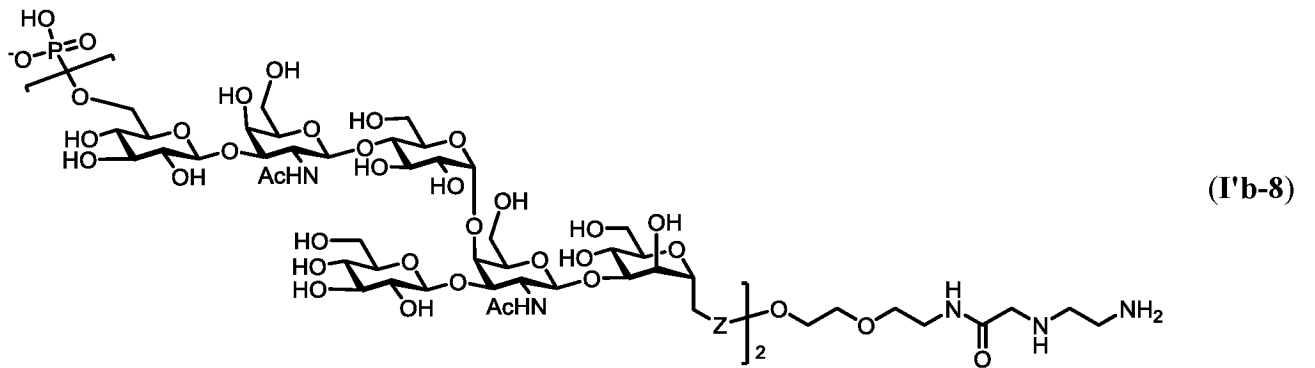
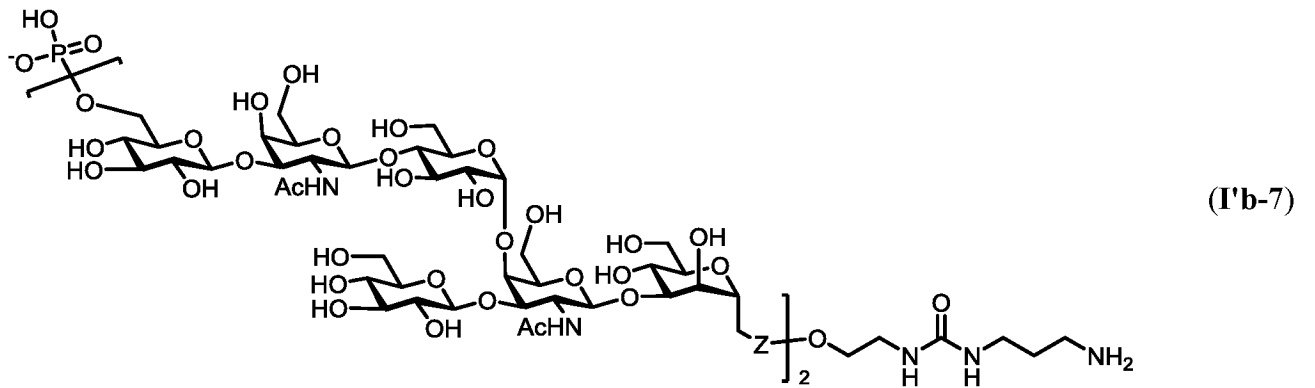
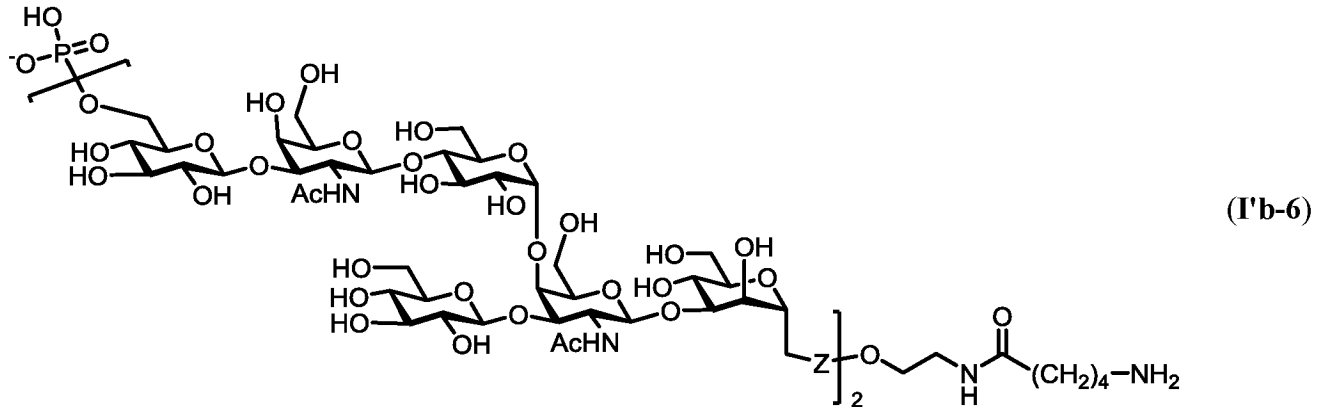


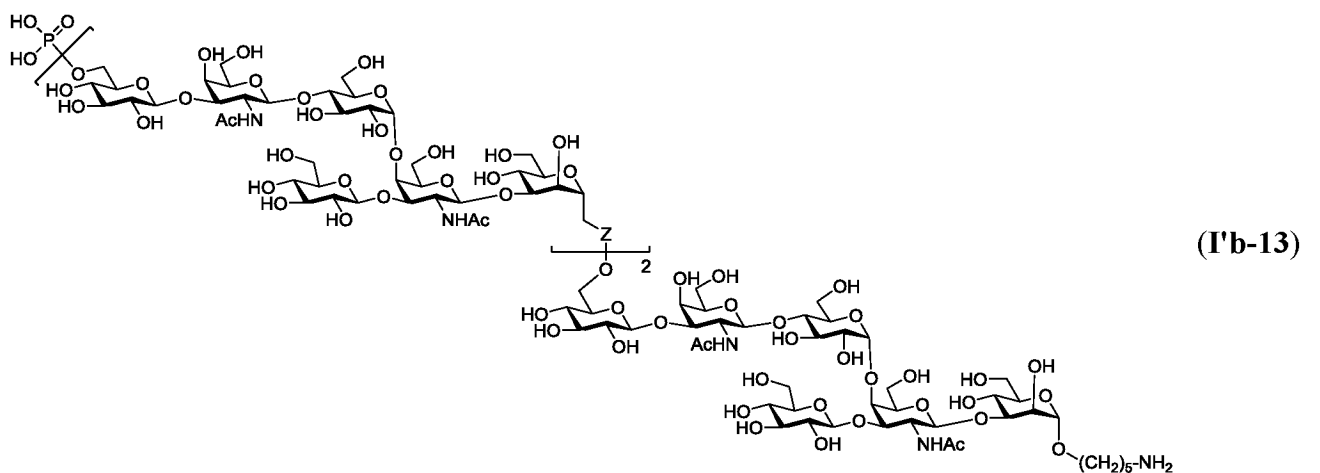
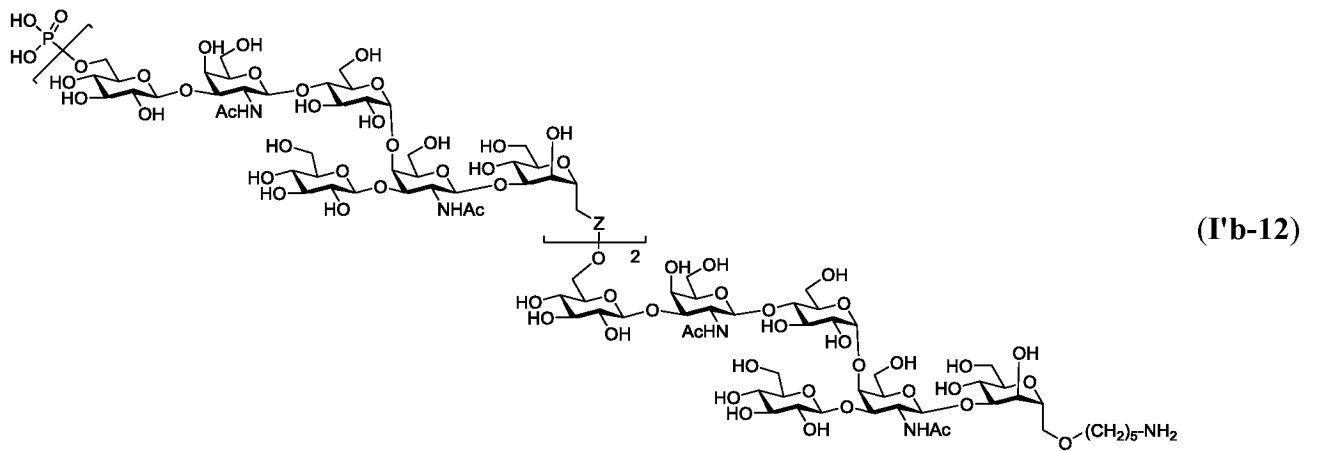
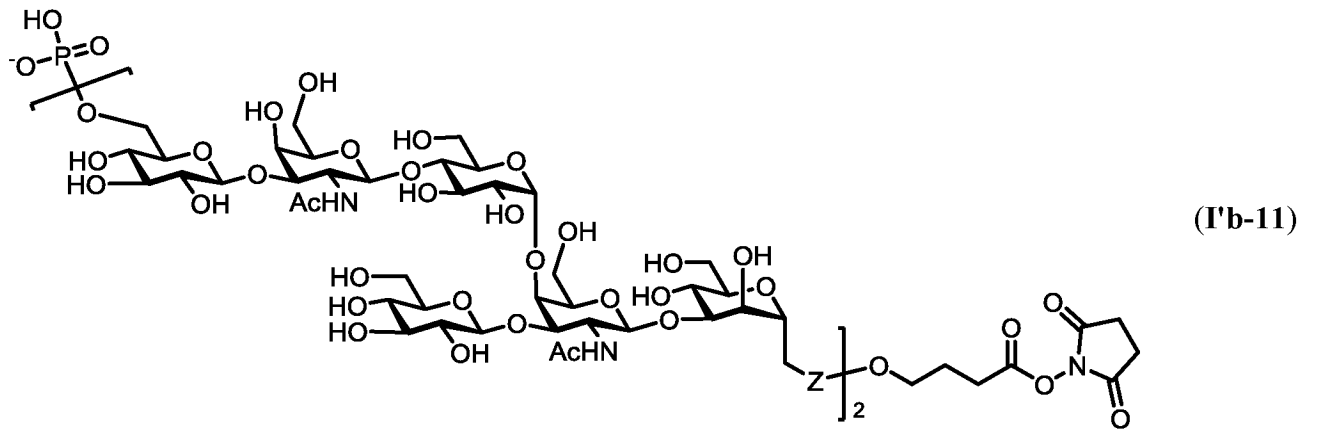
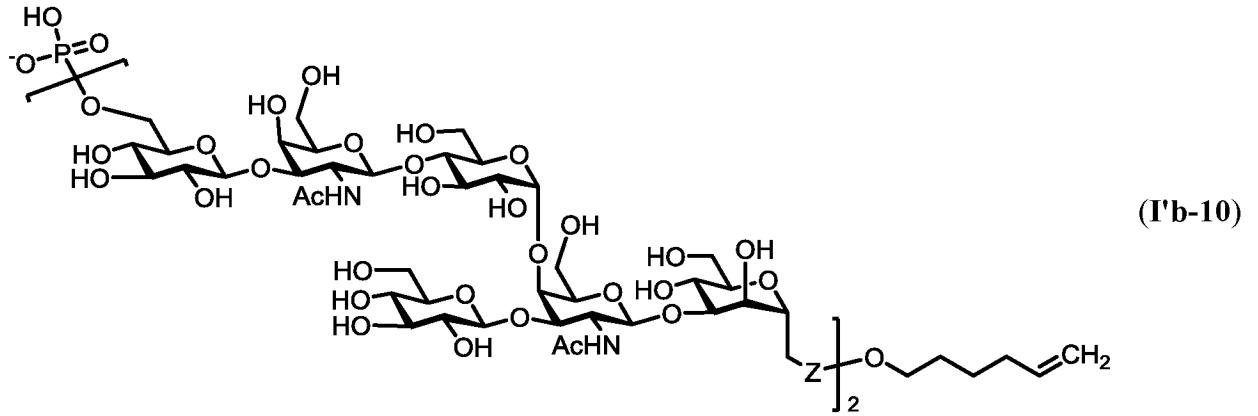




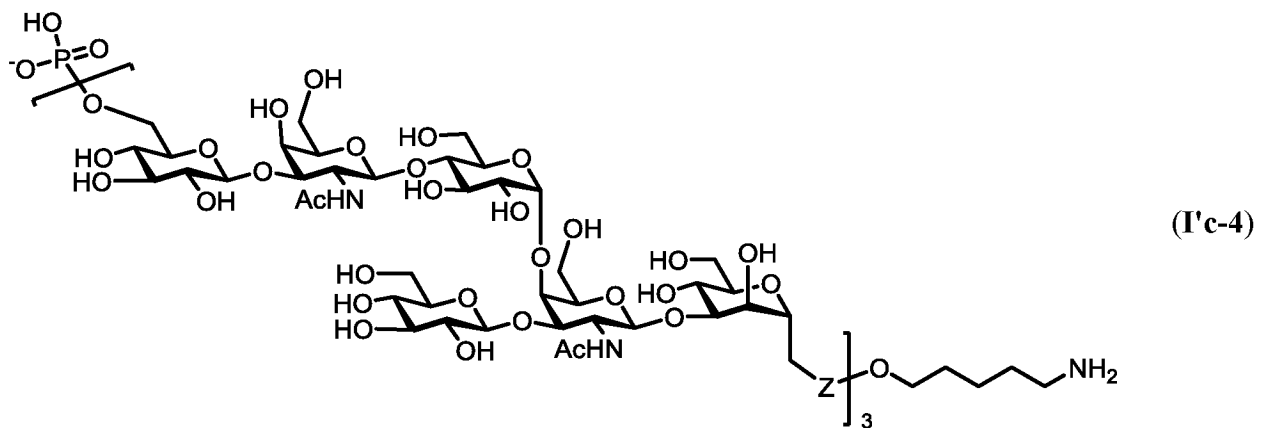
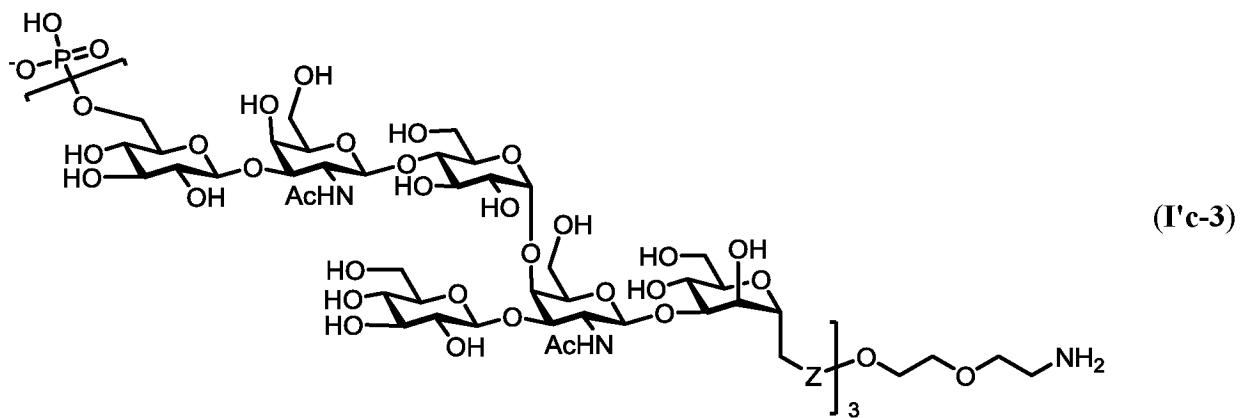
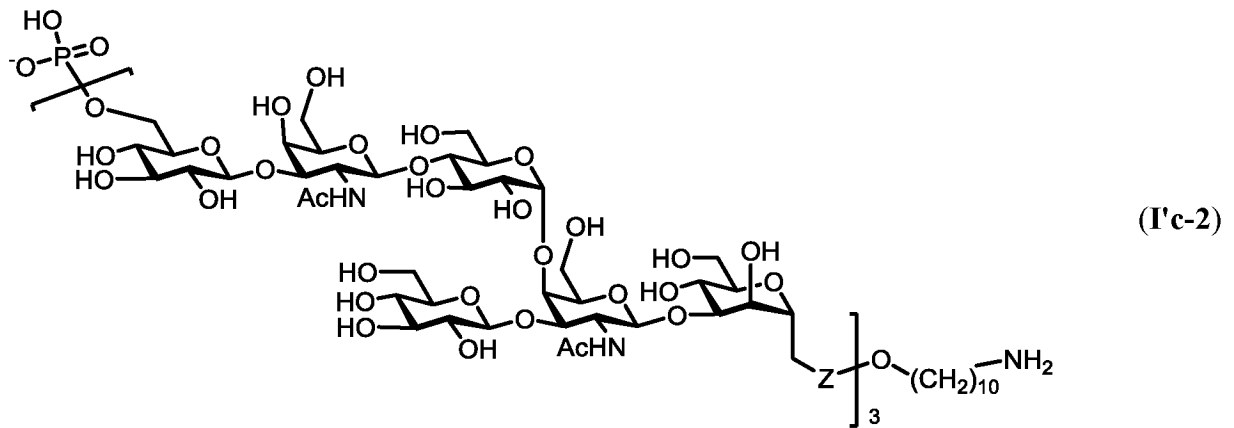
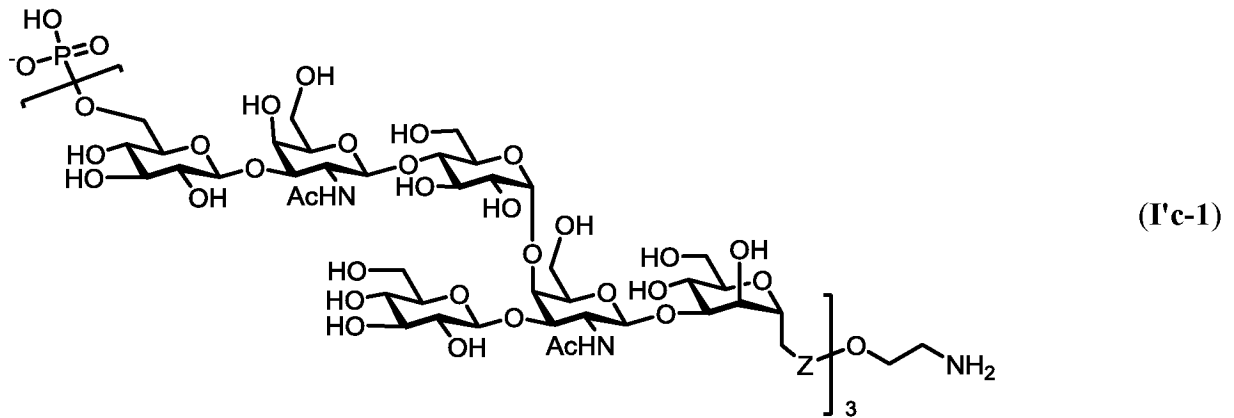


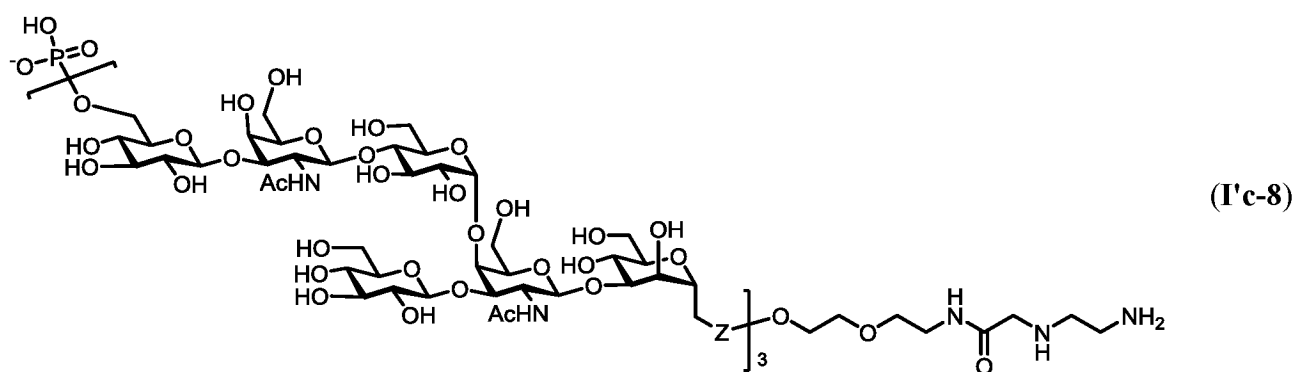
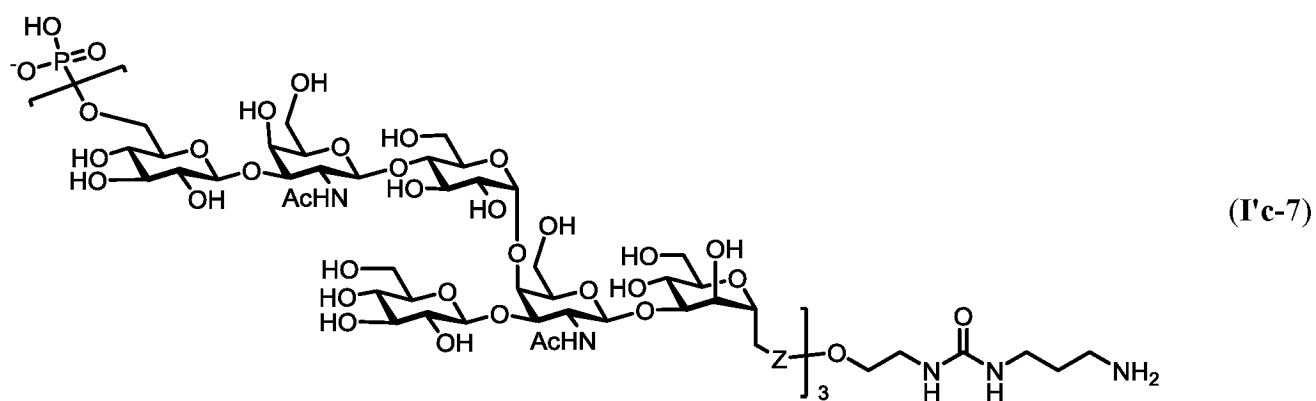
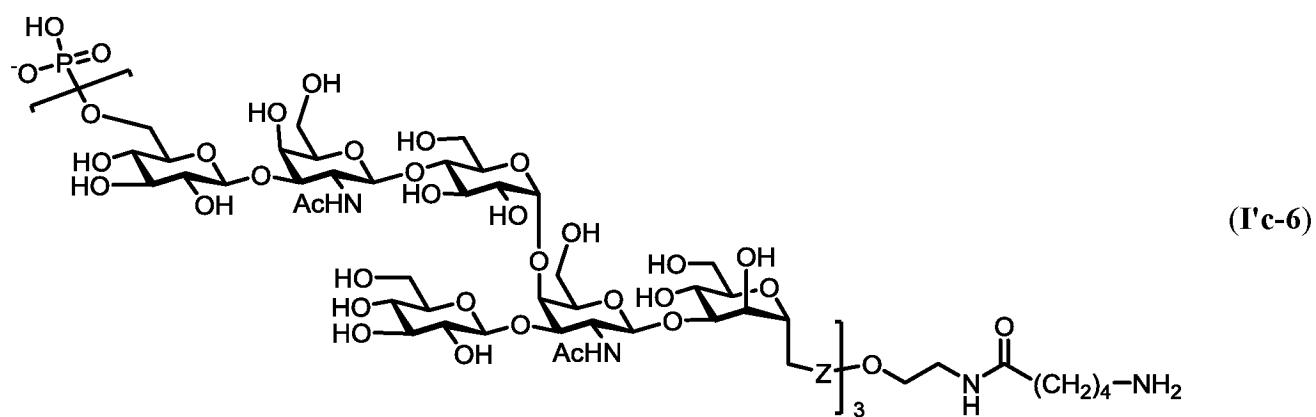
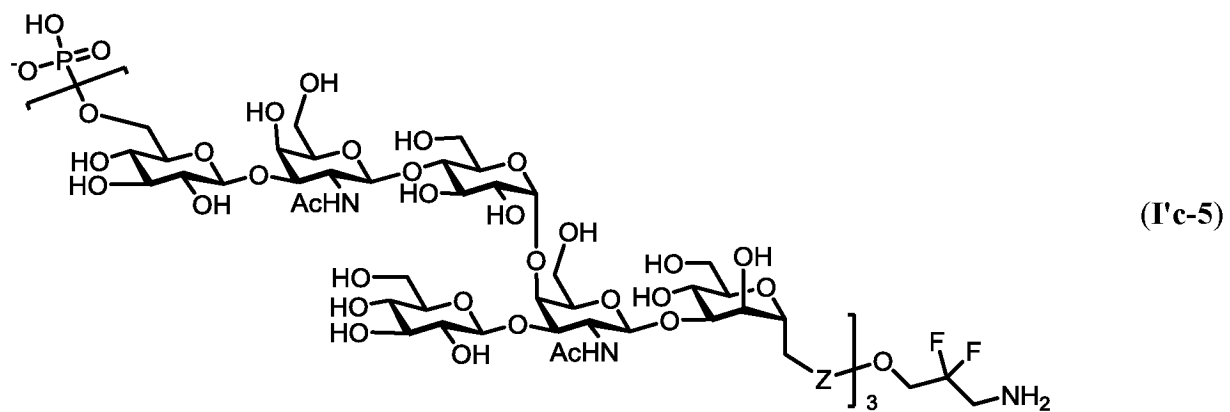


