

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290694** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.08.31

(51) Int. Cl. *C07H 5/06* (2006.01)
C07H 15/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.11.03

(54) **ОЛИГОСАХАРИДЫ С КЭП-СТРУКТУРОЙ, СОДЕРЖАЩИЕ СЕМЬ ИЛИ БОЛЕЕ ЗВЕНЬЕВ ИЗ 4,6-ДИДЕЗОКСИ-4-АЦИЛАМИДО- α -ПИРАНОЗЫ, И ИХ КОНЬЮГАТЫ В КАЧЕСТВЕ ВАКЦИН, НАПРАВЛЕННЫХ ПРОТИВ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ ОРГАНИЗМАМИ BRUCELLA**

(31) **1618635.5**

(32) **2016.11.04**

(33) **GB**

(62) **201990945; 2017.11.03**

(71) Заявитель:

**ZE SEKRETARI OF STEIT FOR
ЭНВАЙРОНМЕНТ, ФУД ЭНД РУРАЛ
ЭФФЕЙРС (GB); ZE ГОВЕРНОРЗ ОФ
ZE ЮНИВЕРСИТИ ОФ АЛЬБЕРТА
(CA)**

(72) Изобретатель:

**Макгивен Джон, Хоувэллс Лоренс,
Данком Люси (GB), Бандл Дэвид,
Мандал Сагадру Секхар, Саркар
Сусмита (CA)**

(74) Представитель:

Рыбина Н.А. (RU)

(57) Предложен диагностический конъюгат, содержащий трисахарид, состоящий из трех звеньев из 4,6-дидезокси-4-ациламидо- α -пиранозы и содержащий только C₁-C₂-связи, и/или содержащий дисахарид, состоящий из двух звеньев из 4,6-дидезокси-4-ациламидо- α -пиранозы, соединенных C₁-C₂-связью, и/или моносахарид, состоящий из одного звена из 4,6-дидезокси-4-ациламидо- α -пиранозы, при этом трисахарид, и/или дисахарид, и/или моносахарид соединен с несакхаридным носителем через восстанавливающий конец.

A2

202290694

202290694

A2

ОЛИГОСАХАРИДЫ С КЭП-СТРУКТУРОЙ, СОДЕРЖАЩИЕ СЕМЬ ИЛИ БОЛЕЕ ЗВЕНЬЕВ ИЗ 4,6-ДИДЕЗОКСИ-4-АЦИЛАМИДО-АЛЬФА-ПИРАНОЗЫ, И ИХ КОНЬЮГАТЫ В КАЧЕСТВЕ ВАКЦИН, НАПРАВЛЕННЫХ ПРОТИВ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ ОРГАНИЗМАМИ BRUCELLA

Область техники

Настоящее изобретение относится к полисахаридной молекуле, которая пригодна в качестве компонента вакцины для вакцинации животных от инфицирования организмами *Brucella*, такой, чтобы было возможно проведение теста DIVA (дифференциации инфицированных от вакцинированных животных). Настоящее изобретение также относится к новым диагностическим способам детекции инфицирования организмом *Brucella*.

Предпосылки изобретения

Бруцеллез является одним из наиболее серьезных зоонозных заболеваний в мире и вызывается бактериями рода *Brucella*. Это споронеобразующие коккобактериальные палочки с клеточной стенкой, характерной для грамотрицательных бактерий, в состав которой входят пептидогликаны, белки наружной мембраны и липополисахарид (LPS). Виды *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. suis* оказывают наибольшее воздействие на состояние здоровья человека и животных. У LPS полевых штаммов этих видов присутствует О-полисахарид (OPS), который выступает из клеточной стенки, возвышается над поверхностью и изменяет морфологию колоний, отчего их описывают как «гладкие» молекулы и как штаммы, которые содержат гладкий (s) LPS. Штаммы, которые не содержат OPS на своей поверхности, описывают как «шероховатые», и они содержат шероховатые (r) LPS. Основным признаком заболевания у сельскохозяйственных животных является неспособность к размножению, которая чаще всего выражается в виде выкидыша и мужского бесплодия. Это

приводит к большим потерям в животноводстве и к распространению заболевания среди людей. В иных случаях многие животные внешне будут выглядеть здоровыми.

Влияние этого заболевания ощущается в большинстве стран земного шара. Даже при отсутствии заболевания важно проводить обследование для поддержания здорового статуса. В большинстве стран заболевание продолжает сохраняться или может возобновляться, и существуют его обширные естественные резервуары.

Борьба с эндемическим бруцеллезом возможна лишь путем массовой вакцинации. Программы по тестированию и забою при высоких уровнях распространенности заболевания являются недоступными по средствам, неразумными и неприятными. После периода массовой вакцинации дальнейшая тенденция на снижение распространенности может быть достигнута путем вакцинации животных для воспроизводства поголовья. На практике, однако, может быть затруднительным осуществить эффективную вакцинацию с достаточным охватом. Современные вакцины обеспечивают недостаточную защиту для устранения заболевания. Поэтому для достижения устранения заболевания требуется программа по тестированию и забою, основанная на результатах серологии. Серодиагностика является ключевым инструментом в поддержании здорового состояния и для облегчения торговли сельскохозяйственными животными, а также для эпидемиологических исследований. Другие способы детекции заболевания, такие как прямое культивирование представителей рода *Brucella* и ПЦР для детекции специфической для *Brucella* ДНК, являются недостаточно чувствительными, более дорогими, и, в случае культивирования, культуры несут значительные риски для здоровья. Иммунодиагностика с помощью клеточных реакций также недостаточно эффективна из-за низкой диагностической чувствительности и реакций, возникающих в результате вакцинации. (Pouillot *et al* (1997) *Vet Res* 28:365-374).

В настоящее время общепризнанными вакцинами против бруцеллеза являются S19 *B. abortus* и RB51 *B. abortus* для применения на крупном рогатом скоте, а также Rev1 *B. melitensis* для применения на овцах и козах. Все они характеризуются значительными и хорошо задокументированными недостатками (Blasco *et al* (2015) *Veterinary Vaccines for Developing Countries*. FOA, Rome). Например, все они являются живыми (в этом случае для распространения необходимо использование холодовой цепи), обладают остаточной вирулентностью у сельскохозяйственных животных и являются патогенными для людей. Как RB51 *B. abortus*, так и Rev1 *B. melitensis* обладают устойчивостью к антибиотикам, которые важны для лечения данного заболевания у человека. S19 *B. abortus* и Rev1 *B. melitensis* могут утратить способность синтезировать OPS, что приводит к потере защитной эффективности. Это особенно проблематично в случае с Rev1 *B. melitensis* (Mancilla *et al* (2010) *Journal of Bacteriology* 192: 6346-6351).

S19 *B. abortus* и Rev1 *B. melitensis* являются гладкими штаммами, и поэтому их применение приводит к индукции выработки антител, которые дают положительную реакцию в стандартных серологических тестах на инфекцию *Brucella*. Это связано с тем, что в основе серодиагностических антигенов, используемые в этих тестах, лежит наличие OPS, что придает им превосходную чувствительность, тогда как антигены без OPS являются неэффективным диагностическим средством (McGiven (2013) *Rev Sci Tech* 32:163-176). Во многих случаях это делает невозможным различение инфицированных от вакцинированных животных. Это создает значительный барьер для эффективного контроля, поскольку крайне затрудняет эффективное применение вакцинации наряду со стратегией тестирования и исключения, в основе которой лежит серодиагностика.

Был выведен шероховатый штамм RB51 *B. abortus* для облегчения серологических реакций, являющихся следствием вакцинации посредством S19 *B. abortus*, у крупного рогатого скота. Этот шероховатый штамм был выведен путем пассирования на пропитанной рифампицином питательной среде (Schurig

et al (1991) *Vet Microbiol* 28:171-188). Из множества мутаций, спонтанно создаваемых антибиотиком, некоторые влияют на синтез OPS. Штамм не может ни синтезировать OPS, ни, если синтез дополняют путем внесения гена, экспортировать его на клеточную поверхность (Vemulapalli *et al* (2000) *Infect Immun* 68). Следовательно, применение такой вакцины не приводит к выработке антител к OPS и оказывает ограниченное вмешательство в обычную серологию.

Несмотря на это преимущество RB51 *B. abortus*, его признание было далеко не повсеместным. Спорна и его защитная эффективность и безопасность для крупного рогатого скота в сравнении с S19 *B. abortus* (Moriyon *et al* (2004) *Veterinary Research* 35:1-38). На мышинных моделях защиты, т. е. на основном модельном животном, было показано, что он обладает значительно меньшими защитными свойствами, чем S19 *B. abortus* (Monreal *et al* (2003) *Infection and Immunity* 71:3261-3271).

Попытки разработать RB51 *B. abortus* в качестве вакцины от бруцеллеза у овец и коз не увенчались успехом в смысле обеспечения защиты (Idrissi *et al* (2001) *Rev Sci Tech* 20:741-747). Шероховатые штаммы *B. melitensis* также были подвергнуты оценке в качестве вакцин для овец, но они не продемонстрировали достаточной защитной эффективности (Barrío *et al* (2009) *Vaccine* 27:1741-1749). Шероховатый штамм B115 *B. melitensis* применялся на овцах, но было продемонстрировано, что он недостаточно безопасен, при этом сообщалось о высокой частоте выкидышей (Pérez-Sancho *et al* (2014) *Vaccine* 32:1877-1881). Проведенные ранее исследования на мышах показали, что B115 *B. melitensis* индуцирует выработку антител к OPS, что обусловлено наличием цитоплазматического OPS (Cloeckaert *et al* (1992) *J Gen Microbiol* 138:1211-1219). Всестороннее комплексное изучение защитной способности шероховатых мутантов *B. melitensis* защищать от заражения *B. melitensis* у мышей показало, что шероховатые варианты, которые не синтезировали OPS, обладали значительно меньшими защитными свойствами, чем их гладкие аналоги (Gonzalez *et al* (2008) *PLoS ONE* 3:e2760).

На мышинной модели бруцеллеза было продемонстрировано, что антитела к OPS обладают защитными свойствами (Montaraz *et al* (1986) *Infection and Immunity* 51:961-963). Было показано, что комбинация гуморальной и клеточной защиты оказывает синергетический эффект (Grilló *et al* (2006) *Vaccine* 24:2910-2916) и обеспечивает оптимальную защиту. И хотя данные, полученные у естественного хозяина, являются менее убедительными, доказательства, основанные на относительных свойствах гладких и шероховатых штаммов, которые описаны выше, являются убедительными, особенно для небольших жвачных животных.

Поиск усовершенствованных вакцин против *Brucella* является общепризнанной потребностью, но, несмотря на десятилетия усилий, с момента введения RB51 *B. abortus* никаких новых вакцин для их применения в животноводстве в обращение введено не было. Исследования в отношении вакцин на основе субъединиц рекомбинантных белков, векторов экспрессии белка *Brucella* или ДНК-вакцин еще не оказали какого-либо влияния в данной области техники. В случае аттенуированных гладких мутантов *Brucella* столкнулись с теми же проблемами индукции антител, что и с S19 *B. abortus* и 16M *B. melitensis*, и не было продемонстрировано достаточных дополнительных преимуществ в других отношениях, таких как безопасность и эффективность, для того, чтобы их можно было взять на вооружение за пределами исследовательской лаборатории.

Как уже обсуждалось, новые эффективные разработки были серьезно затруднены из-за постоянной и, казалось бы, неразрешимой проблемы, что OPS, по-видимому, необходим как для оптимальной защиты с помощью вакцин у скота, так и для эффективной серодиагностики. Это многолетний барьер, мешающий разработке вакцины с оптимальными защитными свойствами, которую можно будет использовать в схеме вакцинирования и тестирования DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals - дифференциации инфицированных от вакцинированных животных).

Основным структурным элементом в OPS *Brucella* является гомополимер из 4,6-дидезокси-4-формаидоманнопиранозильных (D-Rha4NFo) звеньев, которые

связаны различным образом: $\alpha(1\rightarrow 2)$ и $\alpha(1\rightarrow 3)$ (Meikle *et al* (1989) *Infect Immun* 57:2820-2828). Доля каждого типа связи у разных штаммов *Brucella*, судя по всему, варьирует, при этом частота от 0 до 20% характерна для $\alpha(1\rightarrow 3)$ типа связи, а остальное приходится на долю $\alpha(1\rightarrow 2)$ типа. Следует отметить, что было обнаружено, что только штамм биовара 2 типа *B. suis* лишен $\alpha(1\rightarrow 3)$ связей (Zaccheus *et al* (2013) *PLoS One* 8:e53941).

Как подробно рассмотрено в WO2014/170681 (содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки), относительные доли и распределение $\alpha(1\rightarrow 2)$ и $\alpha(1\rightarrow 3)$ связей в гомополимерном OPS *Brucella* и O:9 *Y. enterocolitica* позволяют создать различные, но не обязательно полностью описанные, связывающие эпитопы антител. У *Brucella* есть три различных антигенных эпитопа, которые можно найти в OPS, для которых имеются убедительные доказательства в отношении их структуры (Bundle *et al* (1989) *Infect Immun* 57:2829-2836), которые обобщены в таблице 1:

Таблица 1: – эпитопы OPS

| Название эпитопа | Количество перозаминов | Характеристики | В каком OPS присутствует |
|------------------|------------------------|--|---|
| C/Y | 3-4 | N-формилперозамины соединены исключительно $\alpha(1\rightarrow 2)$ связями | Все гладкие штаммы <i>Brucella</i> , а также O:9 <i>Y. enterocolitica</i> |
| A | 5 или более | N-формилперозамины соединяются $\alpha(1\rightarrow 2)$ связями | Преимущественно у всех A-доминантных штаммов <i>Brucella</i> , а также у O:9 <i>Y. enterocolitica</i> |
| M | 2-6 | Присутствует по меньшей мере одна $\alpha(1\rightarrow 3)$ связь без $\alpha(1\rightarrow 2)$ связей, с одной или двумя смежными $\alpha(1\rightarrow 2)$ связями; местоположение $\alpha(1\rightarrow 3)$ связи в эпитопе не определено | Преимущественно в M-доминантных по OPS штаммах <i>Brucella</i> , но также, в меньшей степени, в A-доминантных штаммах. Не обнаружен у O:9 <i>Y. enterocolitica</i> или биовара 2 <i>B. suis</i> |

Nielsen *et al* (Nielsen *et al* (1989) *Am J Vet Res* 50:5-9) предположили наличие дополнительного эпитопа в невозстанавливаемом концевом участке OPS. Эти авторы выдвинули идею, что во время вакцинации посредством S19 *B. abortus* антитела вырабатывались к этому теоретическому эпитопу.

OPS *Brucella* образуется в виде блок-сополимера D-Rha4NFo (Kubler-Kielb & Vinogradov (2013) *Carbohydrate Research* 378:144-147), при этом два полимерных элемента объединены в одну молекулу наряду с тремя отличными от D-Rha4NFo сахарами на восстанавливаемом конце, которые формируют адапторные и затравочные участки (Kubler-Kielb & Vinogradov (2013) *Carbohydrate Research* 366:33-37). Первый полимерный элемент D-Rha4NFo, обнаруженный на восстанавливаемом конце, представляет собой последовательность звеньев D-Rha4NFo, при этом все они связаны по $\alpha(1\rightarrow2)$ типу. Эта последовательность связана со вторым полимерным элементом, состоящим из одного или нескольких тетрасахаридных звеньев D-Rha4NFo, содержащих центральную $\alpha(1\rightarrow3)$ связь, при этом в других случаях связи являются $\alpha(1\rightarrow2)$ связями. Как упомянуто выше, наличие $\alpha(1\rightarrow3)$ связи является характерным признаком «M-эпитопа». OPS M-доминантных штаммов *Brucella* имеют в несколько раз больше этих тетрасахаридных звеньев, связанных с полимером с $\alpha(1\rightarrow2)$ связями. OPS A-доминантных штаммов содержат один или два таких терминальных тетрасахарида, связанных с более длинным полимером с $\alpha(1\rightarrow2)$ связями. Следовательно, $\alpha(1\rightarrow3)$ связь присутствует вблизи верхушки каждой молекулы OPS, независимо от того, происходит ли она от A- или M-доминантного штамма *Brucella*.

Значимость этой детали связывания заключается в том, что она практически изменяет форму OPS и влияет на связывание антитела. Это было показано в многочисленных исследованиях с применением моноклональных антител (mAb) (Bundle *et al* (1989) *Infect Immun* 57:2829-2836) и абсорбированных моноспецифических поликлональных сывороток, которые используют в рамках классической схемы биотипирования *Brucella* с целью классификации штаммов

как любого из А, М или смешанных А и М серотипов (Alton *et al* (1994) INRA Editions).

Инфицирование другими граммотрицательными бактериями, которые обладают схожими структурами OPS, может индуцировать выработку антител, которые перекрестно реагируют с OPS *Brucella* (Corbel (1985) Vet. Bull. 55: 927-942), что приводит к ложноположительным серологическим реакциям (FPSR). Наиболее часто упоминаемым из них является O:9 *Yersinia enterocolitica*, так как он содержит гомополимер, который состоит звеньев D-Rha4NFo с исключительно $\alpha(1\rightarrow2)$ связями (Caroff *et al* (1984) Eur J Biochem 139:195-200).

Изобретение, раскрытое в WO2014/170681, относится к различным синтетическим олигосахаридным структурам, в основе которых лежит структура OPS *Brucella*. Все структуры содержат по меньшей мере два 4,6-дидезокси-4-формамидо-D-маннопиранозных звена и содержат по меньшей мере одну $\alpha(1\rightarrow3)$ связь в парах звеньев. В зависимости от числа звеньев, включенных в олигосахарид, структура может быть использована в качестве «универсального» антигена, способного детектировать антитела, вырабатываемые к любому OPS *Brucella* или *Y. enterocolitica*, или в качестве «М-специфического» антигена, способного детектировать только антитела, вырабатываемые к OPS *Brucella*, содержащему $\alpha(1\rightarrow3)$ связи (McGiven *et al* (2015) Journal of Clinical Microbiology). Это впервые позволило пользователю отличить животное, инфицированное *Brucella*, от животного, которое может быть инфицировано либо *Brucella*, либо O:9 *Y. enterocolitica*.

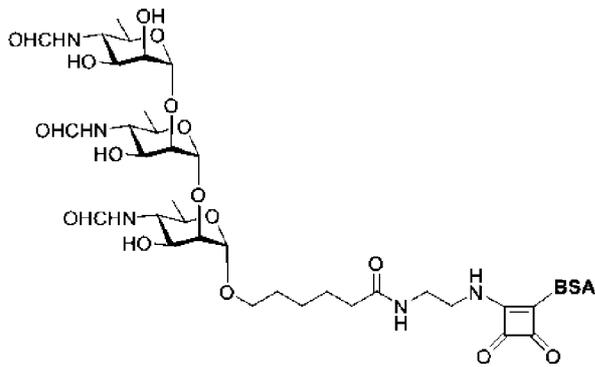
Краткое описание изобретения

Авторами настоящего изобретения недавно был выявлен и охарактеризован еще один важный структурный признак OPS *Brucella*, который впервые позволяет создать вакцину, которую можно применять в системе тестирования DIVA, которая описана в настоящем документе.

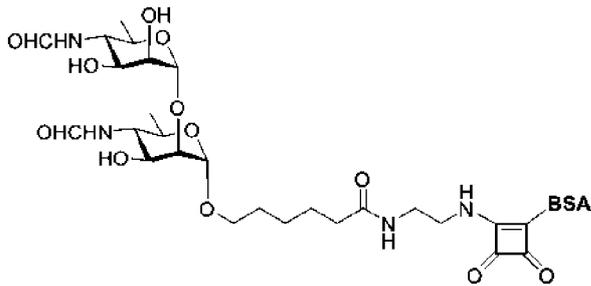
Как дополнительно рассмотрено ниже, начальная работа, описанная в настоящем документе, также привела к оценке серодиагностических свойств некоторых синтетических олигосахаридных структур, которые в ином случае не подвергались бы рассмотрению. У некоторых из них неожиданно были обнаружены превосходные свойства в серодиагностических анализах на бруцеллез.

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложен диагностический конъюгат, содержащий трисахарид, состоящий из трех звеньев из 4,6-дидезокси-4-ациламидо- α -пиранозы и содержащий только C_1 - C_2 -связи, и/или содержащий дисахарид, состоящий из двух звеньев из 4,6-дидезокси-4-ациламидо- α -пиранозы, соединенных C_1 - C_2 -связью, и/или моносахарид, состоящий из одного звена из 4,6-дидезокси-4-ациламидо- α -пиранозы, при этом трисахарид, и/или дисахарид, и/или моносахарид соединен с несахаридным носителем через восстанавливающий конец. Любая 4,6-дидезокси-4-ациламидо- α -пираноза может представлять собой 4,6-дидезокси-4-формамидо- α -пиранозу, например, 4,6-дидезокси-4-формамидо- α -D-маннопиранозу.

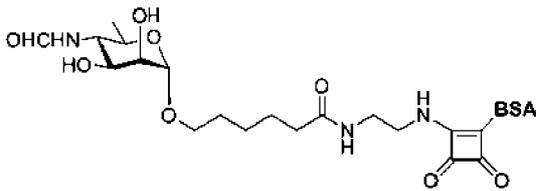
В данном аспекте трисахарид представляет собой структуру XII



и/или дисахарид представляет собой структуру XI



и/или моносахарид представляет собой структуру II



Краткое описание графических материалов

Далее варианты осуществления настоящего изобретения будут описаны, лишь в качестве примера, со ссылкой на фигуры 1-16, где:

на фигуре 1 показан профиль связывания антител, показанный как титр конечной точки при iELISA, сывороток от мышей, вакцинированных ТТ-dsg-1,2-гекса (структура I) в сравнении с различными синтетическими конъюгатами олигосахаридов и BSA (1-2 гексасахарид = структура IX; 1-3 гексасахарид = структура VIII; тетрасахарид = структура VI; трисахарид = структура V; трисахарид = структура IV; дисахарид = структура III; моносахарид = структура II), а также в сравнении с различными антигенами sLPS (S99 *B. abortus*; sLPS 16M *B. melitensis*; sLPS O:9 *Y. enterocolitica*);

на фигуре 2 показаны серологические титры при iELISA сывороток крупного рогатого скота с использованием модифицированных маннозой и эквивалентных немодифицированных конъюгатов олигоперозамина и BSA (моно = структура II; С-моно = структура XIII; три = структура V; С-три = структура XIV, гекса = структура IX; С-пента = структура XVIII; «полож.» обозначает сыворотку от

известного инфицированного животного, а «отриц.» обозначает сыворотку от известного неинфицированного животного);

на фигуре 3 показан профиль связывания антител, показанный как титр конечной точки при iELISA, для сывороток от мышей, вакцинированных ТТ-dsg-1,2-гепта_(не восстанавливающий) (структура XXI) в сравнении с различными синтетическими конъюгатами олигосахаридов (гептасахарид = структура XXII; тетрасахарид = структура VI; дисахарид = структура III) и различными антигенами sLPS (S99 *B. abortus*; sLPS 16M *B. melitensis*; sLPS O:9 *Y. enterocolitica*);

на фигуре 4 показано связывание антител, показанное как титр конечной точки (ось y), полученный с помощью iELISA, сывороток (через 48 дней после иммунизации) от двух групп из 8 CD1 мышей, иммунизированных двумя типами конъюгата ТТ-OPS *Brucella*, оцениваемого в сравнении с различными антигенами (столбнячным анатоксином; цельными клетками S99 *B. abortus* [А-доминантный OPS]; цельными клетками 16M *B. melitensis* [М-доминантный OPS]; цельными клетками биовара 2 *B. suis* [OPS с исключительно $\alpha(1\rightarrow2)$ связями]; sLPS S99 *B. abortus* [А-доминантный OPS]; sLPS 16M *B. melitensis* [М-доминантный OPS]; 1,2-гексасахарид = структура IX; 1,3-гексасахарид = структура VIII; тетрасахарид = структура VI; трисахарид = структура XII; дисахарид = структура III); горизонтальными столбцами показан медианный титр, диапазон тестируемых титров начинался от $\log_{10}2,0$;

на фигуре 5 показаны результаты iELISA с применением sLPS S99 *B. abortus* (ось x) и конъюгированных (с) антигенов OPS S99 *B. abortus* (ось y) (процесс конъюгации с включением кэп-структуры на антиген OPS) для 20 образцов сыворотки, собранных от крупного рогатого скота через 45 дней после вакцинации посредством S19 *B. abortus* (незакрашенные треугольники), и 60 образцов от крупного рогатого скота из стад, инфицированных полевыми штаммами *B. abortus* (закрашенные ромбы);

на фигуре 6 показаны средние (сплошная линия) и индивидуальные (маркеры) результаты iELISA (ось y) для 12 сывороток от 12 особей крупного рогатого скота, инфицированных *B. abortus*, и средние (пунктирная линия) результаты ELISA для 4 сывороток от 4 неинфицированных особей крупного рогатого скота, по результатам трех различных ELISA-анализов (ось x): один с гексасахаридом с исключительно 1,2-связями (гекс 1,2 = структура IX), один с трисахаридом с исключительно 1,2-связями (три 1,2 = структура XII) и один с моносахаридом (моно = структура II);

на фигуре 7 показан средний результат iELISA для образцов сыворотки от 4 животных, экспериментально инфицированных штаммом 544 *B. abortus* (А-доминантным), в каждом из выбранных моментов времени (3, 7, 16, 24 и 53 недели после инфицирования, ось x), по результатам двух ELISA-анализов: один с гексасахаридом с исключительно 1,2-связями (структура IX) и один с трисахаридом с исключительно 1,2-связями (структура XII);

на фигуре 8 показаны результаты iELISA для образцов сыворотки от 17 свиней, инфицированных биоваром 2 *B. suis* (А-доминантным, OPS имеет исключительно 1,2-связи), обозначенных как «инфицированные», и 12 случайно выбранных неинфицированных свиней, обозначенных как «случ. неинфиц.». ELISA-анализы проводили с применением конъюгата трисахарида с исключительно 1,2-связями и BSA (структура XII) (при концентрации покрытия 2,5 мкг/мл) и с применением равной по массе смеси (концентрация покрытия каждого антигена 1,25 мкг/мл, общая концентрация = 2,5 мкг/мл) конъюгата трисахарида с исключительно 1,2-связями и BSA (структура XII) и конъюгата М-тетрасахарида и BSA (структура VI);

на фигуре 9 показаны результаты iELISA (ось y) с применением антигена в форме sLPS S99 *B. abortus* для 20 сывороток от 4 коров, экспериментально инфицированных посредством 544 *B. abortus* (сплошные линии), у каждой из которых забирали образцы через 3, 7, 16, 24 и 53 недели после инфицирования (ось x), и для 20 сывороток от 4 коров, экспериментально инфицированных

посредством O:9 *Y. enterocolitica*, у которых также забирали образцы через 3, 7, 16, 24 и 53 недели после инфицирования;

на фигуре 10 показаны результаты iELISA (ось y) с применением антигена в форме гексасахарида с исключительно 1,2-связями (структура IX) для 20 сывороток от 4 коров, экспериментально инфицированных посредством 544 *B. abortus* (сплошные линии), у каждой из которых забирали образцы через 3, 7, 16, 24 и 53 недели после инфицирования (ось x), и для 20 сывороток от 4 коров, экспериментально инфицированных посредством O:9 *Y. enterocolitica*, у которых также забирали образцы через 3, 7, 16, 24 и 53 недели после инфицирования;

на фигуре 11 показаны результаты iELISA (ось y) с применением антигена в форме трисахарида с исключительно 1,2-связями (структура XII) для 20 сывороток от 4 коров, экспериментально инфицированных посредством 544 *B. abortus* (сплошные линии), у каждой из которых забирали образцы через 3, 7, 16, 24 и 53 недели после инфицирования (ось x), и для 20 сывороток от 4 коров, экспериментально инфицированных посредством O:9 *Y. enterocolitica*, у которых также забирали образцы через 3, 7, 16, 24 и 53 недели после инфицирования;

на фигуре 12 показаны результаты iELISA (ось y) с применением антигена в форме моносахарида (структура II) для 20 сывороток от 4 коров, экспериментально инфицированных посредством 544 *B. abortus* (сплошные линии), у каждой из которых забирали образцы через 3, 7, 16, 24 и 53 недели после инфицирования (ось x), и для 20 сывороток от 4 коров, экспериментально инфицированных посредством O:9 *Y. enterocolitica*, у которых также забирали образцы через 3, 7, 16, 24 и 53 недели после инфицирования;

фигура 13 представляет собой график рассеяния, на котором изображены результаты iELISA с применением sLPS S99 *B. abortus* (ось x) в сравнении с результатами iELISA с применением антигена в форме конъюгата трисахарида с исключительно 1,2-связями и BSA (структура XII) (ось y), при этом точки данных демонстрируют результаты для 29 образцов сыворотки от 29 инфицированных *B. abortus* особей крупного рогатого скота

(«инфицированные», закрашенные ромбы), 31 образца сыворотки от 31 неинфицированной *Brucella* особи крупного рогатого скота, которые были ложноположительными в случае стандартных серодиагностических анализов на бруцеллез («FPSR», незакрашенные кружки), и 20 образцов сыворотки от 20 случайно выбранных неинфицированных особей крупного рогатого скота («случ. неинфиц.», кресты);

фигура 14 представляет собой график рассеяния, на котором изображены результаты iELISA с применением sLPS S99 *B. abortus* (ось x) в сравнении с результатами iELISA с применением равной по массе смеси (концентрация покрытия каждого антигена 1,25 мкг/мл, общая концентрация = 2,5 мкг/мл) конъюгата трисахарида с исключительно 1,2-связями и BSA (структура XII) и конъюгата М-тетрасахарида и BSA (структура VI) (ось y), при этом точки данных демонстрируют результаты для 29 образцов сыворотки от 29 инфицированных *B. abortus* особей крупного рогатого скота («инфицированные», закрашенные ромбы), 31 образца сыворотки от 31 неинфицированной *Brucella* особи крупного рогатого скота, которые были ложноположительными в случае стандартных серодиагностических анализов на бруцеллез («FPSR», незакрашенные кружки), и 20 образцов сыворотки от 20 случайно выбранных неинфицированных особей крупного рогатого скота («случ. неинфиц.», кресты); и

фигура 15 представляет собой график рассеяния, на котором изображены результаты iELISA с применением конъюгата трисахарида с исключительно 1,2-связями и BSA (структура XII) (ось x) в сравнении с результатами iELISA с применением равной по массе смеси (концентрация покрытия каждого антигена 1,25 мкг/мл, общая концентрация = 2,5 мкг/мл) конъюгата трисахарида с исключительно 1,2-связями и BSA (структура XII) и конъюгата М-тетрасахарида и BSA (структура VI) (ось y), при этом точки данных демонстрируют результаты для 29 образцов сыворотки от 29 инфицированных *B. abortus* особей крупного рогатого скота («инфицированные», закрашенные ромбы), 31 образца сыворотки от 31 неинфицированной *Brucella* особи крупного рогатого скота, которые были

ложноположительными в случае стандартных серодиагностических анализов на бруцеллез («FPSR», незакрашенные кружки), и 20 образцов сыворотки от 20 случайно выбранных неинфицированных особей крупного рогатого скота («случ. неинфиц.», кресты); и

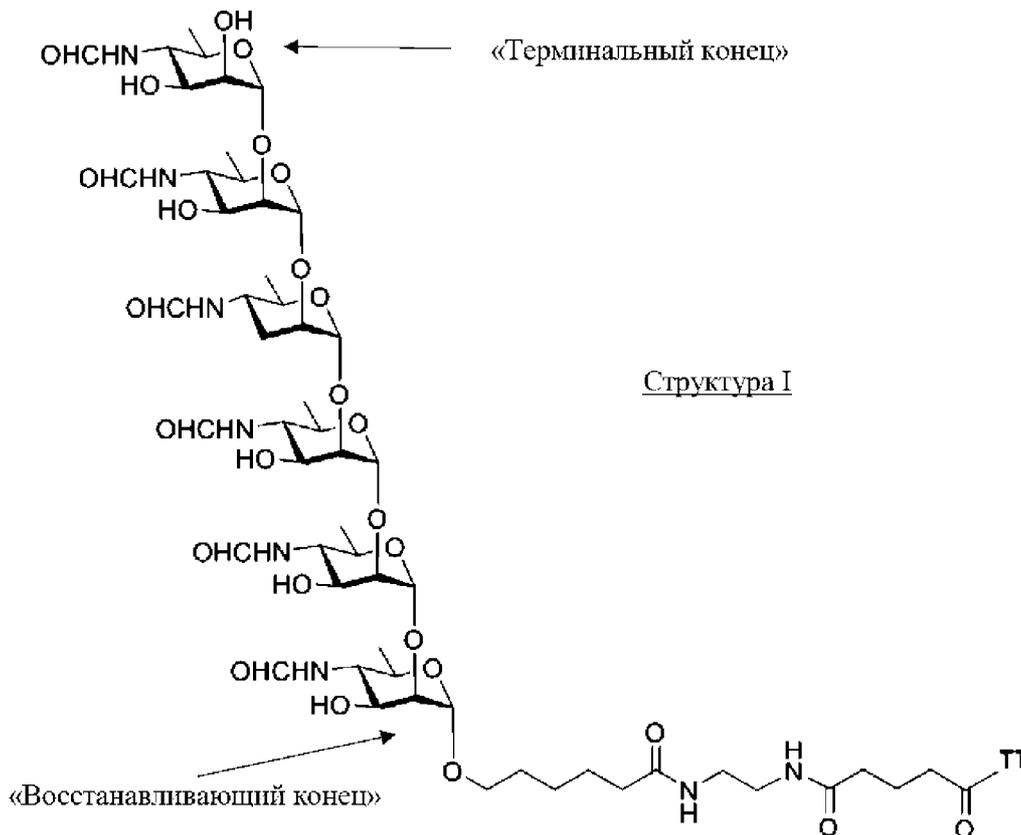
на фигуре 16 показаны результаты потребления окислительного реагента (метапериодата натрия [SMP]) при внесении к антигену RBT; на фигуре показана стандартная кривая известной концентрации SMP (ось x) в зависимости от оптической плотности (OD) на 405 нм (ось y), причем отдельные точки данных показаны в виде черных крестиков, а значения OD окислительных реагентов, полученные в разных точках от начала процесса окисления, показаны справа от оси x («инкубации клеток»).

Примеры

Пример 1: начальная работа по разработке возможной вакцины-кандидата

По результатам работы, раскрытой в WO2014/170681 и в (Ganesh *et al* (2014) *Journal of American Chemical Society* 136: 16260-16269) и (McGiven *et al* (2015) *Journal of Clinical Microbiology* 53: 1204-1210), было сделано предположение, что может быть возможным разработать вакцину, сформированную цепями 4,6-дидезокси-4-формамидо- α -D-маннопиранозных звеньев, которые связаны исключительно C₁-C₂-связями. Это обусловлено тем, что, согласно результатам наблюдений, более короткие олигосахариды, описанные в этих публикациях (такие как ди- или тетрасахариды), которые содержат одну C₁-C₃-связь и ограниченное количество C₁-C₂-связей, с меньшей вероятностью связываются с антителами, выработка которых индуцирована полисахаридами, которые связаны исключительно C₁-C₂-связями. Было высказано предположение, что тогда вакцинация полисахаридом с исключительно C₁-C₂-связями позволит отличить животное, инфицированное организмом OPS, где присутствуют C₁-C₃-связи.

Поэтому были проведены первоначальные эксперименты, в которых мышей иммунизировали гексасахаридом с исключительно C_1 - C_2 -связями, конъюгированным со столбнячным анатоксином через дисукцинимидилглутаратный (DSG) линкер (структура I). Структура I называется «ТТ-dsg-1,2-гекса».



Ожидали, что эти конструкции будут индуцировать выработку антител только к эпитомам А и С/У, но не к эпитомам М, из-за отсутствия C_1 - C_3 -связи.

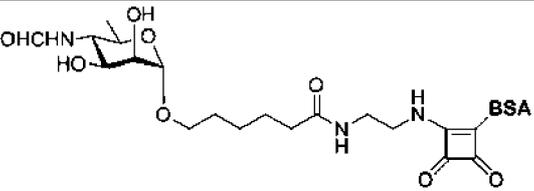
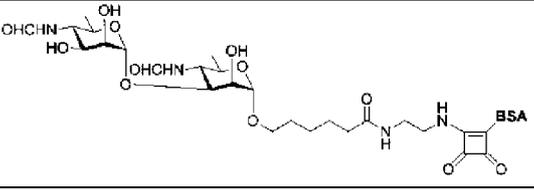
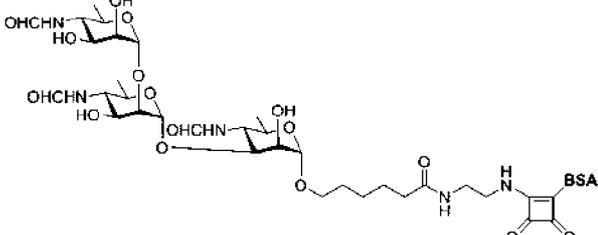
После иммунизации мышей посредством ТТ-sq-1,2-гекса и ТТ-dsg-1,2-гекса сыворотки животных тестировали в отношении конъюгированного с BSA 1,2-гексасахарида (структуры IX), и, как и ожидалось, был продемонстрирован хороший ответ. Сыворотку также тестировали в отношении нативных бактериальных антигенов в форме липополисахаридов (LPS) из *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* и O:9 *Yersinia enterocolitica*, и, опять же, наблюдали хорошие ответы.

Затем сыворотки тестировали с различными антигенами в форме синтетических конъюгатов олигосахаридов, которые описаны ранее и показаны в виде структур II, III, IV, V, VI, VII и IX в приведенной ниже таблице 2 (в которой в третьем столбце «S» обозначает 4,6-дидезокси-4-формамидо- α -D-маннопиранозное звено, S2S обозначает соседние звенья, связанные C₁-C₂-связью, а S3S обозначает соседние звенья, связанные C₁-C₃-связью).

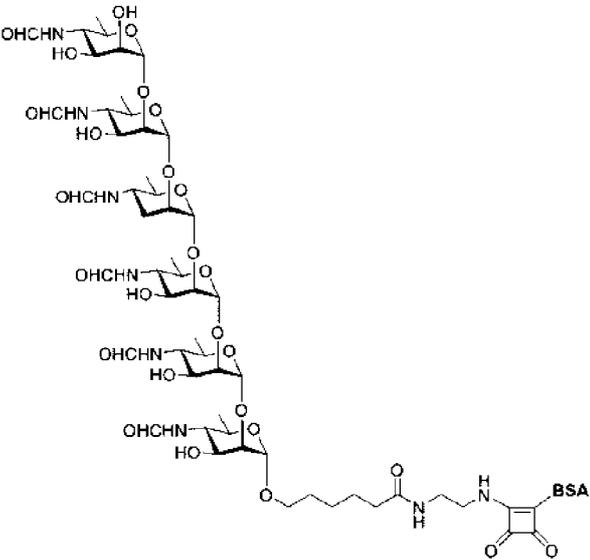
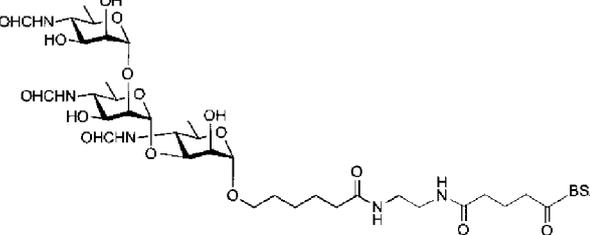
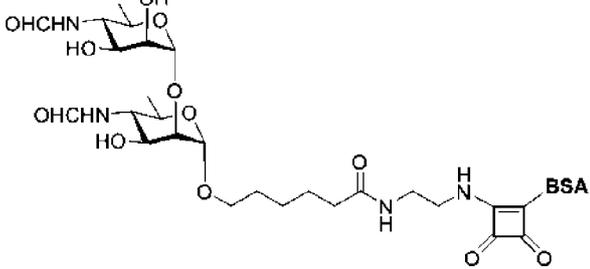
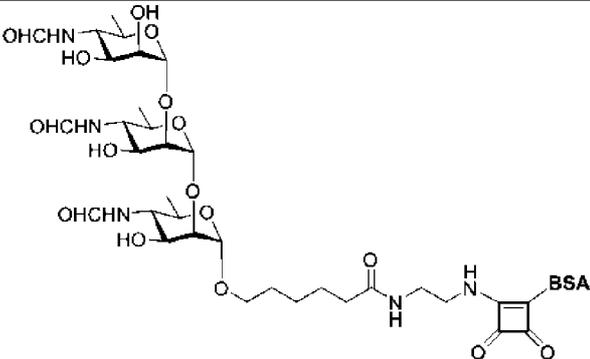
К удивлению было обнаружено, что иммунизированные сыворотки распознавали антигены, включающие C₁-C₃-гликозидную связь, хотя в иммунизирующем антигене отсутствовала C₁-C₃-связь (фигура 1).

Неожиданный ответ с выработкой антител даже на моносахаридный антиген (структура II) привел авторов настоящего изобретения к выводу, что разработка первоначально предложенной вакцины для DIVA не была бы успешной, поскольку любой олигосахарид, независимо от наличия или отсутствия C₁-C₃-связей, мог бы индуцировать как минимум такой ответ.

Таблица 2: синтетические конъюгаты олигосахаридов и BSA

| | <u>Номер структу ры</u> | <u>Схема сахаров /связей</u> | <u>Структура</u> |
|--|---------------------------------|--------------------------------------|--|
| Моносахарид | II | S |  |
| Дисахарид (связан C ₁ -C ₃ - связью) | III | S3S |  |
| Трисахарид | IV | S2S3S |  |

| | <u>Номер структу ры</u> | <u>Схема сахаров /связей</u> | <u>Структура</u> |
|--------------|---------------------------------|--------------------------------------|------------------|
| Трисахарид | V | S3S2S | |
| Тетрасахарид | VI | S2S3S2 S | |
| Пентасахарид | VII | S2S3S2 S2S | |
| Гексасахарид | VIII | S2S3S2 S2S2S | |

| | <u>Номер структу ры</u> | <u>Схема сахаров /связей</u> | <u>Структура</u> |
|--|---------------------------------|--------------------------------------|--|
| Гексасахарид | IX | S2S2S2 S2S2S |  |
| Трисахарид (связан с помощью DSG) | X | S2S3S |  |
| Дисахарид (связан C ₁ -C ₂ - связью) | XI | S2S |  |
| Трисахарид (связан исключительно C ₁ -C ₂ -связями) | XII | S2S2S |  |

Способы, которые были использованы для примера 1

Животное: для изучения иммунного ответа использовали самок мышей CD1 (Charles River, Канада) в возрасте 6-8 недель. Все процедуры и эксперименты с участием животных проводили с использованием протокола, утвержденного Комитетом по уходу за животными факультета биологических наук университета провинции Альберта. Протокол был утвержден в соответствии с методическими рекомендациями Канадского совета по уходу за животными (CCAC).

Антиген: все синтетические олигосахаридные антигены получали так, как описано ранее (Ganesh *et al* (2014) *Journal of the American Chemical Society* 136:16260-16269) или в приведенном ниже Приложении. Для экспериментов на животных гексасахарид из шести звеньев перозамина, все из которых связаны посредством 1,2-гликозидных связей, конъюгировали со столбнячным анатоксином (ТТ) с использованием dsG-линкера (дисукцинимидилглутаратного) с получением молекулы с описанной выше структурой I (также называемой «ТТ-DSG-1,2-гекса»). Гексасахарид синтезировали с содержащим концевую аминогруппу линкером на восстанавливающем конце (Ganesh *et al* (2014) *Journal of the American Chemical Society* 136:16260-16269). Смесь гексасахарид и DSG (15 экв.) в DMF и 0,1 М PBS-буфере (4:1, 0,5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 6 часов. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом и остаток промывали с помощью EtOAc 10 раз для удаления избытка DSG. Полученное твердое вещество сушили под вакуумом в течение 1 часа с получением DSG-активированного олигосахарид. Активированный гексасахарид (0,518 мкмоль) вносили в раствор столбнячного анатоксина (0,025 мкмоль) в 0,5 М боратном буфере с рН 9 и медленно перемешивали при 21 С в течение 3 дней. Затем реакционную смесь промывали PBS-буфером, фильтровали через трубку для ультратонкой фильтрации (10000 MWCO, 4×10 мл) и полученный конъюгат столбнячного анатоксина хранили в PBS-буфере. Масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF продемонстрировал, что конъюгат имел в среднем 11,7 гексасахарид на молекулу столбнячного анатоксина.

Для скрининга иммунного ответа с помощью ELISA тот же гексасахарид конъюгировали с другим белком-носителем, а именно с бычьим сывороточным альбумином (BSA), с помощью скватратной химии (Ganesh *et al* (2014) *Journal of the American Chemical Society* 136:16260-16269) так, как описано ранее (например, WO2014/170681), с получением структуры IX. Кроме того, также проводили скрининг иммунных ответов с использованием различных синтетических олигосахаридов (структур II-VI и структуры VIII из таблицы 1). Также использовали различные нативные sLPS из *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* и *Yersinia enterocolitica*.

Составление вакцины: в самом начале иммунизации готовили свежую квасцовую муку согласно опубликованному протоколу (Lipinski *et al* (2012) *Vaccine* 30:6263-6269). Вкратце: отдельно готовили растворы 0,2-молярного $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ и 1,0-молярного $NaHCO_3$ и стерилизовали их фильтрованием. Затем 10 мл второго раствора (раствора бикарбоната) быстро добавляли к 20 мл первого раствора при энергичном встряхивании. Во избежание потери материала из-за пенообразования от бурного выделения газа стадию перемешивания проводили в 200 мл химическом стакане. Полученный в результате осадок квасцовой муки промывали с помощью PBS (который предварительно был отфильтрован и простерилизован в автоклаве) и осаждали центрифугированием при 4000 g в течение 7 минут. Этот цикл промывки продолжали до тех пор, пока pH надосадочной жидкости не стал идентичным с PBS (pH 7,3). Наконец, квасцовую муку суспендировали в PBS в концентрации 50 мг/мл, добавляли тимеросал (0,01% мас./об.) и смесь хранили при 4°C.

Квасцовую муку смешивали с конъюгатом ТТ в массовом соотношении 5:1 и смесь оставляли встряхиваться на ночь перед введением животным.

Иммунизация: животных иммунизировали трижды с интервалом в 21 день. Общий объем 250 мкл, включающий 12 мкг ТТ-dsg-1,2-гекса (эквивалентный 1 мкг 1,2-гексасахариды) вводили инъекцией каждой мышце, из которых 150 мкл вводили инъекцией внутрибрюшинно, а остальные 100 мкл вводили инъекцией

подкожно. Перед началом иммунизации производили предварительный забор крови. Животных умерщвляли на 10-й день после последней инъекции и производили конечный отбор крови.

Обработка сыворотки: после забора мышиную кровь инкубировали при 37°C в течение одного часа, затем центрифугировали при 1500 g в течение 10 минут. Осветленную сыворотку с верхней фракции собирали и хранили при -20°C до использования.

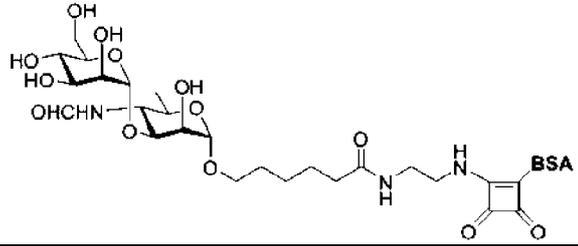
Иммуноанализы: уровни антител в мышиную сыворотку исследовали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Придерживались опубликованного протокола (Bundle et al. (2014) *Bioconjugate Chemistry* 25:685-697) с незначительной модификацией. Вкратце: полистирольные микротитровальные планшеты инкубировали с нанесенным антигеном (1 мкг/мл, 100 мкл/лунка) при 4°C в течение ночи, затем промывали (5×) посредством PBST (0,05% Tween-20 в фосфатно-солевом буферном растворе, PBS). Затем в лунку с нанесенным покрытием вносили мышиную сыворотку в серийных $\sqrt{10}$ -кратных разведениях (100 мкл/лунка). Начальное разведение для сывороток составляло 1:100. После инкубации при комнатной температуре в течение 2 часов планшеты промывали (5×) посредством PBST. Затем планшеты инкубировали с 100 мкл/лунка разведенного в соотношении 1:5000 козьего антитела к мышиным IgG, меченного посредством HRPO (KPL, 1,0 мг/мл исходный раствор), в течение 30 минут при комнатной температуре, затем промывали (5×) посредством PBST. Вносили пероксидазный субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ) с H₂O₂. Спустя 15 минут реакцию гасили добавлением фосфорной кислоты (1 M, 100 мкл/лунка). Планшеты считывали на 450 нм и данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Origin. Для разведения всех сывороток использовали 0,1% BSA в PBST. Разведение в конечной точке (x_0) регистрировали как разведение сыворотки, дающее поглощающую способность 0,2 выше фонового значения, а титр сыворотки рассчитывали как обратную величину от x_0 . Все данные

обрабатывали с использованием программного обеспечения Origin 9 и GraphPad Prism.