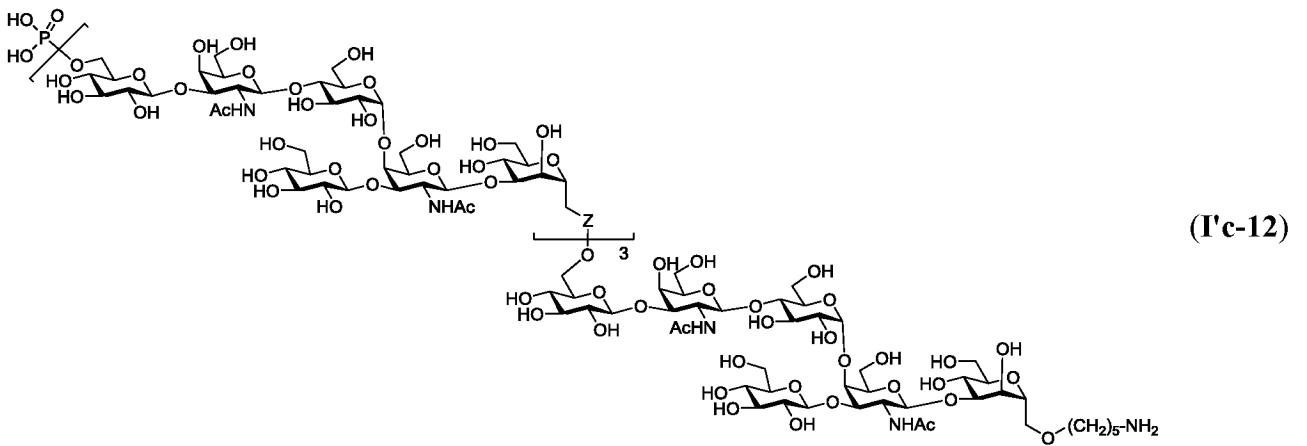
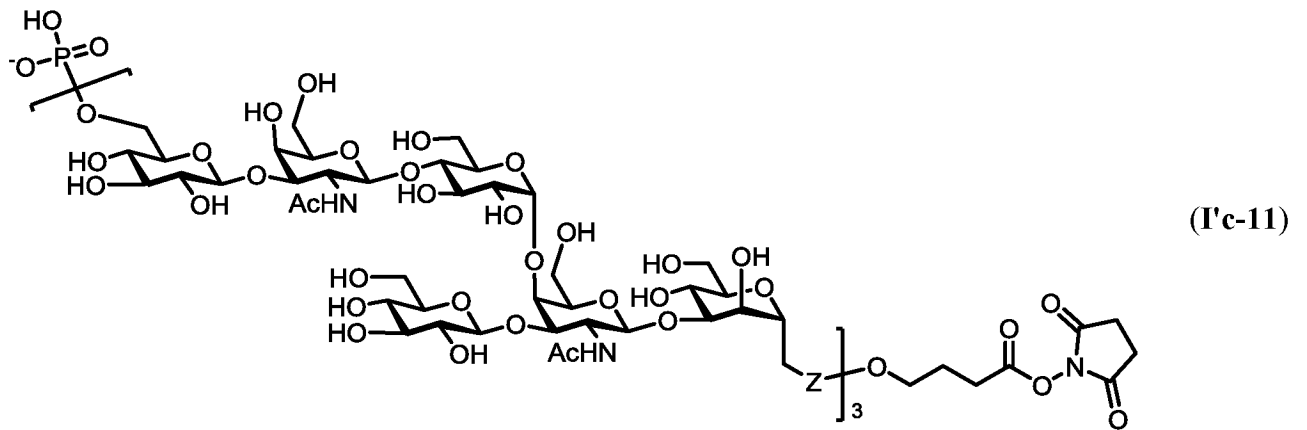
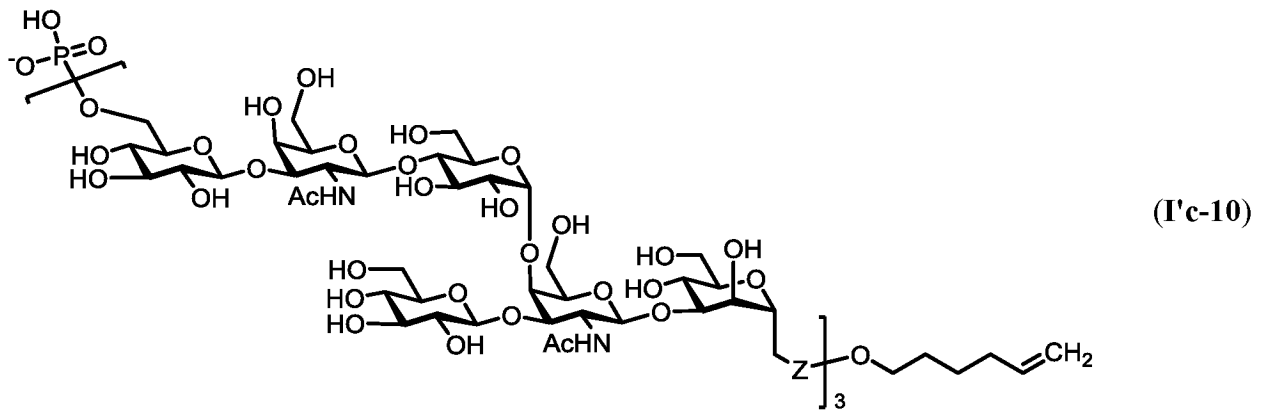
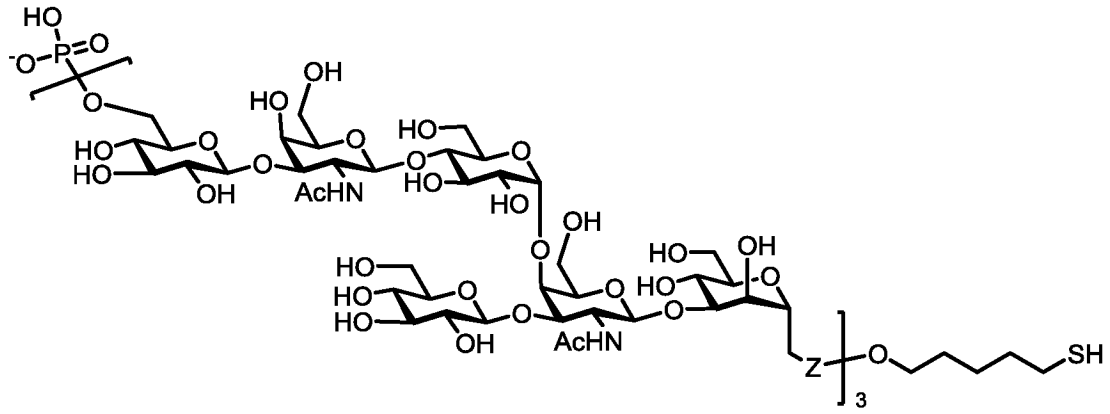


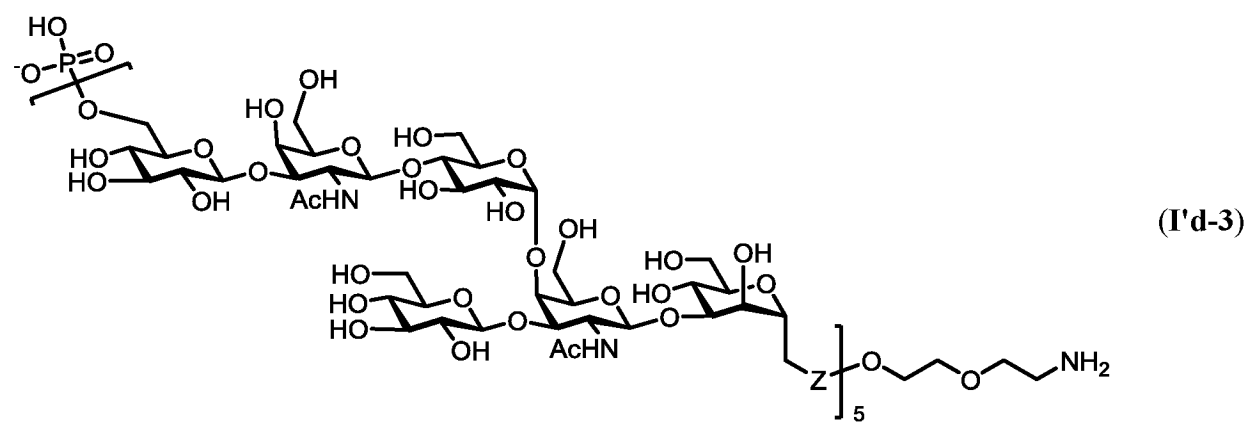
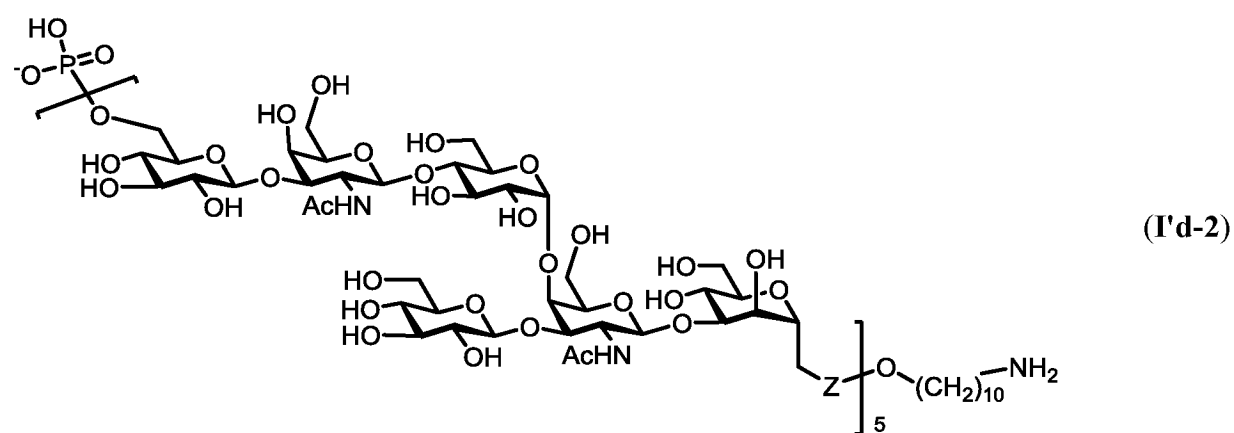
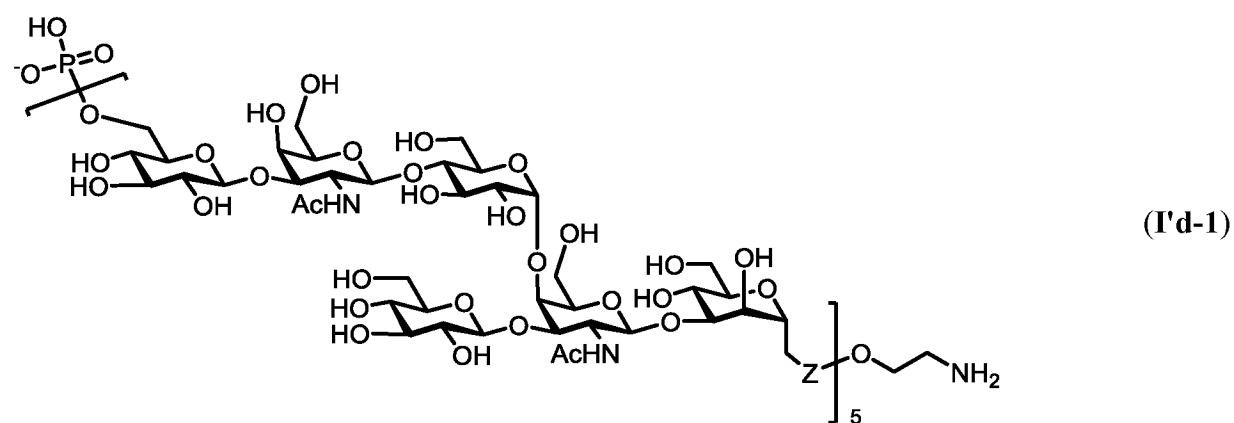
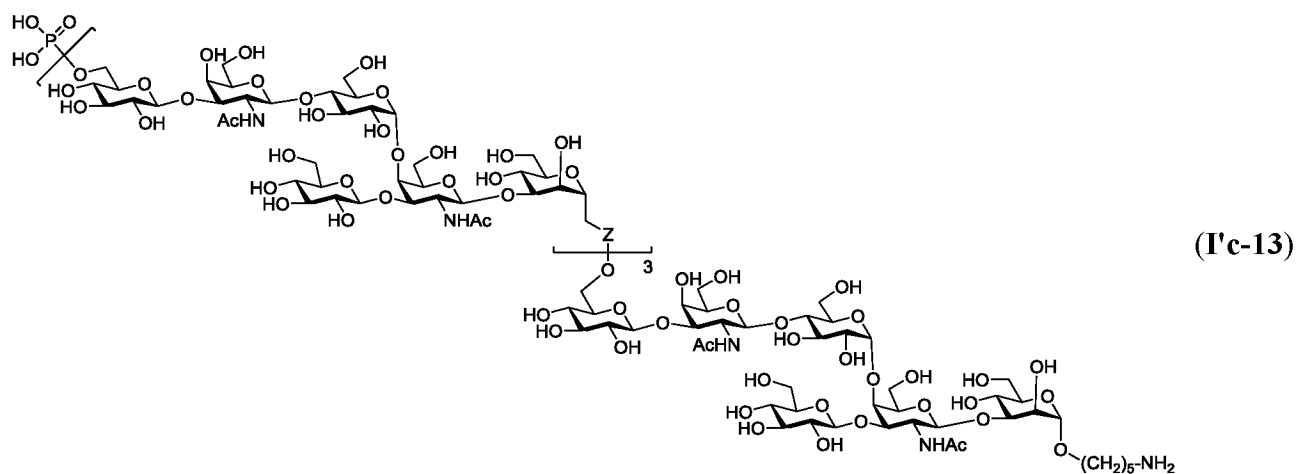


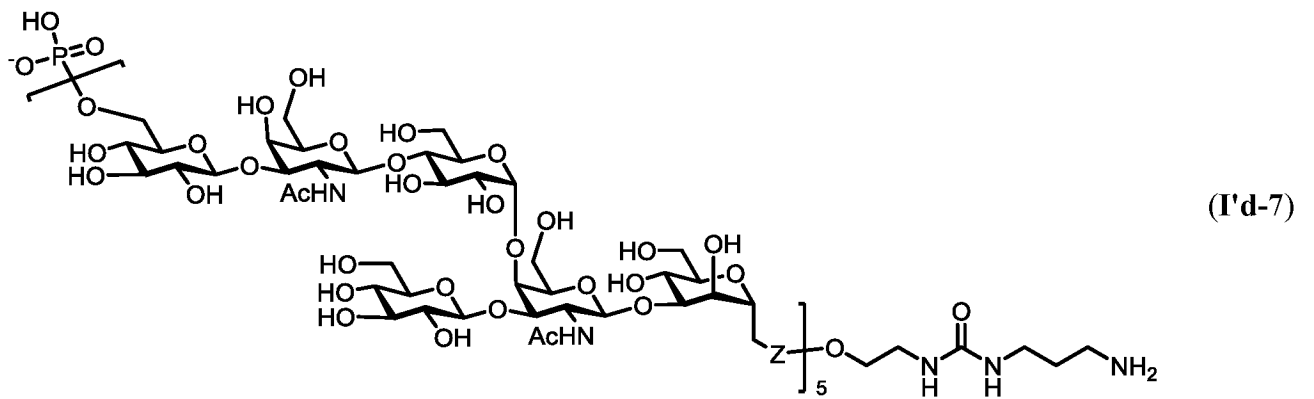
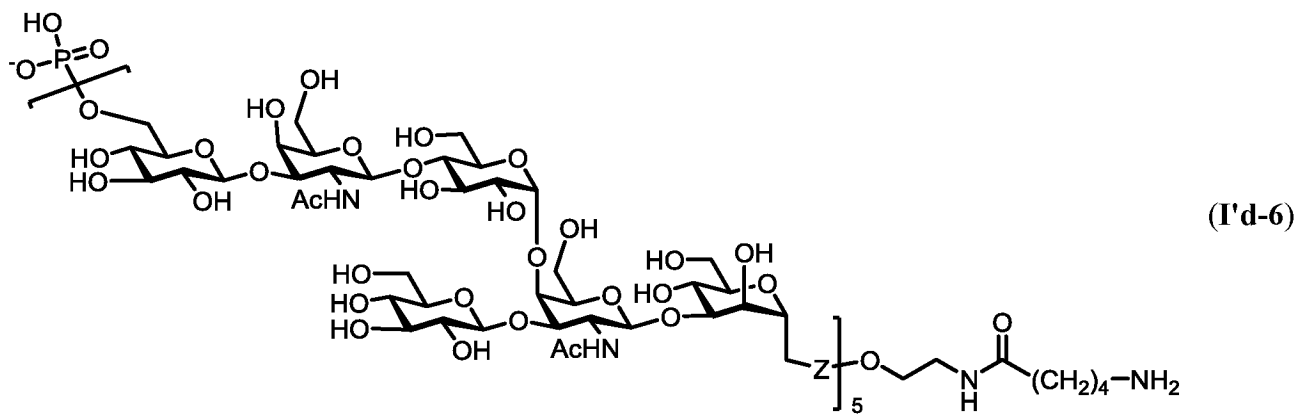
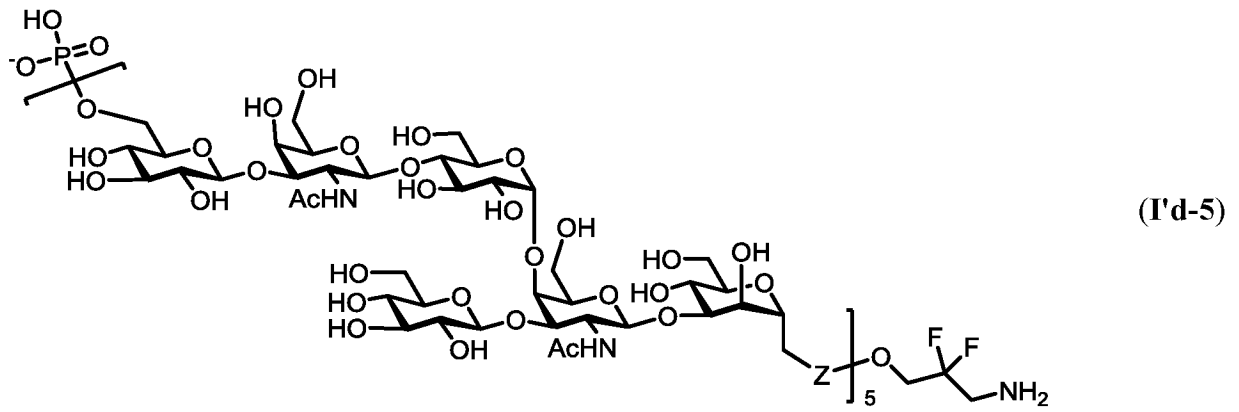
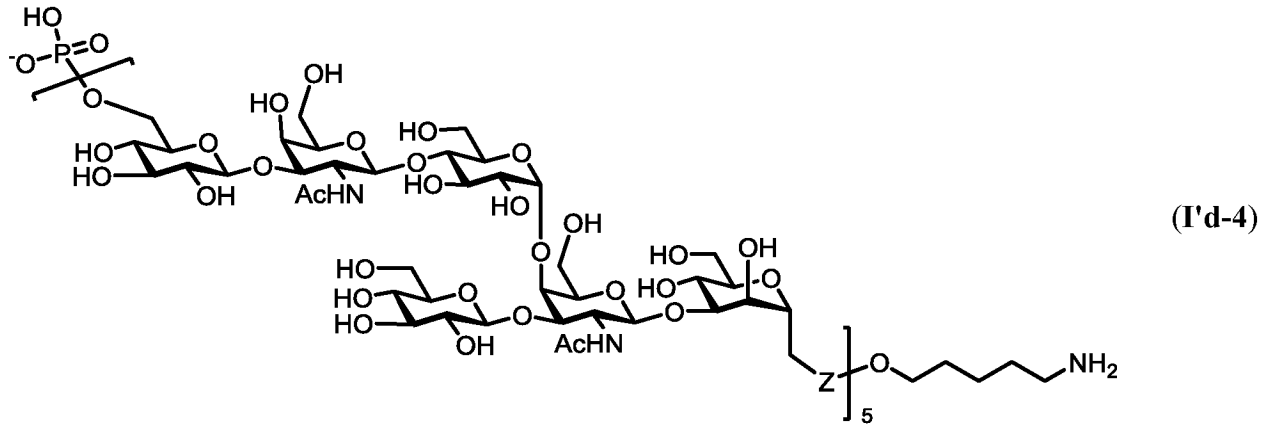


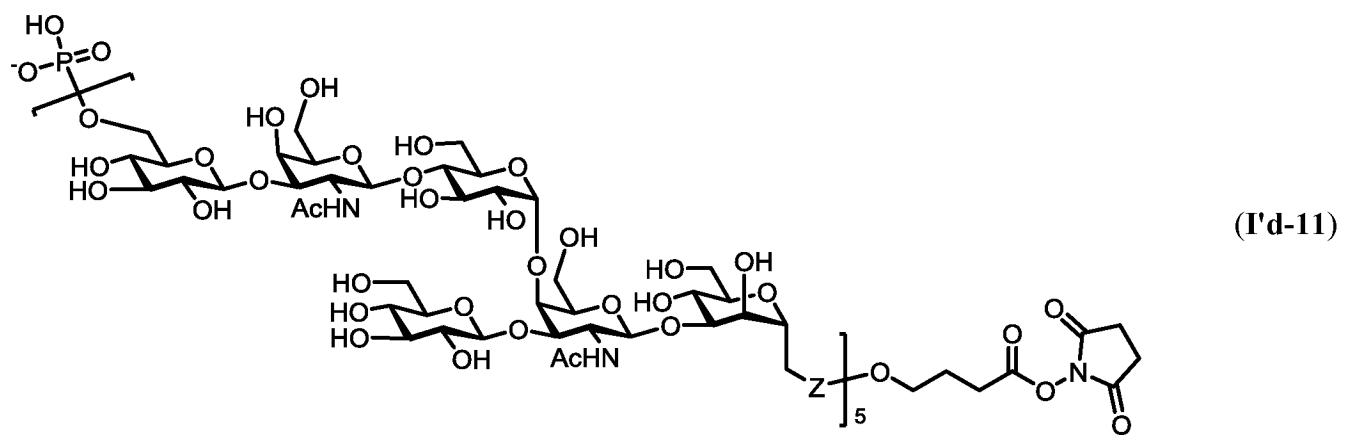
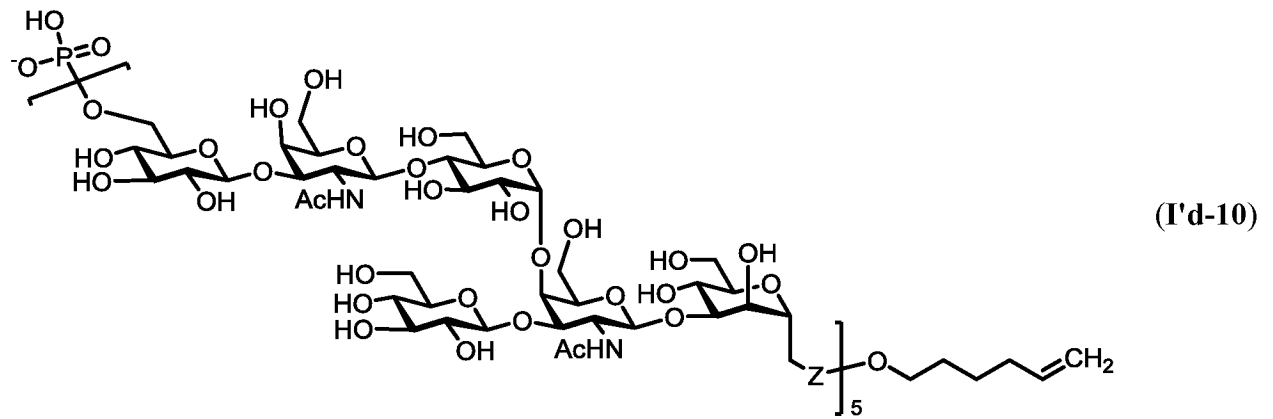
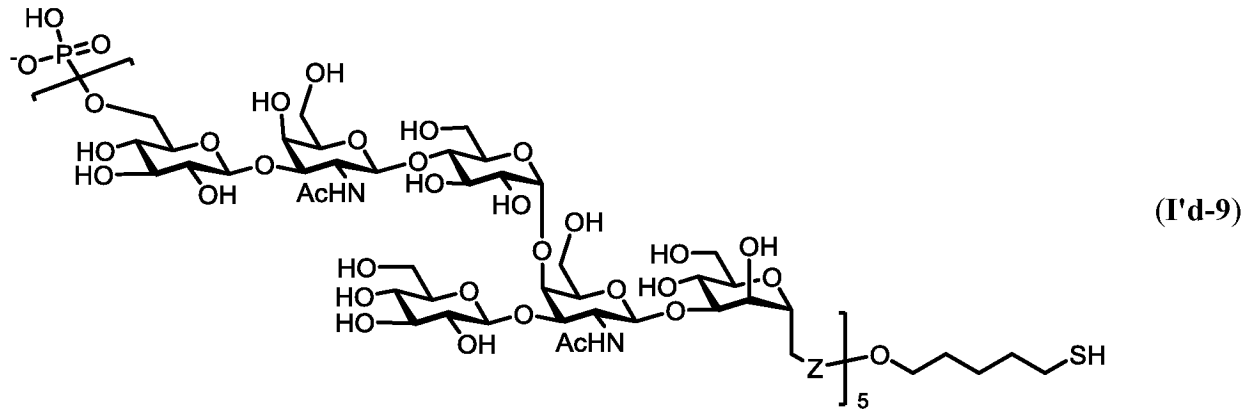
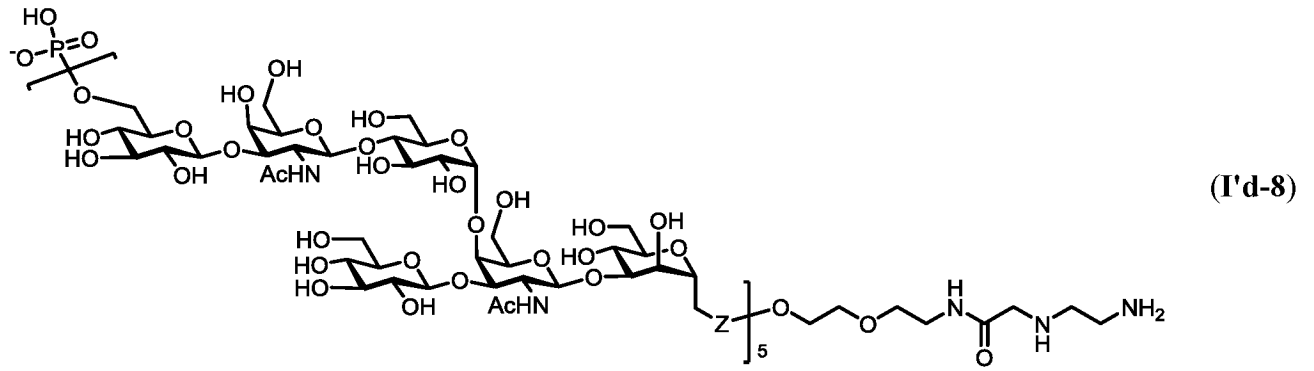