Пример 2: исследование возможного эпитопа на невосстанавливаемом конце 4,6-дидезокси-4-формамидо- α -D-маннопиранозной цепи

Поскольку авторы настоящего изобретения наблюдали связывание антител, вырабатываемых к структуре I, даже с моносахаридным антигеном (структурой II), было сделано предположение, что терминальный сахар обеспечивал эпитоп для связывания антител (называемый в настоящем документе «терминальным эпитопом»). Для исследования, зависит ли потенциал связывания одного перозамина (4,6-дидезокси-4-формамидо- α -D-маннопиранозы) от конкретных структурных признаков, которыми обладал только терминальный перозамин (например, гидроксилы, расположенные как на C2, так и на и C3), получали различные синтетические олигосахариды, содержащие «кэп-» структуру на невосстанавливаемом конце, которые показаны ниже в таблице 3. Некоторые олигосахариды связывали с BSA с помощью скватратной химии, а некоторые через DSG, как описано выше.

Таблица 3: дополнительные синтетические конъюгаты олигосахаридов с BSA, обеспечивающие «кэп-» структуры на терминальном перозамине

| | <u>Номер структуры</u> | <u>Схема сахаров /связей</u> | <u>Структура</u> |
|----------------------------------|------------------------|------------------------------|--|
| Связанный с маннозой моносахарид | XIII | S |  |

| | <u>Номер структуры</u> | <u>Схема сахаров /связей</u> | <u>Структура</u> |
|--|------------------------|------------------------------|------------------|
| Связанный с маннозой трисахарид | XIV | S3S2S | |
| Модифицированный метоксигруппой дисахарид | XV | S3S | |
| Модифицированный двумя метоксигруппами дисахарид | XVI | S3S | |
| Модифицированный метоксигруппой трисахарид | XVII | S2S3S | |
| Связанный с маннозой пентасахарид | XVIII | S2S2S2 S2S | |

Сыворотки от инфицированного в полевых условиях крупного рогатого скота тестировали с помощью подборки вышеуказанных структур (фигура 2). Это демонстрировало, что модификация невосстанавливающего конца сахарной цепи действительно влияла на серологическую реактивность олигосахаридного антигена. Этот эффект был сильнее у более коротких олигосахаридов, что позволяло предположить, что по мере увеличения длины линейного эпитопа пропорционально уменьшалось влияние связывания антител с потерей терминального эпитопа.

«Положительные» точки данных на фигуре 2 представляют собой средний результат 6 образцов сыворотки от инфицированных животных, которые были положительными для традиционных серологических анализов. «Отрицательные» точки данных представляют собой средний результат от 2 образцов сыворотки, которые были отрицательными в таких анализах. В положительных образцах средний результат для моносахаридного антигена (структуры II) при 1/100 разведении сыворотки составлял примерно 60%. Эквивалентный результат для модифицированного моносахарида (структуры XIII) составлял примерно 5%. Снижение титра было по меньшей мере 64-кратным, и при использовании модифицированного моноперозамина (структуры XIII) различий между отрицательной и положительной сыворотками не было. В отличие от этого, при использовании немодифицированного моноперозамина (структуры II) наблюдалось различие. Таким образом, судя по всему, ни одно из антител, которые связывались со структурой II, не могли связывать модифицированную версию, структуру XIII. Авторами настоящего изобретения был сделан вывод, что репертуар антител к OPS *Brucella* в этих образцах включал антитела, которые связывались с одним 4,6-дидезокси-4-формамидо- α -D-маннопиранозным звеном, но это связывание возможно было только тогда, когда сахарное звено находилось в терминальном положении. Способность этих антител связываться сильно ограничивалась, как только 4,6-дидезокси-4-формамидо- α -D-маннопираноза переставала быть доступной в качестве терминального сахарного звена, а была доступна только внутри линейной структуры.

Аналогичная картина имела место при оценке трисахаридов, хотя контраст между модифицированным (структурой XIV) и немодифицированным (структурой V) антигенами был не таким выраженным (4-8-кратное снижение титра). Предположительно, менее выраженный контраст отражал повышенную способность трисахарида в структуре XIV выступать в роли линейного антигена. Эта картина также наблюдалась с 1-2-гексасахаридом (структурой IX) и модифицированным 1-2-пентасахаридом (структурой XVIII).

На основании этих данных авторами настоящего изобретения был сделан вывод, что присутствовала значительная подгруппа антител к OPS, у которых на связывание антигена с короткими олигосахаридами оказывало существенное влияние наличие или отсутствие терминального 4,6-дидезокси-4-формамидо- α -D-маннопиранозного звена.

Аналогичные эксперименты были проведены с использованием той же сыворотки от крупного рогатого скота, инфицированного *B. abortus*, с применением различных олигосахаридных антигенов, модифицированных заменой C₂-ОН (гидроксильной) группы на терминальном перозамине на группу -ОМе. Общие результаты приведены ниже в таблице 4.

В приведенной ниже таблице 5 показано больше серологических данных, полученных в результате внесения синтетических антигенов в сыворотки от крупного рогатого скота, инфицированного *B. abortus* (n=20), «инфицированные» образцы, и в сыворотки от неинфицированного крупного рогатого скота (n=20), «неинфицированные» образцы. Связанные с маннозой моносахаридные (структура XIII) и связанные с маннозой трисахаридные (структура XIV) антигены имеют плохие диагностические свойства (низкие значения AUC [площади под кривой зависимости от дозы]), поскольку они не позволяют эффективно различать «инфицированные» образцы от «неинфицированных». Структура XIII имеет особенно плохие свойства при сравнении с исключительными и совершенно неожиданными диагностическими

свойствами немодифицированного (т. е. без кэп-структуры) моносахарида (структуры II).

Таблица 4: результаты 6 образцов сыворотки от крупного рогатого скота, инфицированного *B. abortus*

| Антиген | Сильнополож. | Слабополож. | Отрицательный |
|---|--------------|---------------------|---------------|
| моносахарида скварат (структура II) | 6 | 0 | 0 |
| 1-3-дисахарида скварат (структура III) | 6 | 0 | 0 |
| t1-2-трисахарида скварат (структура IV) | 6 | 0 | 0 |
| t1-2-трисахарида dsg (структура X) | 6 | 0 | 0 |
| t1-3-трисахарида скварат (структура V) | 6 | 0 | 0 |
| исключительно 1-2-гексасахарида скварат (структура IX) | 6 | 0 | 0 |
| связанного с маннозой исключительно 1-2-пентасахарида скварат (структура XVIII) | 5 | 1 | 0 |
| связанного с маннозой t1-3-трисахарида скварат (структура XIV) | 2 | 2 | 2 |
| OMe-модифицированного t1-2-трисахарида dsg (структура XVII) | 2 | 2 | 2 |
| OMe-модифицированного 1-3-дисахарида dsg (структура XV) | 1 | 2 | 3 |
| связанного с маннозой моносахарида скварат (структура XIV) | 0 | 1 (очень слабый) | 5 |

На основании результатов, показанных в таблице 5, авторами настоящего изобретения был сделан вывод, что даже включения одной группы OMe в C2 терминального моносахарида было достаточно, чтобы аннулировать большую

часть ответа с выработкой антител. Это подтверждало идею о том, что терминальная 4,6-дидезокси-4-формамидо- α -D-маннопираноза была специфической структурой, отличной, в контексте распознавания антителами, от линейного полимера из 4,6-дидезокси-4-формамидо- α -D-маннопиранозных звеньев.

Таблица 5: диагностические характеристики (YI_{max} , DSn , DSP и AUC) для образцов от животных, которые положительны в культуре по *B. abortus*, в сравнении с образцами от случайных животных, не инфицированных в полевых условиях

| Антиген | YI_{max} | DSn | DSP | AUC |
|--|------------|-------|-------|--------|
| Связанный с маннозой моносахарид (структура XIII) | 26,16 | 75 | 51,16 | 0,5558 |
| Связанный с маннозой трисахарид (структура XIV) | 53,02 | 60 | 93,02 | 0,7733 |
| Связанный с маннозой пентасахарид (структура XVIII) | 78,72 | 95 | 83,72 | 0,9605 |
| Моносахарид (структура II) | 83,02 | 90 | 93,02 | 0,9663 |
| Гексасахарид (структура IX) | 95 | 95 | 100 | 0,9942 |
| Пентасахарид (структура VII) | 100 | 100 | 100 | 1,00 |
| Нонасахарид (структура XIX, представлена ниже) | 100 | 100 | 100 | 1,00 |
| Дисахарид (структура III) | 100 | 100 | 100 | 1,00 |
| Тетрасахарид (структура VI) | 100 | 100 | 100 | 1,00 |

(DSn = диагностическая чувствительность (%); DSP = диагностическая специфичность (%); AUC = площадь под кривой (ROC); ROC = график

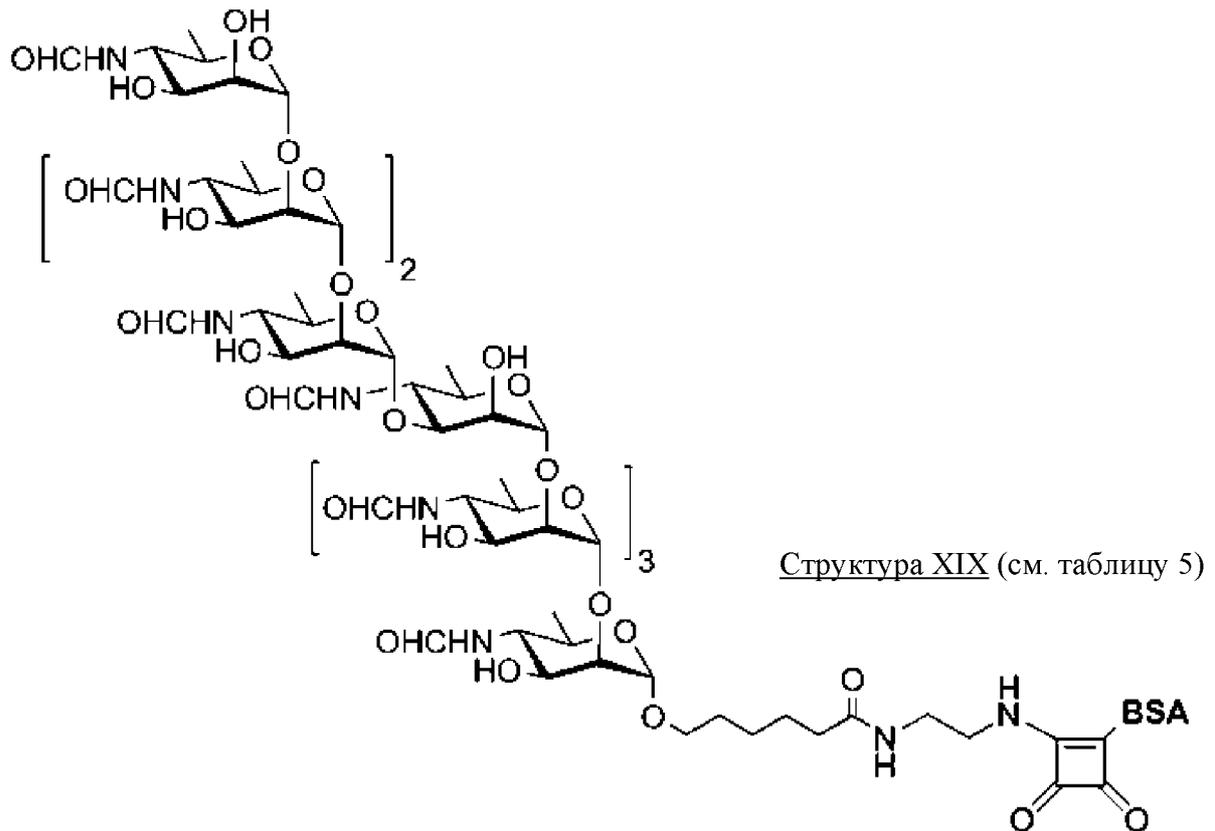
зависимости чувствительности от частоты ложноположительных заключений; $YI = \text{индекс Юдена } (DS_n + DS_p - 100)$; YI_{\max} = максимальное значение YI , которое может быть достигнуто с варьированием +/- граничного значения.)

Поэтому авторами изобретения было сделано предположение, что ответ на модифицированные олигосахариды из сыворотки от инфицированных животных может быть аналогичен ответу на немодифицированные олигосахариды из сыворотки от животных, иммунизированных антигенами, которые не имеют верхушечного эпитопа (т. е. нет терминальной 4,6-дидезокси-4-формамидо- α -D-маннопиранозы). В первом случае будут связываться только антитела к линейным структурам, и ответ будет низким (очень низким в случае коротких олигосахаридов). Во втором случае не будет никаких доступных к связыванию антител к верхушке, и, следовательно, единственный наблюдаемый ответ будет связан с антителами к линейной структуре. Ответ с выработкой этих антител к коротким олигосахаридам также будет низким.

Способы, которые были использованы для примера 2

Антиген: олигосахариды перозамина конъюгировали со столбнячным анатоксином (ТТ) с применением dsg-линкера (дисукцинимидилглутаратного) или с использованием сквартной химии, как описано выше.

Исследования серологии на быках: уровни антител в бычьей сыворотке изучали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), как описано ранее (McGiven et al (2015) Journal of Clinical Microbiology 53:1204-1210).



Пример 3: окисление сахара на терминальном конце OPS для нарушения терминального эпитопа

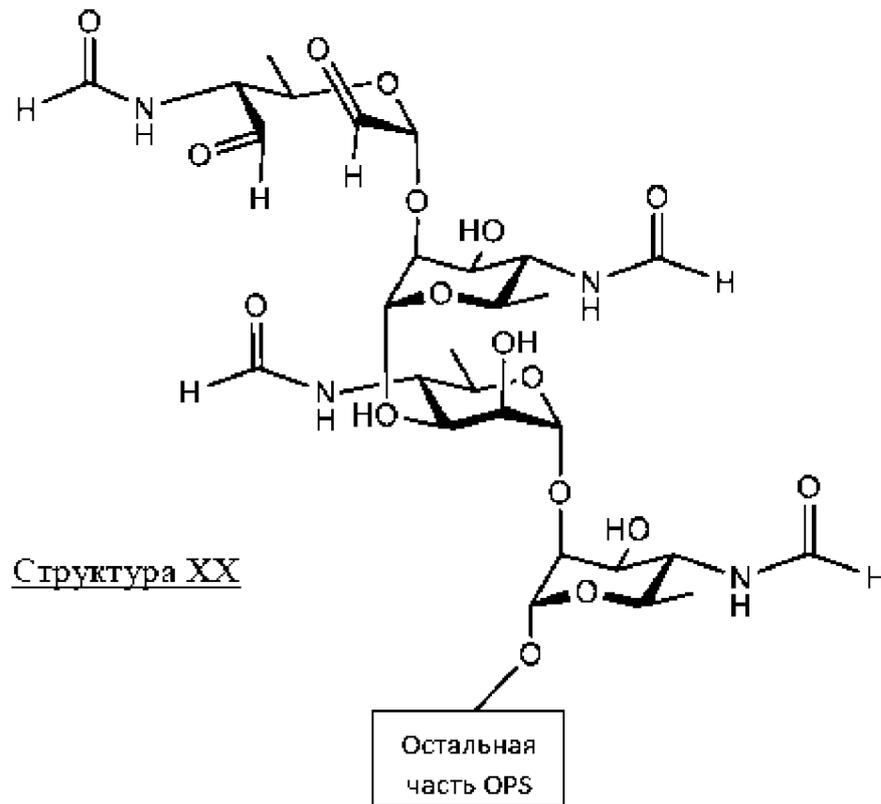
Авторами настоящего изобретения было адаптировано раскрытие Stefanetti *et al.* (Stefanetti et al. (2014) Vaccine 32: 6122-6129) для нарушения структуры терминального сахара в OPS *Brucella*. Этими сотрудниками OPS *Salmonella typhimurium* был подвергнут умеренному окислению метапериодатом натрия. Это открывает рамнозное кольцо с образованием альдегидов, которые затем можно конъюгировать с аминами на CRM₁₉₇ (генетически детоксифицированном дифтеротоксине) посредством восстановительного аминирования. Рамнозный сахар в этом способе является внутренним сахаром, а не терминальным сахаром. Следовательно, возможно окисление, поскольку полимер присоединен через C₁ и C₄ так, что *цис*-соседние гидроксильные группы на C₂ и C₃ доступны для окисления. В случае *Brucella* перозамины имеют D-рамнозный каркас (как и D-маннозный, но без OH на C₆), но, поскольку каждая нетерминальная рамноза в OPS *Brucella* связана со своим соседом на терминальном конце через либо C₂,

либо C₃, терминальной группой является единственная рамноза с *цис*-соседними гидроксильными группами на C₂ и C₃.

Следовательно, можно использовать аналогичный способ на OPS *Brucella* для создания показанной ниже терминальной структуры (структуры XX).

Способы, которые были использованы для примера 3

OPS *Brucella* (из S99 *B. abortus* и биовара 2 *B. suis* [штамма Thomsen]) очищали экстракцией горячим фенолом (Westphal *et al* (1952) *Über die Extraction von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z. Naturforsch.* 7:148-155) с последующим умеренным кислотным гидролизом и эксклюзионной хроматографией (Meikle *et al.* (1989) *Infect Immun* 57:2820-2828). OPS для конъюгирования с ТТ окисляли в количестве 2 мг/мл в 10 мМ метаперйодате натрия (SMP) и 50 мМ ацетатно-натриевого буфера (pH 5,5) в течение 1 часа в темноте. Этого было достаточно для окисления соседних гидроксильных групп диола на 2-м и 3-м атомах углерода терминального сахара. Остаточный SMP удаляли путем обессоливания с помощью колонки PD-10 (колонка Sephadex-G25) в соответствии с инструкциями производителя (GE Healthcare). Подходящий объем элюирующего буфера позволял элюировать OPS.



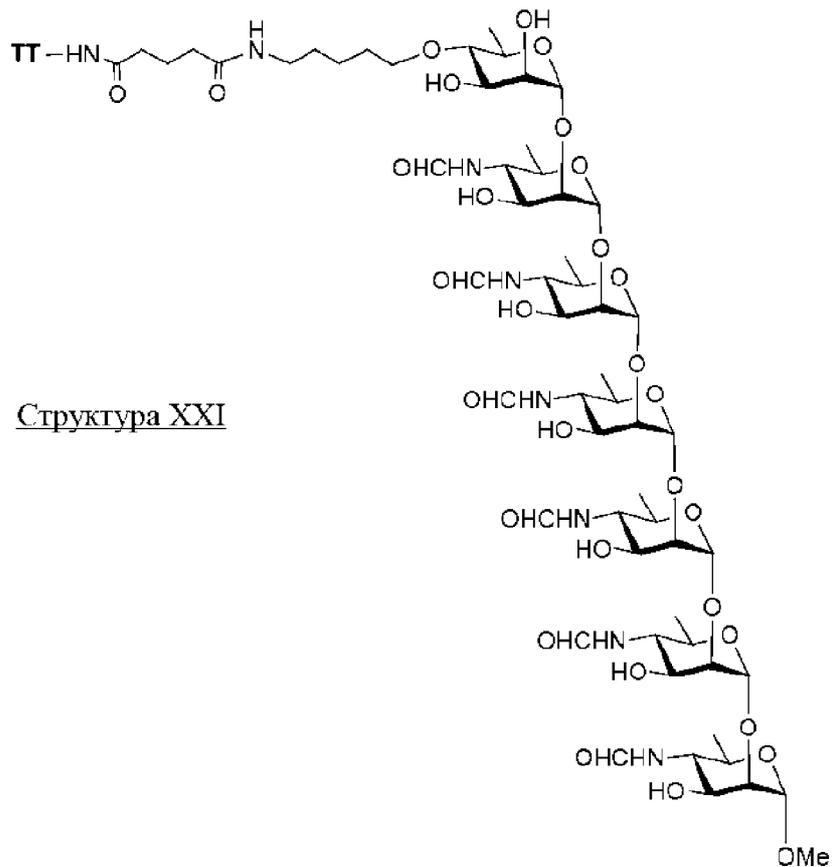
Пример 4: вакцинация гексасахаридом с кэп-структурой

Ввиду очевидной важности верхушечного эпитопа в выработке антител получали гептасахарид, связанный с ТТ через невозстанавливающий терминальный конец сахарной цепи (ТТ-dsg-1,2-гепта_(не восстанавливающий)) (структура XXI). Этот способ конъюгации нарушает верхушечный эпитоп, так как отсутствует доступная терминальная 4,6-дидезокси-4-формамидо- α -D-маннопираноза. Структура представляет собой показанную ниже структуру XXI.

Следовательно, она представляет собой гексасахарид с кэп-структурой, которая не является 4,6-дидезокси-4-формамидо-D-маннопиранозой.

Мышей иммунизировали с помощью этого конъюгата, и сыворотку оценивали с помощью iELISA в отношении различных антигенов. На фигуре 3 представлены результаты. На фигуре 1 показаны сравнительные результаты из примера 1 для животных, вакцинированных посредством ТТ-dsg-1,2-гекса (структуры I). Это свидетельствовало о том, что вакцинация структурой XXI с разрушенным

верхушечным эпитопом индуцировала продуцирование антител со значительно сниженной аффинностью связывания в отношении предлагаемых диагностических конъюгатных антигенов (ди- и тетрасахаридов, структур III и VI соответственно). Тем не менее, все еще присутствовала реакция в отношении дисахаридных и тетрасахаридных антигенов, что указывало на то, что ТТ-dsg-1,2-гепта_(не восстанавливающий) (структура XXI) также не подходил для применения в качестве вакцины в тест-системе DIVA.

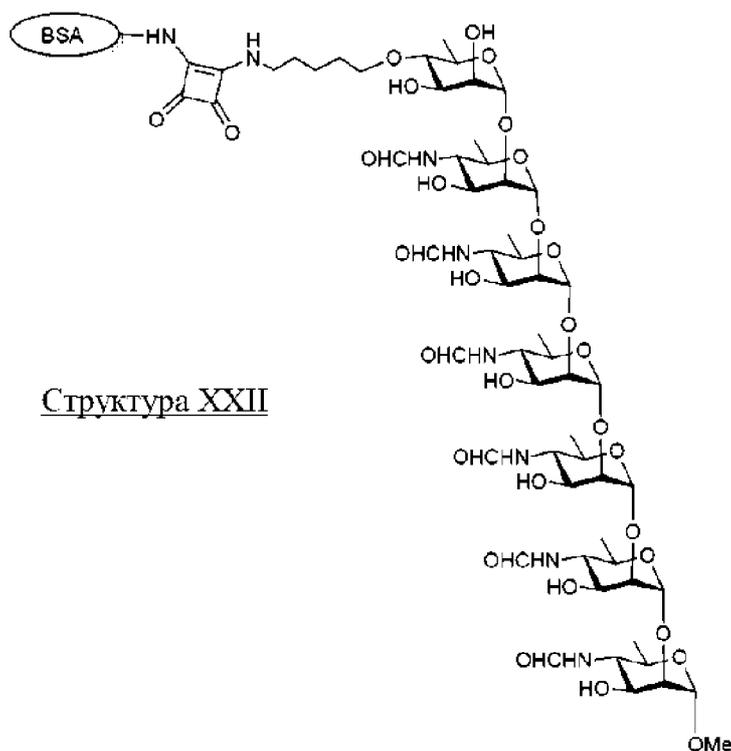


Способы, которые были использованы для примера 4

Животные; составление вакцины; иммунизация; обработка сыворотки; иммуноанализ: все, как описано выше для примера 1.

Антиген: 4,6-дидезокси-4-формамино- α -D-маннопиранозный гексасахарид получали в соответствии с описанными ранее способами (Eis & Ganem (1988) Carbohydrate Research 176:316-323).

Для скрининга иммунного ответа с помощью ELISA тот же гептасахарид конъюгировали с бычьим сывороточным альбумином (BSA) так, как описано ранее (например, WO2014/170681). Полученный в результате гептасахарид (фактически «гексасахарид с кэп-структурой») имел следующую структуру:



Дополнительные способы синтеза и конъюгирования, применяемые для получения ТТ-DSG-1,2-гепта_(не восстанавливающий) (структуры XXI) и BSA-DSG-1,2-гепта_(не восстанавливающий) (структуры XXII), можно найти в приведенном ниже Приложении.

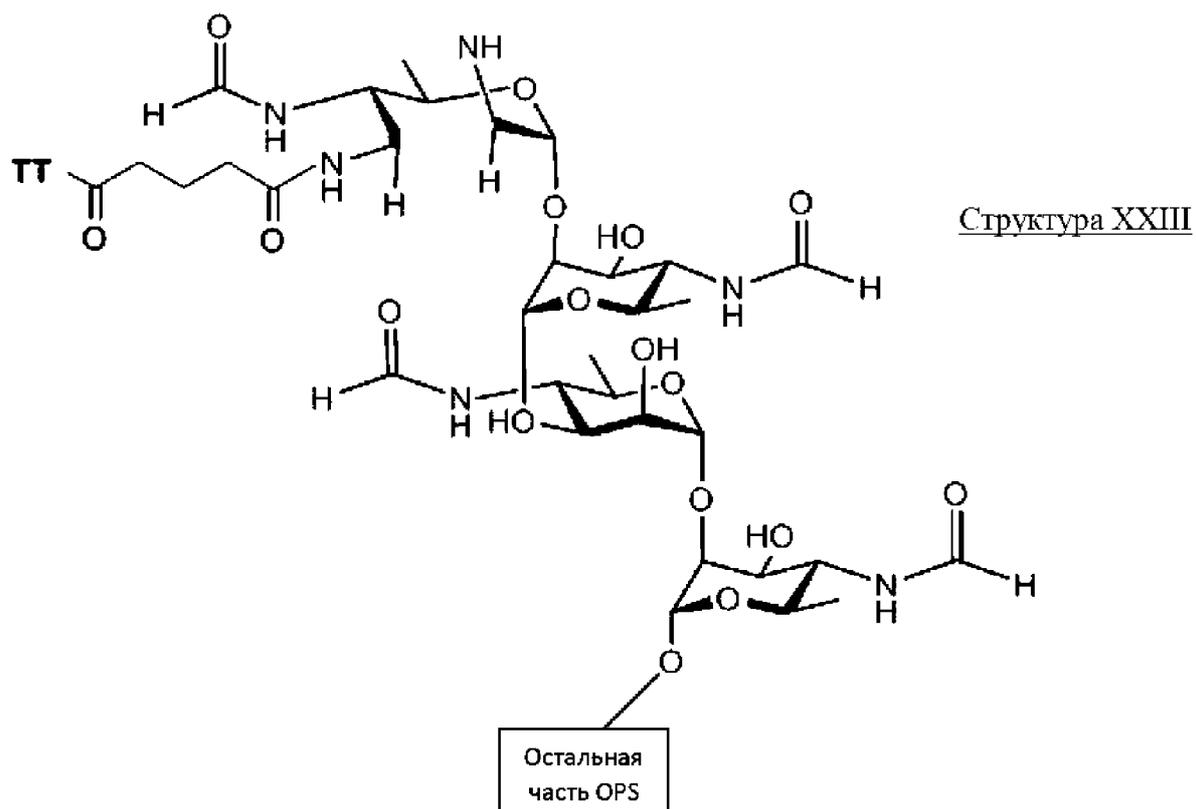
Кроме того, также проводили скрининг иммунных ответов с применением различных синтетических олигосахаридов (структур III, VI и IX), а также различных природных антигенов клеточной стенки бактерий из *Brucella abortus* и O:9 *Yersinia enterocolitica*.

Пример 5: вакцинация полисахаридом с конъюгированной верхушкой

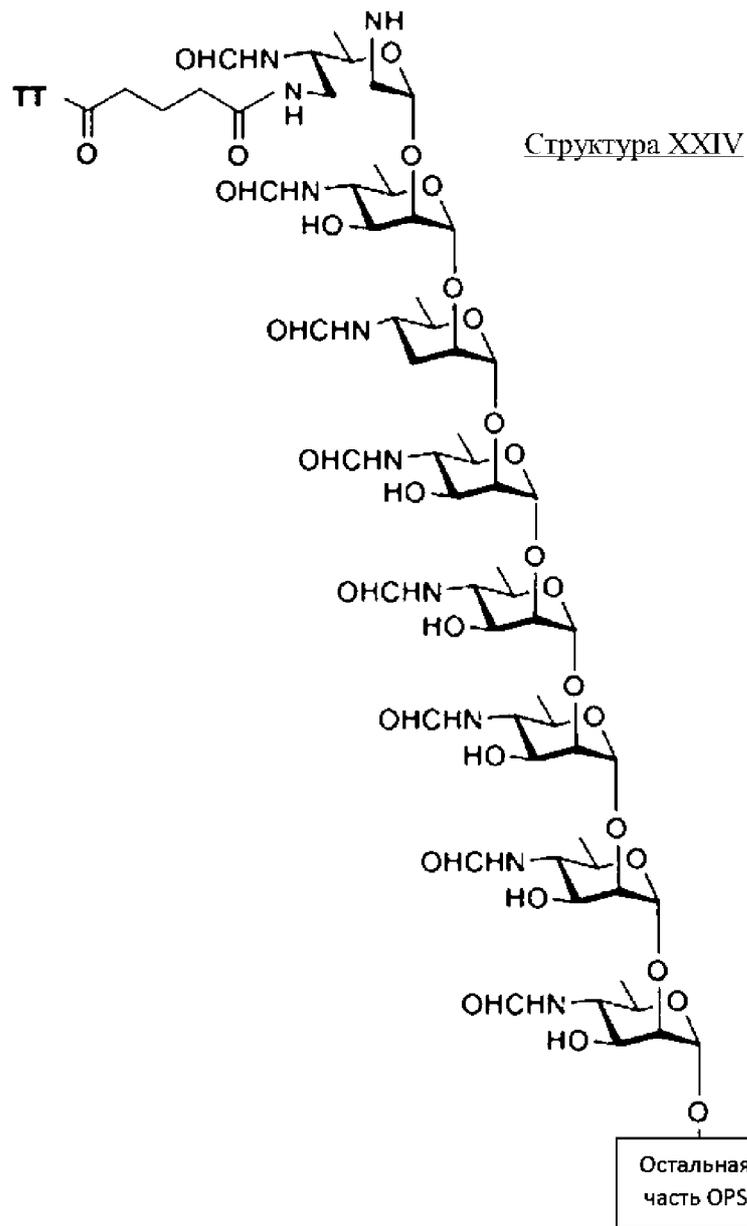
Затем авторами настоящего изобретения была предпринята попытка вакцинации с применением намного более длинного полисахарида, конъюгированного с

белковым носителем через невозстанавливающий верхушечный конец, в дополнительной попытке получить вакцину, которую можно было бы применять в системе тестирования DIVA. Цель заключалась в том, чтобы получить молекулу вакцины, которая будет приводить к выработке антител, которые не будут связываться с предлагаемыми диагностическими конъюгатными антигенами (ди- и тетрасахаридами, структурами III и VI соответственно). Как описано в WO2014/170681, эти антигены уже пригодны для проведения различения между животными, инфицированными *Brucella*, и животными, которые не инфицированы или инфицированы O:9 *Yersinia enterocolitica* (или штаммами *Brucella*, которые имеют OPS без α 1,3-гликозидных связей).

Мышей иммунизировали, как указано ниже, посредством OPS от S99 *B. abortus* (который имеет примерно 2% α 1,3-связей) и OPS от штамма Thomsen биовара 2 *B. suis* (штамма с полисахаридом с исключительно α 1,2-связями), причем оба они конъюгированы с ТТ через терминальный сахар. Следовательно, полученная от S99 *B. abortus* структура была приведенной ниже структурой XXIII, в которой конъюгация с ТТ осуществляется через C₃, или родственной структурой, в которой конъюгация с ТТ осуществляется через C₂ или как через C₂, так и через C₃.



Полученная от биовара 2 *B. suis* структура представляла собой структуру XXIV, которая приведена ниже. Опять же, у структуры XXIV конъюгация с ТТ показана как осуществляемая через C_3 , но структура, полученная от биовара 2 *B. suis*, может быть родственной структурой, в которой конъюгация с ТТ осуществляется через C_2 или как через C_2 , так и через C_3 .



Конечную сыворотку крови животных затем тестировали в отношении бактериальных антигенов липополисахаридов (LPS) из S99 *B. abortus* и штамма 16М *Brucella melitensis* (приблизительно 20% α 1,3-связей), цельноклеточных антигенов из S99 *B. abortus*, 16М *B. melitensis* и биовара 2 *B. suis*, а также в отношении столбнячного анатоксина. Результаты показаны на фигуре 4. Сыворотки также тестировали в отношении синтетических антигенов, имеющих структуру IX («1,2-гексасахарид»), структуру VIII («1,3-гексасахарид»), структуру VI («тетрасахарид»), структуру XII («трисахарид с исключительно 1,2-связями») и структуру III («дисахарид»).

В анализ был включен трисахарид (структура XII) с тем, чтобы вместе с гексасахаридом с исключительно 1,2-связями (структура IX) можно было произвести оценку, как длина олигосахаридов с исключительно 1,2-связями влияет на связывание антител, индуцированных гликоконъюгатными иммуногенами со структурами XXIII и XXIV. При тестировании сыворотки в разведении 1/100 ответ на трисахарид отсутствовал (структура XII). Результаты демонстрировали по меньшей мере десятикратную разницу в среднем титре между гексасахаридом (структурой IX) и трисахаридом (структурой XIII). Величина этой разницы была больше, чем ожидали, с учетом того факта, что антиген в форме трисахаридов с исключительно 1,2-связями считается эпитопом для антитела к C/Y (таблица 1) и что считалось, что эти антитела вероятно должны быть ответственными за наблюдаемые перекрестные реакции между A-доминантным (например, S99 *B. abortus*) и M-доминантным (например, 16M *B. melitensis*) серотипами антигена *Brucella*.

Для демонстрации, что антигены способны детектировать антитела, индуцированные инфицированием *Brucella*, эти трисахаридные (структуру XIII) и гексасахаридные антигены (структуру IX) оценивали в отношении сывороток от животных, инфицированных в естественных или экспериментальных условиях. На фигуре 6 показаны результаты ELISA для обоих антигенов при тестировании в отношении сывороток от 12 особей крупного рогатого скота, инфицированных в естественных условиях посредством *B. abortus*, и 4 особей крупного рогатого скота, не инфицированных посредством *B. abortus*. Из них видно, что оба антигена способны детектировать все сыворотки от инфицированных животных без реакции в отношении сывороток от неинфицированных животных, что свидетельствует о том, что они пригодны в качестве антигенов для DIVA. Кроме того, из них видно, что разница в результатах между двумя антигенами была очень мала; средние результаты составляли 138,6% для гексасахаридов (структуры IX) по сравнению с 125,9% для трисахаридов (структуры XIII). На фигуре также показаны результаты для моносахарида (112,2%) (структуры II). Величина этих результатов была неожиданной.

Результаты, полученные в результате иммунизаций мышей структурами XXIII и XXIV, позволяют предположить, что скорее антитела к верхушечному эпитопу, а не антитела к линейному эпитопу, являются основными типами, которые связываются с короткими антигенами с исключительно 1,2-связями. До этой оценки полагали, что отсутствие связывания антител, выработка которых индуцирована этими структурами, с более короткими олигосахаридами, содержащими 1,3-связь, обусловлена преимущественно тем, что 1,3-связь предотвращает связывание антител к линейным последовательностям 1,2-связей; при этом полагали, что верхушечный эпитоп играет важную, но меньшую роль. Данные, которые были теперь получены с использованием трисахарида с исключительно 1,2-связями, демонстрируют, что верхушечный эпитоп играет более важную роль в серодиагностике, чем считали ранее.

Два антигена с исключительно 1,2-связями (структуры VIII и XII, гексасахарид и трисахарид соответственно) также тестировали на сыворотках, взятых у четырех особей крупного рогатого скота, экспериментально инфицированных штаммом 544 *Brucella abortus* (А-доминантным штаммом); образцы брали на 3, 7, 16, 24 и 53 неделях после инфицирования. Средние титры из этих образцов показаны на фигуре 7. Для четырех из пяти дат забора образцов средние результаты для трисахарида были выше, чем для гексасахарида, а результаты на другую дату были очень близкими. Эти результаты демонстрируют, что антигены в форме трисахаридов и гексасахаридов с исключительно 1,2-связями имеют очень похожую и очень хорошую чувствительность при их применении на сыворотке крови, взятой у крупного рогатого скота, инфицированного *Brucella* в экспериментальных и естественных условиях. Поэтому по меньшей мере 10-кратная разница, наблюдаемая между этими двумя антигенами при их внесении в сыворотки от мышей, иммунизированных структурой XXIII, скорее всего связана с природой антител, выработка которых индуцирована этой иммунизацией, а не с какими-либо врожденными различиями в диагностической чувствительности у этих двух антигенов (так как они являются равными). Включение кэп-структуры в OPS посредством процесса модификации предотвращало образование антител к верхушечному эпитопу формируемого

OPS. Следовательно, антитела вырабатывались лишь к линейным эпитопам; большая длина гексасахаридного антигена позволяла связываться большему количеству этих антител, тогда как более короткая длина трисахаридов — нет. Эти результаты подтверждают вывод о том, что большая часть чувствительности антигена в форме трисахаридов с исключительно 1,2-связями зависит от детекции антител к верхушечному эпитопу, вырабатываемых во время инфицирования. Эти различия делают трисахарид с исключительно 1,2-связями (структуру XII) эффективным диагностическим антигеном для DIVA.

По тем же причинам антиген в форме дисахаридов с исключительно 1,2-связями (структура XI) также является эффективным диагностическим средством для DIVA. Очевидно, что он не будет связывать антитела, выработка которых индуцирована молекулой, содержащей кэп-структуру, которая описана в настоящем документе, например, структурами XXIII и XXIV. Это подтверждается диагностическими данными, показанными для моносахарида (структуры II) на фигуре 6 и в таблице 5 ($DS_n = 90\%$, $DSP = 93,02\%$). Из них видно, что даже этот небольшой антиген обладает неожиданно высокой диагностической чувствительностью и специфичностью.

Для дополнительной демонстрации его пользы в качестве антигена для DIVA антиген в форме трисахаридов с исключительно 1,2-связями (структура XII) применяли для детекции антител к OPS *Brucella* в сыворотке от 17 свиней, инфицированных биоваром 2 *B. suis*, и в сыворотке от 12 свиней, которые не были инфицированы *Brucella*. Эти образцы также тестировали с равной смесью (по массе конъюгатного диагностического антигена) тетрасахарида, выполняющего роль специфического М-антигена (структуры VI), и конъюгата трисахаридов с исключительно 1,2-связями (структуры XII). Эти результаты представлены на графике рассеяния на фигуре 8. На нем продемонстрировано, что трисахарид (структура XII) детектировал все образцы от 17 инфицированных свиней и не давал реакции ни на один из образцов от 12 неинфицированных свиней. Препарат из смешанных антигенов демонстрировал практически идентичные результаты. OPS биовара 2 не содержит 1,3-связей (Zacchus *et al.*

(2015) PLoS One 8, e53941), поэтому нельзя было ожидать, что антитела, которые вырабатываются против него, будут так хорошо связываться с конъюгатами олигосахаридов, выполняющих роль специфических М-антигенов, таких как тетрасахарид (структура VI) и дисахарид (структура III). Тем не менее, эти антитела хорошо связывались с трисахаридом с исключительно 1,2-связями (структурой XII); это имело место быть, когда его использовали сам по себе или в комбинации с тетрасахаридом (структурой VI). Эти результаты демонстрируют, что описываемую в настоящем документе идею вакцины и диагностики DIVA можно также применять против инфицирования посредством *B. suis*, в том числе инфицирования посредством биовара 2 *B. suis*.

Отсюда можно увидеть, что вакцинация посредством OPS, конъюгированным с белком-носителем через невозстанавливающий терминальный конец, вызывала выработку антител, способных связываться с бактериальными антигенами sLPS, с цельными клетками *Brucella*, с антигеном в форме гексасахаридов с исключительно α 1,2-связями (структурой IX), а также с универсальным антигеном (например, который описан в WO2014/170681; структурой VIII). Однако связывания с более короткими антигенами (структурами III, IV, V, VI и XII) не наблюдали.

Сравнивая результаты этого примера с результатами примера 4, авторами настоящего изобретения был сделан вывод, что для создания вакцины для DIVA требуется более длинный полимер по меньшей мере из семи 4,6-дидезокси-4-формамидо- α -D-маннопиранозных звеньев. Антитела, которые вырабатываются к такому полисахариду и не имеют терминального верхушечного эпитопа (нарушенного в результате конъюгирования с переносящим вакцину белком через невозстанавливающий конец полимера), не детектировались короткими антигенными структурами, имеющими структуры III, IV, V, VI и XII, так что эти структуры можно применять в качестве агентов для DIVA для различения животного, которое было вакцинировано с помощью модифицированного полисахарида, от животного, которое было инфицировано *Brucella*.

Способы, которые были использованы для примера 5

Получение окисленного и ТТ-конъюгированного OPS:

OPS *Brucella* очищали с помощью экстракции горячим фенолом (Westphal *et al* (1952) *Z. Naturforsch.* 7:148-155) с последующим умеренным кислотным гидролизом и эксклюзионной хроматографией (Meikle *et al.* (1989) *Infect Immun* 57:2820-2828). OPS для конъюгирования с ТТ окисляли в количестве 2 мг/мл в 10 мМ метаперйодате натрия (SMP) и 50 мМ ацетатно-натриевого буфера (рН 5,5) в течение 1 часа в темноте. Этого было достаточно для окисления соседних гидроксильных групп диола на 2-м и 3-м атомах углерода терминального сахара. Остаточный SMP удаляли путем обессоливания с помощью колонки PD-10 (колонка Sephadex-G25) в соответствии с инструкциями производителя (GE Healthcare). Подходящий объем элюирующего буфера позволял элюировать OPS.

Окисленный OPS затем подвергали восстановительному аминированию. Перед удалением солей в воду с помощью колонки Sephadex G-25 окисленный OPS инкубировали в PBS в конечных концентрациях 5 мг/мл OPS и 0,5 М хлорида аммония, а также 0,1 М цианоборогидрида натрия при 37°C в течение 24 часов, а затем лиофилизировали.

Затем OPS инкубировали в количестве 5 мг/мл с 5 мг/мл DSG в PBS в течение 45 минут на роторном шейкере перед удалением солей с помощью колонки Zeba 40 кДа в свежий PBS. Образцы OPS-DSG затем инкубировали со столбнячным анатоксином (ТТ) в конечных концентрациях примерно 2,5 и 0,5 мг/мл соответственно. Инкубацию производили в течение 2 часов при комнатной температуре (в темноте) на роторном шейкере. Затем добавляли глицин в конечной концентрации 2 мг/мл и инкубировали в течение дополнительных 15 минут. Затем образцы подвергали фракционированию с помощью SEC-HPLC для отделения гликоконъюгата от невключенного OPS. Связывание гликоконъюгатов с антителами к *Brucella* подтверждали с помощью SDS-PAGE с окрашиванием серебром и вестерн-блоттинга.

Животные и иммунизация: использовали три группы по 8 самок мышей CD1 в возрасте 7 недель на момент предварительного забора крови. Предварительный забор крови (100 мкл) брали у каждой мыши (из хвостовой вены) для получения сыворотки, из которой устанавливали исходный титр антител к нативным и предполагаемым антигенам для DIVA. Титр антител оценивали с помощью непрямых ELISA-анализов.

Через два дня мышей иммунизировали посредством 5 мкг обозначенного гликоконъюгатного антигена, суспендированного в физиологическом PBS без адьюванта. Дозу вводили подкожно в объеме 100 мкл. Спустя 19 дней после иммунизации у каждой мыши брали образец крови объемом 100 мкл крови через хвостовую вену. Спустя еще 2 дня (21 день после 1-й иммунизации) мышей иммунизировали 2-й раз тем же антигеном, составом, дозой, объемом и тем же путем, что и при 1-й иммунизации. Спустя 33 дня после 1-й иммунизации у мышей через хвостовую вену брали образец крови объемом 100 мкл. Спустя еще 2 дня (35 дней после 1-й иммунизации) мышей иммунизировали в 3-й раз тем же антигеном, составом, дозой, объемом и тем же путем, что и при 1-й иммунизации. Спустя две недели (49 дней после первой иммунизации) мышей безболезненно умерщвляли, затем вскрывали для извлечения крови из грудной полости после разрезания аорты.

Иммуноанализы: гладкие LPS-антигены из S99 *B. abortus* и 16M *B. melitensis* разводили до 0,6 мкг/мл, а TT разводили до 2,5 мкг/мл в карбонатном буфере (Sigma). Цельноклеточные антигены S99 *B. abortus*, 16M *B. melitensis* и биовара 2 *B. suis* (Thomsen) разводили до 15,6 мкг/мл в карбонатном буфере (Sigma). Синтетические антигены (структуры III, VI, VII, VIII) разводили до 2,5 мкг/мл в карбонатном буфере (Sigma).

100 мкл на лунку каждого антигена вносили в стандартные ELISA-планшеты для связывания (Nunc). Планшеты инкубировали в течение ночи при 4-8°C, затем четыре раза промывали PBS-Tween по 200 мкл на лунку и промокивали на фильтровальной бумаге.

Мышинные сыворотки разводили в логарифмических разведениях в количестве 1/100, 1/316,22, 1/1000, 1/3162,27, 1/10000, 1/31622,7, 1/100000, 1/316227, 1/1000000 и 1/3162270 в казеиновом буфере и 100 мкл на лунку вносили в покрытые антигеном планшеты. В качестве контроля моноклональное антитело BM40 разводили до 5 мкг/мл в казеиновом буфере (Sigma) и вносили в планшеты, 100 мкл на лунку. Также в качестве контролей включали 100 мкл на лунку сыворотки положительного контроля, мышиной сыворотки от мыши, иммунизированной гексасахаридной структурой I, и сыворотки отрицательного контроля от нормальной (неиммунизированной) мыши.

Планшеты инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре на мешалке на скорости 120 об./мин., затем четыре раза промывали PBS-Tween по 200 мкл на лунку и промокивали на фильтровальной бумаге. Конъюгированные с HRP иммуноглобулины к мышинным антителам (Dako) разводили 1 к 1000 в казеиновом буфере (Sigma) и вносили в планшеты в количестве 100 мкл/лунка. Планшеты инкубировали в течение 60 минут в случае синтетических антигенов и в течение 30 минут в случае sLPS и цельноклеточных антигенов при комнатной температуре на мешалке на скорости 120 об./мин., затем четыре раза промывали PBS-Tween по 200 мкл на лунку и промокивали на фильтровальной бумаге. Субстратный буфер (pH 4,0) (Fluka) с диаммониевой солью 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS) (Sigma) и 3% перекисью водорода (Sigma) вносили в планшеты по 100 мкл на лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут. Реакцию замедляли с помощью 0,1 М азида натрия, 100 мкл на лунку, и планшеты считывали в режиме поглощения 405 нм. Данные рассчитывали как среднее значение за вычетом фона для дублированных лунок в процентах от контрольных лунок с BM40, протестированных с дисахаридной структурой III, так как ее добавляли в каждый тестируемый планшет.

Оптические плотности (OD) для каждого образца и разведения корректировали по фону путем вычитания OD контрольных лунок, в которые не была добавлена сыворотка, но которые в остальном подвергали такой же обработке, как описано

выше. Количественные данные для образцов затем нормализовали путем выражения OD в процентах от положительного контроля. Конечные титры рассчитывали (с помощью GraphPad Prism 6) как разведение, при котором сигнал (выраженный в процентах от положительного контроля) был равен положительному/отрицательному порогу. Этот порог рассчитывали как среднее значение для образцов предварительного отбора крови плюс 1,96-кратное стандартное отклонение образцов предварительного отбора крови.

iELISA-анализы на сыворотках крупного рогатого скота и свиней: для проведения ELISA конъюгаты олигосахарида и BSA (структуры II, VI, IX, XII) пассивно иммобилизовали на поверхности стандартных полистирольных планшетов для ELISA путем инкубации в течение ночи в карбонатном буфере при 4°C в концентрации 2,5 мкг/мл (1,25 мкг каждого для нанесения покрытия смешанными антигенами), 100 мкл/лунка. Планшеты 4 раза промывали посредством 200 мкл/лунка PBST (PBS, содержащего 0,05% (об./об.) Tween 20), промакивали насухо. Сыворотки разводили 1/50 в буфере (в двух повторностях) и вносили по 100 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре на скорости 160 об./мин, после чего их промывали и промакивали насухо, как описано выше. В случае сывороток крупного рогатого скота применяли конъюгат конъюгированного с HRP антитела мышей к бычьим IgG1. В случае сывороток свиней применяли конъюгированный с HRP рекомбинантный белок A/G. Конъюгаты разводили до рабочей концентрации в буфере и планшеты инкубировали, промывали и промакивали насухо, как и в случае стадии инкубации сыворотки. Затем планшеты проявляли с помощью ABTS (диаммониевой соли 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты)) и перекиси водорода в качестве субстрата в течение 10-15 минут, останавливали с помощью 0,4 мМ азида натрия и считывали на длине волны 405 нм. Оптическую плотность для дубликатов усредняли и вычитали фоновую OD (только буфер вместо сывороток). Затем это значение выражали в процентах от стандартного положительного контрольного образца сыворотки от коровы, инфицированной *B. abortus* (при тестировании сыворотки крупного рогатого скота), или от положительного контрольного образца сыворотки от свиньи,

инфицированной *B. suis* (при тестировании свиных образцов). В каждом случае для обеспечения качества данных всегда проводили анализ с отрицательным контрольным образцом.

Тот же способ ELISA использовали для тестирования с применением антигена sLPS. Разводили sLPS до рабочей концентрации и пассивно наносили на стандартные полистирольные планшеты для ELISA, как описано для конъюгатов олигосахаридов. Остальную часть процедуры проводили так, как описано для конъюгатов олигосахаридов.