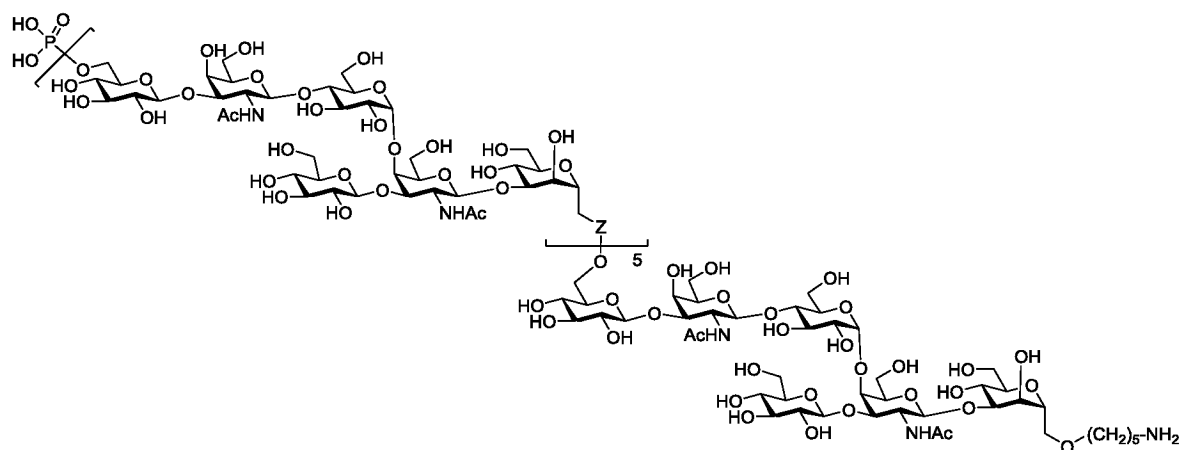




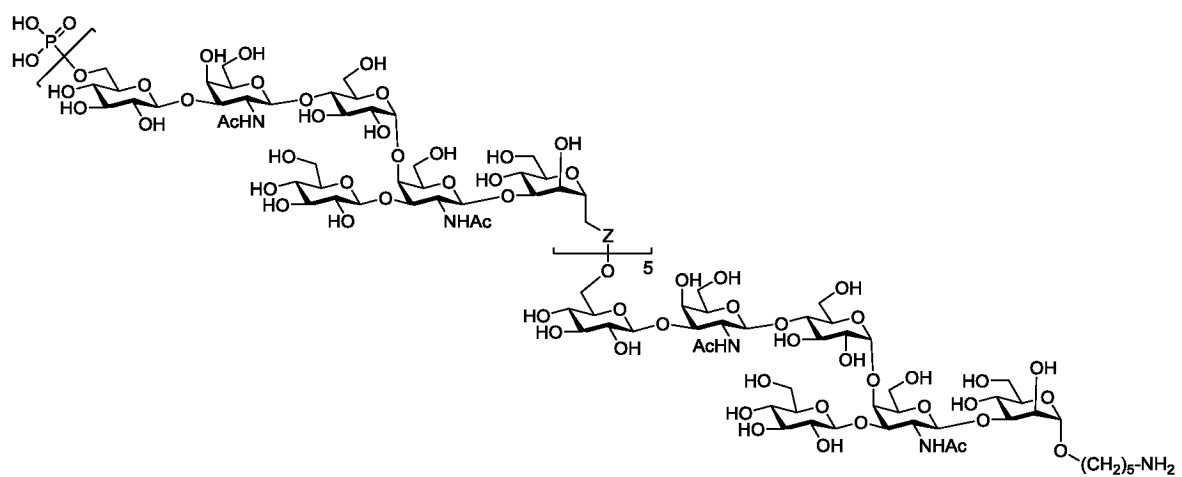








(Gamma'd-12)



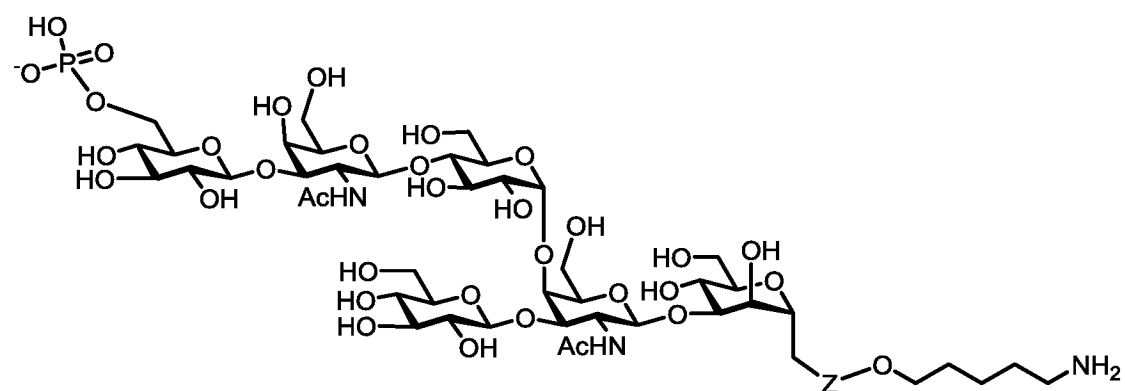
(Gamma'd-13)

где **Z** представляет собой

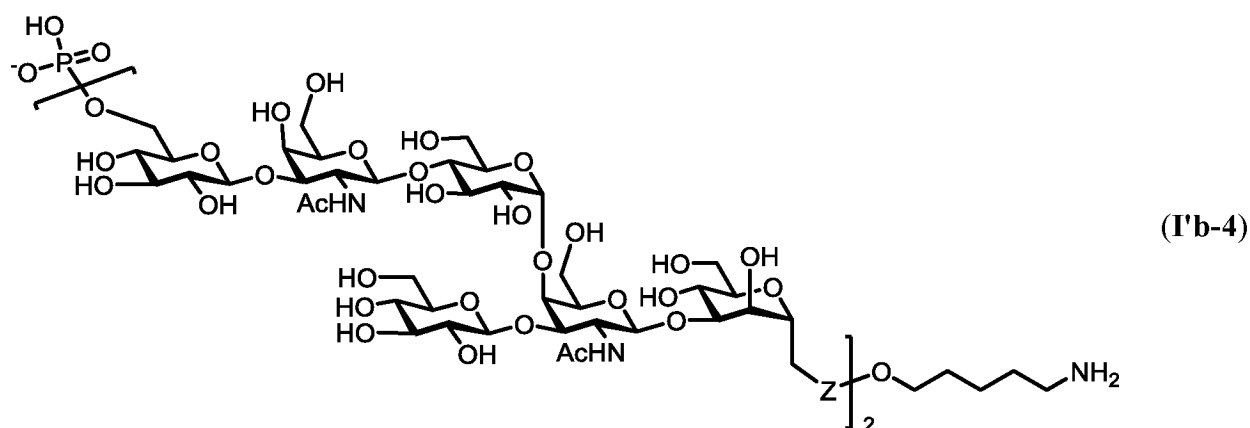


6. Сахарид по п. 5 формулы (Gamma'a-4) или формулы (Gamma'b-4),

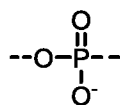
5



(Gamma'a-4)



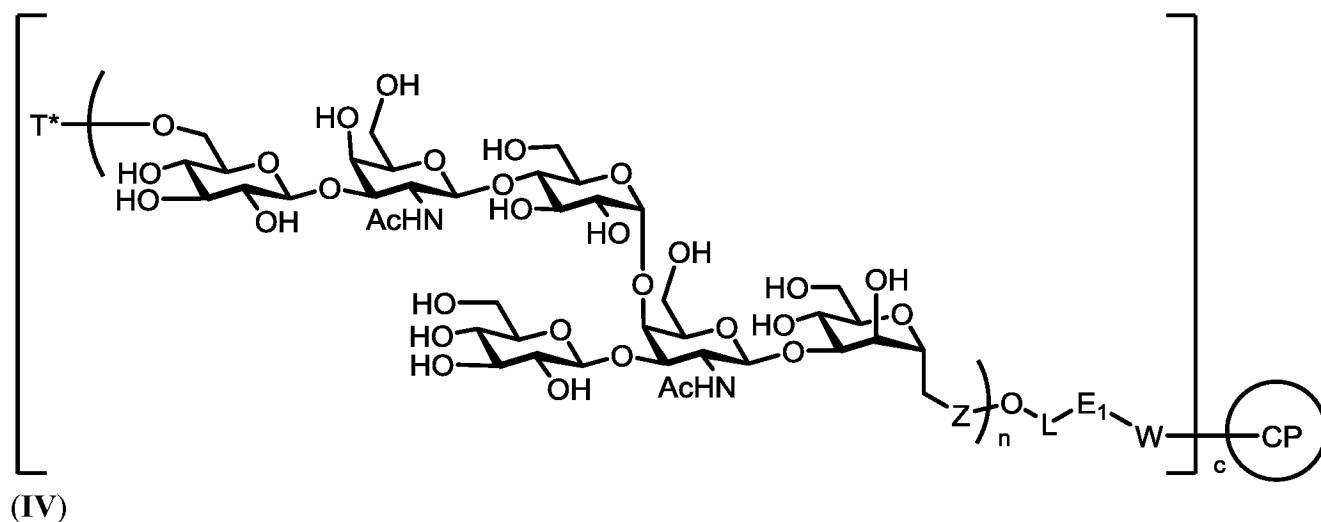
где **Z** представляет собой



7. Конъюгат, который содержит сахарид по любому из пп. 1 – 6, ковалентно связанный с иммуногенным носителем через остаток **E** группы –O–L–E.

5

8. Конъюгат по п. 7 общей формулы (IV)



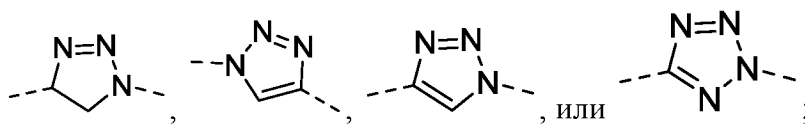
10

где

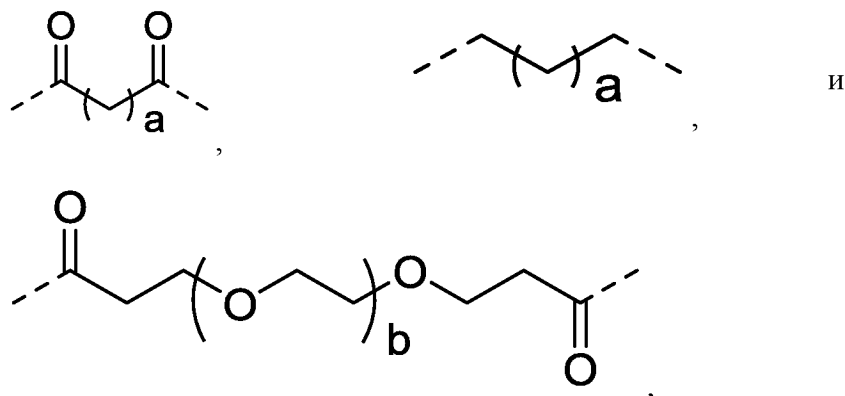
**n** находится в диапазоне между 2 и 18;

–**E<sub>1</sub>**– представляет собой ковалентную связь, –NH–, –O–NH–, –O–, –S–, –CO–, –CH=CH–, –CONH–, –CO–NHNH–,





-W- выбран из:



a представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10,

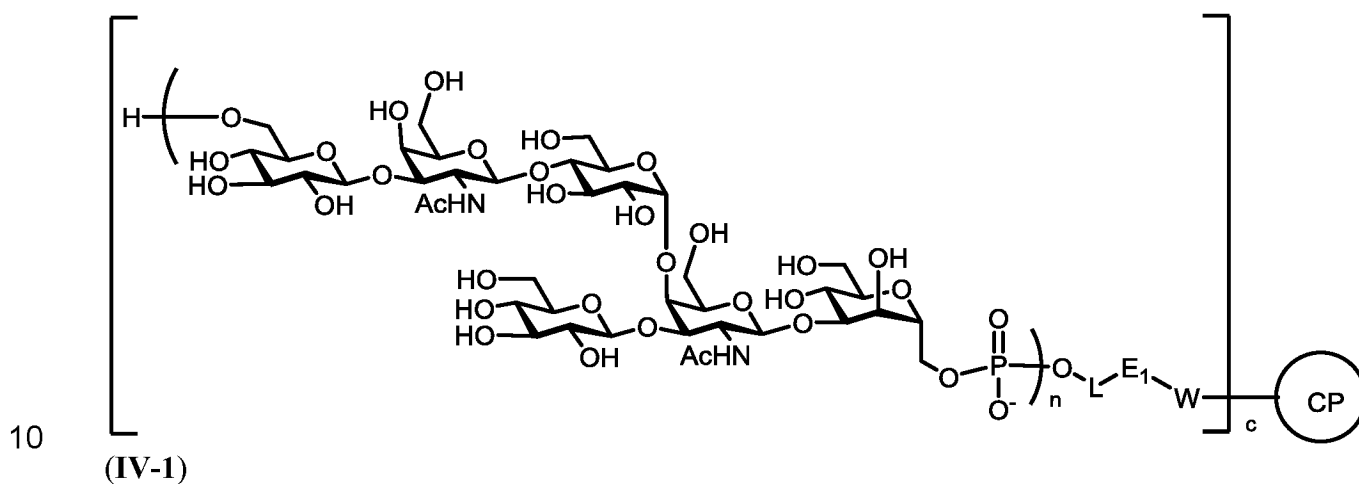
b представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3 и 4,

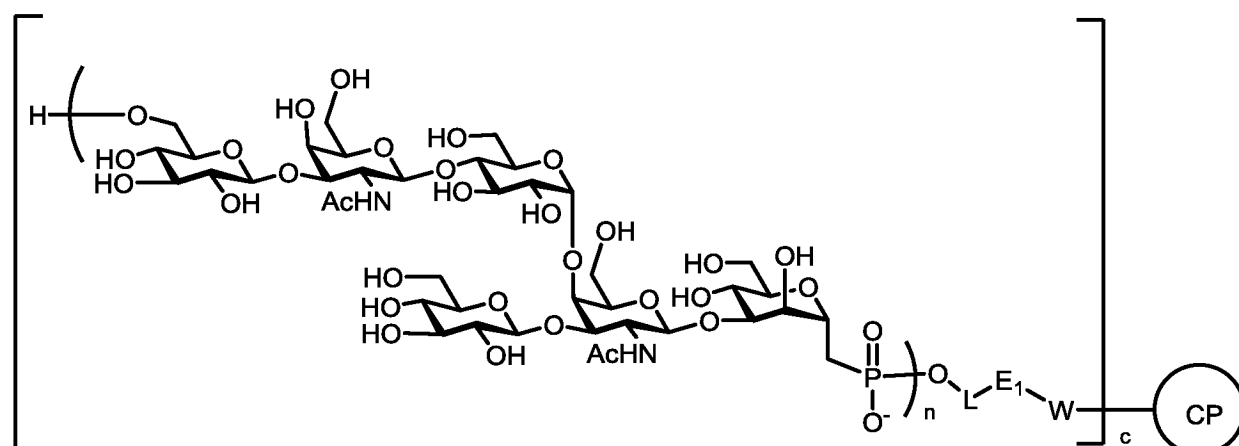
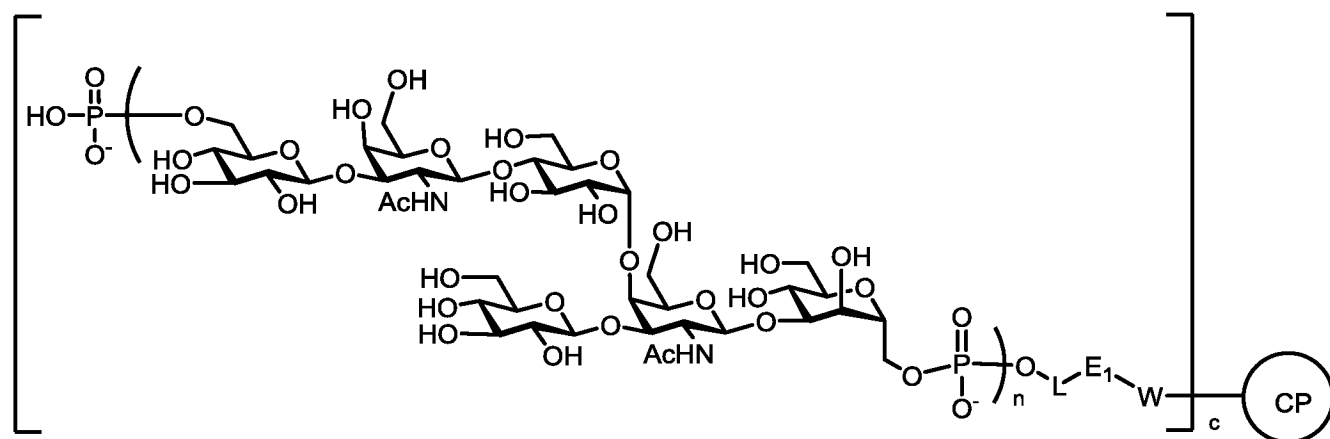
5 CP означает белок-носитель и

n, L, Z и T\* имеют значения, указанные в п. 1.

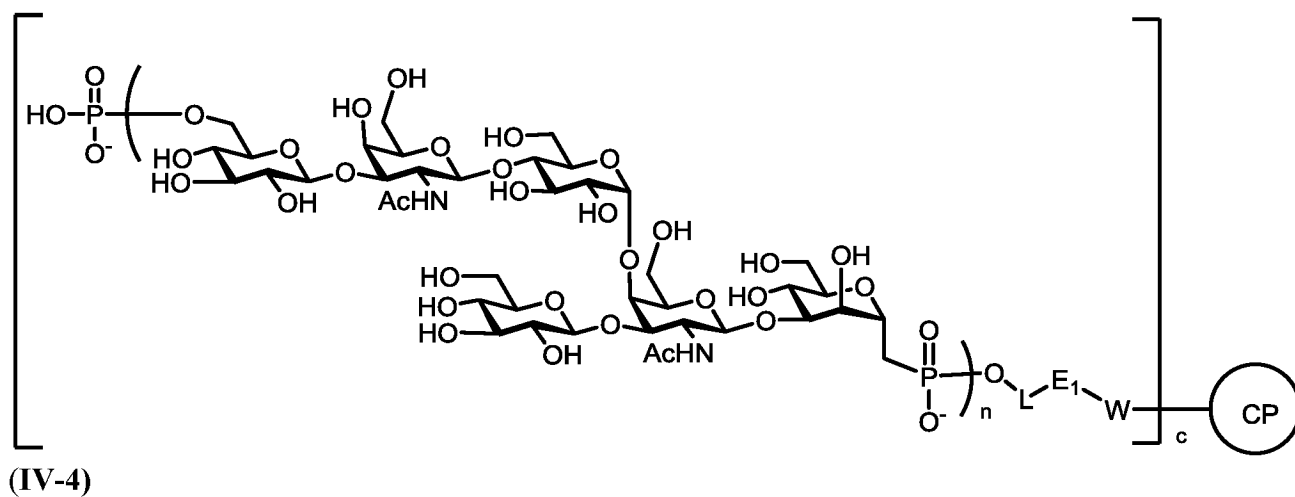
9. Конъюгат по п. 8, где конъюгат имеет любую из следующих формул (IV-

1) – (IV-4)





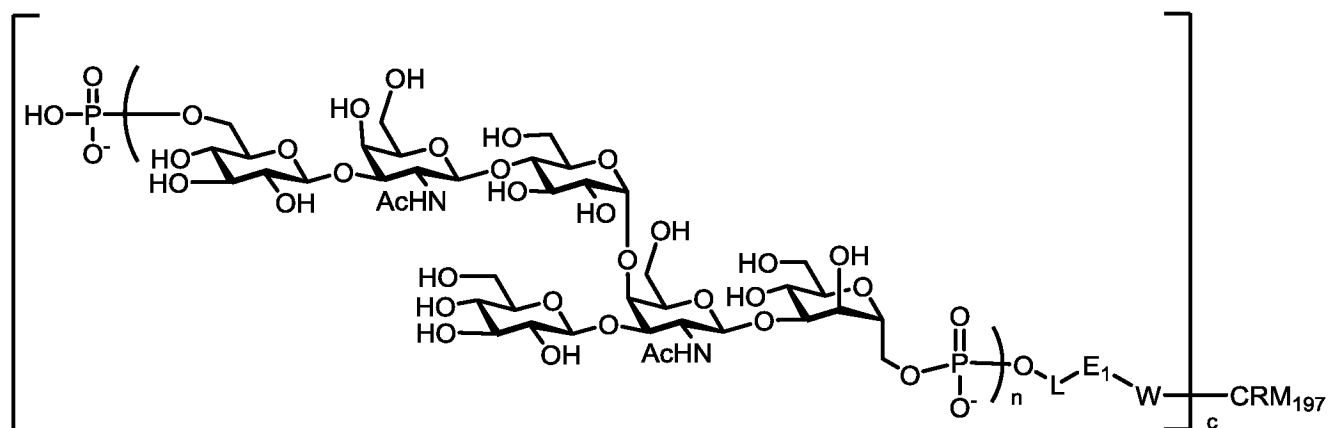
5



где L, E<sub>1</sub>, W, c, CP, и n имеют те же значения, что и указанные в п. 8.

10

10. Конъюгат по п. 8, который имеет следующую формулу (V-2)



(V-2)

5

где L представляет собой  $-(CH_2)_5-$ ,

$E_1$  представляет собой  $-NH-$ ,

n представляет собой целое число, выбранное из 1 или 2,

c и W имеют значения, указанные в п. 8.

10

11. Сахарид по любому из пп. 1 – 6 или конъюгат по любому из пп. 7 – 10 для применения для повышения защитного иммунного ответа у человека- и/или животного-хозяина.

15

12. Сахарид по любому из пп. 1 – 6 или конъюгат по любому из пп. 7 – 10 для применения для предотвращения и/или лечения заболеваний, связанных с бактериями, содержащими в их полисахариде клеточной стенки один из следующих сахаридных фрагментов:

-6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1, 4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1-;

-3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1, 4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1;

-4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1;

-4)- $\alpha$ -D-Glc-(1, 4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1; и

-3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1, 4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1.

13. Сахарид для применения или конъюгат для применения по п. 12, где бактерия представляет собой *Clostridium difficile*.

5 14. Фармацевтическая композиция, которая содержит конъюгат по любому из пп. 7 – 10 и/или сахарид по любому из пп. 1 – 6 вместе с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым адъювантом и/или наполнителем.

10 15. Сахарид по любому из пп. 1 – 6 для применения в качестве маркера в иммунологических анализах для обнаружения антител к бактериям, содержащим в их полисахариде клеточной стенки один из следующих сахаридных фрагментов:

-6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1, 4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1-;

-3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1, 4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1;

-4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1;

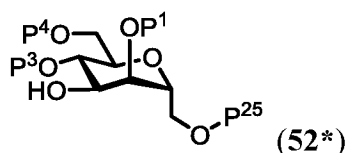
-4)- $\alpha$ -D-Glc-(1, 4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1, 3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1; и

-3)- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 4)- $\alpha$ -D-Glc-(1, 4)-[ $\beta$ -D-Glc-(1, 3)]- $\beta$ -D-GalNAc-(1, 3)- $\alpha$ -D-Man-(1, 6)- $\beta$ -D-Glc-(1.