Оценивали несколько групп полевых сывороток с помощью iELISA с применением описанных выше антигенов. Конкретные количества образцов описаны выше. Все образцы, классифицированные как инфицированные, были получены от животных, которые были подтверждены как инфицированные бактериологической культурой *B. abortus* (в случае крупного рогатого скота) или *B. suis* (в случае свиней), из тканей, полученных от самих животных (большинство образцов крупного рогатого скота и все свиные образцы), или животные были серологически положительными на бруцеллез (по результатам традиционной серологии) и были членами стада, которое было подтверждено с помощью бактериального культивирования как инфицированное *B. abortus*. Случайным образом собранные образцы от животных (крупного рогатого скота и свиней), которые не были инфицированы посредством *Brucella*, были собраны в Великобритании, начиная с 2007 года.

Конъюгаты олигосахаридов и BSA (структуры II, VI, IX и XII), sLPS *B. abortus* и модифицированные OPS (т. е. содержащие кэп-структуру) *B. abortus* оценивали с помощью ELISA на панели сыворотки от крупного рогатого скота, экспериментально инфицированного посредством либо *B. abortus*, либо или O:9 *Y. enterocolitica*. Две группы из четырех скрещенных гибридов крупного рогатого скота голштинской/фрезской пород независимо инфицировали либо штаммом 544 *B. abortus* (109 колониеобразующих единиц) через глазной путь, либо O:9 *Y. enterocolitica* (1012 колониеобразующих единиц) перорально 4 раза в

разные дни. Затем две группы животных держали отдельно, чтобы предотвратить перекрестное инфицирование. Все особи крупного рогатого скота были подтверждены как не имеющие *Yersinia* и *Brucella* до экспериментального заражения, а микробиологические исследования подтверждали, что последующее инфицирование имело место быть. Сыворотку от каждого животного тестировали через 3, 7, 16, 24 и 53 недели после инфицирования. Все процедуры на животных проводили в соответствии с «Актом о животных» (порядке научных исследований) (англ. — United Kingdom Animal (Scientific Procedures) Act), принятым в Великобритании в 1986 году.

Пример 6: применение OPS, содержащего кэп-структуру, в качестве диагностического антигена

Проводили исследование на крупном рогатом скоте для оценки потенциала новых антигенов на основе OPS различать антитела, выработка которых индуцирована полевыми штаммами *B. abortus* или вакциной S19 *B. abortus*.

Оценивали два антигена на основе OPS с помощью стандартных способов iELISA. Они представляли собой стандартный препарат гладкого липополисахарида (sLPS) от S99 *B. abortus* и очищенный OPS, полученный от S99 *B. abortus*, который был модифицирован и конъюгирован с носителем для облегчения прикрепления к поверхности планшета для ELISA (сOPS). Эта модификация и конъюгация создавали кэп-структуру в OPS, т. е. нарушали терминальный эпитоп.

Эти антигены оценивали относительно следующей панели сывороток (не было многократного забора образцов у животных): 20 образцов, взятых через 45 дней после вакцинации, 60 образцов, взятых из стад, которые были подтверждены путем культивирования как инфицированные полевыми штаммами *B. abortus*. Результаты представлены на фигуре 5. Кроме того, вносили 7 отрицательных и 7 положительных контролей. Вакцинацию проводили конъюнктивальным путем с применением дозы $5-10 \times 10^9$ КОЕ S19 *B. abortus*.

Антиген sLPS был наиболее эффективным при дифференциации образцов от инфицированных и неинфицированных животных. Как и можно было ожидать, он также был наиболее подвержен реакции с сыворотками от вакцинированных животных. Антиген cOPS также детектировал сыворотки от инфицированных стад. Основная находка заключалась в том, что антиген cOPS был менее чувствителен при детекции антител, выработка которых была индуцирована вакциной, в то же время сохраняя чувствительность к антителам, выработка которых была индуцирована в полевых условиях вследствие истинной инфекции. Об этом свидетельствовали значения AUC (при различении сывороток от инфицированных стад от вакцинированных животных), которые составляли 0,8817 для антигена cOPS и 0,6800 для антигена sLPS. Между этими двумя значениями AUC была значимая разница ($P < 0,01$). Результаты этого исследования свидетельствовали, что антиген OPS с кэп-структурой является превосходным серологическим инструментом в тех областях, где проводят вакцинацию посредством S19 *B. abortus*.

Способы, которые были использованы для примера 6

Получение антигенов: sLPS *Brucella*, полученные из S99 *B. abortus*, очищали экстракцией горячим фенолом (Westphal *et al* (1952) *Über die Extraction von Bakterien mit Phenol/Wasser.Z.Naturforsch.*7:148-155). Из него получали OPS с помощью умеренного кислотного гидролиза и эксклюзионной хроматографии (Meikle *et al.* (1989) *Infect Immun* 57:2820-2828). OPS окисляли в количестве 2 мг/мл в 10 мМ метапериодате натрия (SMP) и 50 мМ ацетатно-натриевого буфера (pH 5,5) в течение 1 часа в темноте. Этого было достаточно для окисления соседних гидроксильных групп диола на 2-м и 3-м атомах углерода терминального сахара. Остаточный SMP удаляли путем обессоливания с помощью колонки PD-10 (колонка Sephadex-G25) в соответствии с инструкциями производителя (GE Healthcare). Подходящий объем элюирующего буфера позволял элюировать OPS.

Окисленный OPS затем подвергали восстановительному аминированию. Перед удалением солей в воду с помощью колонки Sephadex G-25 окисленный OPS инкубировали в PBS в конечных концентрациях 5 мг/мл OPS и 0,5 М хлорида аммония, а также 0,1 М цианоборогидрида натрия при 37°C в течение 24 часов, а затем лиофилизировали. Затем OPS активировали путем инкубации в количестве 5 мг/мл с 5 мг/мл DSG в PBS в течение 45 минут на роторном шейкере перед обессоливанием с помощью колонки Zeba 40 кДа в свежий PBS. Гидразид пальмитиновой кислоты (ПАН) растворяли до 10 мг/мл в DMSO и 1 его часть добавляли к 9 частям OPS в PBS для конечного разведения 4,5 мг/мл OPS и 1 мг/мл ПАН. Реакцию образцов проводили в течение 2 часов при комнатной температуре на роторном шейкере, после чего избыток ПАН удаляли путем обессоливания в H₂O с помощью 40 кДа MWCO колонки Zeba. Затем OPS, конъюгированный с ПАН, лиофилизировали.

Иммуноанализы: Разводили sLPS и cOPS до 0,5 и 5 мкг/мл соответственно в карбонатном буфере (pH 10). 100 мкл на лунку каждого антигена вносили в стандартные ELISA-планшеты для связывания. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4-8°C, затем 5 раз промывали промывочным раствором (0,0014% мас./об. натрия моногидроортофосфата и 0,1% Tween-20 в H₂O) и промакивали насухо.

Сыворотки крупного рогатого скота разводили 1/50 в PBS, содержащем 0,1% Tween-20, и 100 мкл на лунку вносили в покрытые антигеном планшеты. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на роторном шейкере, а затем их промывали и промакивали насухо, как описано выше. Конъюгат белка A/G с HRP разводили до 0,05 мкг/мл в PBS, содержащем 0,1% Tween 20, и 100 мкл его вносили в каждую лунку. Затем планшеты инкубировали, промывали и высушивали, как указано выше, для инкубации сыворотки. Субстратный буфер представлял собой двухосновный фосфат натрия с лимонной кислотой с pH 5,5. Одну 10 мг таблетку OPD (дигидрохлорида о-фенилендиамина) и 100 мкл 3% H₂O₂ вносили на 25 мл субстратного буфера и 100 мкл полученного раствора вносили в каждую лунку. Планшеты проявляли в

течение 15-30 минут, а затем считывали значения оптической плотности (OD) на 450 нм. Значения OD для образцов и контролей корректировали по фону путем вычитания OD лунки, в которую был добавлен только буфер (без сывороток). Скорректированное по фону значение OD для каждого образца выражали в процентах от скорректированного по фону значения OD общего положительного контроля.

Исследования вакцинации: защитную эффективность вакцинного состава тестировали в соответствии с требованиями OIE (Всемирной организации здравоохранения животных) по тестированию иммуногенности вакцин S19 *B. abortus* и Rev1 *B. melitensis* (как описано в главах 2009 по бруцеллезу крупного рогатого скота (глава 2.4.3) и бруцеллезу коз и овец (глава 2.7.2) в Руководстве OIE по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных. Мышей иммунизировали так, как описано ранее для примера 5, за исключением того, что на день 49 им вводили провокационную дозу 100 мкл, доставляемую внутрибрюшинно и содержащую 2×10^5 КОЕ штамма 544 *B. abortus* (или штамма 16М *B. melitensis*). Мышей умерщвляли через 15 дней.

Одновременно оценивали эталонные партии вакцин S19 *B. abortus* и Rev1 *B. melitensis* и отрицательный (только PBS) контроль для демонстрации, что процедура была проведена правильно, и для получения контрольных точек, относительно которых оценивали защитную эффективность новой вакцины. Ниже описана процедура количественной оценки защитной эффективности путем определения значений массы селезенки и бактериальной нагрузки.

Каждую селезенку иссекали в асептических условиях, удаляли жир, а селезенку взвешивали и гомогенизировали. Альтернативно селезенки можно было заморозить и хранить при -20°C в течение срока от 24 часов до 7 недель. Каждую селезенку гомогенизировали в асептических условиях с помощью стеклянной дробилки (или в соответствующих стерильных пакетах в гомогенизатор Stomacher) в девятикратном относительно ее массы количестве PBS, pH 6,8, и в том же разбавителе производили три серийных десятикратных

разведения (1/10, 1/100 и 1/1000) каждого полученного гомогената. 0,2 мл каждого разведения распределяли в четырех повторностях в чашках с агаром; две чашки инкубировали в 10% атмосфере CO₂ (что делало возможным рост как вакцинных штаммов, так и штаммов для провокационного инфицирования), а две другие чашки инкубировали на воздухе (ингибировал рост CO₂-зависимого штамма 544 *B. abortus* для провокационного инфицирования), обе при 37°C в течение 5 дней.

Подсчитывали колонии *Brucella* на разведениях, соответствующих чашкам, у которых наблюдалось менее 300 КОЕ. Если в чашках, соответствующих разведению 1/10, колоний не наблюдали, считали, что селезенка заражена пятью бактериями. Эти количества *Brucella* на селезенку сначала записывали как X и выражали как Y после следующего преобразования: $Y = \log(X/\log X)$. Затем рассчитывали среднее и стандартное отклонение, которые являются ответом каждой группы из шести мышей.

Условия контрольного эксперимента были удовлетворительными, если: i) ответ невакцинированных мышей (среднее от Y) был по меньшей мере 4,5; ii) ответ мышей, вакцинированных эталонной вакциной S19, был ниже 2,5; и iii) стандартное отклонение, рассчитанное для каждой партии из шести мышей, было ниже 0,8.

Пример 7: интактный цельноклеточный диагностический антиген (для роз-бенгал теста), содержащий кэп-структуру

Если OPS также присоединен к другим молекулам, можно осуществить процесс удаления верхушки из OPS. Посредством этих присоединений OPS может формировать часть более крупного объекта, в том числе цельной бактериальной клетки, из которой он в норме выступает.

Терминальный перозамин в цепи OPS можно разрушить умеренным окислением, тем самым создавая кэп-структуру на удаленном конце цепи OPS, как описано в настоящем документе. Эта реакция, если ее поддерживать в соответствующих

условиях, очень специфична по химическим группам, которые представляют собой часть терминального перозамина в OPS. Следовательно, возможно, что разрушение (создание кэп-структуры) можно выполнить на OPS, если он представлен в более сложном сочетании молекул и компонентов, без какого-либо значительного или пагубного воздействия на отличные от OPS компоненты. В результате можно получить диагностические преимущества от содержащего кэп-структуру OPS, как описано в приведенном выше примере 6, даже если OPS находится в неочищенном состоянии.

Этот подход оценивали с помощью диагностического анализа агглютинации цельных клеток, известного как роз-бенгал тест (RBT). Этот тест обычно применяют в качестве скринингового анализа для серодиагностики бруцеллеза, и он описан OIE (Всемирная организация здравоохранения животных) как подходящий для этой цели. Диагностический антиген состоит из интактных цельных клеток *B. abortus* (штаммов S99 или S1119-3, как биовара 1, так и A-доминантного), которые были окрашены в розовый цвет бенгальским розовым красителем, а затем суспендированы в буфере с pH 3,65 ($\pm 0,05$). Этот краситель очень облегчает визуализацию агглютинации, которая возникает при смешивании антигена с тестируемой сывороткой, которая содержит антитела к *Brucella*. Как и во всех традиционных диагностических тестах, применяемых для серодиагностики бруцеллеза, вызванного гладкими штаммами *Brucella* (случаи, вызванные видами *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*), основной диагностической молекулой в антигене является OPS, так как это молекула, к которой вырабатываются большинство антител, индуцируемых при инфицировании (Ducrotoy *et al.* (2016) *Veterinary Immunology and Immunopathology* 171:81-102).

Для создания кэп-структуры (т. е. разрушения верхушки) OPS в антигене RBT, который существует на поверхности клеток, антиген отделяли от аналитического буфера центрифугированием и суспендировали в холодных (4°C) окислительных реагентах (10 мМ метапериодате натрия в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, pH 5,5). Клетки инкубировали с этими реагентами в темноте при 4°C до завершения реакции умеренного окисления. Это подтверждали путем измерения расхода

метапериодата натрия с течением времени и достижения стадии, когда пополнение метапериодата натрия обратно до 10 мМ не приводило к дальнейшему расходу. На этой стадии полагали, что все OPS на поверхности клеток были с кэп-структурами (т. е. у них была разрушена верхушка). Клетки центрифугировали для отделения их от окислительного буфера и ресуспендировали в тестовом буфере для серологической оценки.

Аналитическую чувствительность окисленных (с кэп-структурами) и не окисленных (без кэп-структур) антигенов сравнивали с помощью серии разведений (в отрицательной бычьей сыворотке) известного положительного бычьего образца от животного, инфицированного *B. abortus*: в чистом виде, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 и 1/128. Также тестировали отрицательную сыворотку, используемую для разведения. Результаты демонстрировали, что два антигена (до и после окисления) оказывали одинаковое действие, агглютинацию наблюдали вплоть до разведения 1/64. Разведение 1/128 положительной сыворотки и чистой отрицательной сыворотки было отрицательным с обоими антигенами.

Для оценки диагностической чувствительности окисленные (с кэп-структурой) и не окисленные (без кэп-структуры) антигены вносили в 17 сывороток от крупного рогатого скота, не инфицированного *Brucella*, и в 17 сывороток от крупного рогатого скота, инфицированного *B. abortus*. Результаты демонстрировали, что все образцы от крупного рогатого скота, инфицированного *Brucella*, агглютинировали с обоими антигенами, а все образцы от неинфицированного крупного рогатого скота не агглютинировали ни с одним из антигенов. Положительные и отрицательные контроли, использованные при данной оценке, также давали корректные результаты для обоих антигенов.

Результаты этого исследования демонстрировали, что относительно неочищенные антигены, которые содержали OPS, могут полностью окисляться в умеренных условиях и оставаться эффективными серодиагностическими

антигенами. Уже было показано, что эта обеспечивало формирование кэп-структуры в OPS. В результатах, полученных в ходе этого исследования, способность окисленного антигена различать образцы животных, инфицированных *Brucella*, от неинфицированных животных не изменялась. Это согласуется с данными, представленными в примере 6, где диагностические характеристики окисленных (с кэп-структурой/без верхушки) OPS в отношении этих типов образцов были превосходными. В этом примере OPS с кэп-структурой демонстрировал пониженную чувствительность к образцам от животных, вакцинированных S19 *B. abortus*. Окисленный (т. е. с кэп-структурой) антиген RBT также характеризуется этим свойством и поэтому будет превосходить неокисленный антиген в дифференцировании между сыворотками от животных, инфицированных гладкими штаммами *Brucella*, и сыворотками от животными, вакцинированными вакцинами на основе гладких штаммов *Brucella* (такими как S19 *B. abortus* и Rev1 *B. melitensis*).

Этот способ создания кэп-структуры (разрушения верхушки) OPS также можно применять и к другим OPS *Brucella*, содержащимся в диагностических антигенах, таких как sLPS, которые применяют для ELISA (где OPS присоединен к сахарам остова, которые, в свою очередь, присоединены к липиду A), других антигенах (цельных клетках, клеточных лизатах или фракциях), применяемых в анализах агглютинации (таких как анализ агглютинации сыворотки, реакция иммунодиффузии в агаровом геле с О-ПС-антигеном и реакция связывания комплемента).

Способы, которые были использованы для примера 7

RBT проводили так, как описано в руководстве OIE (OIE 2016, Глава по бруцеллезу 2.1.4. Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных. OIE, Париж). Тестируемую (и контрольную) сыворотку добавляли на сторону тестируемого антигена RBT, по 30 мкл каждой, на гладкой белой поверхности. Затем их обе смешивали друг с другом с получением овала или круга диаметром примерно 2 см. Эту смесь аккуратно встряхивали при

комнатной температуре (18-26°C) в течение 4 минут. По истечении этого времени обследовали смесь и любую видимую агглютинацию считали положительной. Все образцы, которые были протестированы так, как описано выше, были подвергнуты анализу с помощью этого способа. Для каждого теста проводили анализ с положительными и отрицательными контрольными сыворотками.

Для окисления антигена RBT объем антигена с рабочей концентрацией центрифугировали при 3000 g с целью осаждения клеток. Надосадочную жидкость, т. е. тестовый буфер, удаляли и клетки ресуспендировали в объеме, равном удаленному, холодного (+4°C) окислительного реагента (10 mM метапериодата натрия в 0,1 M натрий-ацетатном буфере, pH 5,5). Клетки инкубировали в течение 30 минут в темноте, а затем центрифугировали, как и раньше. Надосадочную жидкость удаляли и заменяли свежим окислительным реагентом. Этот процесс повторяли еще четыре раза так, чтобы антиген подвергнуть всего 6 раз 30-минутному окислению с ежечасным восполнением окислительного реагента. Через пятый час клетки центрифугировали, как описано выше, надосадочную жидкость удаляли и заменяли исходным объемом свежего тестового буфера. Процесс восполнения позволял протекать реакции без ограничения в отношении расхода метапериодата натрия и без отклонения от умеренных условий окисления, которые облегчают специфическую реакцию с соседними цис-диолами на терминальном перозамине OPS.

Содержание метапериодата натрия в экстрагированной надосадочной жидкости измеряли путем дозирования 100 мкл окислительного реагента в отдельные лунки 96-луночного планшета для ELISA. Затем в каждую тестовую лунку вносили 100 мкл с концентрацией 0,5 мг/мл ABTS (2,2-азинобис-3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) в буфере с pH 4,0. В присутствии метапериодата натрия это приводило к изменению цвета, которое было пропорционально концентрации данного окислителя. Изменение цвета спустя 15 минут измеряли с помощью планшет-ридера для ELISA, установленного для измерения оптической плотности на 405 нм. Молярность метапериодата натрия в

тестовом образце рассчитывали путем сравнения со стандартной кривой, которая была построена с помощью контрольных лунок, содержащих известную концентрацию метапериодата натрия. Результаты расхода окислительного реагента представлены на фигуре 16, причем «А» обозначает расход после первого 30-минутного периода, «В» обозначает расход после двух 30-минутных периодов и так далее. Таким образом, на фигуре показана стандартная кривая известной концентрации метапериодата натрия в зависимости от оптической плотности (O.D. на 405 нм) и значений OD окислительных реагентов, экстрагированных в разные моменты времени с начала процесса окисления (с правой стороны). Как можно видеть, спустя 30 минут большая часть метапериодата натрия была израсходована. Первое восполнение (2×30 минут) было не в таком количестве, сколько было потреблено, а лишь слегка превышало половину израсходованного метапериодата натрия. Второе восполнение (3×30 минут) содержало более половины (примерно 7 мМ) оставшегося метапериодата натрия. Третье восполнение (4×30 минут) содержало примерно 8 мМ концентрацию метапериодата натрия, а четвертое (5×30 минут) и пятое (6×30 минут) восполнения содержали примерно 9 мМ оставшегося метапериодата натрия.

Из этих данных ясно, что метапериодат натрия расходовался, и что расход замедлялся, а затем фактически прекращался при введении клеток, которые уже были подвергнуты действию метапериодата натрия. График на данной фигуре демонстрирует, что после пяти циклов окисления не было более значительного расхода реагента. Из этого был сделан вывод, что антиген был полностью окислен, все молекулы, способные к окислению этим умеренным процессом, были полностью окислены. После этого процесса окисления клетки центрифугировали так, как описано ранее, удаляли надосадочную жидкость и ресуспендировали их в тестовом буфере. Затем эти клетки оценивали на диагностическую эффективность путем внесения их в описанные выше тестовые сыворотки. Окисленный антиген RBT анализировали параллельно с исходным антигеном RBT, который не был подвергнут окислению.

Пример 8: применение антигенов в форме трисахаридов (структуры XII) и дисахаридов (структуры XI) с исключительно 1,2-связями в качестве серодиагностических антигенов при бруцеллезе

Свойства антигенов в форме трисахаридов (структура XII) и дисахаридов (структура XI) с исключительно 1,2-связями в качестве средств диагностики DIVA были описаны выше в примере 5. Эффективность этих антигенов была показана путем демонстрации их хорошей диагностической чувствительности для детекции инфицирования *B. abortus* у крупного рогатого скота и инфицирования (биоваром 2) *B. suis* у свиней. Таким образом, ценность этих антигенов в контексте DIVA была хорошо доказана.

Проводили дополнительное исследование для оценки пригодности и преимуществ этих антигенов для типовой серологии в присутствии или отсутствии вакцинации. Поскольку роль верхушечного эпитопа была продемонстрирована в ходе описанной в настоящем документе работы как важный аспект диагностической чувствительности этих антигенов, ожидали, что наличие идентичного эпитопа на OPS O:9 *Y. enterocolitica* (4,6-дидезокси-4-формамидо-маннопиранозильном полимере с исключительно 1,2-связями) будет приводить к возникновению перекрестных реакций и ложноположительных результатов, которые могут быть чрезмерными. Это ожидание было подкреплено сильными реакциями, которые демонстрировала сыворотка от свиней, инфицированных биоваром 2 *B. suis* (поскольку длинный повторяющийся элемент OPS из этого биовара идентичен O:9 *Y. enterocolitica*), в отношении антигена в форме трисахаридов с исключительно 1,2-связями (структуры XII).

Для оценки степени этой перекрестной реакции оценивали сыворотки от четырех особей крупного рогатого скота, экспериментально инфицированных штаммом 544 *Brucella abortus*, и четырех особей крупного рогатого скота, экспериментально инфицированных O:9 *Y. enterocolitica* (с использованием образцов, взятых на 3, 7, 16, 24 и 53 неделе после инфицирования). Для

измерения реакций относительно других диагностических антигенов проводили серологические тесты с применением нескольких различных антигенов, и результаты этих тестов представлены в виде линейных графиков: sLPS S99 *B. abortus* (фигура 9), гексасахарид с исключительно 1,2-связями (структура IX) (фигура 10), трисахарид с исключительно 1,2-связями (структура XII) (фигура 11) и моносахарид (структура II) (фигура 12). В таблице 6 показано количество образцов от крупного рогатого скота, инфицированного O:9 *Y. enterocolitica*, с серологическими результатами, превышающими наименьший серологический результат, полученный от образцов от крупного рогатого скота, инфицированного 544 *B. abortus*. Это давало показатель количества ложноположительных результатов, которые имели место в этом наборе образцов при использовании способа по настоящему изобретению, если критерий чувствительности был установлен на 100% (так как все животные были инфицированы *Brucella*). 100% чувствительность анализа необходима в системе тестирования на *Brucella*, поскольку невозможность детектировать *Brucella*-положительное животное может иметь опустошающий эффект.

Таблица 6: количество образцов от крупного рогатого скота, инфицированного O:9 *Y. enterocolitica*, с серологическими результатами, превышающими наименьший серологический результат, полученный от образцов от крупного рогатого скота, инфицированного 544 *B. abortus*.

| Антиген | Наличие/отсутствие верхушки | Кол-во положительных по O:9 <i>Y. enterocolitica</i> образцов |
|---|-----------------------------|---|
| sLPS S99 <i>B. abortus</i> | Наличие | 15 |
| Конъюгат гексасахариды с исключительно 1,2-связями и BSA (структура IX) | Наличие | 11 |
| Конъюгат трисахариды с исключительно 1,2-связями и BSA (структура XII) | Наличие | 7 |
| Конъюгат моносахарида и BSA (структура II) | Наличие | 4 |

Результаты демонстрируют, что, если диагностические антигены обладали верхушечным эпитопом, количество положительных по O:9 *Y. enterocolitica* образцов уменьшалось, а значит специфичность увеличивалась по мере того, как становилась меньше длина антигена: sLPS > гексасахарид > трисахарид > моносахарид. Это происходило даже несмотря на то, что терминальный перозамин в OPS *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* и O:9 *Y. enterocolitica* был абсолютно одинаковым. Чем короче был олигосахарид (с исключительно 1,2-связями), тем больше возрастала специфичность; этого нельзя было спрогнозировать.

Подробная оценка серологических результатов демонстрировала, что, хотя результаты для образцов от инфицированных посредством O:9 *Y. enterocolitica* животных изначально были высокими в сравнении трисахаридом с исключительно 1,2-связями (структурой XII), они затем быстро падали у всех четырех животных. К 16-й неделе результаты у всех четырех животных оставались ниже, чем наиболее низкий результат у инфицированных посредством *Brucella* животных. Результаты у инфицированных посредством *Brucella* животных не начинали значимо снижаться с периода после 16-й недели, и даже тогда двое животных имели стабильно высокие результаты. Серологические профили, полученные с применением антигена в форме sLPS S99 *B. abortus* (антигена, рекомендованного OIE для iELISA на *Brucella*), демонстрировали падение результатов, полученных от инфицированных посредством O:9 *Y. enterocolitica* животных, сразу в 3 из 4 случаев (но не так резко, как это было в случае с трисахаридом с исключительно 1,2-связями), и при этом один образец от инфицированного посредством *Brucella* животного под номером 2 начинал давать относительно низкий результат на 53-й неделе. Результаты у инфицированного посредством O:9 *Y. enterocolitica* животного под номером 2 увеличивались до 7-й недели и оставались высокими до 24-й недели.

Результаты от антигена в форме гексасахаридов с исключительно 1,2-связями (структуры IX) демонстрировали свойства как трисахаридного (структуры XII) антигена, так и антигенов в форме sLPS от s99 как соответствующие его

промежуточной длине. Хотя результаты у образцов, полученных от инфицированных посредством O:9 *Y. enterocolitica* животных, относительно быстро снижались, результат у животного 2 увеличивался со 2-й по 7-ю недели. Результаты в случае моносахаридов демонстрировали хорошее различие между типами инфекции, хотя некоторые из результатов в случае образцов от инфицированных посредством *Brucella* животных были довольно низкими, что отражало более ограниченную чувствительность у этого антигена.

Трисахарид с исключительно 1,2-связями (структура XII), sLPS S99 *B. abortus* и смесь (50/50 по массе) антигенов в форме трисахаридов с исключительно 1,2-связями (структуры XII) и тетрасахаридов с исключительно 1,2-связями (структуры VI) тестировали на 29 образцах сыворотки от особей крупного рогатого скота, инфицированных в полевых условиях посредством *B. abortus*, 20 образцах сыворотки от случайно выбранных, не инфицированных *Brucella* особей крупного рогатого скота, и 31 образце от особей крупного рогатого скота, которые были ложноположительными для традиционных серодиагностических анализов на *Brucella*. Данные представлены на 3 графиках рассеяния: sLPS S99 *B. abortus* относительно трисахаридов с исключительно 1,2-связями (структуры XII) (фигура 13), sLPS S99 *B. abortus* относительно 50/50 смеси трисахаридов с исключительно 1,2-связями (структуры XII) и специфического М-антигенного тетрасахарида (структуры VI) (фигура 14) и трисахаридов с исключительно 1,2-связями (структура XII) относительно 50/50 смеси трисахаридов с исключительно 1,2-связями (структуры XII) и специфического М-антигенного тетрасахарида (структуры VI) (фигура 15).

На графиках рассеяния (фигуры 13-15) видно, что все три антигенных препарата полностью различали образцы от инфицированных животных от образцов от случайно выбранных неинфицированных животных. Тем не менее, во всех случаях наблюдали значительное перекрытие с образцами из популяции FPSR. В таблице 7 показана способность антигенов различать образцы от инфицированных посредством *Brucella* животных и от животных из популяций FPSR, где высока чувствительность. Необходимость в высокой

чувствительности отражали как выборочные популяции, так и требование к тестированию. Результаты демонстрировали, что при диагностической чувствительности 100% и 96,6% как трисахарид с исключительно 1,2-связями (структура XII), так и 50/50 смесь трисахаридов с исключительно 1,2-связями (структуры XII) и М-антигенного тетрасахарида (структуры VI) превосходили нативный sLPS S99 *B. abortus* (текущий стандартный антиген, который рекомендован OIE).

Таблица 7: специфичность в отношении популяции FPSR, когда положительный/отрицательный порог теста адаптирован к различной чувствительности антигенов (в скобках указано количество положительных образцов)

| <u>Диагностическая чувствительность</u> | <u>sLPS S99 <i>B. abortus</i></u> | <u>Трисахарид с исключительно 1,2-связями</u> | <u>Смесь</u> |
|---|-----------------------------------|---|--------------|
| 100,0% | 0,0% (0) | 12,9% (4) | 9,7% (3) |
| 96,6% | 16,1% (5) | 38,7% (12) | 35,5% (11) |
| 93,1% | 58,1% (18) | 45,2% (14) | 38,7% (12) |

Результаты и выводы, полученные на полевых сыворотках и экспериментально инфицированных сыворотках, согласовывались. При наиболее высоких уровнях диагностической чувствительности специфичность, полученная с использованием трисахаридов с исключительно 1,2-связями (структуры XII), превосходила специфичность, полученную с природным антигеном sLPS (текущим стандартным антигеном). Снижение требования к чувствительности давало превосходные характеристики у sLPS, хотя снижение чувствительности было нежелательным. Данные, полученные в результате экспериментальных инфекций, позволяли предположить, что специфичность различных антигенов зависит от того, насколько близко к моменту инфицирования перекрестно реагирующим организмом, таким как O:9 *Y. enterocolitica*, был взят образец.

Следовательно, трисахарид (структура XII) с исключительно 1,2-связями, дисахарид (структура XI) с исключительно 1,2-связью и моносахарид (структура

II) не только неожиданно были высокочувствительными диагностическими чувствительными антигенами к бруцеллезу, но они также обладали неожиданно высокой диагностической специфичностью.

В настоящем примере серологию проводили на образцах, взятых у инфицированных животных, при этом инфекционный биовар *Brucella* был А-доминантным штаммом. Можно было ожидать, что такие инфекции будут вызывать увеличение доли антител, которые вступают в реакции с последовательностями перозаминов с исключительно 1,2-связями (4,6-дидезокси-4-формаидоманнопиранозильных), но не антител к последовательностям, содержащим перозамины с 1,3-связями. Способность трисахарида с исключительно 1,2-связями (структуры XII) и антигенов в форме специфического М-антигенного тетрасахарида (структуры VI) детектировать антитела к OPS, выработка которых индуцирована такими инфекциями, была показана выше или ранее (WO2014/170681). Антигены могут быть пригодны при их отдельном применении, или, как показано выше, они дают хороший эффект при их совместном применении.

Если имеют место инфицирования М-доминантными штаммами, то индуцируемые к выработке антитела, вероятно, будут смещаться в сторону более высокой доли антител к последовательностям перозаминов, содержащих 1,3-связи. При таких обстоятельствах специфический М-антигенный тетрасахарид (структура VI) будет более чувствительным диагностическим средством. Применение двух антигенов в комбинации (структур XII или XI в комбинации со структурой VI, например, применяемых в виде смеси) давало оптимальную чувствительность при обоих сценариях, а именно при инфицировании А-доминантными или М-доминантными штаммами *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*.

В целом, в описанной в настоящем документе работе предложена комбинация антигенов, являющаяся универсальным антигеном, который является чувствительным, совместимым с DIVA, более специфичным, чем нативные

антигены, такие как рекомендуемый OIE антиген sLPS S99 *B. abortus*, и более дешевым в производстве и применении, чем более длинный синтетический «универсальный» антиген.

Способы, которые были использованы для примера 8

Использованные серологические способы и образцы были такими же, как описано для примера 5, с добавлением ложноположительных серологических реакционных образцов (FPSR). Эти сыворотки были собраны в Великобритании в период с 1996 по 1999 год, более 10 лет с момента объявления ее официального статуса «без бруцеллеза». Эти сыворотки были положительными по меньшей мере в одном из четырех традиционных серодиагностических анализов на бруцеллез крупного рогатого скота: CFT, SAT, cELISA или iELISA, которые одобрены OIE. Кроме серологии не было никаких культуральных или эпидемиологических доказательств заболевания.

Приложение: способы синтеза полисахаридов

Синтез гептасахаридов

Синтез предусматривал использование трех ключевых блоков построения известного метилгликозида **S12** с защитной группой. Два гликозильных донора **11** и **13** (описаны ниже) использовали для удлинения олигосахаридов с 1,2-связями, причем донор **11** и несущий кэп-структуру остаток **13** несли соединяющий элемент для конъюгации с белком. Соединение **11** позволяло удлинить цепь на один остаток за раз, а временную защитную для ацетатной группы на *O*-2 можно было легко удалить, обнажая гидроксильную группу для дополнительного удлинения цепи. Предварительно сформированный несущий кэп-структуру остаток с присоединенным соединяющим элементом **13** получали из известного метил-2,3-*O*-изопропилиден-6-дезоксид- α -D-маннопиранозидов **S5** и соединяющего элемента **12** с защитной группой, который, в свою очередь, получали из коммерчески доступного бензил(5-гидроксипентил)карбамата путем двухстадийного превращения в **S13**, а затем в **12** (схема 4S). Серия превращений позволяла провести реакцию **S5** с **12**, а затем дополнительные реакции давали тиогликозид **13**.

Подробное построение этих промежуточных соединений происходило так, как описано ниже.

Синтез тиогликозидных доноров 11

Метил-4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозид (S11)

Аналитические данные для искомого соединения были фактически такими же, как описано ранее (Bundle *et al* (1988) Carbohydr Res 174:239-251).

1,2-ди-*O*-ацетил-4-азидо-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозид (S12)

Раствор **S11** (5 г, 17,05 ммоль) в уксусном ангидриде/уксусной кислоте/серной кислоте (50:20:0,5, 50 мл) перемешивали при 21 °C в течение 3 ч, а затем выливали в ледяной 1 М раствор K₂CO₃ (80 мл). Затем смесь разводили

посредством CH_2Cl_2 (~100 мл) и промывали водой (2×30 мл), насыщенным водным раствором NaHCO_3 (35 мл) и соевым раствором (15 мл). Органическую фазу отделяли, сушили над MgSO_4 и концентрировали под вакуумом. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом - гексаном) с получением искомого соединения **S12** (5,6 г, 91%) в виде клейкой жидкости. Аналитические данные для **S12**: $R_f = 0,35$ (этилацетат/гексан, 1/4, об./об.); $[\alpha]_D^{21} = +30,71$ ($c = 1,51$, CHCl_3); ^{13}C ЯМР (176 МГц, CDCl_3): δ : 169,8, 168,3, 136,9, 128,5, 128,3, 128,1, 91,0, 75,7, 71,8, 69,3, 66,3, 63,5, 20,8(×2), 18,5 ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 386,1323, выявленное: 386,1322.

***n*-Толил-2-*O*-ацетил-4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси-1-тио- α -D-маннопиранозид (11)**

В перемешиваемый раствор **S12** (0,78 г, 2,15 ммоль) и *n*-толуолтиола (0,4 г, 3,22 ммоль) в водном растворе CH_2Cl_2 (15 мл) при 0 °C по каплям добавляли $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (0,32 мл, 2,57 ммоль). Когда по результатам ТСХ было видно, что реакция завершилась, то смесь разводили посредством CH_2Cl_2 (~50 мл) и промывали водой (2×10 мл), насыщенным водным раствором NaHCO_3 (15 мл) и соевым раствором (10 мл). Органическую фазу отделяли, сушили над MgSO_4 и концентрировали под вакуумом. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией (градиентное элюирование этилацетатом - гексаном) с получением **11** в виде клейкой жидкости (0,854 г, 92,9%). Аналитические данные для **11**: $R_f = 0,7$ (этилацетат/гексан, 1/3, об./об.); $[\alpha]_D^{21} = +135,5$ ($c = 2,25$, CHCl_3); ^{13}C ЯМР (176 МГц, CDCl_3): δ : 170,0, 138,1, 137,0, 132,4, 132,3, 129,9, 129,8, 129,6, 128,5, 128,5, 128,4, 128,1, 86,4, 76,4, 71,7, 69,1, 68,2, 64,2, 21,1, 21,0, 18,4 ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 450,1458, выявленное: 450,1465.

Синтез линкерного бромолкана 12

5-(*N*-бензил((бензилокси)карбонил)амино)пентанолбензоат (S13)

Бензоилхлорид (0,88 мл, 7,59 ммоль) по каплям добавляли в перемешиваемый раствор бензил(5-гидроксипентил)карбамата (коммерчески доступен) (1,5 г, 6,32 ммоль) в водном растворе CH_2Cl_2 (15 мл), содержащем Et_3N (1,76 мл, 1,26 ммоль), при 0 С. Спустя 1 минуту в реакцию смесь по каплям добавляли DMAP (1,7 г, 13,9 ммоль) в водном растворе CH_2Cl_2 (10 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Полученную смесь разводили с помощью CH_2Cl_2 (~30 мл) и промывали водным раствором HCl (1 М, 1×10 мл), водой (60 мл), водным раствором NaHCO_3 (30 мл) и соевым раствором (30 мл). Органическую фазу отделяли, сушили над MgSO_4 и концентрировали под вакуумом. Остаток быстро отфильтровывали на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом - гексаном) с получением почти чистого соединения в виде масла. Этот неочищенный материал непосредственно использовали для бензилирования.

К раствору соединения с защищенной бензоильной группой (0,9 г, 2,63 ммоль), растворенного в безводном DMF (10 мл), добавляли NaNH (0,12 г, 2,89 ммоль) при 0 С. Смесь перемешивали при 0 С в течение 45 минут, а затем добавляли VnBr (0,37 мл, 3,16 ммоль). После перемешивания в течение еще 12 ч, когда по результатам ТСХ было видно, что реакция завершилась, ее гасили с помощью H_2O при 0 С и разводили смесь посредством EtOAc . Водный слой экстрагировали посредством EtOAc (5×25 мл), а органические фазы объединяли и сушили над Na_2SO_4 . Требуемый продукт **S13** (1,093 г, 96,1%) получали после колоночной флэш-хроматографии (градиентное элюирование этилацетатом - гексаном) конденсированного продукта. Аналитические данные для **S13**: $R_f = 0,6$ (этилацетат/гексан, 1/3,5, об./об. ^{13}C ЯМР (176 МГц, CDCl_3): δ : 166,6, 156,7, 156,2, 137,9, 136,8, 132,8, 130,4, 129,5, 128,5, 128,4, 128,3, 127,8, 127,3, 127,2, 67,2, 64,8, 64,7, 50,5, 50,2, 47,0, 46,0, 28,4, 27,8, 27,4, 23,3 ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NO}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 454,1989, выявленное: 454,1986.

Бензил-*N*-бензил(5-бромпентанил)карбамат (12)

Метоксид натрия (~0,8 мл, 0,5 М раствор) добавляли в раствор **S13** (1,0 г, 2,32 ммоль) в CH₃OH (15 мл) до достижения pH ~9 и полученную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 6 часов при 21 С. После этого реакционную смесь нейтрализовали ионообменной смолой Amberlite IR 120 (H⁺), смолу отфильтровывали и последовательно промывали посредством CH₃OH. Объединенный фильтрат концентрировали под вакуумом и этот неочищенный материал непосредственно использовали для бромирования.

В раствор соединения с удаленной защитной группой (0,96 г, 2,92 ммоль), растворенного в безводном CH₂Cl₂ (15 мл), добавляли CBr₄ (1,85 г, 5,55 ммоль) и PPh₃ (1,54 г, 5,86 ммоль) при 0 С. Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали еще 3 часа. Когда по результатам ТСХ было видно, что реакция завершилась, ее гасили посредством H₂O при 0 С, затем смесь разводили с помощью CH₂Cl₂ (~50 мл) и промывали водой (2×10 мл), насыщенным водным раствором NaHCO₃ (15 мл) и соевым раствором (15 мл). Органическую фазу отделяли, сушили над MgSO₄ и концентрировали под вакуумом. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом - гексаном) с получением искомого соединения **12** (1,085 г, 94,8%) в виде жидкости. Аналитические данные для **12**: R_f = 0,85 (этилацетат/гексан, 1/4, об./об.); ¹³C ЯМР (176 МГц, CDCl₃): δ: 156,7, 156,2, 137,8, 136,7, 128,5(×2), 128,4, 128,0, 127,9, 127,4, 127,3, 127,2, 67,3, 67,2, 50,6, 50,3, 46,9, 46,0, 33,6, 33,4, 32,3(×2), 27,2, 26,8, 25,3 ppm; HRMS (ESI): m/z, расчетное для C₂₀H₂₄NO₂BrNa [M+Na]⁺: 412,0883, выявленное: 412,0878.

Синтез *n*-толилтиогликозидного донора 13

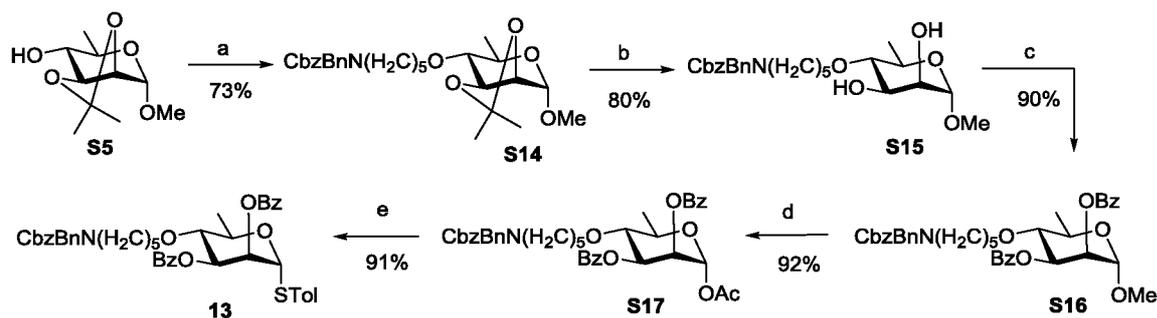


Схема 4S Условия: а) CbzBnN(CH₂)₅Br, NaH, DMF, 0 С до комнатной температуры, 18 ч; б) TFA/H₂O (9:1), CH₂Cl₂, при комнатной температуре, 10 минут.; в) BzCl, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 С до комнатной температуры, 12 ч; д) Ac₂O, AcOH, H₂SO₄, при комнатной температуре, 4 ч; е) BF₃·Et₂O, *p*-толуолтиол, CH₂Cl₂, 0 С до комнатной температуры, 10 ч.

Метил-2,3-*O*-изопропилиден-6-дезоксид- α -D-маннопиранозид (S5)

Аналитические данные для искомого соединения были фактически такими же, как описано ранее (Eis & Ganem (1988) Carbohydrate Research 176:316-323).

Метил-4-*O*-(5'-*N*-бензил-5'-*N*-карбоксибензилпентанил)-2,3-*O*-изопропилиден-6-дезоксид- α -D-маннопиранозид (S14)

К раствору **S5** (2,0 г, 9,17 ммоль), растворенному в безводном DMF (15 мл), добавляли NaH (0,4 г, 10,08 ммоль) при 0 С. Смесь перемешивали при 0 С в течение 45 минут, а затем добавляли CbzBnN(CH₂)₅Br (4,5 г, 11,01 ммоль). После перемешивания в течение еще 12 ч, когда по результатам ТСХ было видно, что реакция завершилась, ее гасили с помощью H₂O при 0 С и разводили смесь посредством EtOAc. Водный слой экстрагировали посредством EtOAc (5×25 мл), а органические фазы объединяли и сушили над Na₂SO₄. Требуемый продукт **S14** (3,26 г, 73,2 %) вместе с удаленным алкеном и небольшим количеством непрореагировавшего исходного материала **S5** (0,16 г) получали после колоночной флэш-хроматографии (градиентное элюирование этилацетатом - гексаном) конденсированного продукта. Аналитические данные для **S14**: R_f = 0,6

(этилацетат/гексан, 1/4, об./об.); $[\alpha]_D^{21} = +20,48$ ($c = 2,11$, CHCl_3); ^{13}C ЯМР (176 МГц, CDCl_3): δ : 156,7, 156,1, 137,9, 136,9, 136,8, 128,5, 128,4, 127,9, 127,8, 127,3, 127,2, 109,0, 98,0, 82,0, 78,5, 75,9, 71,3, 67,1, 64,5, 54,7, 50,4, 50,1, 47,1, 46,1, 29,8, 28,0, 27,9, 27,5, 26,3, 23,4, 17,7 ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{NO}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 550,2775, выявленное: 550,2785.

Метил-4-*O*-(5'-*N*-бензил-5'-*N*-карбоксибензилпентанил)-6-дезоксид- α -D-маннопиранозид (S15)

Раствор S14 (1,0 г, 1,89 ммоль) в TFA:H₂O (9:1, 10 мл) перемешивали при 21 С в течение 30 минут, а затем выливали в ледяной 1 М раствор K₂CO₃ (50 мл). Затем смесь разводили посредством CH₂Cl₂ (~50 мл) и промывали водой (2×30 мл), насыщенным водным раствором NaHCO₃ (25 мл) и солевым раствором (15 мл). Органическую фазу отделяли, сушили над MgSO₄ и концентрировали под вакуумом. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом - гексаном) с получением искомого соединения S15 (0,742 г, 80,3%) в виде масла. Аналитические данные для S15: $R_f = 0,4$ (этилацетат/гексан, 1/1, об./об.); $[\alpha]_D^{21} = +38,31$ ($c = 1,27$, CHCl_3); ^{13}C ЯМР (176 МГц, CDCl_3): δ : 156,7, 156,3, 137,8, 136,6, 129,6, 128,5, 128,4, 127,9, 127,8, 127,3, 127,2, 100,3, 81,7, 71,4, 71,3, 71,2, 67,2, 67,1, 54,8, 50,5, 50,3, 47,1, 46,1, 30,0, 29,8, 27,9, 27,2, 23,2, 17,9 ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{NO}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 510,2462, выявленное: 510,2462.

Метил-2,3-ди-*O*-бензоил-4-*O*-(5'-*N*-бензил-5'-*N*-карбоксибензилпентанил)-6-дезоксид- α -D-маннопиранозид (S16)

Бензоилхлорид (0,23 мл, 1,97 ммоль) по каплям добавляли в перемешиваемый раствор S15 (0,4 г, 0,82 ммоль) в безводном CH₂Cl₂ (10 мл), содержащем Et₃N (0,46 мл, 3,28 ммоль), при 0 С. Спустя 2 минуты в реакционную смесь по каплям добавляли DMAP (0,451 г, 3,69 ммоль) в водном растворе CH₂Cl₂ (5 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Полученную смесь разводили с помощью CH₂Cl₂ (~20 мл) и промывали водным раствором HCl (2 М, 1×5 мл), водой (20 мл), водным раствором NaHCO₃ (10 мл) и солевым

раствором (10 мл). Органическую фазу отделяли, сушили над $MgSO_4$ и концентрировали под вакуумом. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом - гексаном) с получением искомого соединения **S16** (0,513 г, 90%) в виде масла. Аналитические данные для **S16**: $R_f = 0,7$ (этилацетат/гексан, 1/3,5, об./об.); $[\alpha]_D^{21} = -70,58$ ($c = 1,71$, $CHCl_3$); ^{13}C ЯМР (176 МГц, $CDCl_3$): δ : 165,5, 165,2, 156,7, 156,3, 137,9, 133,3, 133,0, 129,9, 129,8, 129,8, 129,6, 128,5, 128,4, 128,3, 127,9, 127,8, 127,1, 98,5, 79,5, 73,1, 72,9, 72,1, 71,1, 67,6, 67,1, 55,0, 50,4, 50,1, 47,0, 46,0, 29,9, 27,8, 27,4, 23,3, 18,0 ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $C_{41}H_{45}NO_9Na$ $[M+Na]^+$: 718,2987, выявленное: 718,298.

1-*O*-ацетил-2,3-ди-*O*-бензоил-4-*O*-(5'-*N*-бензил-5'-*N*-карбоксібензилпентанил)-6-дезоксид- α -D-маннопираноза (S17**)**

Раствор **S16** (0,5 г, 0,716 ммоль) в уксусном ангидриде/уксусной кислоте/серной кислоте (50:20:0,5, 10 мл) перемешивали при 21 °C в течение 3 ч, а затем выливали в ледяной 1 М раствор K_2CO_3 (50 мл). Затем смесь разводили посредством CH_2Cl_2 (~20 мл) и промывали водой (2×30 мл), насыщенным водным раствором $NaHCO_3$ (15 мл) и солевым раствором (10 мл). Органическую фазу отделяли, сушили над $MgSO_4$ и концентрировали под вакуумом. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом - гексаном) с получением искомого соединения **S17** (0,485 г, 92,2%) в виде жидкости. Аналитические данные для **S17**: $R_f = 0,55$ (этилацетат/гексан, 1/4, об./об.); $[\alpha]_D^{21} = -48,86$ ($c = 1,51$, $CHCl_3$); ^{13}C ЯМР (176 МГц, $CDCl_3$): δ : 168,6, 165,4, 165,2, 137,8, 136,7, 133,5, 133,2, 129,8, 129,6, 129,4, 129,0, 128,5, 128,5, 128,4, 128,2, 127,9, 127,8, 127,2, 127,1, 90,8, 79,1, 73,4, 71,8, 70,1, 69,9, 67,1, 50,4, 50,1, 46,9, 45,9, 29,9, 27,8, 27,4, 23,3, 21,0, 18,1, ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $C_{42}H_{45}NO_{10}Na$ $[M+Na]^+$: 746,2936, выявленное: 746,2931.