16. Способ синтеза сахарада общей формулы (I), который включает:

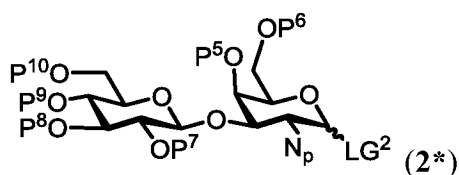
**E1)** обеспечение моносахарида формулы **52\***:

15

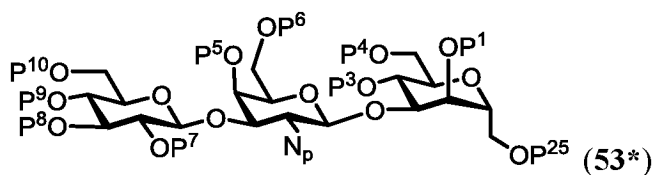


где P<sup>1</sup>, P<sup>3</sup>, P<sup>4</sup> и P<sup>25</sup> представляют собой защитные группы; и

**E2)** введение в реакцию моносахарида формулы **52\*** с соединением формулы **2\*** с получением соединения **53\***:



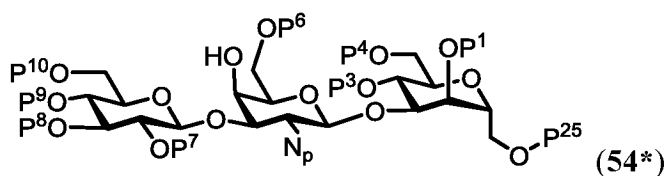
5



где  $P^1, P^3, P^4 - P^{10}$  и  $P^{25}$  представляют собой защитные группы,  $LG^2$  представляет собой уходящую группу и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

10

**E3)** осуществление удаления защитной группы  $P^5$  соединения **53\*** с получением соединения **54\***

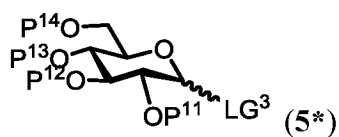


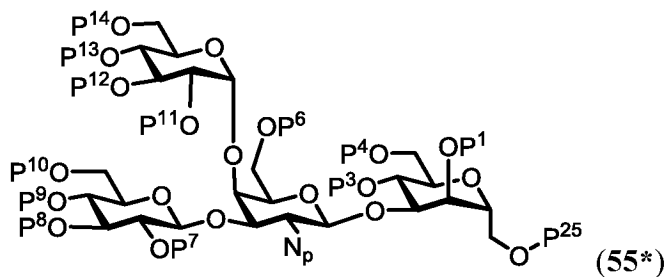
15

где  $P^1, P^3, P^4, P^6 - P^{10}$  и  $P^{25}$  представляют собой защитные группы, и  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу; и

20

**E4)** введение в реакцию соединения **54\*** с моносахаридом **5\*** с получением соединения **55\***

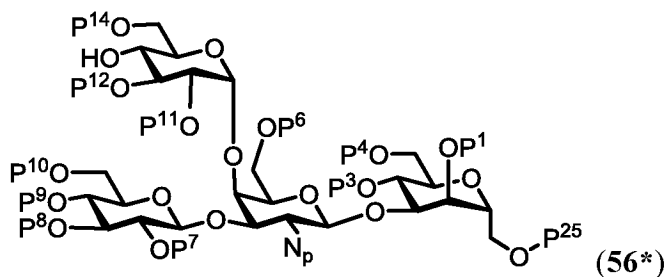




5

где P<sup>1</sup>, P<sup>3</sup>, P<sup>4</sup>, P<sup>6</sup> – P<sup>14</sup> и P<sup>25</sup> представляют собой защитные группы, LG<sup>3</sup> представляет собой уходящую группу и N<sub>p</sub> представляет собой защищенную аминогруппу; и

**Е5)** осуществление удаления защитной группы P<sup>13</sup> соединения **55\*** с получением соединения **56\***

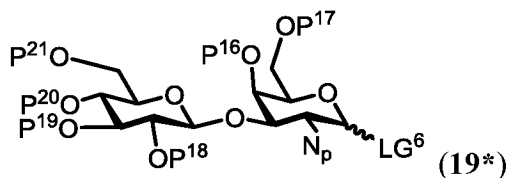


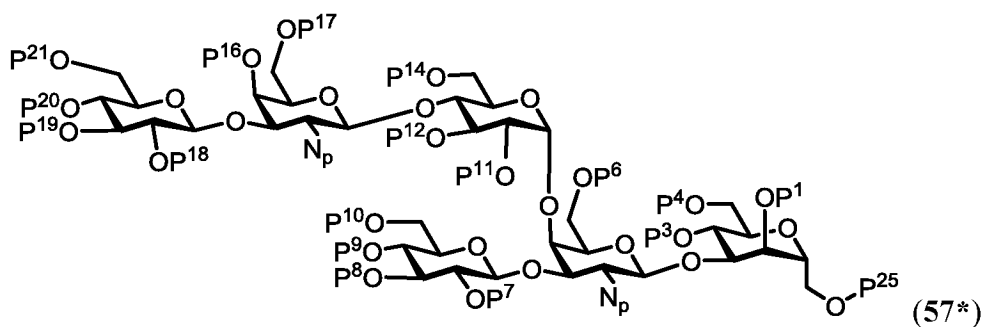
10

где P<sup>1</sup>, P<sup>3</sup>, P<sup>4</sup>, P<sup>6</sup> – P<sup>12</sup>, P<sup>14</sup> и P<sup>25</sup> представляют собой защитные группы, и N<sub>p</sub> представляет собой защищенную аминогруппу; и

**Е6)** введение в реакцию соединения **56\*** с дисахаридом **19\*** с получением соединения **57\***

15

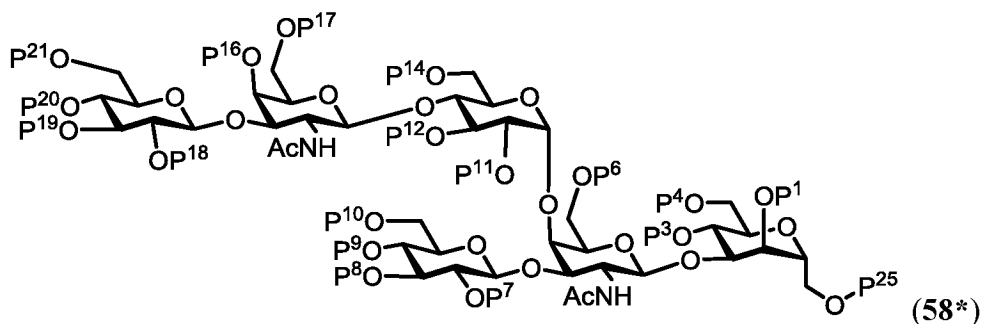




где P<sup>1</sup>, P<sup>3</sup>, P<sup>4</sup>, P<sup>6</sup> – P<sup>12</sup>, P<sup>14</sup> и P<sup>16</sup> – P<sup>25</sup> представляют собой защитные группы, LG<sup>6</sup> представляет собой уходящую группу и N<sub>p</sub> представляет собой защищенную аминогруппу; и

5

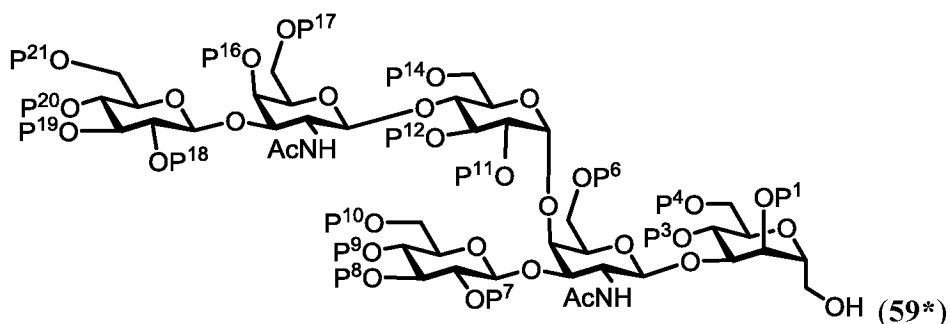
**Е7)** превращение защищенных аминогрупп соединения **57\*** в соответствующие ацетиамидо группы с получением соединения **58\***



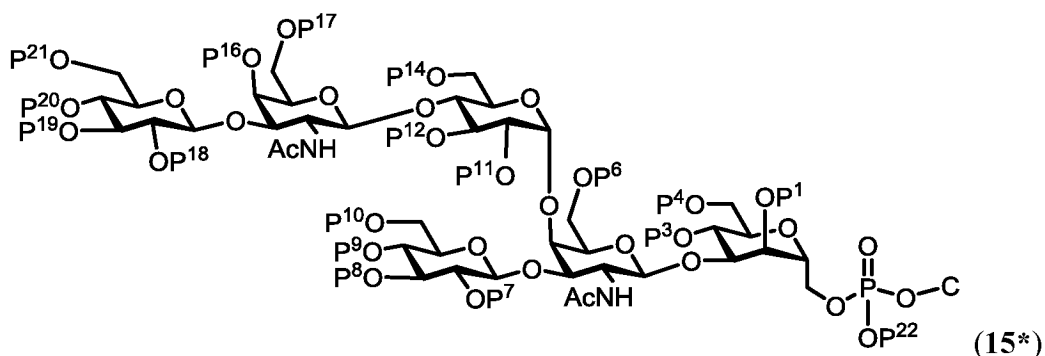
10

где P<sup>1</sup>, P<sup>3</sup>, P<sup>4</sup>, P<sup>6</sup> – P<sup>12</sup>, P<sup>14</sup>, P<sup>21</sup> и P<sup>25</sup> представляют собой защитные группы; и

**Е8)** осуществление удаления защитной группы P<sup>25</sup> соединения **58\*** с получением соединения **59\*** и введение в реакцию соединения **59\*** со спиртом HO–L–С в присутствии фосфорилирующего агента с получением соединения **15\***



15

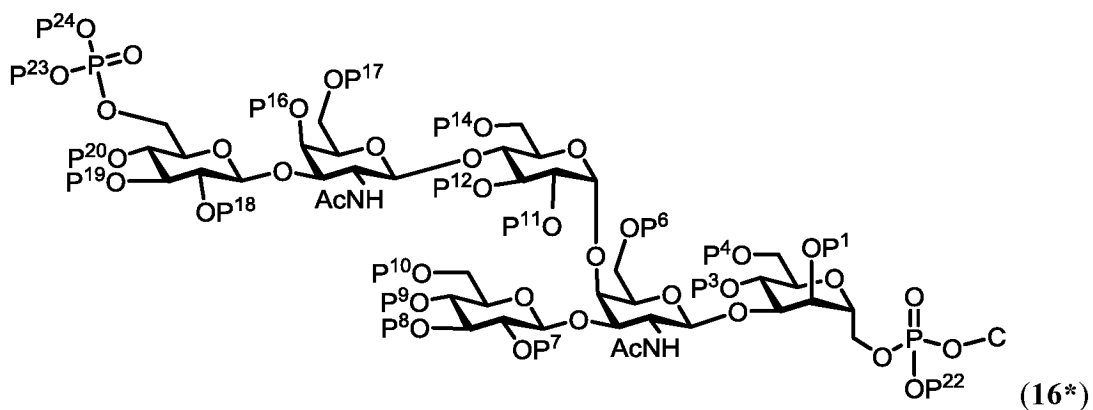
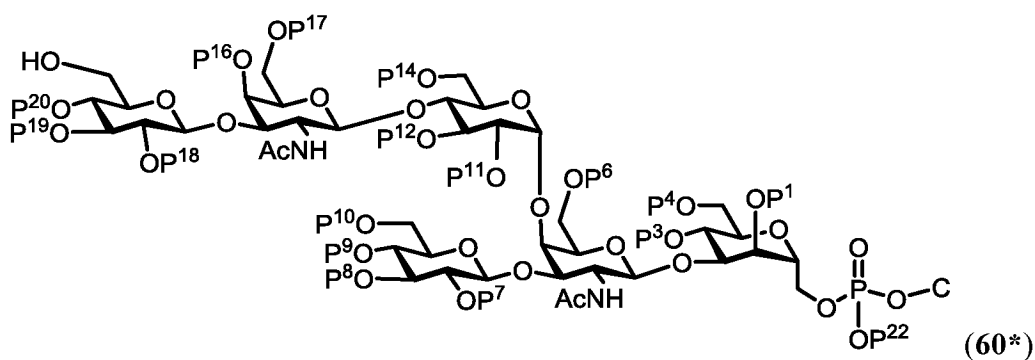


где P<sup>1</sup>, P<sup>3</sup>, P<sup>4</sup>, P<sup>6</sup> – P<sup>12</sup>, P<sup>14</sup>, P<sup>16</sup> – P<sup>22</sup> представляют собой защитные группы, и

**Е9)** необязательно осуществление удаления защитной группы P<sup>21</sup> соединения

5 **15\*** с получением соединения **60\*** и введение в реакцию соединения **60\*** с

фосфорилирующим агентом с получением соединения **16\***

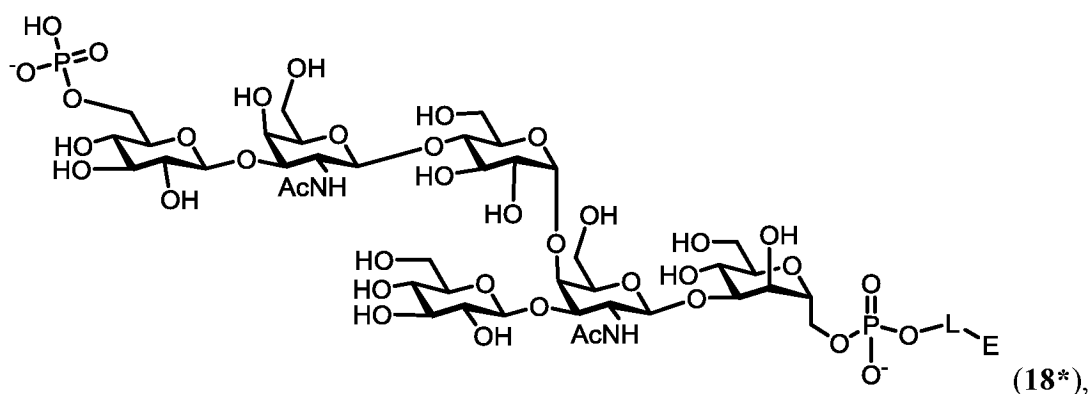
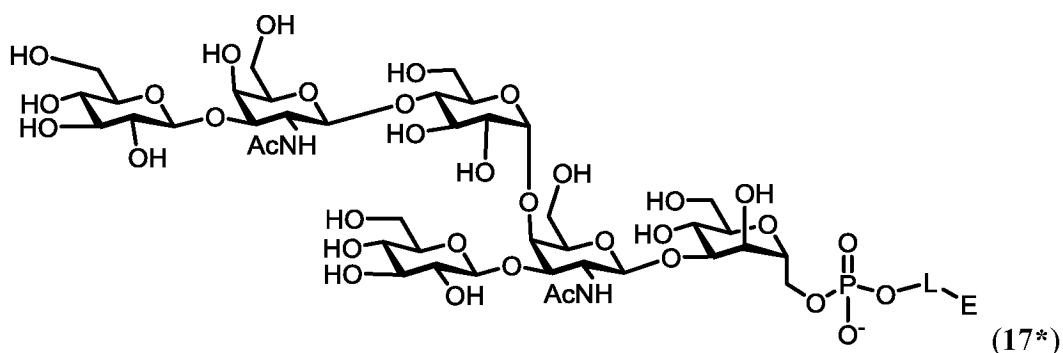


10

где P<sup>1</sup>, P<sup>3</sup>, P<sup>4</sup>, P<sup>6</sup> – P<sup>12</sup>, P<sup>14</sup>, P<sup>16</sup> – P<sup>20</sup> и P<sup>22</sup> – P<sup>24</sup> представляют собой защитные группы, С представляет собой –L–E<sub>p</sub>, где E<sub>p</sub> представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу E; и



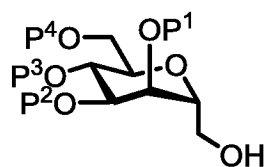
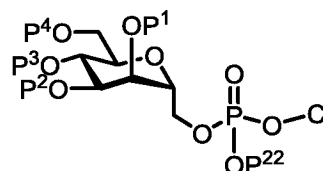
**E10)** осуществление удаления всех оставшихся защитных групп из соединения **15\*** или **16\*** с получением соединения **17\*** или **18\*** общей формулы **(I)**

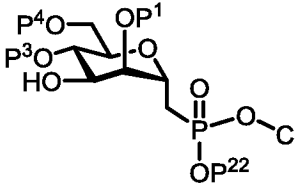


5

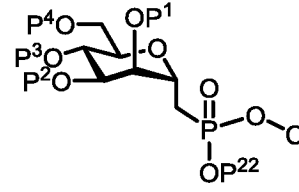
где L и E имеют значения указанные в п. 1.

17. Промежуточное соединение для получения сахара общей формулы **(I)**,  
 10 где промежуточное соединение имеет любую из общих формул **(I2a)**, **(I2b)**, **(I2c)**, **(I2d)**, **(I2e)**, **(I2f)**, **(I4a)**, **(I4b)**, **(I4c)**, **(I4d)**, **(I4e)**, **(I4f)**, **(I4g)**, **(I4h)**, **(I4i)**, **(I4j)**, **(I5a)**, **(I5b)**, **(I5c)**, **(I5d)**, **(I5e)**, **(I5f)**, **(I5g)**, **(I5h)**, **(I5i)**, **(I5j)**, **(I6a)**, **(I6b)**, **(I6c)**, **(I6d)**, **(I6e)**, **(I6f)**, **(I6g)**, **(I6h)**, **(I7a)**, **(I7b)**, **(I7c)**, **(I7d)**, **(I7e)**, **(I7f)**, **(I7g)**, **(I7h)**, **(I7i)**, **(I7j)**, **(I7k)**, **(I7m)**, **(I7n)**, **(I7o)** или **(I7p)**:

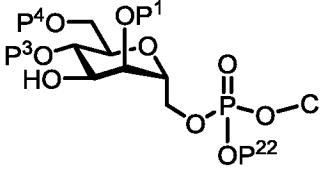
**(I2a)****(I2b)**



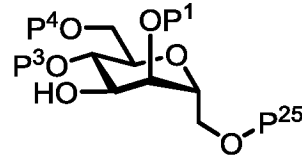
(I2c)



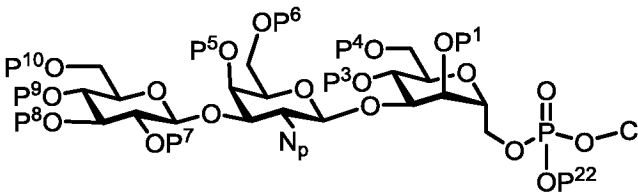
(I2d)



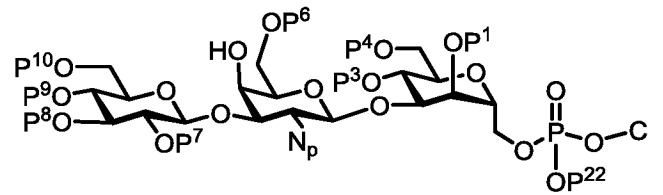
(I2e)



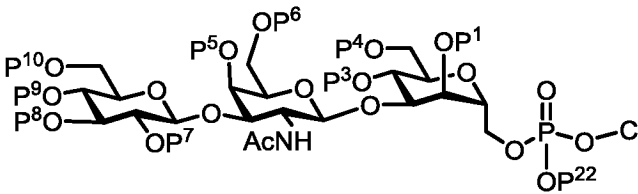
(I2f)



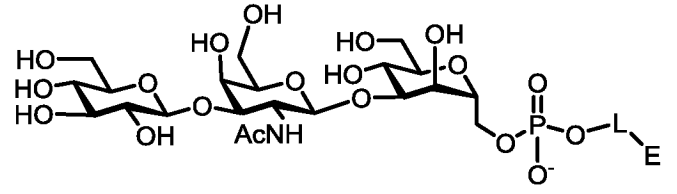
(I4a)



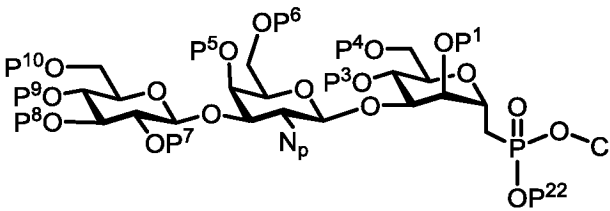
(I4b)



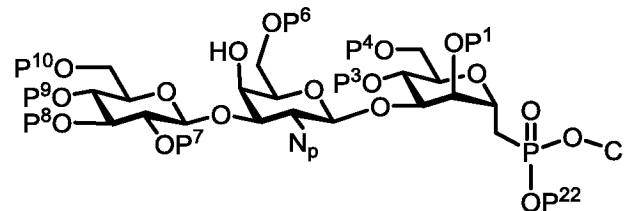
(I4c)



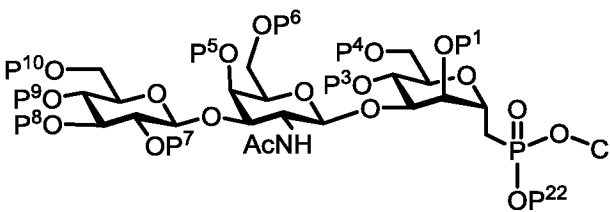
(I4d)



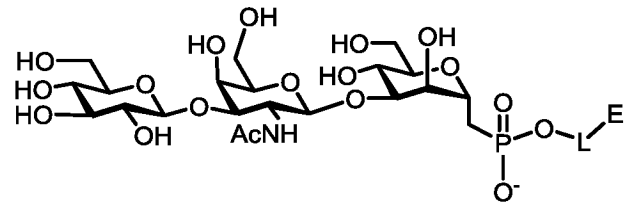
(I4e)



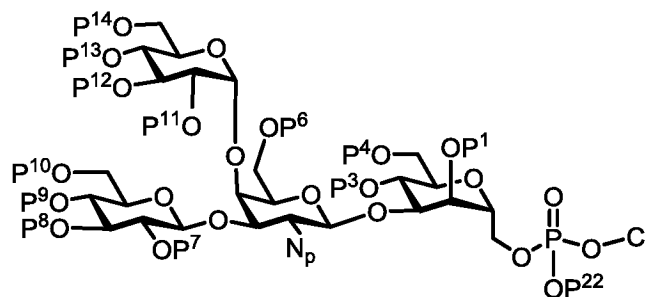
(I4f)



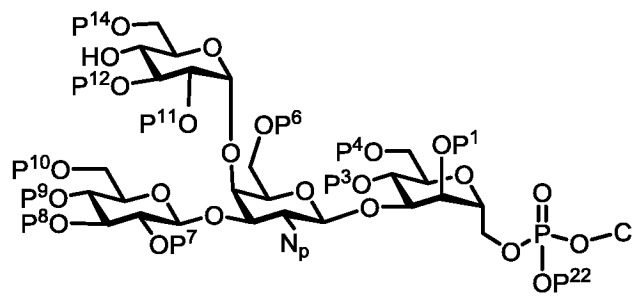
(I4g)



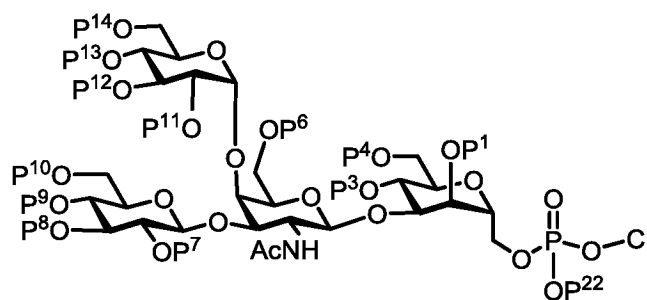
(I4h)



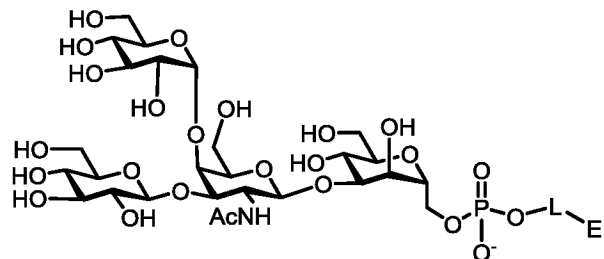
(I5a)



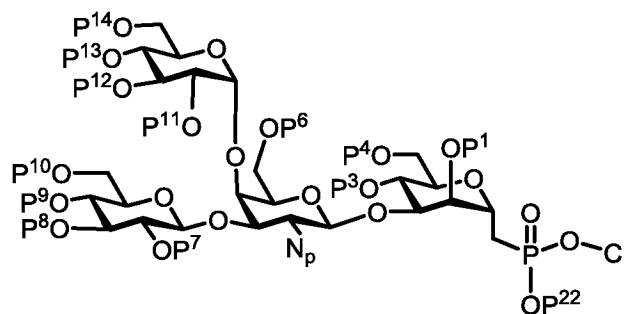
(I5b)



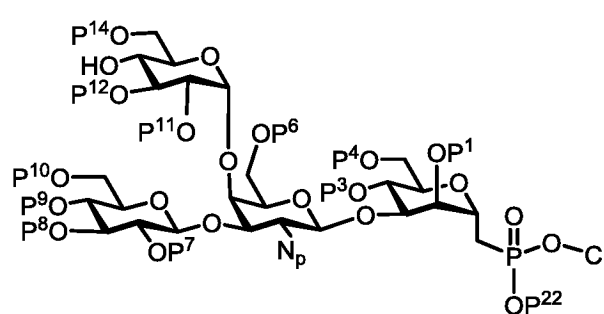
(I5c)



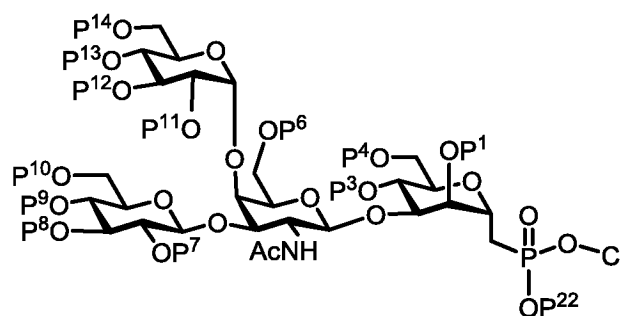
(I5d)



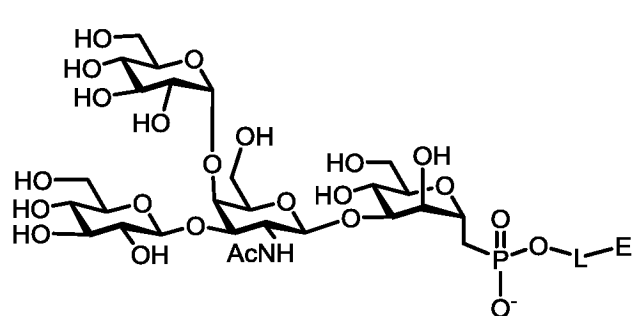
(I5e)



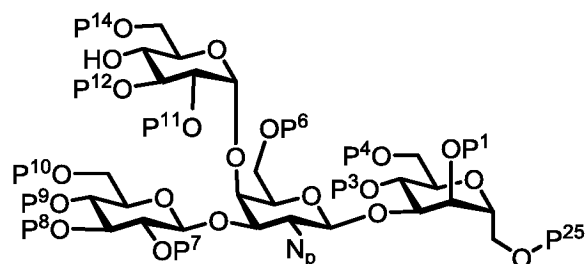
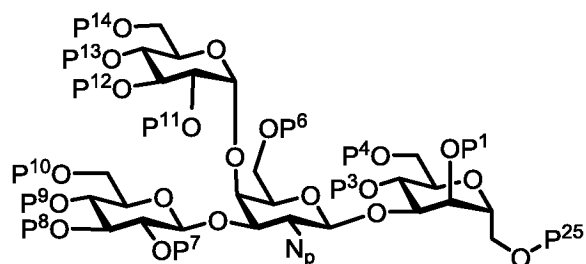
(I5f)



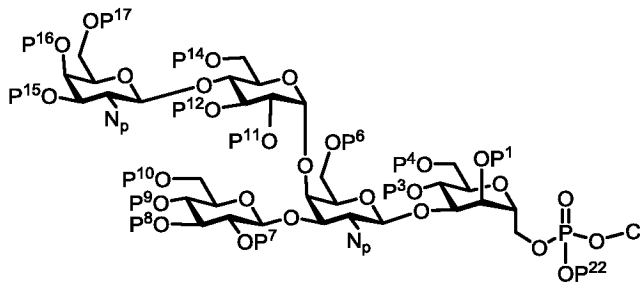
(I5g)



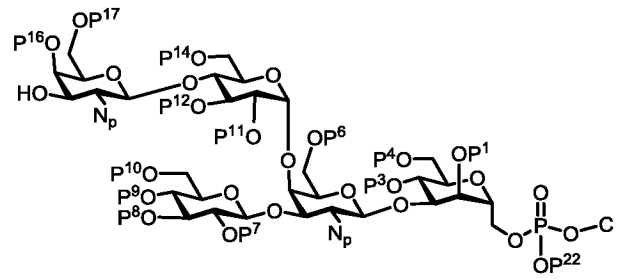
(I5h)



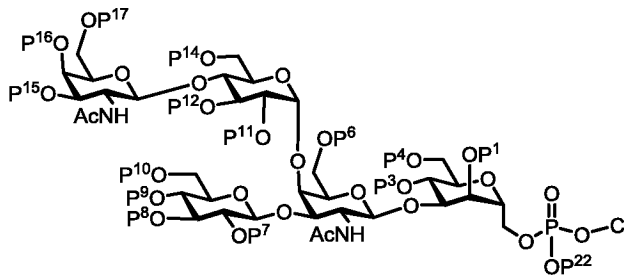
(I5i)