***n*-Толил-2,3-ди-*O*-бензоил-4-*O*-(5'-*N*-бензил-5'-*N*-карбоксібензилпентанил)-6-дезоксид-1-тио- α -D-маннопиранозид (**13**)**

В перемешиваемый раствор **S17** (1,2 г, 1,66 ммоль) и *n*-толуолтиола (0,312 г, 2,48 ммоль) в безводном CH₂Cl₂ (20 мл) при 0 °C по каплям добавляли BF₃·Et₂O (0,25 мл, 1,99 ммоль). Когда по результатам ТСХ было видно, что реакция завершилась, то смесь разводили посредством CH₂Cl₂ (~30 мл) и промывали водой (2×10 мл), насыщенным водным раствором NaHCO₃ (10 мл) и соевым раствором (20 мл). Органическую фазу отделяли, сушили над MgSO₄ и концентрировали под вакуумом. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией (градиентное элюирование этилацетатом - гексаном) с получением **13** в виде белого твердого вещества (1,18 г, 90,7%). Аналитические данные для **13**: R_f = 0,65 (этилацетат/гексан, 1/4, об./об.); [α]_D²¹ = -1,02 (c = 0,9, CHCl₃); ¹³C ЯМР (176 МГц, CDCl₃): δ: 165,4, 165,3, 156,7, 156,1, 138,1, 137,9, 136,9, 136,8, 133,4, 133,2, 132,7, 132,3, 130,0, 129,9(×2), 129,8, 129,7(×2), 129,6, 128,5(×2), 128,4(×2), 127,9, 127,8, 127,3(×2), 127,2, 86,2, 79,7, 73,3, 73,1, 72,6, 72,4(×2), 69,2, 67,1, 50,5, 50,2, 47,0, 46,0, 30,0, 27,9, 27,4, 23,3, 21,2, 18,0 ppm; HRMS (ESI): m/z, расчетное для C₄₇H₄₉NO₈SNa [M+Na]⁺: 810,3071, выявленное: 810,3069.

Метил-4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси-α-D-маннопиранозид

Аналитические данные для искомого соединения были фактически такими же, как описано ранее (Bundle *et al* (1988) Carbohydr Res 174:239-251), (Eis & Ganem (1988) Carbohydrate Research 176:316-323).

Сборка гептасахарида

Гликозилирование метилгликозида активированным тиогликозидом **11** давало дисахарид **14**. Его подвергали реакции переэтерификации для удаления этилацетатной группы, обнажая гидроксильную группу для повторной последовательности гликозилирования и переэтерификации. Это повторяли еще 4 раза, что приводило, в свою очередь, к получению трисахаридов **16** и **17**, тетрасахаридов **18** и **19**, пентасахаридов **21** и **22** и гексасахаридов **22** и **23**. Затем в конечной реакции удлинения цепи присоединяли несущий кэп-структуру остаток с соединяющим элементом путем проведения реакции **13** с **23** с

получением гептасахарида **24**, а после удаления бензоатного сложного эфира — спирта **25** с частично удаленными защитными группами. Удаление защитных групп осуществляли с помощью ряда стадий, включающих восстановление азидогрупп до амина с последующим их *N*-формилированием, а затем стадией гидрогенолиза для удаления бензиловых фрагментов с эфирными группами и защитных групп для аминогрупп (Ganesh *et al* (2014) *Journal of the American Chemical Society* 136:16260-16269). Соединение **8** затем конъюгировали с белком путем селективной активации тетра-аминогруппы бис-сукцинимидным сложным эфиром (DSG) или дибутил-скваратом с получением активированных промежуточных соединений **S26** и **S27**. Проводили реакцию **S26** со столбнячным анатоксином с получением вакцинного гликонъюгата **9** и проводили реакцию **S27** с BSA с получением скринингового антигена **10**.

Метил-4-азидо-2-*O*-ацетил-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1 \rightarrow 2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозид (14**)**

Соединение-гликозильный акцептор **S11** (1,42 г, 4,84 ммоль) и соединение-гликозильный донор **11** (2,27 г, 5,33 ммоль) объединяли, дважды подвергали азеотропной перегонке с безводным толуолом (5 мл) и помещали в атмосферу высокого вакуума на 2 часа. Затем смесь растворяли в CH₂Cl₂ (20 мл), обрабатывали свежеективированными 4 Å молекулярными ситами (1,5 г), перемешивали в атмосфере Ar при комнатной температуре в течение 1 часа. К смеси добавляли NIS (2,4 г, 9,71 ммоль). После охлаждения до -10°C добавляли TMSOTf (0,19 мл, 0,971 ммоль) и реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры. Когда по результатам ТСХ было видно, что реакция завершилась, то добавляли насыщенный водный раствор NaHCO₃ (15 мл) и CH₂Cl₂ и полученную смесь пропускали через целит для удаления молекулярных сит. Объединенные фильтраты промывали водным раствором Na₂S₂O₃ (20%) и водой. После экстракции водного слоя посредством CH₂Cl₂ (3×15) объединенную органическую фазу сушили над Na₂SO₄, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью колоночной хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом/гексаном) с получением дисахарида **14**

(2,66 г, 92,1%) в виде клейкой жидкости. Аналитические данные для **14**: $R_f = 0,5$ (этилацетат/гексан 1:4, об./об.); $[\alpha]_D^{21} = +36,24^\circ$ ($c = 1,92$, CHCl_3); ^{13}C ЯМР (176 МГц, CDCl_3): δ : 169,7, 137,6, 137,1, 128,5($\times 2$), 128,4, 128,0, 127,9, 127,8, 99,7, 99,4, 77,7, 75,4, 73,7, 72,0, 71,6, 67,6, 67,2, 66,9, 64,1, 63,8, 54,9, 20,9, 18,5($\times 2$) ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 619,2487, выявленное: 619,2481.

Метил-4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1 \rightarrow 2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозид (15)

Метоксид натрия (~1,2 мл, 0,5 М раствор) добавляли в раствор **14** (2,6 г, 4,36 ммоль) в $\text{CH}_3\text{OH}:\text{THF}$ [4:2] (20 мл) до достижения pH ~9 и полученную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 6 часов при 21 С. После этого реакцию смесь нейтрализовали ионообменной смолой Amberlite IR 120 (H⁺), смолу отфильтровывали и последовательно промывали посредством CH_3OH . Объединенный фильтрат концентрировали под вакуумом и очищали колоночной хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом - гексаном) с получением дисахаридного соединения **15** с удаленными защитными группами (2,3 г, 95,4%) в виде белой пены. Аналитические данные для **15**: $R_f = 0,4$ (этилацетат/гексан 1:4,5, об./об.); $[\alpha]_D^{21} = +28,71$ ($c = 1,56$, CHCl_3); ^{13}C ЯМР (176 МГц, CDCl_3): δ : 137,5, 137,1, 128,6, 128,5, 128,3, 128,2($\times 2$), 128,0, 100,8, 99,9, 77,8, 77,6, 73,6, 72,1($\times 2$), 67,3, 67,2, 66,9, 64,3, 63,8, 54,9, 18,6, 18,4 ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 577,2381, выявленное: 577,2381.

Метил-2-*O*-ацетил-4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1 \rightarrow 2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1 \rightarrow 2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозид (16)

Соединение-гликозильный акцептор **15** (2,25 г, 4,06 ммоль) и соединение-гликозильный донор **11** (1,90 г, 4,46 ммоль) объединяли, дважды подвергали азеотропной перегонке с безводным толуолом (5 мл) и помещали в атмосферу высокого вакуума на 2 часа. Затем смесь растворяли в CH_2Cl_2 (25 мл),

обрабатывали свежее активированными 4 Å молекулярными ситами (1,6 г), перемешивали в атмосфере Ar при комнатной температуре в течение 1 часа. К смеси добавляли NIS (1,83 г, 8,11 ммоль). После охлаждения до -10°C добавляли TMSOTf (0,16 мл, 0,893 ммоль) и реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры. Когда по результатам ТСХ было видно, что реакция завершилась, то добавляли насыщенный водный раствор NaHCO₃ (15 мл) и CH₂Cl₂ и полученную смесь пропускали через целит для удаления молекулярных сит. Объединенные фильтраты промывали водным раствором Na₂S₂O₃ (20%) [30 мл] и водой (20 мл). После экстракции водного слоя посредством CH₂Cl₂ (3×15) объединенную органическую фазу сушили над Na₂SO₄, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью колоночной хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом/гексаном) с получением трисахарида **16** (3,09 г, 88,9%) в виде клейкой жидкости. Аналитические данные для **16**: R_f = 0,65 (этилацетат/гексан 1:5, об./об.); ¹³C ЯМР (176 МГц, CDCl₃): δ: 169,7, 137,4, 137,3, 137,1, 128,5(×2), 128,4, 128,1, 128,0(×3), 100,3, 99,8, 99,1, 77,5, 76,8, 75,4, 73,5, 72,1, 72,0, 71,5, 67,8, 67,6, 67,1, 67,0, 64,4, 64,0, 63,8, 54,9, 21,0, 18,6(×2), 18,3 ppm; HRMS (ESI): m/z, расчетное для C₄₂H₅₁N₉O₁₁Na [M+Na]⁺: 880,36, выявленное: 880,3607.

Метил-4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1→2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1→2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозид (17)

Метоксид натрия (~1,5 мл, 0,5 М раствор) добавляли в раствор **16** (3,0 г, 3,5 ммоль) в CH₃OH: THF [4:2] (20 мл) до достижения pH ~9 и полученную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 6 часов при 21 С. После этого реакционную смесь нейтрализовали ионообменной смолой Amberlite IR 120 (H⁺), смолу отфильтровывали и последовательно промывали посредством CH₃OH. Объединенный фильтрат концентрировали под вакуумом и очищали колоночной хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом - гексаном) с получением трисахаридного соединения **17** с удаленными защитными группами (2,6 г, 91,2%) в виде белой твердой пены.

Аналитические данные для **17**: $R_f = 0,45$ (этилацетат/гексан 1:5, об./об.); ^{13}C ЯМР (176 МГц, CDCl_3): δ : 137,3($\times 2$), 137,2, 128,6($\times 3$), 128,5, 128,3, 128,3, 128,2($\times 2$), 128,1($\times 2$), 128,0, 100,5, 100,4, 99,8, 77,6, 77,5, 76,8, 73,6, 73,3, 72,2, 72,1($\times 2$), 67,8, 67,3, 67,1, 67,0, 64,4, 64,2, 63,8, 54,9, 18,6($\times 2$), 18,3 ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $\text{C}_{40}\text{H}_{49}\text{N}_9\text{O}_{10}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 383,3495, выявленное: 838,3501.

Метил-2-*O*-ацетил-4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1 \rightarrow 2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1 \rightarrow 2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1 \rightarrow 2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозид (18)

Соединение-гликозильный акцептор **17** (2,05 г, 2,51 ммоль) и соединение-гликозильный донор **11** (1,18 г, 2,76 ммоль) объединяли, дважды подвергали азеотропной перегонке с безводным толуолом (5 мл) и помещали в атмосферу высокого вакуума на 2 часа. Затем смесь растворяли в CH_2Cl_2 (20 мл), обрабатывали свежеективированными 4 Å молекулярными ситами (1,2 г), перемешивали в атмосфере Ar при комнатной температуре в течение 1 часа. К смеси добавляли NIS (1,13 г, 5,02 ммоль). После охлаждения до -10°C добавляли TMSOTf (0,1 мл, 0,553 ммоль) и реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры. Когда по результатам ТСХ было видно, что реакция завершилась, то добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 (10 мл) и CH_2Cl_2 и полученную смесь пропускали через целит для удаления молекулярных сит. Объединенные фильтраты промывали водным раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (20%) и водой. После экстракции водного слоя посредством CH_2Cl_2 (3×10) объединенную органическую фазу сушили над Na_2SO_4 , концентрировали под вакуумом и очищали с помощью колоночной хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом/гексаном) с получением тетрасахарида **18** (2,49 г, 87,8%) в виде сиропа. Аналитические данные для **18**: $R_f = 0,5$ (этилацетат/гексан 1:4, об./об.); ^{13}C ЯМР (176 МГц, CDCl_3): δ : 169,8, 137,4, 137,3, 137,1($\times 2$), 128,6($\times 2$), 128,5($\times 2$), 128,4, 128,3, 128,2, 128,1, 128,0($\times 3$), 100,3, 100,1, 99,7, 99,1, 77,4, 76,6, 75,4, 73,6, 73,4($\times 2$), 72,2, 72,1, 72,0, 71,5, 67,8, 67,6, 67,1,

66,9, 64,3, 64,2, 64,0, 63,8, 54,9, 21,0, 18,6(×2), 18,5, 18,4 ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $C_{55}H_{66}N_{12}O_{14}Na [M+Na]^+$: 1141,4714, выявленное: 1141,473.

Метил-4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1→2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1→2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1→2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозид (19)

Метоксид натрия (~1,2 мл, 0,5 М раствор) добавляли в раствор **18** (2,2 г, 1,95 ммоль) в $CH_3OH: THF [4:2]$ (15 мл) до достижения pH ~9 и полученную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 6 часов при 21 С. После этого реакцию смесь нейтрализовали ионообменной смолой Amberlite IR 120 (H⁺), смолу отфильтровывали и последовательно промывали посредством CH_3OH . Объединенный фильтрат концентрировали под вакуумом и очищали колоночной хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом - гексаном) с получением искомого соединения **19** (1,86 г, 88,7%) в виде белого твердого вещества. Аналитические данные для **19**: $R_f = 0,4$ (этилацетат/гексан 1:4, об./об.); ¹³C ЯМР (176 МГц, $CDCl_3$): δ : 137,3(×2), 137,1, 128,6(×2), 128,5, 128,4, 128,3(×2), 128,2(×3), 128,1, 128,0, 100,4, 100,3, 100,2, 99,7, 77,7, 77,4, 76,6, 73,6, 73,5, 73,2, 72,2, 72,1(×3), 67,8, 67,3, 67,1, 66,9, 64,3, 64,2(×2), 63,8, 54,9, 18,6(×2), 18,5, 18,3 ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $C_{53}H_{64}N_{12}O_{13}Na [M+Na]^+$: 1099,4608, выявленное: 1099,4625.

Метил-2-*O*-ацетил-4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1→2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1→2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1→2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозид (20)

Соединение-гликозильный акцептор **19** (1,63 г, 1,51 ммоль) и соединение-гликозильный донор **11** (0,712 г, 1,66 ммоль) объединяли, дважды подвергали азеотропной перегонке с безводным толуолом (5 мл) и помещали в атмосферу высокого вакуума на 2 часа. Затем смесь растворяли в CH_2Cl_2 (15 мл),

обрабатывали свежее активированными 4 Å молекулярными ситами (1 г), перемешивали в атмосфере Ar при комнатной температуре в течение 1 часа. К смеси добавляли NIS (0,681 г, 3,03 ммоль). После охлаждения до -10°C добавляли TMSOTf (0,06 мл, 0,33 ммоль) и реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры. Когда по результатам ТСХ было видно, что реакция завершилась, то добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 (10 мл) и CH_2Cl_2 и полученную смесь пропускали через целит для удаления молекулярных сит. Объединенные фильтраты промывали водным раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (20%) [15 мл] и водой (15 мл). После экстракции водного слоя посредством CH_2Cl_2 (3×10) объединенную органическую фазу сушили над Na_2SO_4 , концентрировали под вакуумом и очищали с помощью колоночной хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом/гексаном) с получением пентасахарида **20** (1,92 г, 91,9%) в виде клейкой жидкости. Аналитические данные для **20**: $R_f = 0,7$ (этилацетат/гексан 1:4, об./об.); ^{13}C ЯМР (176 МГц, CDCl_3): δ : 169,8, 137,4, 137,3, 137,2, 137,1, 128,6($\times 3$), 128,5($\times 2$), 128,4, 128,3($\times 2$), 128,2, 128,1($\times 2$), 128,0($\times 3$), 100,3, 100,2, 100,0, 99,7, 99,1, 77,4, 76,6, 76,5, 75,4, 73,7, 73,6, 73,4, 73,3, 72,2($\times 2$), 72,1, 72,0, 71,5, 67,8($\times 2$), 67,6, 67,1, 66,9, 64,3, 64,2($\times 2$), 64,1, 63,8, 54,9, 21,0, 18,6($\times 2$), 18,5($\times 2$), 18,4 ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $\text{C}_{68}\text{H}_{81}\text{N}_{15}\text{O}_{17}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1402,5827, выявленное: 1402,5856.

Метил-4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1 \rightarrow 2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозид (21)

Метоксид натрия (~1,2 мл, 0,5 М раствор) добавляли в раствор **20** (1,8 г, 1,31 ммоль) в $\text{CH}_3\text{OH}:\text{THF}$ [4:2] (15 мл) до достижения pH ~9 и полученную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 6 часов при 21 C. После этого реакционную смесь нейтрализовали ионообменной смолой Amberlite IR 120 (H^+), смолу отфильтровывали и последовательно промывали посредством CH_3OH . Объединенный фильтрат концентрировали под вакуумом и очищали

колоночной хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом - гексаном) с получением искомого соединения **21** (1,57 г, 89,8%) в виде белой пены. Аналитические данные для **21**: $R_f = 0,55$ (этилацетат/гексан 1:4, об./об.); ^{13}C ЯМР (176 МГц, CDCl_3): δ : 137,3($\times 2$), 137,2, 129,0, 128,6($\times 4$), 128,4, 128,3($\times 4$), 128,2($\times 2$), 128,1, 128,0, 100,5, 100,3, 100,2($\times 2$), 99,7, 77,7, 77,4, 77,0, 76,6, 76,5, 73,7, 73,6, 73,4, 73,2, 72,2, 72,1($\times 3$), 67,8($\times 2$), 67,3, 67,1, 66,9, 64,4, 64,2, 63,8, 54,9, 18,6($\times 2$), 18,5($\times 2$), 18,3 ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $\text{C}_{66}\text{H}_{79}\text{N}_{15}\text{O}_{16}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1360,5721, выявленное: 1360,5749.

Метил-2-О-ацетил-4-азидо-3-О-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1 \rightarrow 2) 4-азидо-3-О-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозид (22)

Соединение-гликозильный акцептор **21** (1,45 г, 1,08 ммоль) и соединение-гликозильный донор **11** (0,556 г, 1,3 ммоль) объединяли, дважды подвергали азеотропной перегонке с безводным толуолом (5 мл) и помещали в атмосферу высокого вакуума на 2 часа. Затем смесь растворяли в CH_2Cl_2 (15 мл), обрабатывали свежеективированными 4 Å молекулярными ситами (1 г), перемешивали в атмосфере Ar при комнатной температуре в течение 1 часа. К смеси добавляли NIS (0,488 г, 2,16 ммоль). После охлаждения до -10°C добавляли TMSOTf (43 мкл, 0,24 ммоль) и реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры. Когда по результатам ТСХ было видно, что реакция завершилась, то добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 (10 мл) и CH_2Cl_2 и полученную смесь пропускали через целит для удаления молекулярных сит. Объединенные фильтраты промывали водным раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (20%) [10 мл] и водой (15 мл). После экстракции водного слоя посредством CH_2Cl_2 (3 \times 10) объединенную органическую фазу сушили над Na_2SO_4 , концентрировали под вакуумом и очищали с помощью колоночной хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом/гексаном) с получением гексасахарида

22 (1,601 г, 90,1%) в виде клейкой жидкости. Аналитические данные для **22**: $R_f = 0,65$ (этилацетат/гексан 1:4, об./об.); ^{13}C ЯМР (176 МГц, CDCl_3): δ : 169,8, 137,4, 137,3, 137,2, 137,1($\times 3$), 128,6($\times 4$), 128,5($\times 2$), 128,4, 128,3($\times 2$), 128,2, 128,1($\times 2$), 128,0($\times 3$), 100,3, 100,1($\times 2$), 100,0, 99,7, 99,1, 77,4, 76,7($\times 2$), 76,5, 75,4, 73,6($\times 2$), 73,5, 73,4, 73,3, 72,2, 72,1, 72,0, 71,5, 67,8($\times 4$), 67,6, 67,1, 66,9, 64,3($\times 2$), 64,2($\times 2$), 64,1, 63,8, 54,9, 21,0, 18,6($\times 2$), 18,5($\times 3$), 18,4 ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $\text{C}_{81}\text{H}_{96}\text{N}_{18}\text{O}_{20}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1663,694, выявленное: 1663,6982.

Метил-4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1 \rightarrow 2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозид (23**)**

Метоксид натрия (~1,0 мл, 0,5 М раствор) добавляли в раствор **22** (1,3 г, 0,792 ммоль) в CH_3OH : THF [4:2] (15 мл) до достижения pH ~9 и полученную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 6 часов при 21 С. После этого реакционную смесь нейтрализовали ионообменной смолой Amberlite IR 120 (H^+), смолу отфильтровывали и последовательно промывали посредством CH_3OH . Объединенный фильтрат концентрировали под вакуумом и очищали колоночной хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом - гексаном) с получением искомого соединения **23** (1,17 г, 92,3%) в виде масла. Аналитические данные для **23**: $R_f = 0,5$ (этилацетат/гексан 1:4, об./об.). ^{13}C ЯМР (126 МГц, CDCl_3): δ : 137,3, 137,2($\times 2$), 128,7($\times 3$), 128,6($\times 2$), 128,4($\times 3$), 128,3($\times 2$), 128,2, 128,1($\times 3$), 100,5, 100,3, 100,2($\times 2$), 100,1, 99,8, 77,7, 77,5, 76,6($\times 2$), 73,7, 73,6, 73,5($\times 2$), 73,3, 72,2($\times 2$), 72,1, 67,9, 67,8, 67,4, 67,2, 67,0, 64,4, 64,2, 63,9, 54,9, 18,7, 18,6($\times 2$), 18,5($\times 2$), 18,3 ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $\text{C}_{79}\text{H}_{94}\text{N}_{18}\text{O}_{19}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1621,6835, выявленное: 1621,688.

Метил-2,3-ди-*O*-бензоил-4-*O*-(5'-*N*-бензил-5'-*N*-карбоксибензилпентанил)-6-дезокси- α -D-маннопиранозил (1 \rightarrow 2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-

| | | |
|---------------------|-------|---|
| маннопиранозил | (1→2) | 4-азидо-3- <i>O</i> -бензил-4,6-дидезокси- α -D- |
| маннопиранозил | (1→2) | 4-азидо-3- <i>O</i> -бензил-4,6-дидезокси- α -D- |
| маннопиранозил | (1→2) | 4-азидо-3- <i>O</i> -бензил-4,6-дидезокси- α -D- |
| маннопиранозил | (1→2) | 4-азидо-3- <i>O</i> -бензил-4,6-дидезокси- α -D- |
| маннопиранозил | (1→2) | 4-азидо-3- <i>O</i> -бензил-4,6-дидезокси- α -D- |
| маннопиранозид (24) | | |

Соединение-гликозильный акцептор **23** (0,270 г, 0,169 ммоль) и соединение-гликозильный донор **13** (0,146 г, 0,186 ммоль) объединяли, дважды подвергали азеотропной перегонке с безводным толуолом (5 мл) и помещали в атмосферу высокого вакуума на 2 часа. Затем смесь растворяли в CH₂Cl₂ (10 мл), обрабатывали свежеективированными 4 Å молекулярными ситами (0,3 г), перемешивали в атмосфере Ar при комнатной температуре в течение 1 часа. К смеси добавляли NIS (0,076 г, 0,337 ммоль). После охлаждения до -10°C добавляли TMSOTf (6,4 мкл, 0,037 ммоль) и реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры. Когда по результатам ТСХ было видно, что реакция завершилась, то добавляли насыщенный водный раствор NaHCO₃ (5 мл) и CH₂Cl₂ и полученную смесь пропускали через целит для удаления молекулярных сит. Объединенные фильтраты промывали водным раствором Na₂S₂O₃ (20%) [10 мл] и водой (10 мл). После экстракции водного слоя посредством CH₂Cl₂ (3×5) объединенную органическую фазу сушили над Na₂SO₄, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью колоночной хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом/гексаном) с получением гептасахарида **24** (0,334 г, 87,4%) в виде клейкой жидкости. Аналитические данные для **24**: R_f = 0,65 (этилацетат/гексан 1:4, об./об.); [α]_D²¹ = -6,71° (c = 1,23, CHCl₃); ¹³C ЯМР (126 МГц, CDCl₃): δ: 165,3, 165,1, 156,6, 156,1, 137,9, 137,5, 137,4, 137,3, 137,2(×2), 136,8, 133,3, 133,0(×2), 129,9, 129,8, 129,6, 129,1, 128,7(×2), 128,6(×2), 128,5(×2), 128,4(×2), 128,3 (×2), 128,2, 128,1, 127,9, 127,8, 127,3, 125,3, 100,4(×3), 100,2(×2), 99,8, 99,1, 79,8, 77,5, 76,7, 76,6, 73,7, 73,6, 73,5, 73,3, 72,2(×2), 72,1(×2), 71,9, 70,9, 68,5, 68,1, 67,9, 67,8, 67,1, 67,0, 64,4, 64,2, 63,9, 54,9, 50,5, 50,2, 47,0, 46,1, 29,7, 29,4, 27,8, 27,4, 23,3,

18,7, 18,6(×3), 18,5(×2), 18,0 ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $C_{119}H_{135}N_{19}O_{27}Na [M+Na]^+$: 2284,9667, выявленное: 2284,9732.