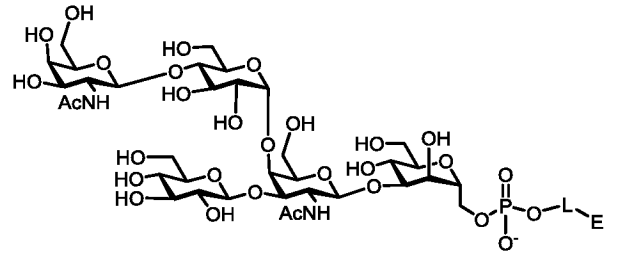
(I5j)



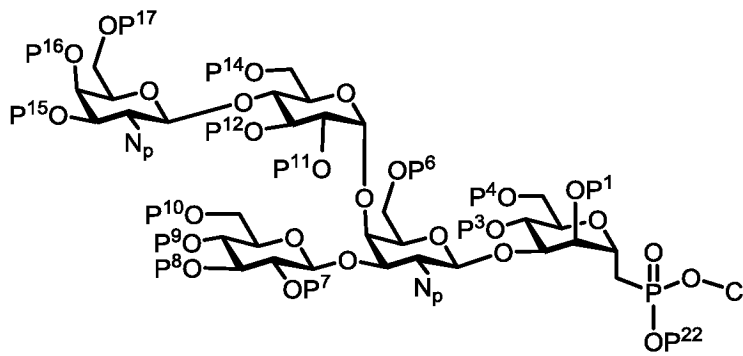
(I6a)



(I6b)

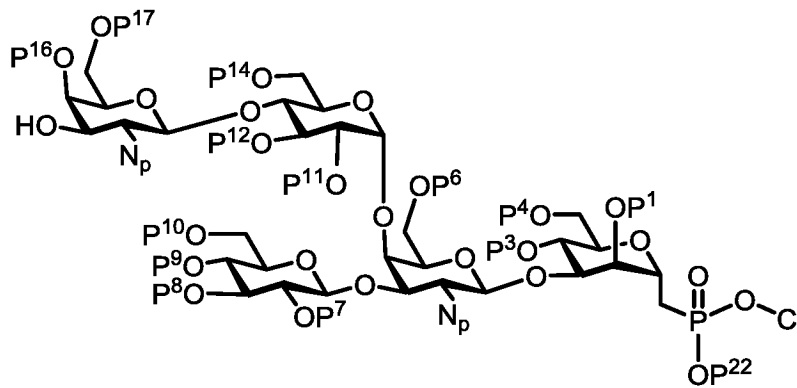


(I6c)

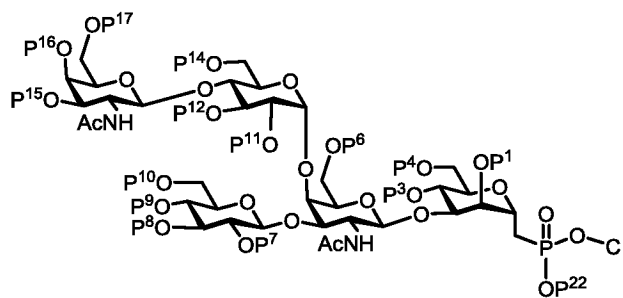


(I6d)

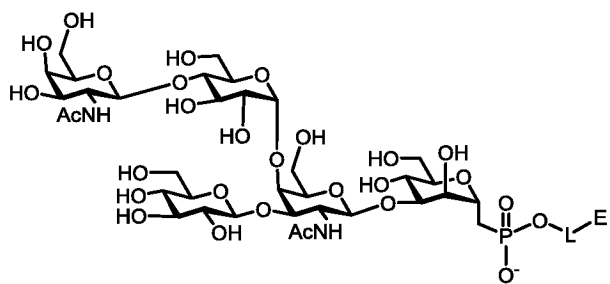
(I6e)



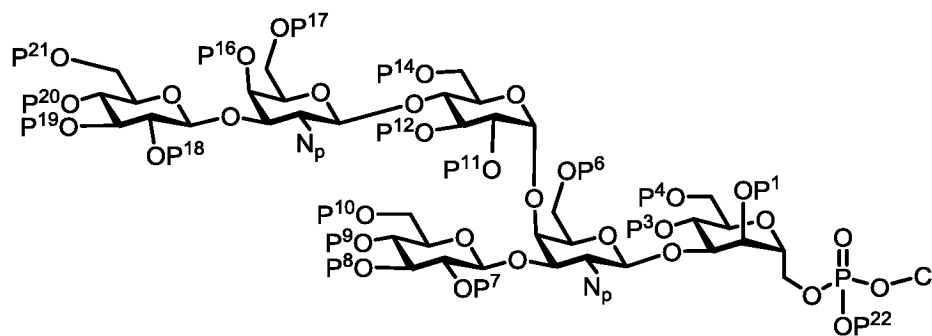
(I6f)



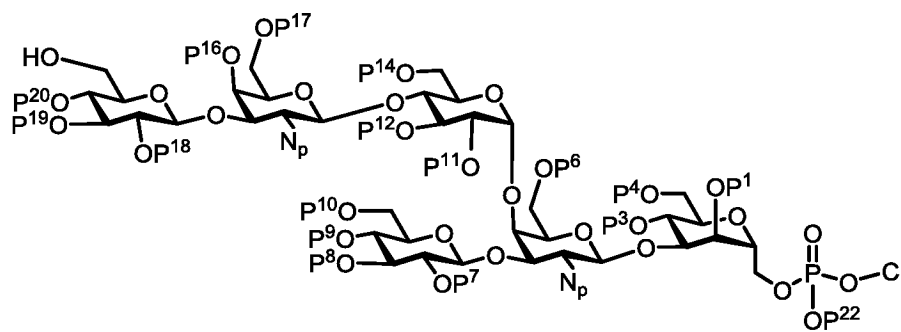
(I6g)



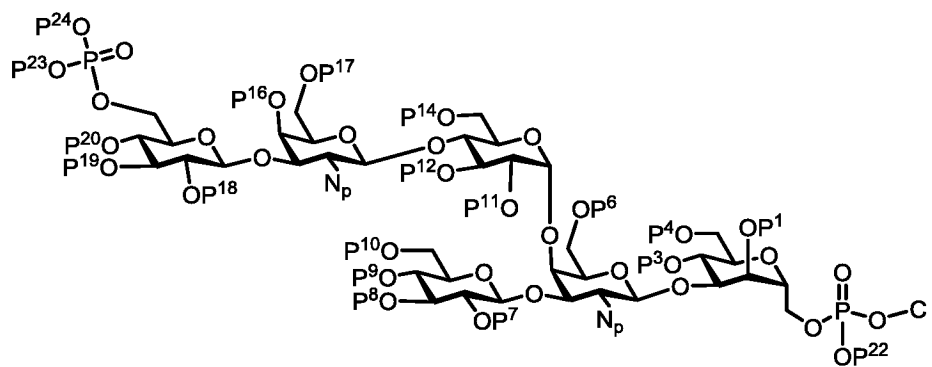
(I6h)



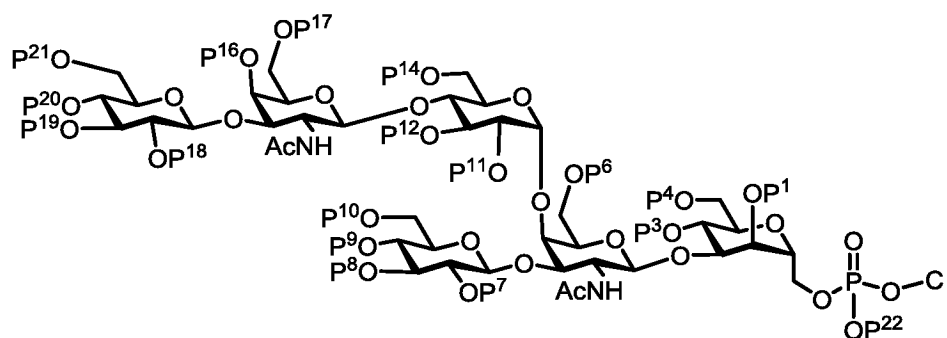
(I7a)



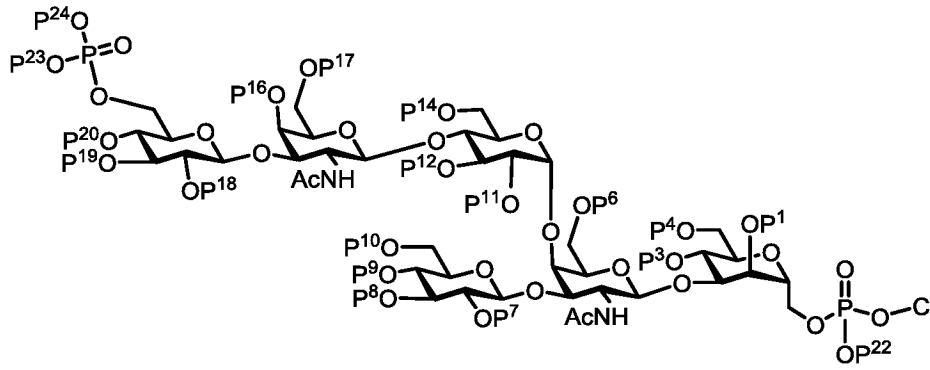
(I7b)



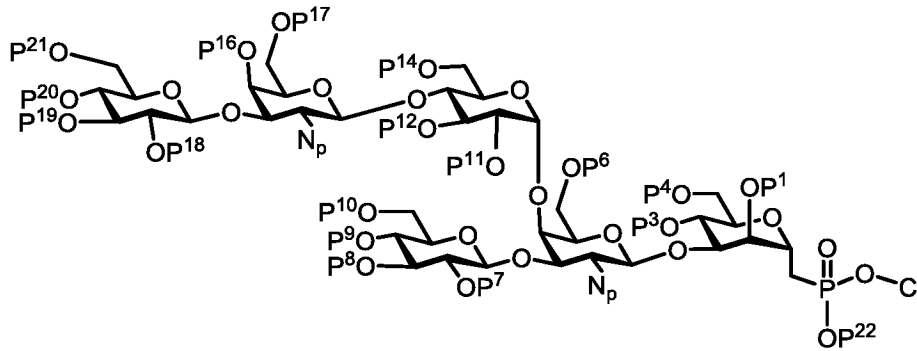
(I7c)



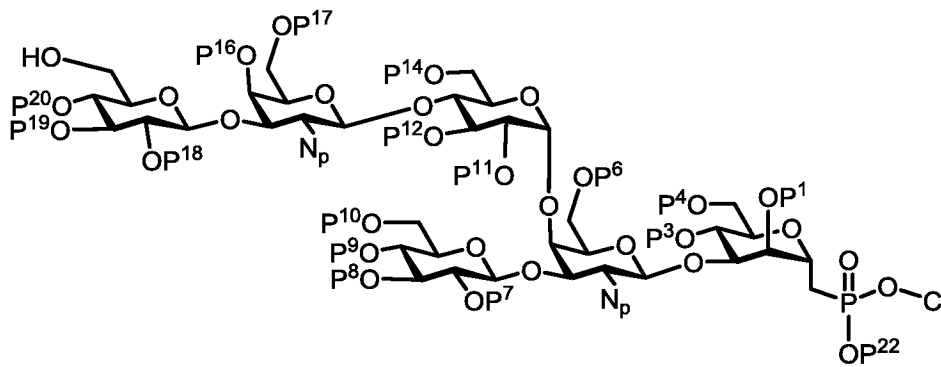
(I7d)



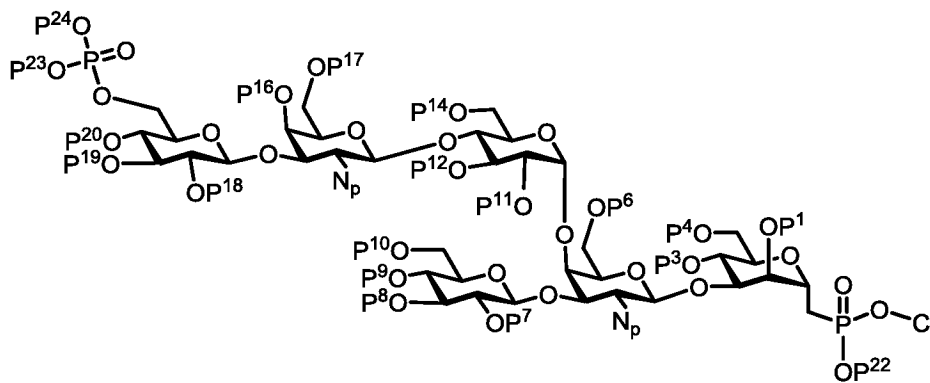
(I7e)



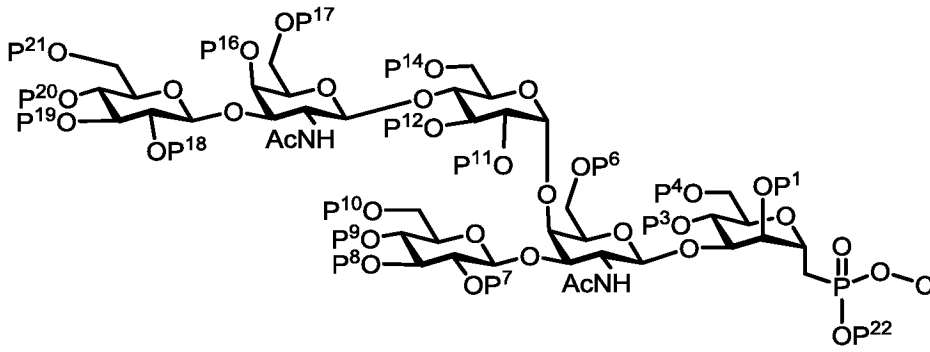
(I7f)



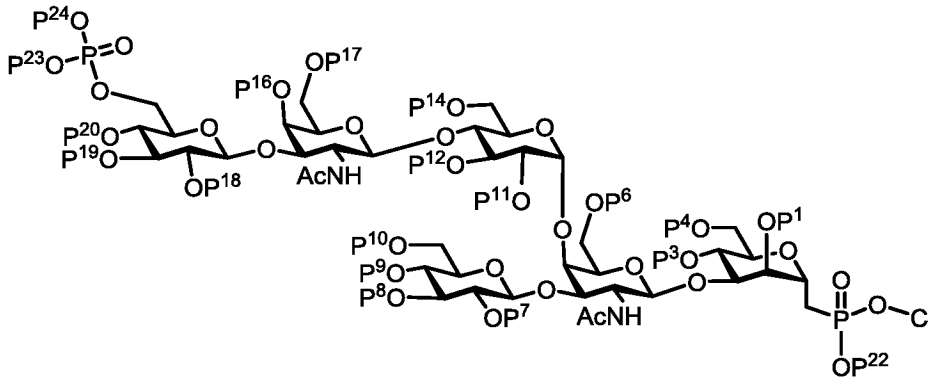
(I7g)



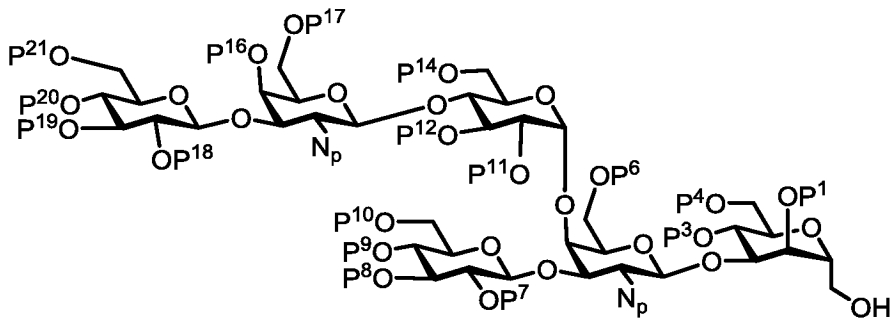
(I7h)



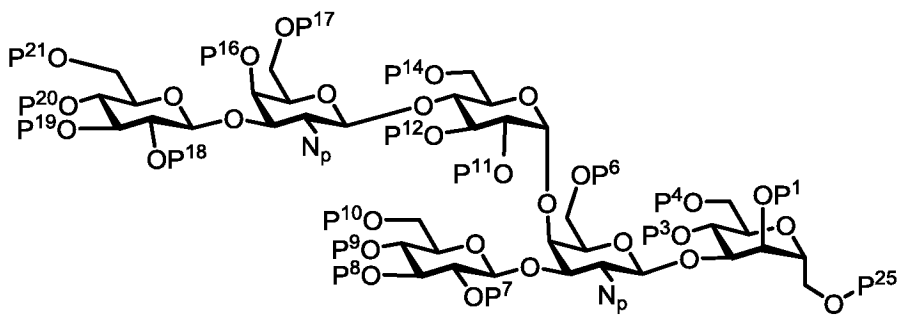
(I7i)



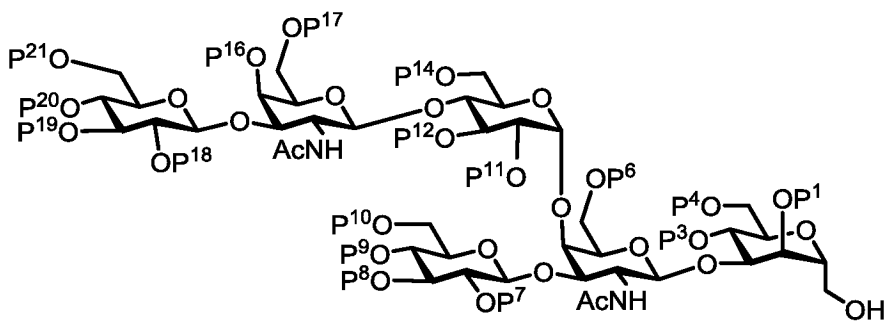
(I7j)



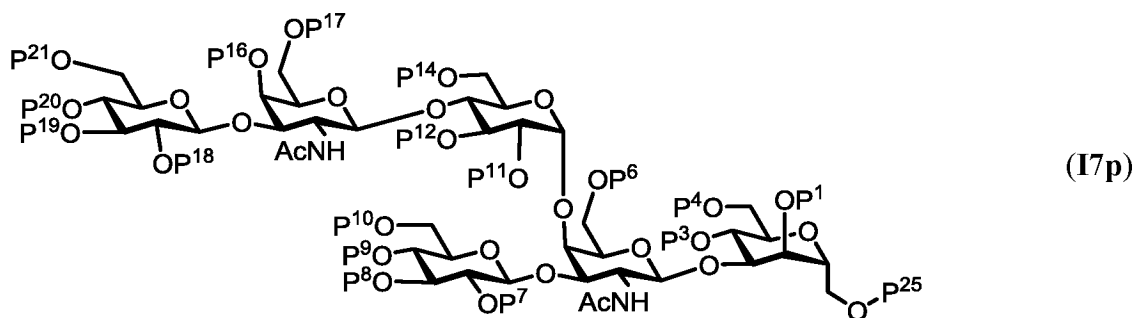
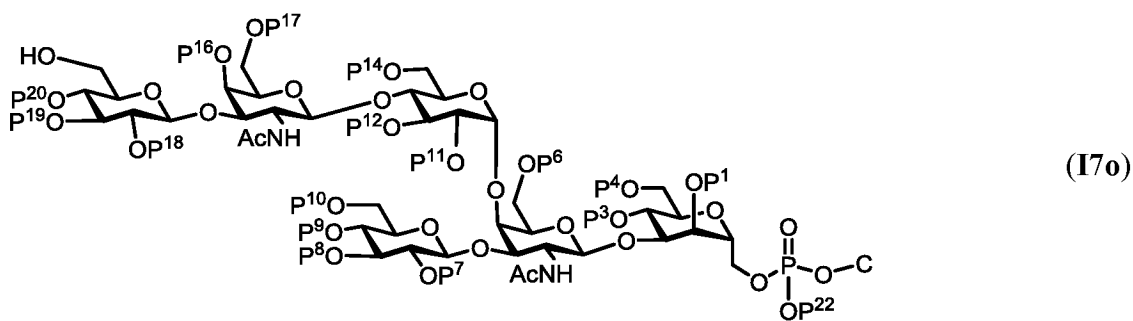
(I7k)



(I7m)



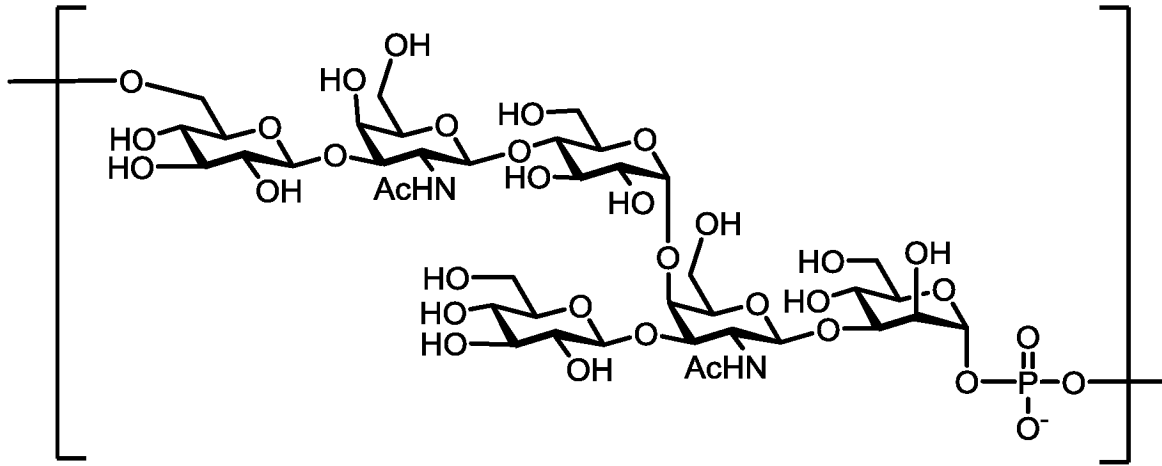
(I7n)



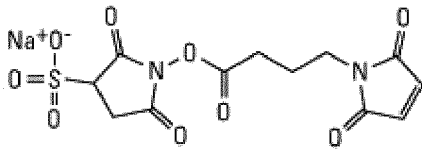
5 где  $P^1 - P^{25}$  представляют собой защитные группы,  $N_p$  представляет собой защищенную аминогруппу, LG представляет собой уходящую группу, и C представляет собой  $-L-E_p$ , где  $E_p$  представляет собой твёрдую подложку или защищенную концевую группу E, где E и L имеют значения, указанные в п. 1.



Фигура 1



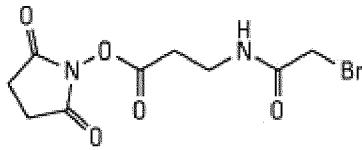
Фигура 2



Сульфо-GMBS

Сложный *N*-( $\gamma$ -малеимидобутирилокси)  
сульфосукцинимидный эфир  
MW 382.28

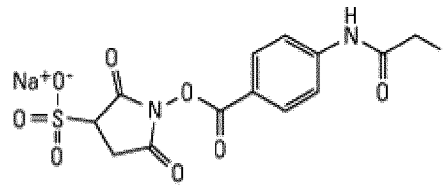
Спейсерная группа 7.3 Å



SBAP

Сукцинимидил-3-(бромацетиамидо)пропионат  
MW 307.10

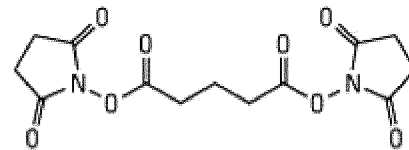
Спейсерная группа 6.2 Å



Сульфо-SIAB

Сульфосукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоат  
MW 504.19

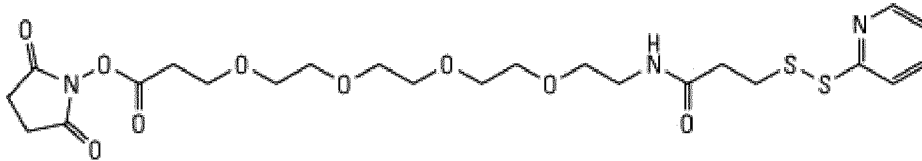
Спейсерная группа 10.6 Å



DSG

Дисукцинимидил глутарат  
MW 326.26

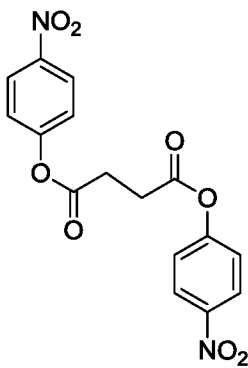
Спейсерная группа 7.7 Å



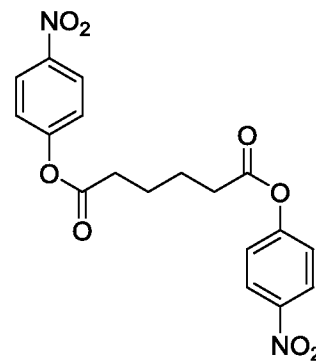
PEG4-SPDP

2-Пиридилдитиол-тетраоксатетрадекан-*N*-гидроксисукцинимид  
MW 559.17

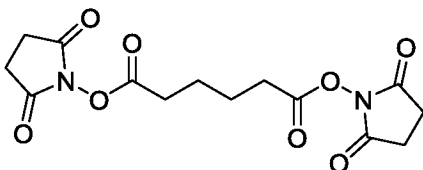
Спейсерная группа 25.7 Å



Бис-(4-нитрофенил)сукцинат

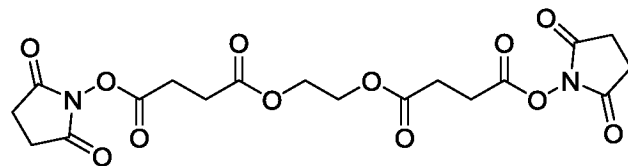


Бис-(4-нитрофенил)адипат



DSA

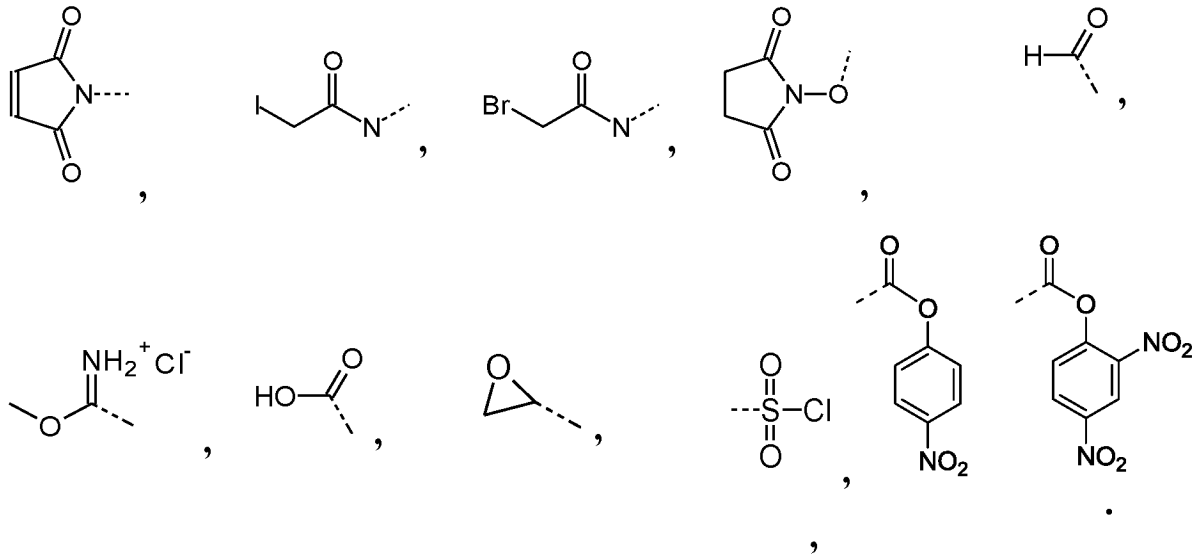
Дисукцинимидил адипат



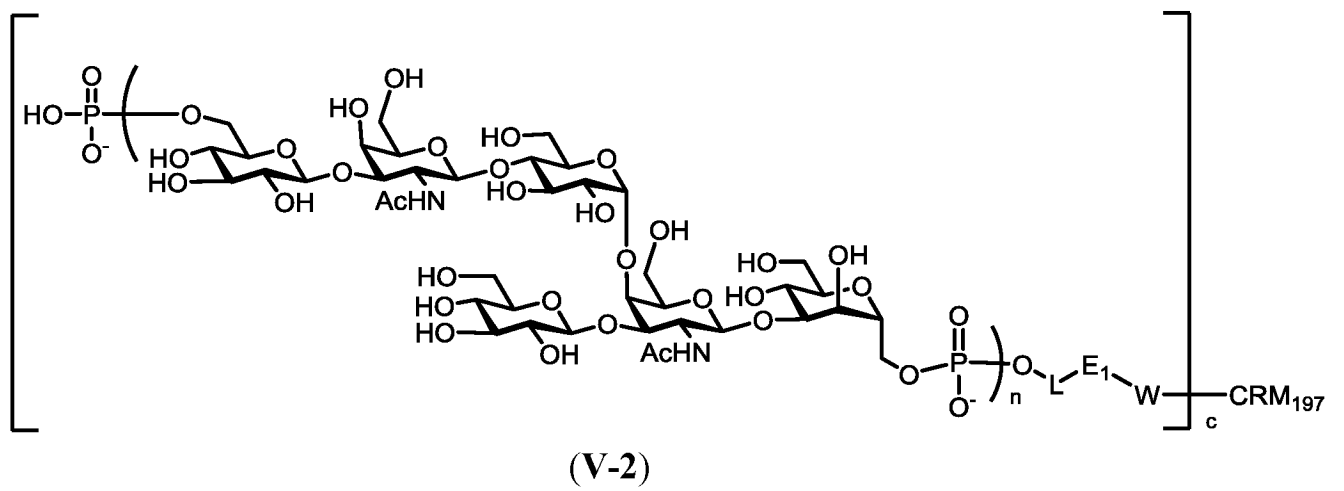
Этиленгликоль-бис(*N*-гидроксисукцинимидный  
эфир янтарной кислоты

)

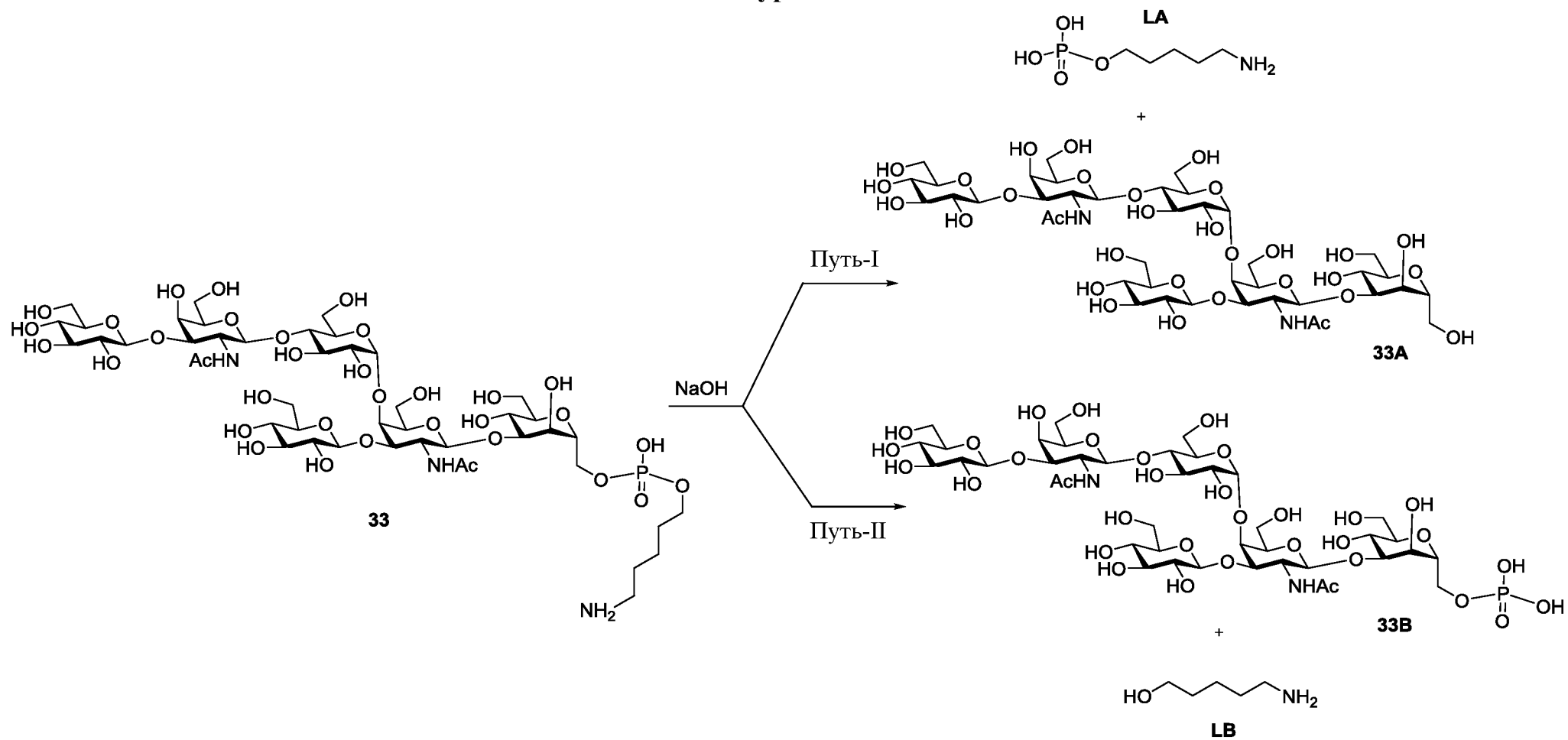
Фигура 3



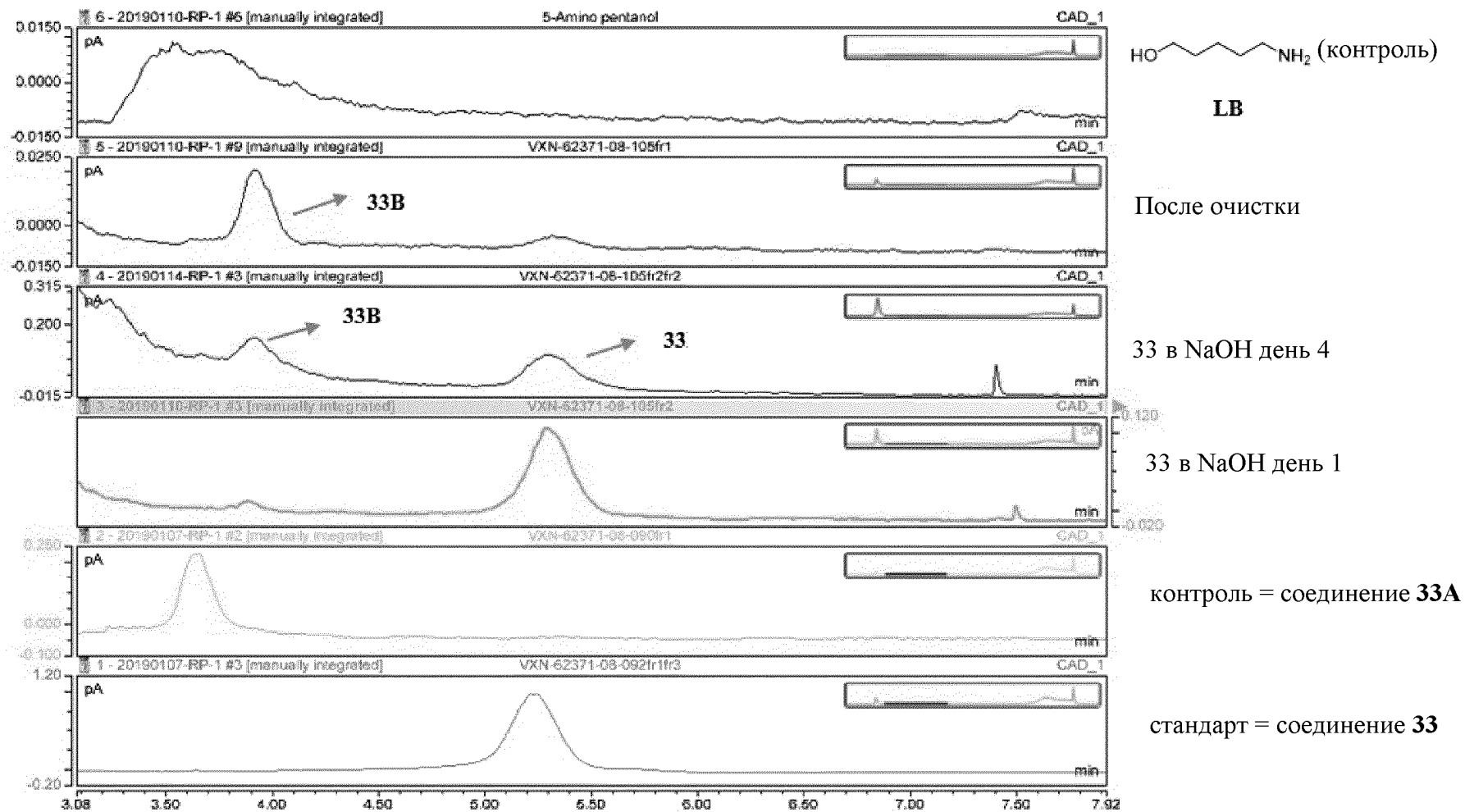
Фигура 4



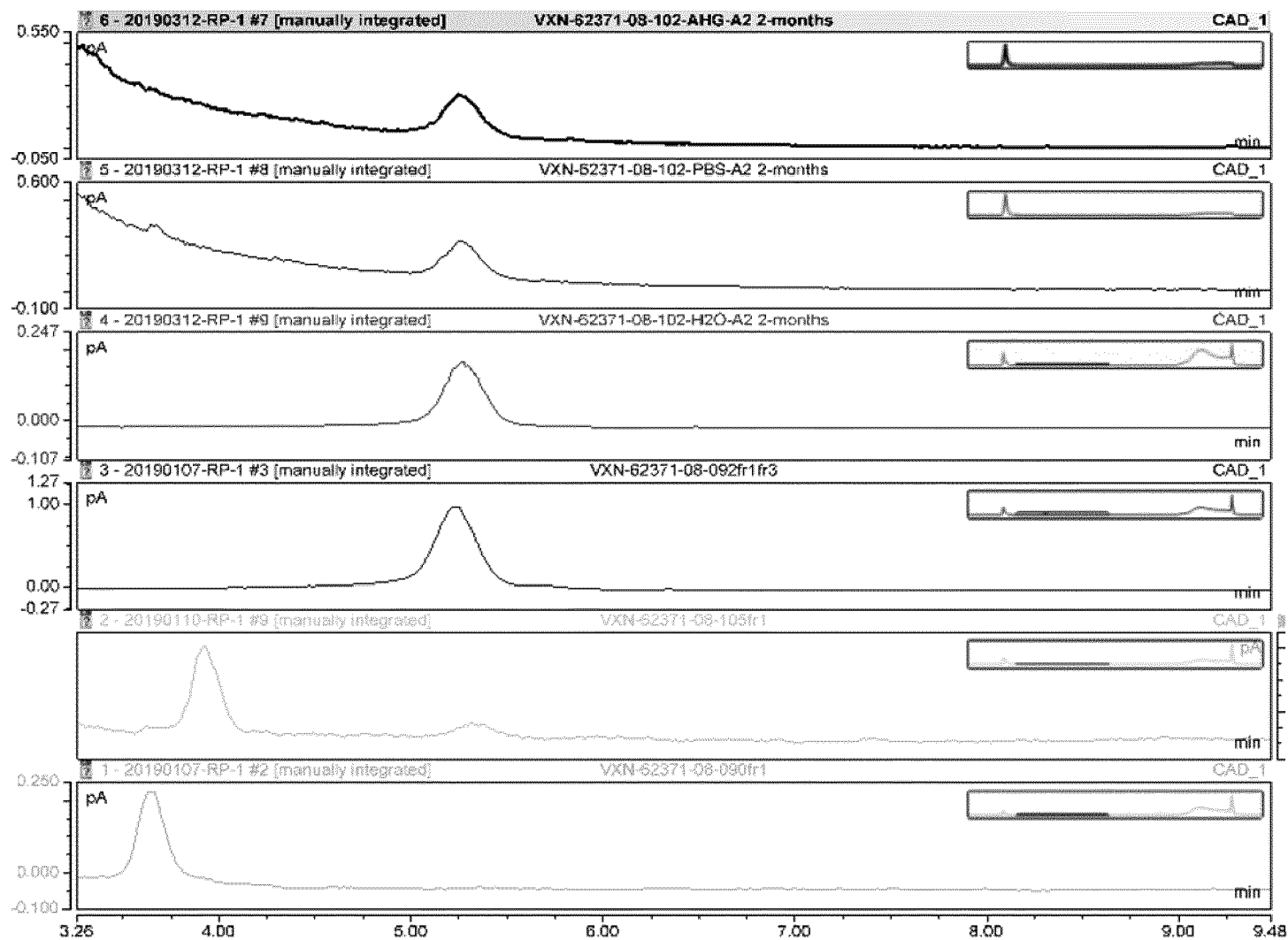
Фигура 5



Фигура 6



Фигура 7



**33** в Алгидрогеле и  
NaPi  
при 2-8 °С, 2 месяца

**33** в NaPi  
при 2-8 °С, 2 месяца

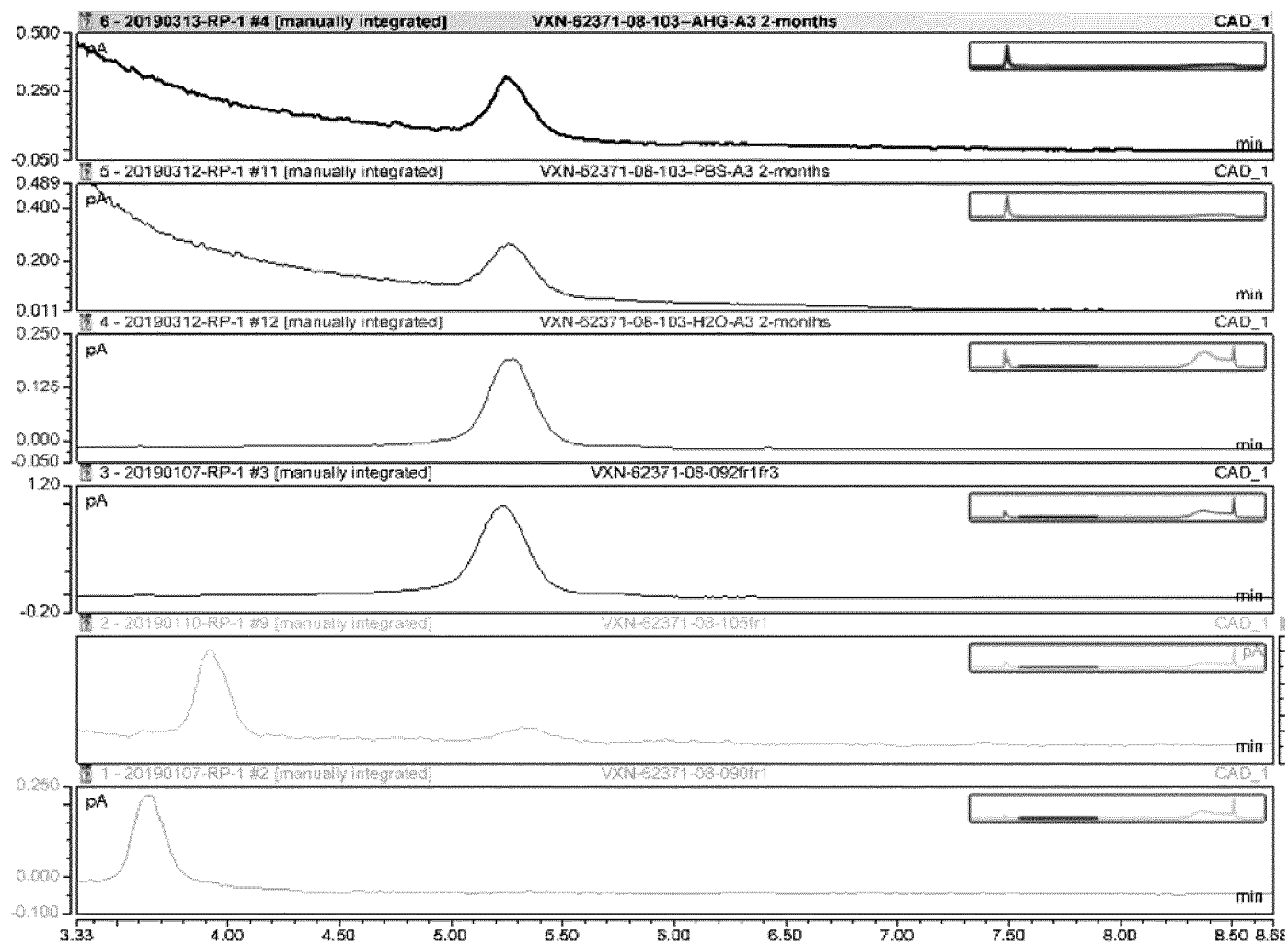
**33** в воде  
при 2-8 °С, 2 месяца

**33** (стандарт)

**33** + NaOH

**33A** (контроль)

Фигура 8



**33** в Алгидрогеле и  
NaPi  
при 25 °C, 2 месяца

**33** в NaPi  
при 25 °C, 2 месяца

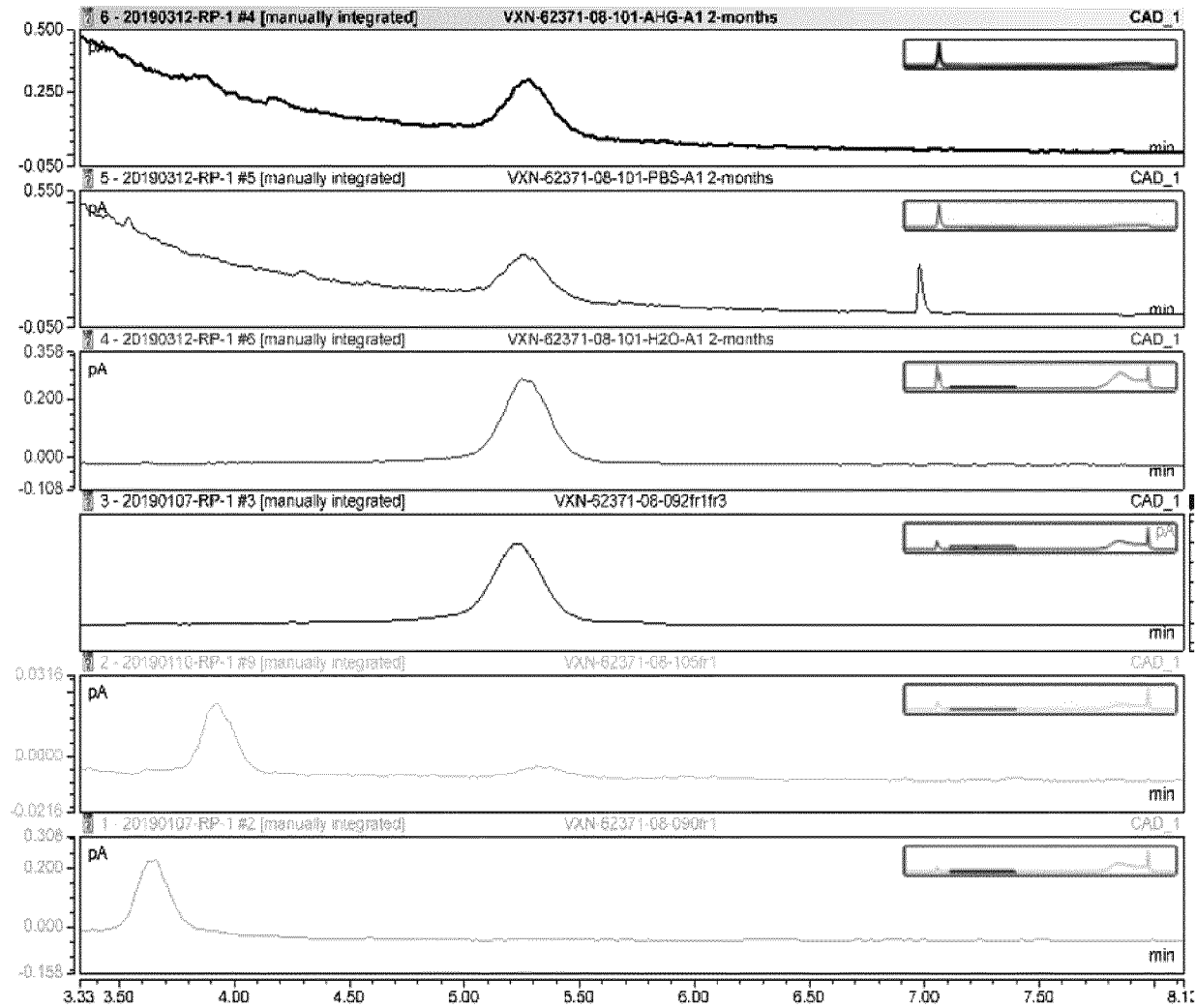
**33** в воде  
при 25 °C, 2 месяца

**33** (стандарт)

**33** + NaOH

**33A** (контроль)

Фигура 9



**33** в Алгидрогеле и  
NaPi  
при 37 °C, 2 месяца

**33** в NaPi  
при 37 °C, 2 месяца

**33** в воде  
при 37 °C, 2 месяца

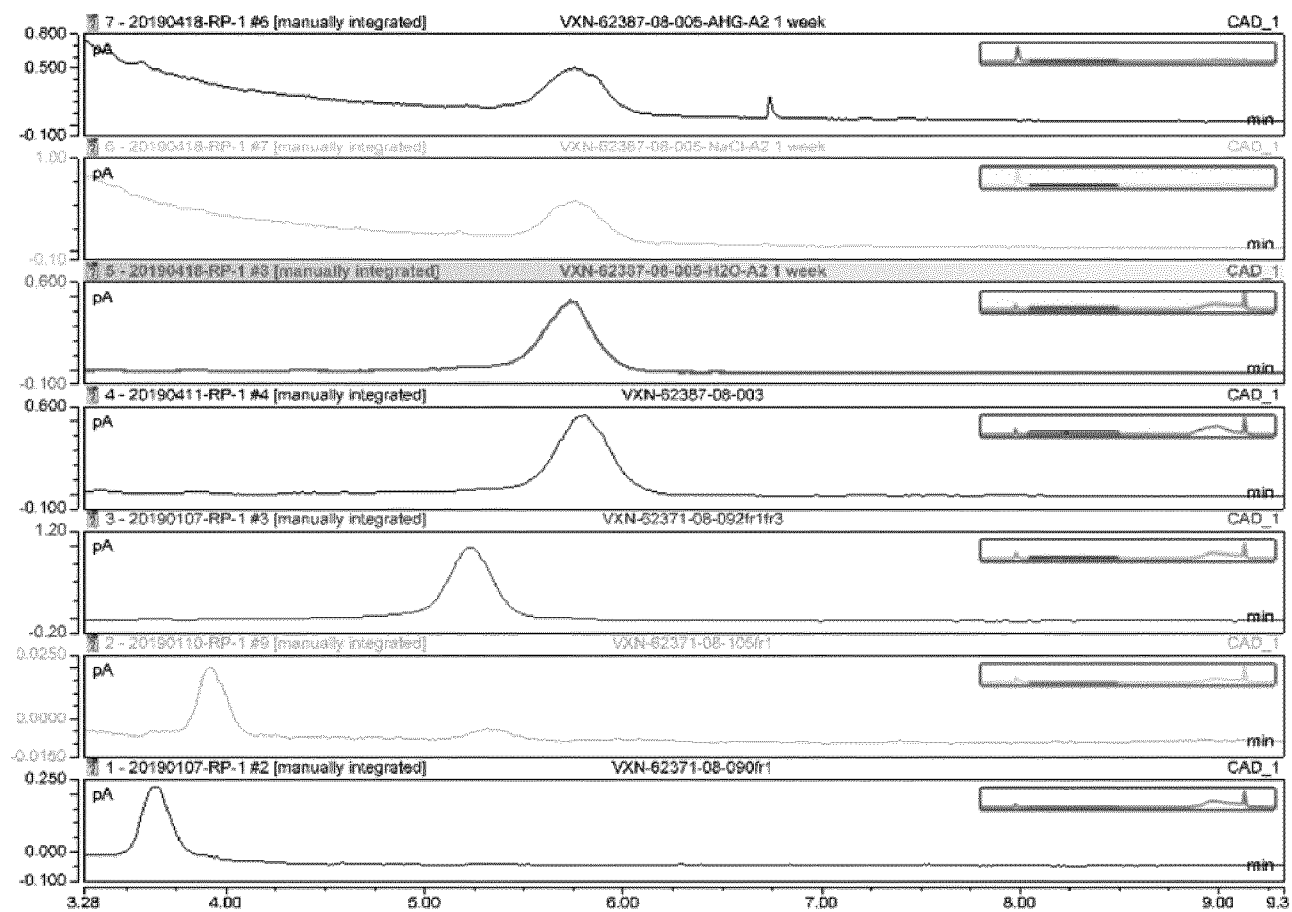
**33** (стандарт)

**33** + NaOH

**33A** (контроль)



Фигура 10



92 в Алгидрогеле и NaPi  
при 2-8 °C, 1 неделя

92 в NaPi  
при 2-8 °C, 1 неделя

92 в воде  
при 2-8 °C, 1 неделя

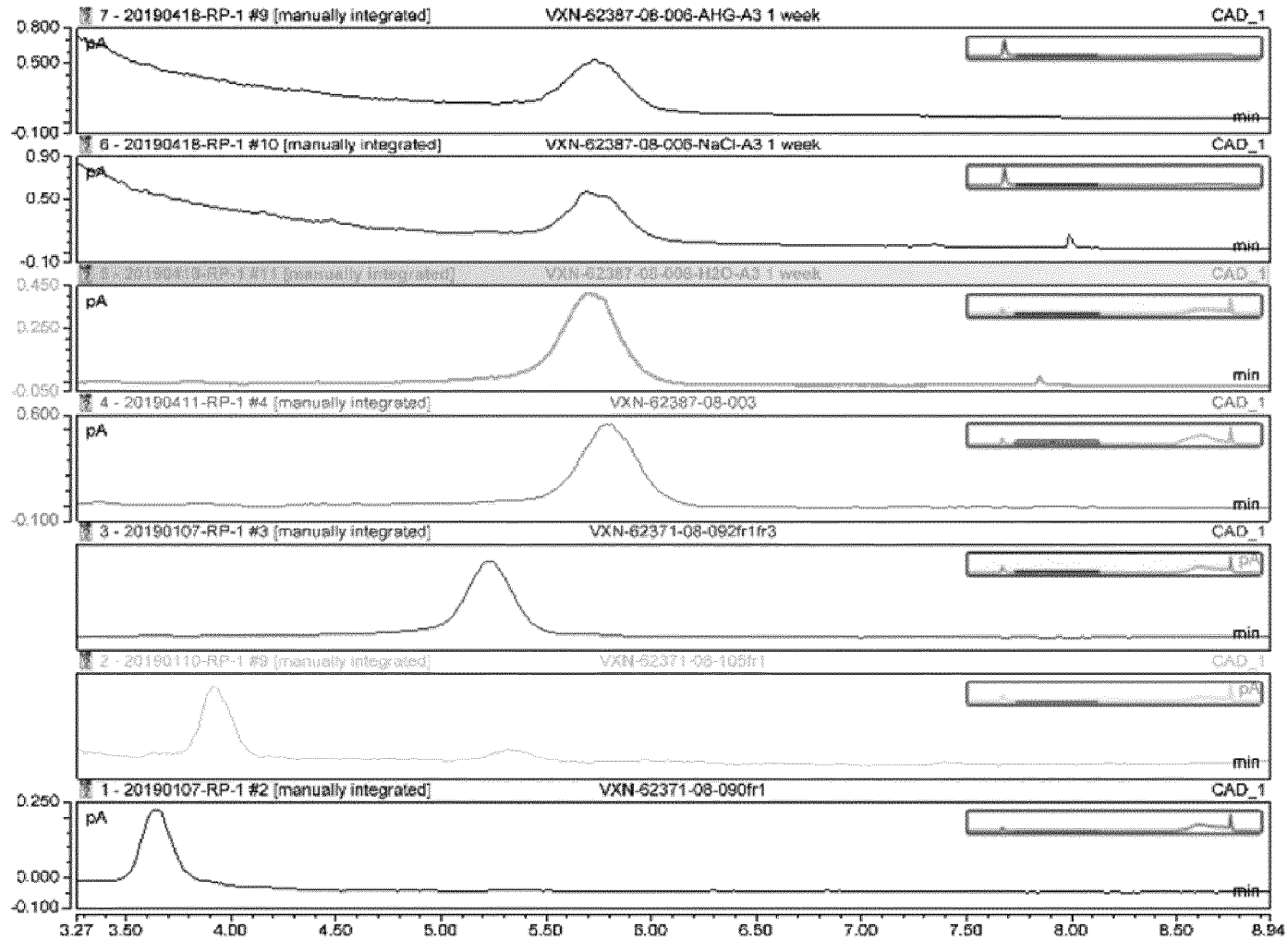
92 (стандарт)

33 (контроль)

33 + NaOH

33A (контроль)

Фигура 11



92 в Алгидрогеле и NaPi  
при 25 °С, 1 неделя

92 в NaPi  
при 25 °С, 1 неделя

92 в воде  
при 25 °С, 1 неделя

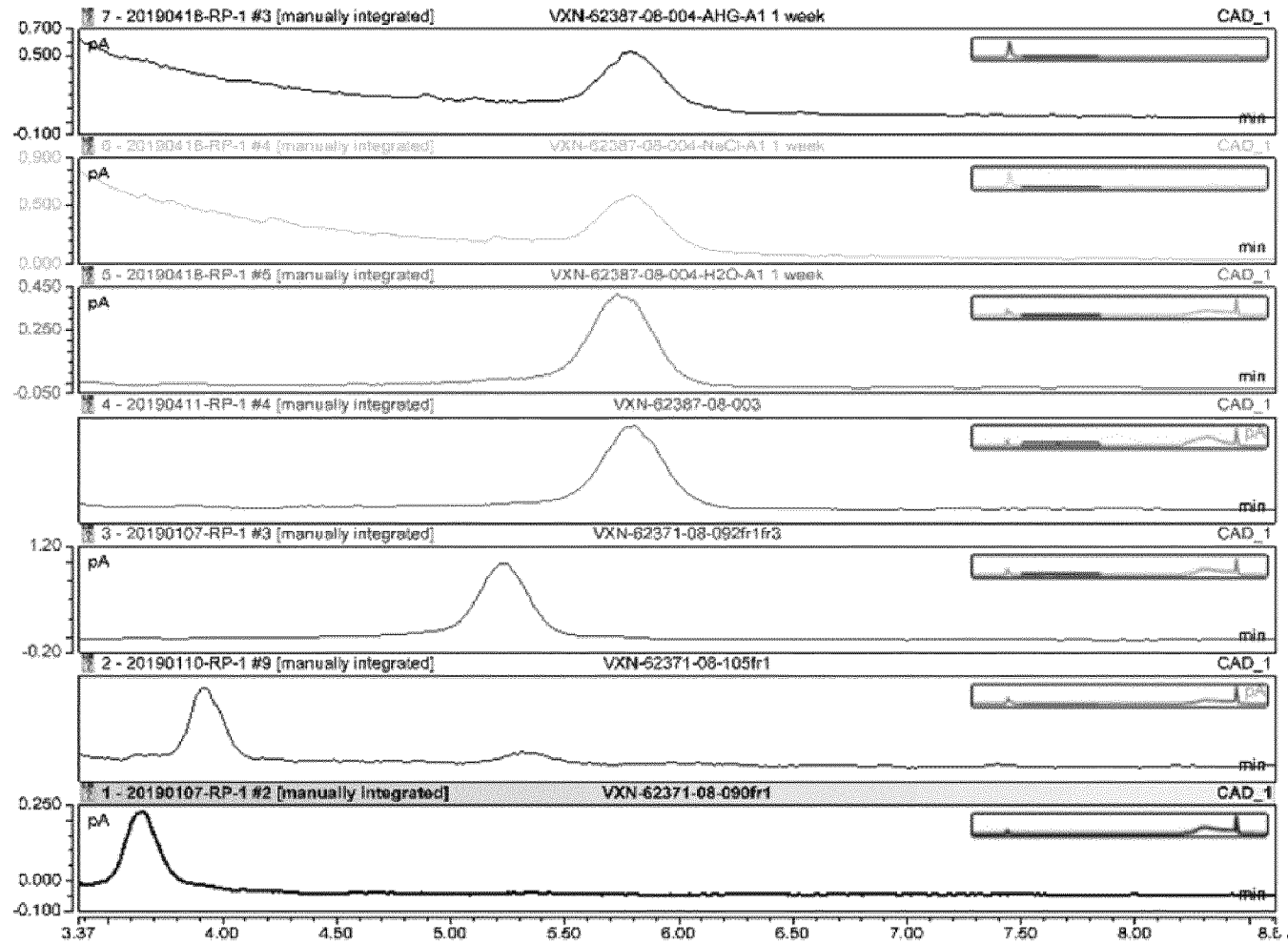
92 (стандарт)

33 (контроль)

33 + NaOH

33A (контроль)

Фигура 12



92 в Алгидрогеле и NaPi  
при 37 °С, 1 неделя

92 в NaPi  
при 37 °С, 1 неделя

92 в воде  
при 37 °С, 1 неделя

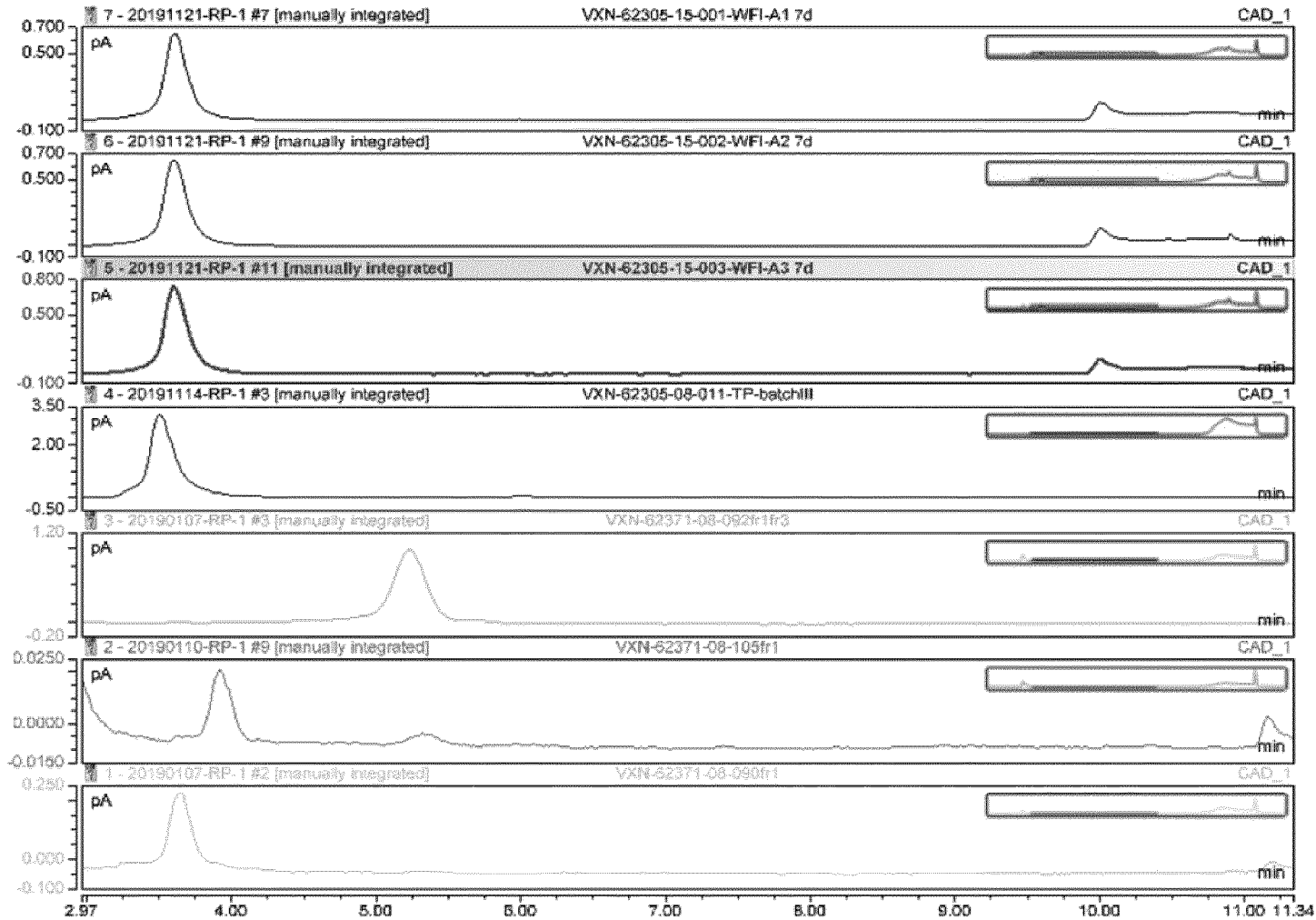
92 (стандарт)

33 (контроль)

33 + NaOH

33A (контроль)

Фигура 13



54 в воде  
при 37 °С, 1 неделя

54 в воде  
при 2-8 °С, 1 неделя

54 в воде  
при 25 °С, 1 неделя

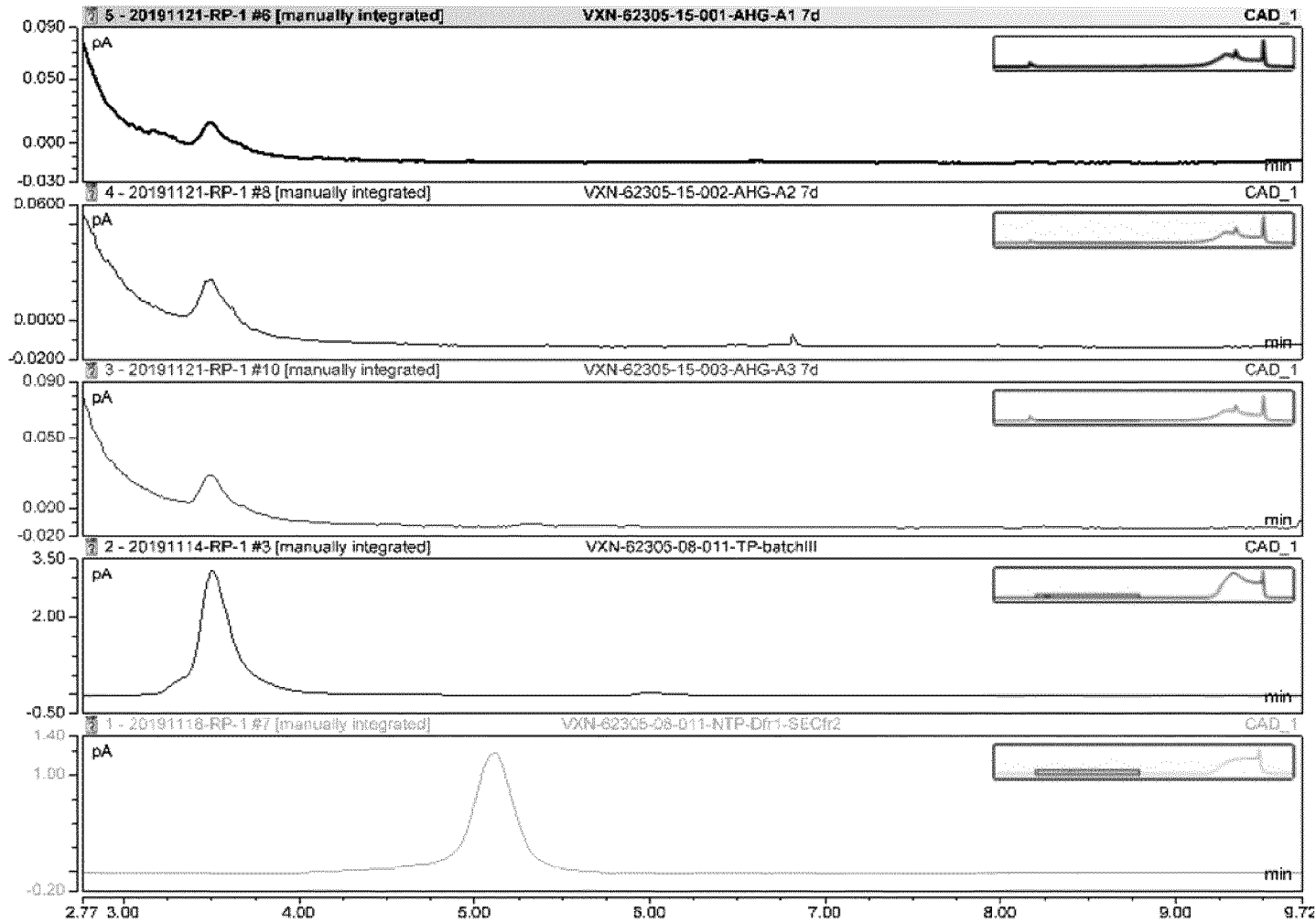
54 (стандарт)

33 (контроль)

33 + NaOH

33A (контроль)

Фигура 14



54 в Алгидрогеле  
при 37 °С, 1 неделя

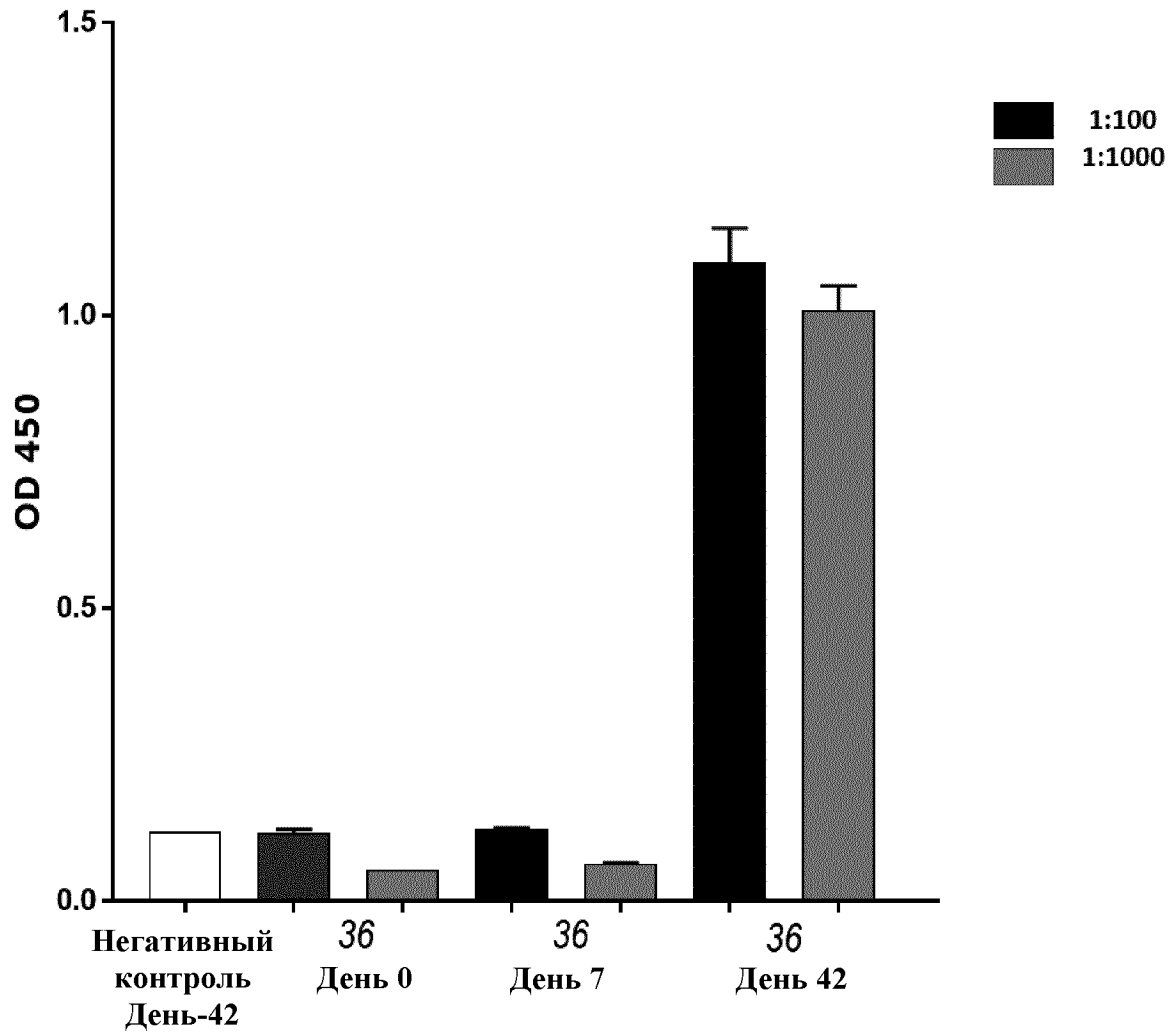
54 в Алгидрогеле  
при 2-8 °С, 1 неделя

54 в Алгидрогеле  
при 25 °С, 1 неделя

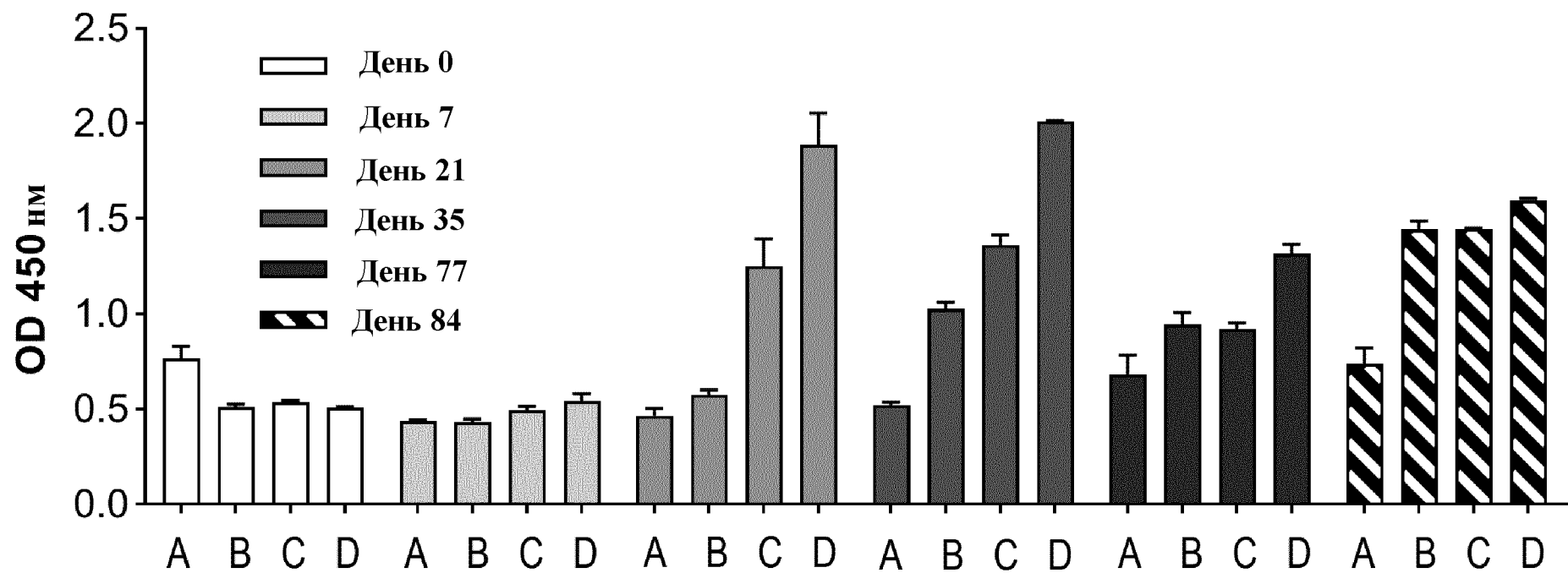
54 (стандарт)

33 (контроль)

Фигура 15

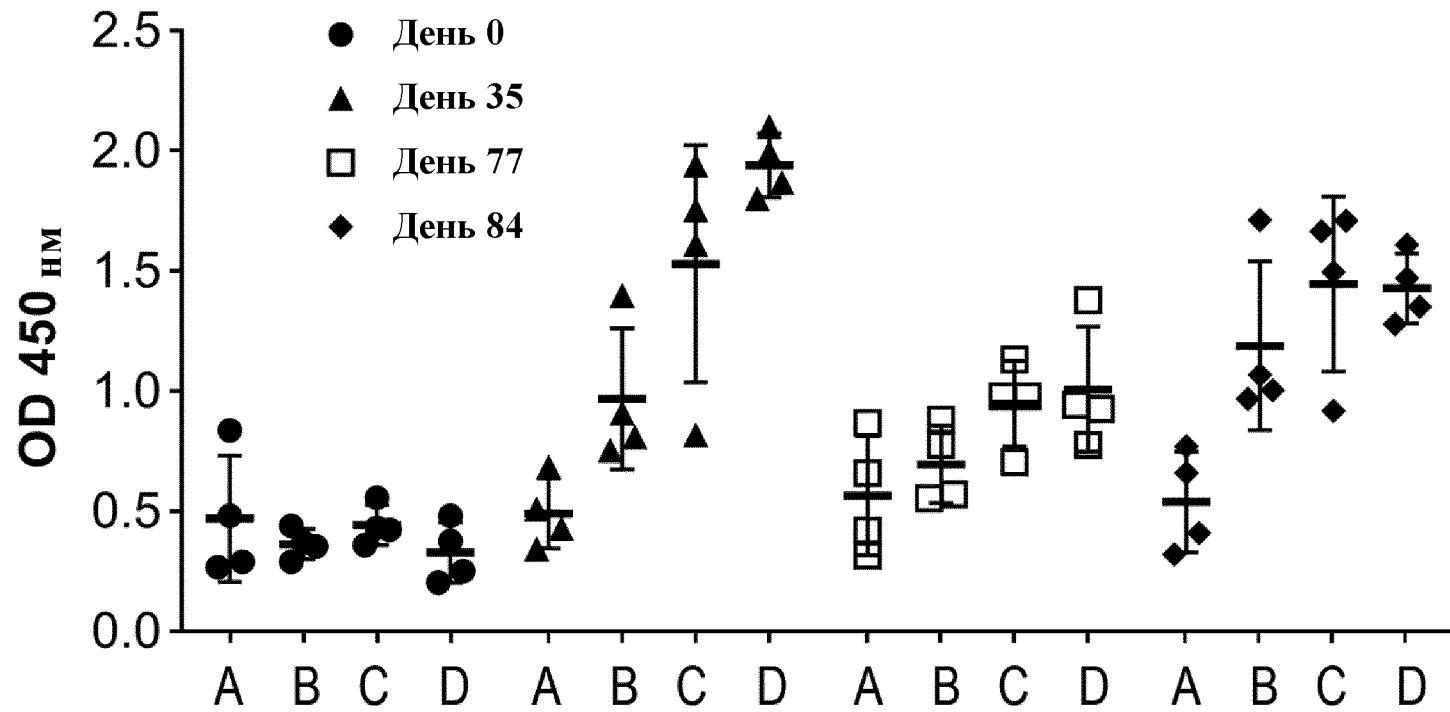


Фигура 16



A: PBS + Alum  
B: 2.5 мкг **56**  
C: 2.5 мкг **56** + Alum  
D: 10 мкг **56** + Alum

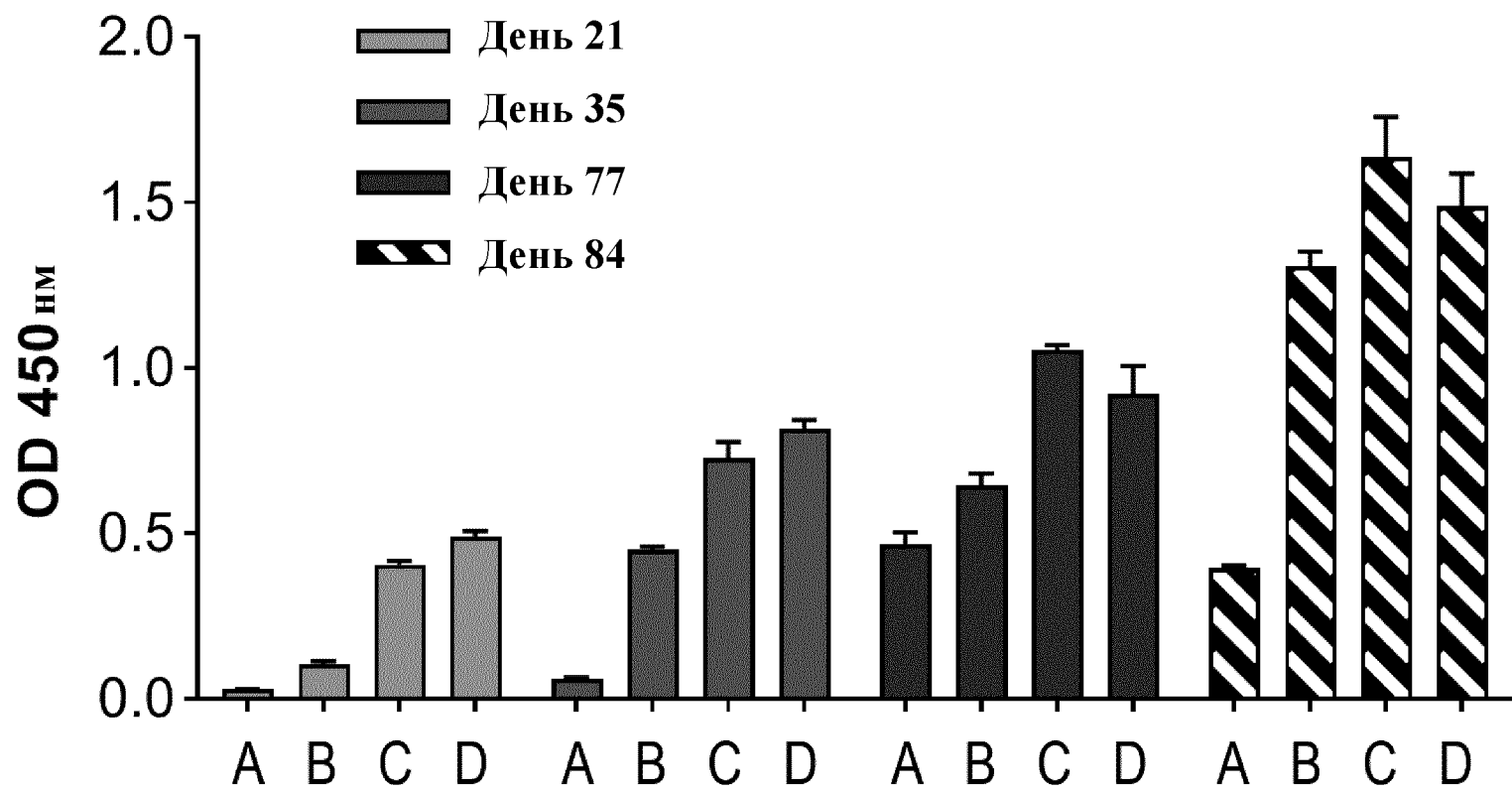
Фигура 17



A:	PBS + Alum
B:	2.5 мкг <b>56</b>
C:	2.5 мкг <b>56</b> + Alum
D:	10 мкг <b>56</b> + Alum

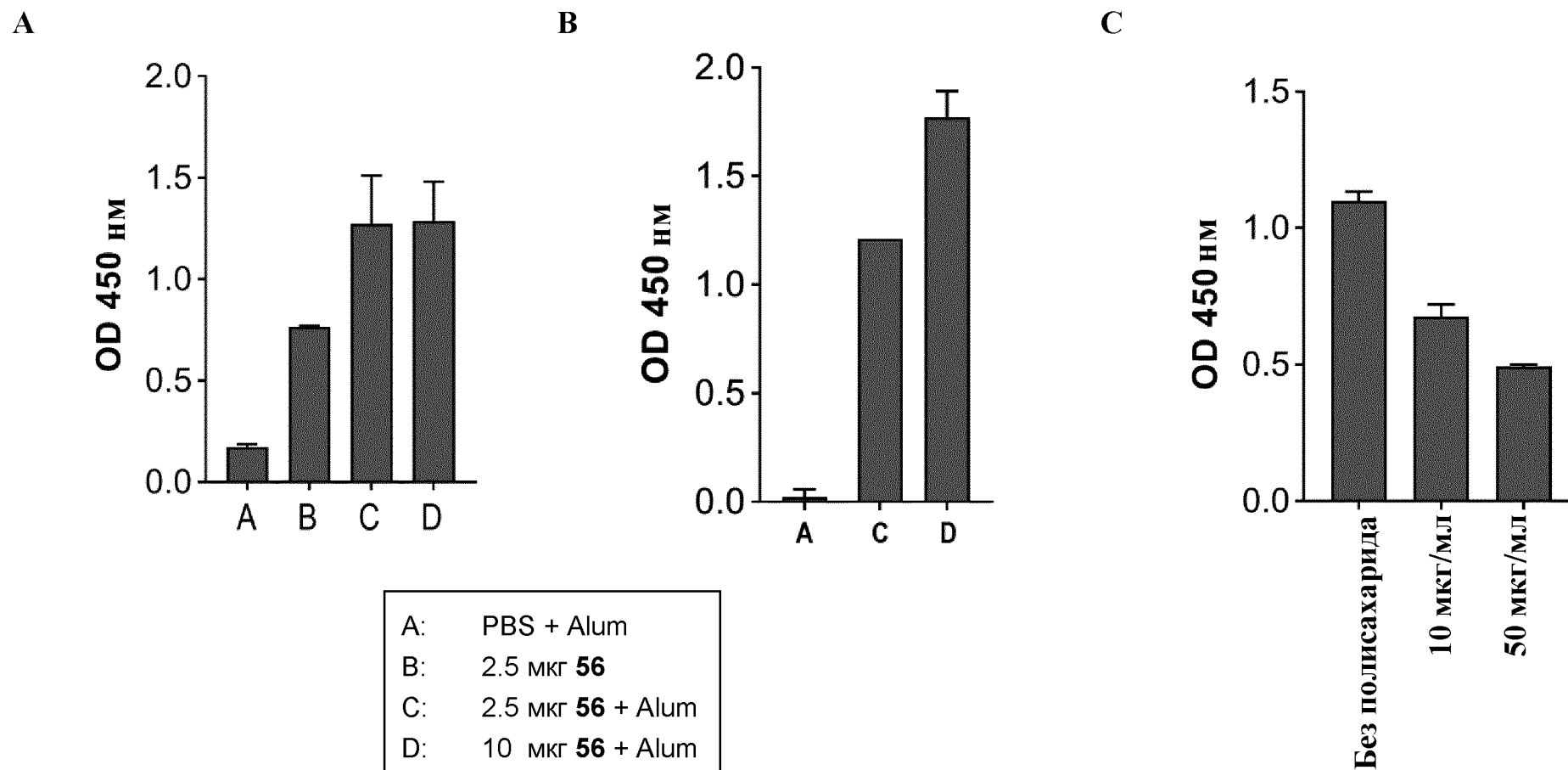


Фигура 18

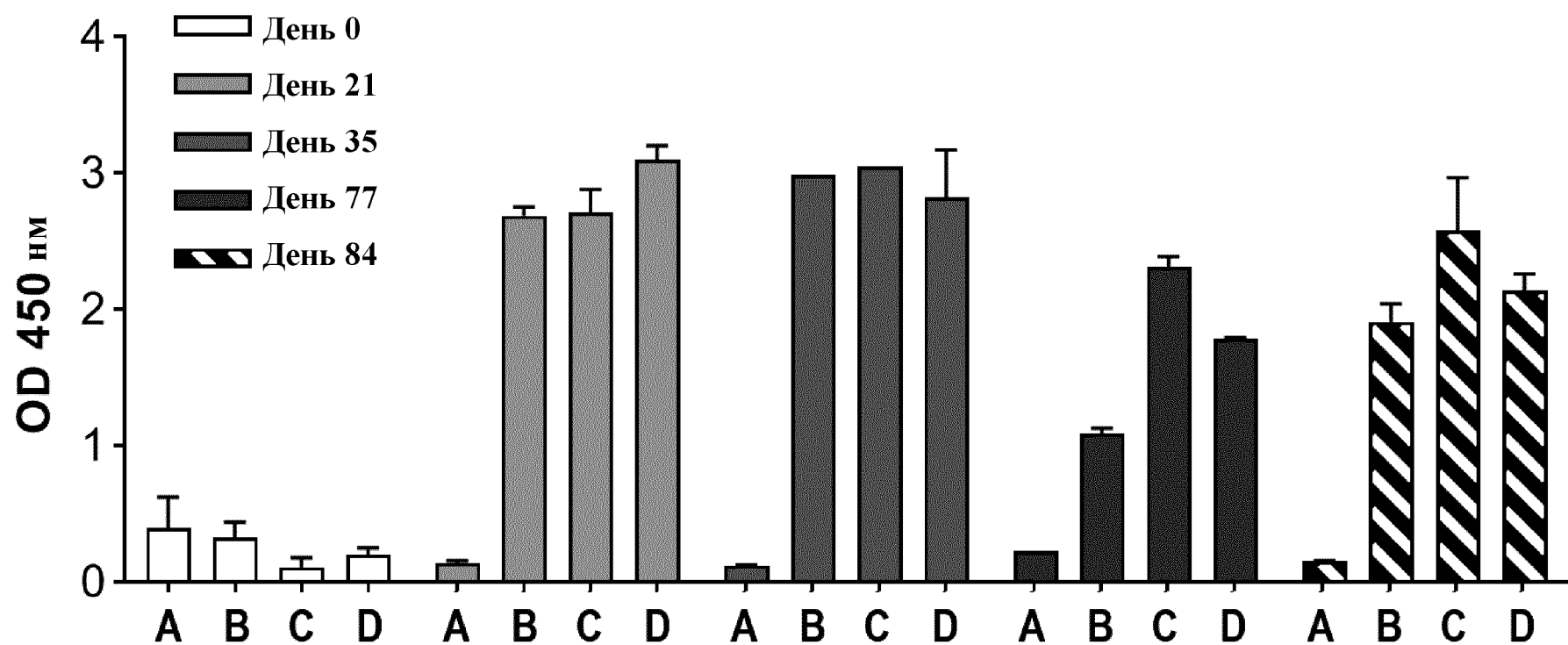


A:	PBS + Alum
B:	2.5 мкг <b>56</b>
C:	2.5 мкг <b>56</b> + Alum
D:	10 мкг <b>56</b> + Alum

Фигура 19

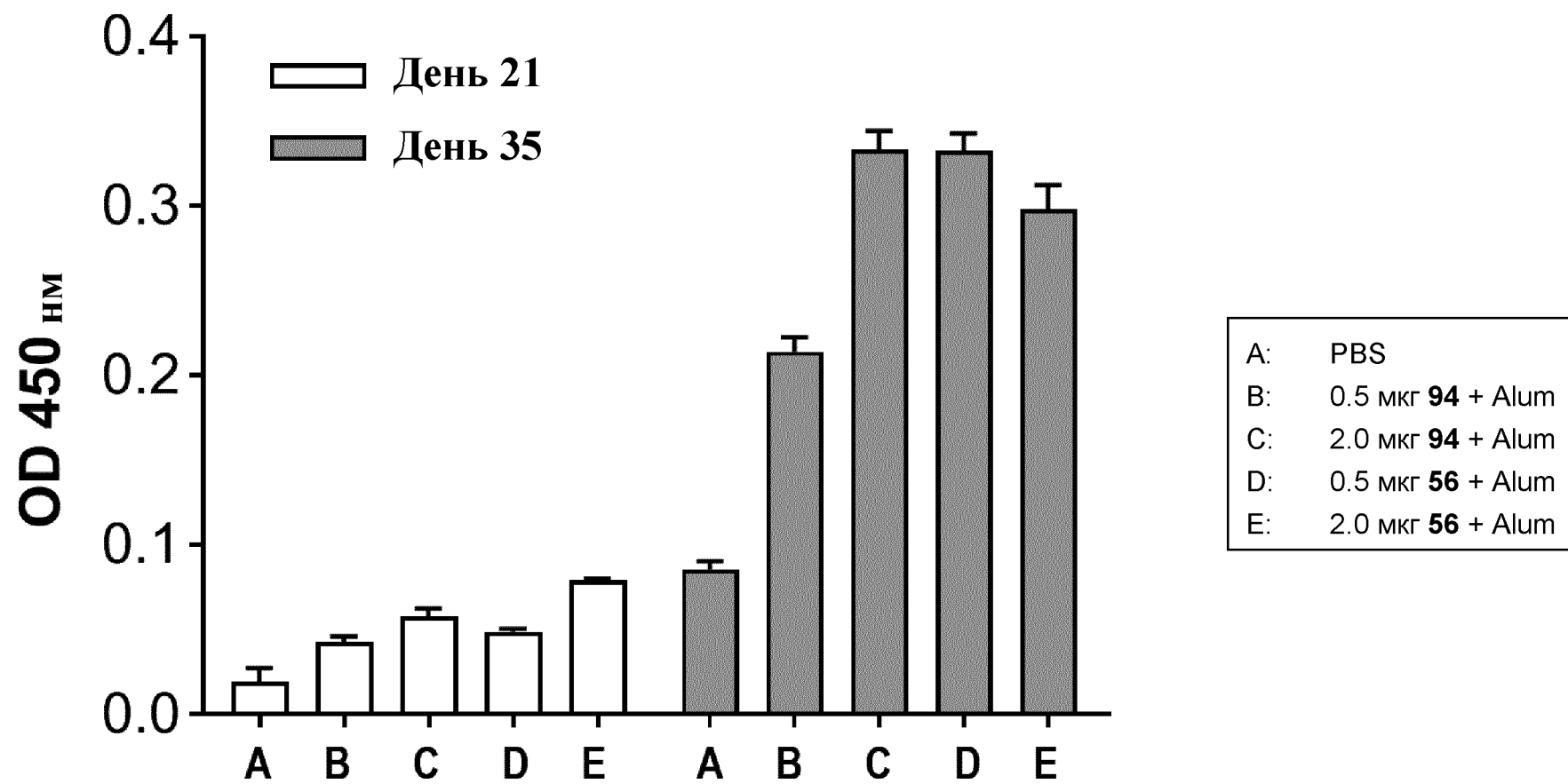


Фигура 20

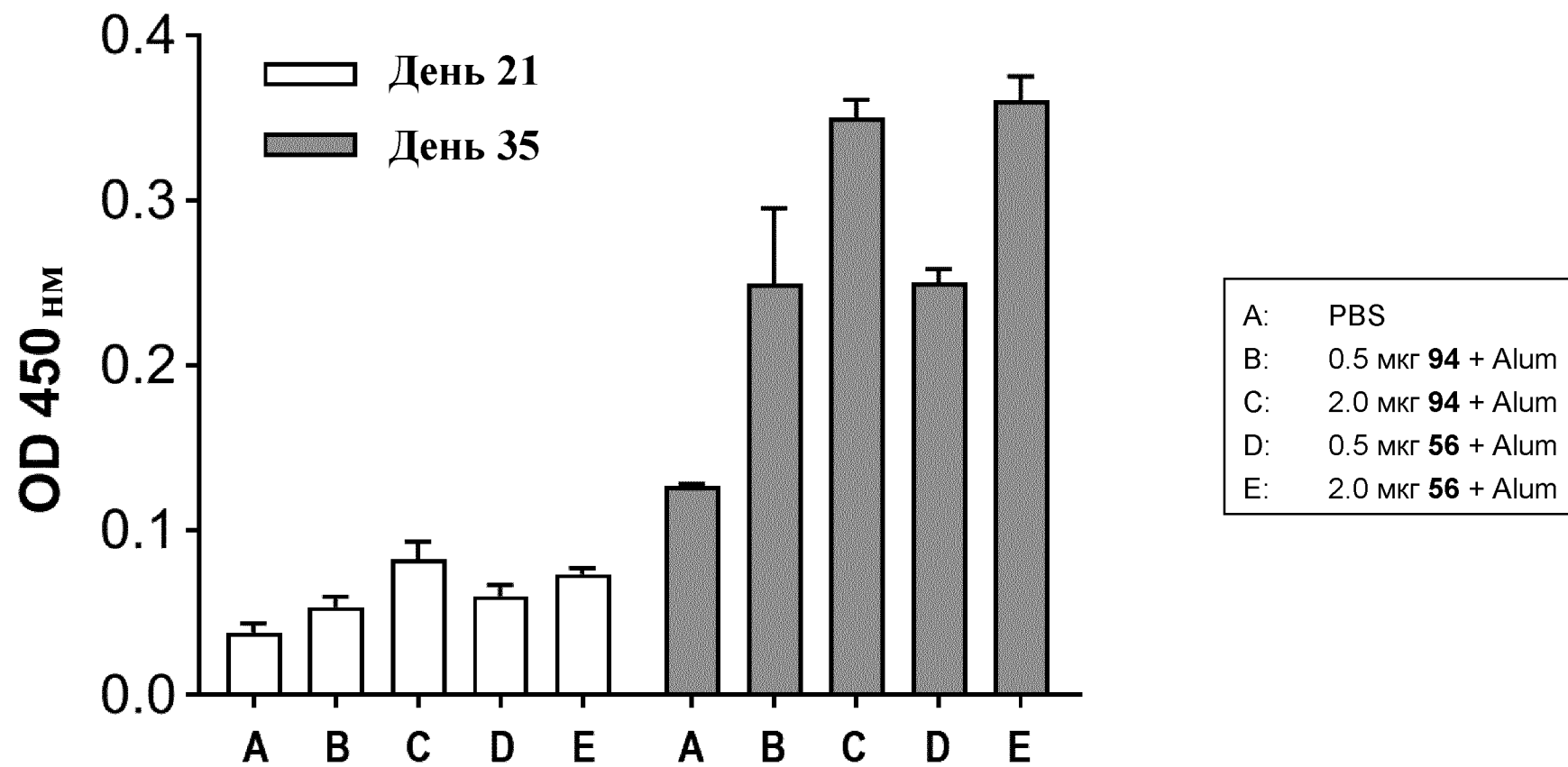


A: PBS + Alum  
B: 2.5 мкг **56**  
C: 2.5 мкг **56** + Alum  
D: 10 мкг **56** + Alum

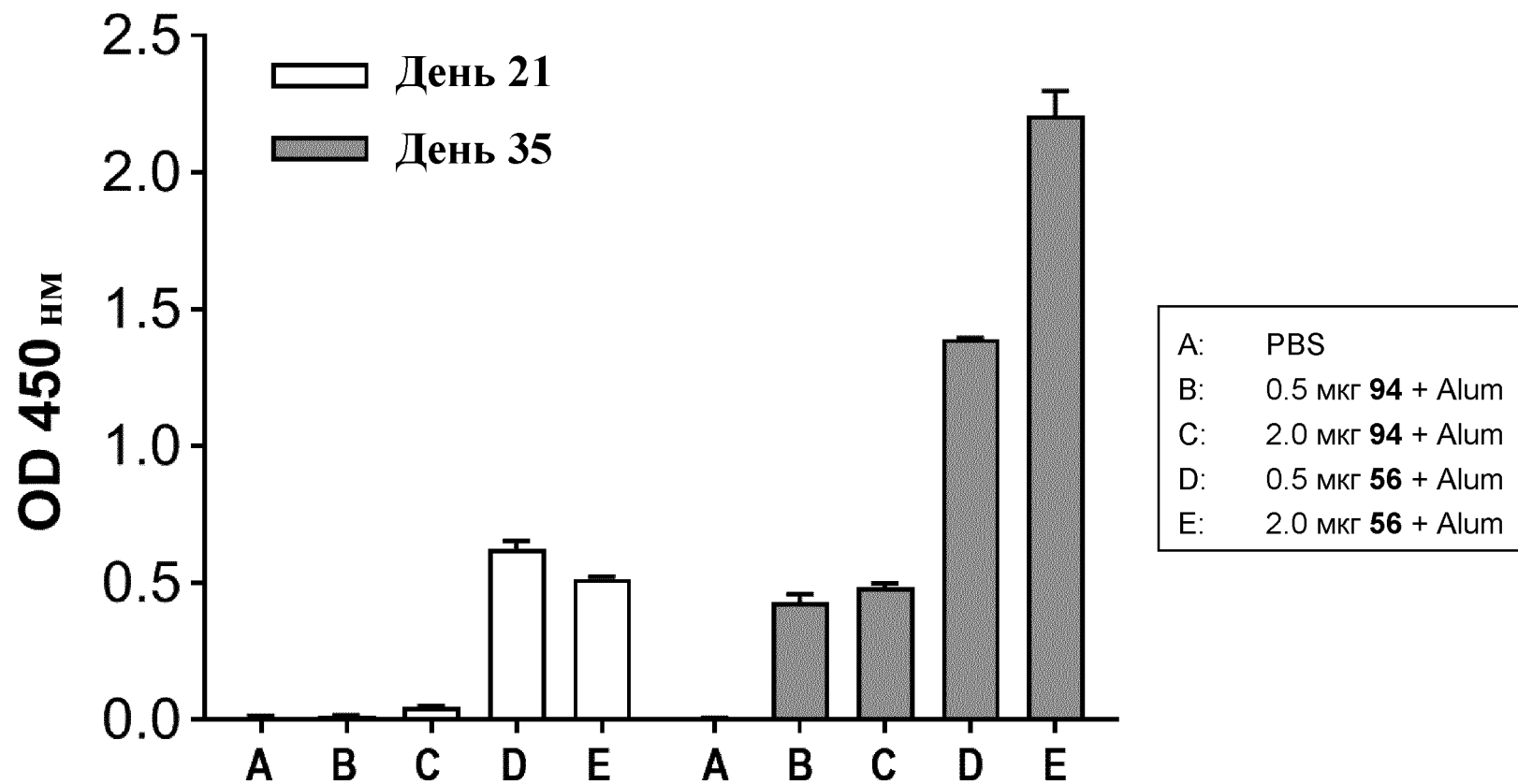
Фигура 21



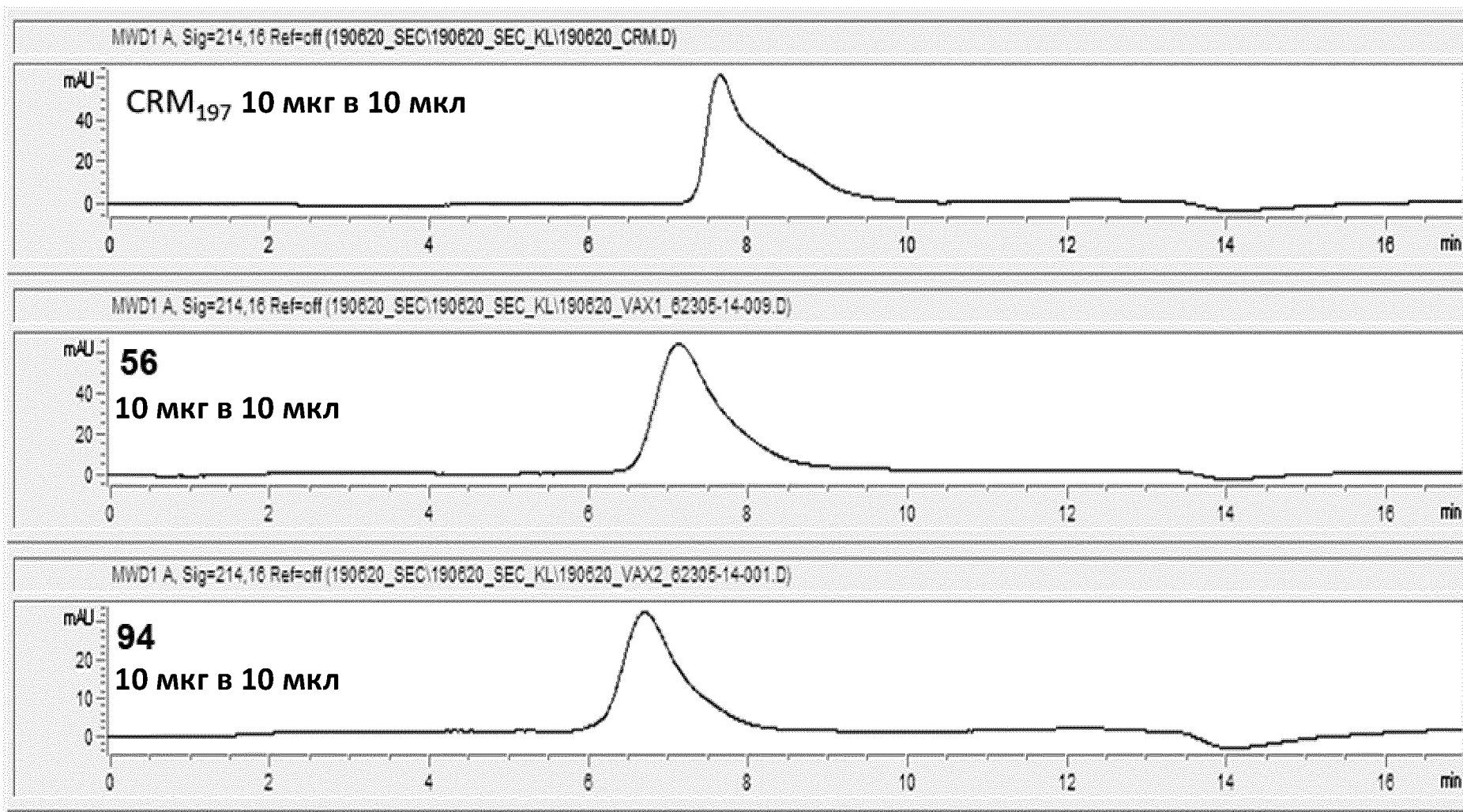
Фигура 22



Фигура 23



Фигура 24



Фигура 25