Метил-4-*O*-(5'-*N*-бензил-5'-*N*-карбоксибензилпентанил)-6-дезоксид- α -D-маннопиранозил (1→2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозид (25)

Метоксид натрия (~0,2 мл, 0,5 М раствор) добавляли в раствор **24** (0,26 г, 0,115 ммоль) в $CH_3OH: THF [2:3]$ (10 мл) до достижения pH ~9 и полученную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 6 часов при 21 С. После этого реакционную смесь нейтрализовали ионообменной смолой Amberlite IR 120 (H⁺), смолу отфильтровывали и последовательно промывали посредством CH_3OH . Объединенный фильтрат концентрировали под вакуумом и очищали колоночной хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом - гексаном) с получением искомого соединения **25** (0,215 г, 91,2%) в виде масла. Аналитические данные для **25**: $R_f = 0,25$ (этилацетат/гексан 1:3,3, об./об.); $[\alpha]_D^{21} = +79,2$ ($c = 2,21$, $CHCl_3$); ^{13}C ЯМР (176 МГц, $CDCl_3$): δ : 156,7, 156,3, 137,8, 137,4, 137,3, 137,2(×2), 137,1(×2), 136,7, 129,0, 128,6(×2), 128,5, 128,4, 128,3(×2), 128,2, 128,1, 128,0, 127,9, 127,8, 127,3, 100,8, 100,4, 100,3, 100,2, 100,1(×2), 99,7, 81,6, 77,4, 76,5, 73,6, 73,6, 73,5, 73,5, 72,9, 72,2, 72,1, 72,1, 72,0, 71,7, 71,1, 68,2, 67,8, 67,7, 67,2, 66,9, 64,3, 64,2, 54,9, 50,5, 50,3, 47,1, 46,1, 29,7, 29,4, 27,9, 27,2, 23,3, 18,6(×2), 18,5(×4), 17,9 ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $C_{105}H_{131}N_{20}O_{25} [M+NH_4]^+$: 2071,9589, выявленное: 2071,9639.

Метил-4-*O*-(5'-аминопентанил)-6-дезоксид- α -D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формаидо- α -D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формаидо- α -D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формаидо- α -D-

маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формамидо- α -D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формамидо- α -D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формамидо- α -D-маннопиранозид (8)

Перемешиваемый раствор **25** (0,11 г, 0,054 ммоль) в смеси пиридина (5 мл) и воды (2 мл) барботировали посредством H_2S в течение 0,5 часа при 40 С и продолжали перемешивание в течение 16 часов. После этого аргоном барботировали в течение 10 минут, растворители удаляли под вакуумом и остаток выпаривали совместно с толуолом (3×10 мл) и сушили. Масс-спектрометрический анализ демонстрировал завершение реакции с получением соответствующего соединения амина, и никаких других продуктов, возникающих в результате неполного восстановления, не было. HRMS (ESI): m/z , расчетное для $C_{105}H_{140}N_7O_{25}$ $[M+H]^+$: 1898,9893, выявленное: 1898,99.

Этот неочищенный материал непосредственно использовали для формилирования. К соединению амина в CH_3OH (5 мл) при -20 С добавляли свежеприготовленный муравьиный ангидрид (5 мл, эфирный раствор) и перемешивали в течение 3 ч, затем медленно давали нагреться до 21 С. После этого растворители выпаривали и остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (градиентное элюирование метанолом – дихлорметаном) с получением гептасахаридов. Масс-спектрометрический анализ высокого разрешения демонстрировал завершение реакции формилирования. HRMS (ESI): m/z , расчетное для $C_{111}H_{139}N_7O_{31}Na$ $[M+Na]^+$: 2088,9408, выявленное: 2088,9405.

Формилированное соединение растворяли в CH_3OH/H_2O (2:1, 10 мл), добавляли $Pd(OH)_2$ на угле (20%, 0,060 г). Затем его перемешивали под давлением газообразного водорода при 21 С в течение 16 часов. После фильтрации через целитную подушку промывали посредством CH_3OH (3×10 мл) и удаляли растворители под вакуумом. Остаток очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке C18 в градиенте воды - ацетонитрила и лиофилизировали с получением искомого соединения **8** (0,0427 г, 61,2%, за 3 стадии) в виде белой

пены. Аналитические данные для **8**: $[\alpha]_D^{21} = +42,44$ ($c = 1,02$, H_2O); ^{13}C ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$): δ : 168,8(×2), 168,6, 165,9(×4), 165,7, 103,2, 103,1(×4), 102,7, 102,5, 101,5(×2), 100,4, 100,3, 81,8, 78,2, 78,1(×3), 78,0(×2), 77,9, 73,5(×2), 71,3, 70,8(×2), 69,2, 68,7(×2), 68,5, 68,4, 67,8, 57,9, 56,4, 55,9, 55,8(×2), 52,9(×2), 52,7(×2), 40,4, 29,7, 27,5, 23,2, 17,9(×2), 17,8(×2), 17,7, 17,6(×4) ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $C_{54}H_{92}N_7O_{29}$ $[M+H]^+$: 1302,5934, выявленное: 1302,5928.

Метил-4-О-(5'-[N-сукцинимидил]глутариламидопентанил)-6-дезоксид-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формаидо-α-D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формаидо-α-D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формаидо-α-D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формаидо-α-D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формаидо-α-D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формаидо-α-D-маннопиранозид (S26)

Смесь гептасахаридов **8** (9 мг) и дисукцинимидного глутарата (15 экв.) в DMF и 0,1 М PBS-буфере (4:1, 1,5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 6 часов. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом и остаток промывали с помощью EtOAc 10 раз для удаления избытка дисукцинимидного глутарата. Полученное твердое вещество сушили под вакуумом в течение 1 часа с получением активированного олигосахаридов **S26**, который непосредственно использовали для конъюгации с BSA и столбнячным анатоксином. MALDI TOF MS (в режиме положительных ионов): расчетное для $C_{63}H_{100}N_8O_{34}Na$ $[M + Na]^+$ m/z , 1535,6342; выявленное, 1535,9996.

1-[(2'-Аминоэтиламино)карбонилпентил]-6-дезоксид-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формаидо-α-D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формаидо-α-D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формаидо-α-D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формаидо-α-D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формаидо-α-D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формаидо-α-D-маннопиранозид] 2-бутоксидциклобутен-3,4-дион (S27)

К перемешиваемому раствору гептасахарида **8** (0,006 г, 0,005 ммоль) в воде (0,5 мл) и EtOH (0,5 мл) добавляли раствор 3,4-дибутокси-3-циклобутен-1,2-диона (20% в этаноле, 50 мкл) и рН доводили до 8 осторожным добавлением водного раствора NaHCO₃ (1%). Спустя 1 час масс-спектрометрия демонстрировала, что реакция завершилась; реакцию смесь нейтрализовали с помощью CH₃COOH (10%) и концентрировали под вакуумом. Остаток очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке C18 в градиенте воды - ацетонитрила и лиофилизировали с получением искомого соединения **S27** (0,005 г, 72,6%) в виде белой пены. Аналитические данные для **S27**: ¹³C ЯМР (126 МГц, CDCl₃): δ: 190,3, 184,2, 183,8, 178,4, 178,0, 174,3, 168,8, 168,7, 168,6, 165,9, 165,7, 103,2, 103,2(×4), 102,8, 102,6, 101,6, 100,4, 100,3, 81,9, 78,2, 78,1(×2), 78,0(×2), 77,9, 73,4, 71,3, 70,7, 69,8, 69,2, 69,1, 68,8, 68,6, 68,5, 68,4, 57,9, 56,4, 55,9, 55,8, 52,9(×2), 52,7, 40,4, 32,4, 30,7, 30,5, 29,7, 27,5, 23,3, 23,2, 19,2, 19,0, 17,9, 17,8(×2), 17,7(×4), 17,6, 13,9 ppm; HRMS (ESI): m/z, расчетное для C₆₂H₉₉N₇O₃₂Na [M+Na]⁺: 1476,6335, выявленное: 1476,6406.

КОНЬЮГАЦИЯ ОЛИГОСАХАРИДА С БЕЛКОМ

Получение конъюгата **9** столбнячного анатоксина (структуры XVI): активированный гептасахарид **S26** (0,8 мг, 0,518 мкмоль) вносили в раствор столбнячного анатоксина (4 мг, 0,026 мкмоль) в 0,5 М боратном буфере с рН 9 (1 мл) и медленно перемешивали при 21 С в течение 3 дней. Затем реакцию смесь промывали PBS-буфером, фильтровали через трубку для ультратонкой фильтрации (10000 MWCO, 4×10 мл) и полученный конъюгат **9** столбнячного анатоксина хранили в PBS-буфере. Масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF демонстрировал, что конъюгат **9** имел в среднем 10,02 гептасахарида на молекулу столбнячного анатоксина.

Получение конъюгата **10** с BSA (структуры XVII): BSA (10 мг) и активированный гептасахарид **S27** (4,5 мг) растворяли в 0,1 М PBS-буфере, рН 9 (1,2 мл), и медленно перемешивали при 21 С в течение 3 дней. Затем реакцию смесь разводили водой Milli-Q, фильтровали через трубку для

ультратонкой фильтрации (10000 MWCO, 4×10 мл), лиофилизировали и получали конъюгат **10** с BSA в виде белой пены (12,2 мг). Масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF демонстрировал, что конъюгат **10** имел в среднем 10,27 гептасахарида на молекулу BSA.

Синтез трисахарида с исключительно 1,2-связями

Этил-4-азидо-2,3-ди-*O*-бензоил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1→2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси-1-тио- α -D-маннопиранозид (S18)

Аналитические данные для искомого соединения были фактически такими же, как описано ранее (Bundle *et al* (1988) *Carbohydr. Res.* 174, 239–251).

5'-Метоксикарбонилпентил-4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозид (S19)

Аналитические данные для искомого соединения были фактически такими же, как описано ранее (Ganesh *et al* (2014) *J. Amer. Chem. Soc.* 136, 16260-16269).

5'-Метоксикарбонилпентил-4-азидо-2,3-*O*-бензоил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1→2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1→2) 4-азидо-3-*O*-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозид (S20)

Соединение-гликозильный акцептор **S19** (0,2 г, 0,491 ммоль) и соединение-гликозильный донор **11** (0,414 г, 0,589 ммоль) объединяли, дважды подвергали азеотропной перегонке с безводным толуолом (5 мл) и помещали в атмосферу высокого вакуума на 2 часа. Затем смесь растворяли в CH₂Cl₂ (15 мл), обрабатывали свежеективированными 4 Å молекулярными ситами (1 г), перемешивали в атмосфере Ar при комнатной температуре в течение 1 часа. К смеси добавляли NIS (0,221 г, 0,982 ммоль). После охлаждения до -10°C добавляли TMSOTf (19,5 мкл, 0,108 ммоль) и реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры. Когда по результатам ТСХ было видно, что реакция завершилась, то добавляли насыщенный водный раствор NaHCO₃ (5

мл) и CH_2Cl_2 и полученную смесь пропускали через целит для удаления молекулярных сит. Объединенные фильтраты промывали водным раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (20%) и водой. После экстракции водного слоя посредством CH_2Cl_2 (3×5) объединенную органическую фазу сушили над Na_2SO_4 , концентрировали под вакуумом и очищали с помощью колоночной хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом - гексаном) с получением дисахарида **S20** (0,418 г, 81,3%) в виде клейкой жидкости. Аналитические данные для **S20**: $R_f = 0,7$ (этилацетат/гексан 1:4,5, об./об.); $[\alpha]_D^{21} = -14,49^\circ$ ($c = 1,79$, CHCl_3); ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3): δ 8,02-8,05 (m, 2 H, ArH), 7,95-7,97 (m, 2 H, ArH), 7,64-7,68 (m, 1 H, ArH), 7,50-7,57 (m, 3 H, ArH), 7,33-7,41 (m, 8 H, ArH), 7,22-7,26 (m, 3 H, ArH), 7,13-7,17 (m, 1 H, ArH), 5,71 (dd, $J=3,3$, 1,5 Гц, 1 H, H-2_C), 5,59 (dd, $J=10,3$, 3,3 Гц, 1 H, H-3_C), 5,06 (d, $J=1,8$ Гц, 1 H, H-1_B), 5,02 (d, $J=1,8$ Гц, 1 H, H-1_C), 4,76 (d, $J=11,7$ Гц, 1 H, CHPh), 4,62-4,69 (m, 4 H, 3 CHPh , H-1_A), 3,95 (dd, $J=2,2$, 0,7 Гц, 1 H, H-2_B), 3,90 (dd, $J=2,2$, 0,7 Гц, 1 H, H-2_A), 3,76-3,81 (m, 2 H, H-3_B, H-5_B), 3,74 (dd, $J=9,9$, 2,9 Гц, 1 H, H-3_A), 3,71 (s, 3 H), 3,69 (t, $J=9,9$ Гц, 1H, H-4_C), 3,55-3,65 (m, 3 H, H-4_B, H-5_C, $-\text{O}-\text{CH}_{2b}$), 3,43-3,49 (m, 1 H, H-5_A), 3,38 (dt, $J=9,7$, 6,4 Гц, 1 H, $-\text{O}-\text{CH}_{2a}$), 3,27 (t, $J=9,9$ Гц, 1 H, H-4_A), 2,33-2,39 (m, 2 H, $-\text{CH}_{2f}$), 1,64-1,72 (m, 2 H, $-\text{CH}_{2e}$), 1,56-1,64 (m, 2 H, $-\text{CH}_{2c}$), 1,35-1,42 (m, 2 H, $-\text{CH}_{2d}$), 1,38 (d, $J=5,6$ Гц, 3 H, H-6_C), 1,32 (d, $J=5,9$ Гц, 3 H, H-6_B), 1,29 (d, $J=5,9$ Гц, 3 H, H-6_A); ^{13}C ЯМР (126 МГц, CDCl_3): δ 174,0, 165,2, 164,9, 137,5, 137,3, 133,4, 133,3, 129,8(×2), 129,6, 129,3, 128,5(×2), 128,4, 128,2, 128,1(×2), 128,0, 100,3, 99,0, 98,8, 77,9, 73,9, 73,5, 72,3(×2), 70,9, 69,5, 68,0, 67,5, 67,2, 64,5, 63,9, 63,5, 51,5, 34,0, 29,1, 25,7, 24,7, 18,6(×2), 18,4 ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для $\text{C}_{53}\text{H}_{61}\text{N}_9\text{O}_{14}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1070,423, выявленное: 1070,4248.

5'-Метоксикарбонилпентил 4-азидо-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1→2) 4-азидо-3-O-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозил (1→2) 4-азидо-3-O-бензил-4,6-дидезокси- α -D-маннопиранозид (S21)

Метоксид натрия (~0,3 мл, 0,5 М раствор) добавляли в раствор **S20** (0,39 г, 0,372 ммоль) в CH_3OH : THF [4:2] (12 мл) до достижения pH ~9 и полученную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 6 часов при 21 С. После этого

реакционную смесь нейтрализовали ионообменной смолой Amberlite IR 120 (H⁺), смолу отфильтровывали и последовательно промывали посредством CH₃OH. Объединенный фильтрат концентрировали под вакуумом и очищали колоночной хроматографией на силикагеле (градиентное элюирование этилацетатом - гексаном) с получением искомого соединения **S21** (0,299 г, 95,6%) в виде белого твердого вещества. Аналитические данные для **S21**: $R_f = 0,3$ (этилацетат/гексан 1:1,5, об./об.); $[\alpha]_D^{21} = +84,18$ ($c = 1,55$, CHCl₃); ¹H ЯМР (500МГц, CDCl₃): δ 7,30-7,44 (m, 10 H, ArH), 5,00 (d, $J=1,8$ Гц, 1 H, H-1_B), 4,90 (d, $J=1,5$ Гц, 1 H, H-1_C), 4,72 (d, $J=11,4$ Гц, 1 H, CHPh), 4,61-4,67 (m, 4 H, , 3 CHPh, H-1_A), 3,93-3,97 (m, 2 H, H-2_B, H-2_C), 3,81-3,87 (m, 2 H, H-2_A, H-3_A), 3,76 (dd, $J=9,9$, 2,9 Гц, 1 H, H-3_B), 3,73 (dd, $J=10,0$, 2,9 Гц, 1 H, H-3_C), 3,70 (s, 3 H), 3,51-3,64 (m, 3 H, H-5_B, H-5_C, -O-CH₂b), 3,43-3,49 (m, 1 H, H-5_A), 3,40 (t, $J=9,9$ Гц, 1H, H-4_C), 3,36 (dt, $J=9,7$, 6,4 Гц, 1 H, -O-CH₂a), 3,27 (t, $J=9,9$ Гц, 1H, H-4_B), 3,40 (t, $J=10,2$ Гц, 1H, H-4_A), 2,49 (d, $J=6,9$ Гц, 1 OH_{3C},), 2,34 (t, $J=7,4$ Гц, 2 H, -CH₂f), 2,18 (d, $J=3,9$ Гц, 1 OH_{2C}), 1,63-1,70 (m, 2 H, -CH₂e), 1,54-1,61 (m, 2 H, -CH₂c), 1,33-1,40 (m, 2 H, -CH₂d), 1,30 (d, $J=6,2$ Гц, 6 H, H-6_B, H-6_C), 1,20 (d, $J=6,2$ Гц, 3 H, H-6_A); ¹³C ЯМР (126 МГц, CDCl₃): δ 174,0, 137,4(×2), 128,6(×2), 128,3, 128,2(×2), 128,1, 100,7, 100,4, 98,7, 77,7, 77,2, 77,2, 73,8, 73,2, 72,3, 72,2, 70,2, 69,9, 67,8, 67,5, 67,4, 67,1, 65,8, 64,4, 64,2, 51,6, 33,9, 29,1, 25,7, 24,7, 18,6(×2), 18,2 ppm; HRMS (ESI): m/z , расчетное для C₃₉H₅₃N₉O₁₂Na [M+Na]⁺: 862,3706, выявленное: 862,3705.

5'-Метоксикарбонилпентил-4,6-дидезокси-4-формамино- α -D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формамино- α -D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формамино- α -D-маннопиранозид (4)

Перемешиваемый раствор **S21** (0,2 г, 0,239 ммоль) в смеси пиридина (5 мл) и воды (2 мл) барботировали посредством H₂S в течение 0,5 часа при 40 С и продолжали перемешивание в течение 16 часов. После этого аргоном барботировали в течение 10 минут, растворители удаляли под вакуумом и остаток выпаривали совместно с толуолом (3×10 мл) и сушили. Масс-спектрометрический анализ демонстрировал завершение реакции с получением

соответствующего соединения амина, и никаких других продуктов, возникающих в результате неполного восстановления, не было.

Этот неочищенный материал непосредственно использовали для формилирования. К соединению амина в CH_3OH (5 мл) при $-20\text{ }^\circ\text{C}$ добавляли свежеприготовленный муравьиный ангидрид (5 мл, эфирный раствор) и перемешивали в течение 3 ч, затем медленно давали нагреться до $21\text{ }^\circ\text{C}$. После этого растворители выпаривали и остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (градиентное элюирование метанолом – дихлорметаном) с получением трисахарида. Масс-спектрометрический анализ высокого разрешения демонстрировал завершение реакции формилирования. HRMS (ESI): m/z , расчетное для $\text{C}_{42}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 868,3838, выявленное: 868,3837.

Формилированное соединение растворяли в $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (2:1, 15 мл), добавляли $\text{Pd}(\text{OH})_2$ на угле (20%, 0,090 г). Затем его перемешивали под давлением газообразного водорода при $21\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 16 часов. После фильтрации через целитную подушку промывали посредством CH_3OH (3×10 мл) и удаляли растворители под вакуумом. Остаток очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке C18 в градиенте воды - ацетонитрила и лиофилизировали с получением искомого соединения **4** (0,094 г, 59,3%, за 3 стадии) в виде белой пены. Аналитические данные для **4**: $[\alpha]_D^{21} = +31,58$ ($c = 1,16$, H_2O); ^1H ЯМР (700 МГц, D_2O): δ 8,20-8,24 (Z) и 8,03-8,06 07 (E) (m, 3H, NCH $\underline{\text{O}}$), 5,16-5,22 (m, 1 H, H-1 $\underline{\text{B}}$), 5,05-5,08 (m, 1 H, H-1 $\underline{\text{C}}$), 4,89-4,93 (m, 1 H, H-1 $\underline{\text{A}}$), 4,13-4,19 (m, 1 H, H-2 $\underline{\text{B}}$), 4,06-4,13 (m, 2 H, H-2 $\underline{\text{C}}$, H-3 $\underline{\text{C}}$), 3,92-4,03 (m, 6 H, H-2 $\underline{\text{A}}$, H-3 $\underline{\text{A}}$, H-3 $\underline{\text{B}}$, H-4 $\underline{\text{C}}$, H-4 $\underline{\text{B}}$, H-4 $\underline{\text{A}}$), 3,87-3,92 (m, 2 H, H-5 $\underline{\text{A}}$, H-5 $\underline{\text{C}}$), 3,80-3,84 (m, 1 H, H-5 $\underline{\text{B}}$), 3,71-3,75 (m, 1 H, -O-CH $\underline{2b}$), 3,71 (s, 3 H), 3,56 (dt, $J=9,9$, 5,9 Гц, 1 H, -O-CH $\underline{2a}$), 2,42 (t, $J=7,4$ Гц, 2 H, -CH $\underline{2f}$), 1,60-1,68 (m, 4 H, -CH $\underline{2e}$, -CH $\underline{2c}$), 1,40 (dq, $J=14,8$, 7,3 Гц, 2 H, -CH $\underline{2d}$), 1,20-1,30 (m, 9 H, 3 \times H-6); ^{13}C ЯМР (176 МГц, D_2O): δ 178,4, 168,6($\times 2$), 165,7, 165,7($\times 2$), 102,9, 102,8, 101,5, 99,1, 78,5, 78,4, 78,2, 78,1, 78,0, 69,8, 69,1, 68,8, 68,7($\times 2$), 68,6, 68,5($\times 2$), 68,3($\times 2$), 67,9, 57,8, 52,9, 52,8, 52,7($\times 2$), 52,5, 34,4($\times 2$),

28,9, 25,7, 24,8, 17,8(×2), 17,7(×2), 17,6, 17,5(×2) ppm. HRMS (ESI): m/z, расчетное для C₂₈H₄₇N₃O₁₅Na [M+Na]⁺: 688,2899, выявленное: 688,2908.

(2'-Аминоэтиламино)карбонилпентил-4,6-дидезокси-4-формамино-α-D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формамино-α-D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формамино-α-D-маннопиранозид (S24)

Раствор **4** (0,06 г, 0,09 ммоль) в свежеперегнанном 1,2-диаминоэтаноле (3,0 мл) перемешивали при 65°C в течение 48 часов. После этого избыток реагента удаляли под вакуумом, а остаток совместно выпаривали с CH₃OH (3×10 мл) и сушили. Остаток очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке C18 в градиенте воды - ацетонитрила и лиофилизировали с получением искомого соединения **S24** (0,052 г, 83,15%) в виде белой пены. Аналитические данные для **S24**: [α]_D²¹ = +37,05 (c = 1,14, H₂O); ¹H ЯМР (500 МГц, D₂O): δ 8,24-8,33 (Z) и 8,05-8,12 (E) (m, 3H, NCH=O), 5,23-5,26 (m, 1 H, H-1_B), 5,12 (s, 1 H, H-1_C), 4,93-4,97 (m, 1 H, H-1_A), 4,19-4,24 (m, 1 H, H-2_B), 4,10-4,18 (m, 2 H, H-2_C, H-3_C), 3,96-4,08 (m, 6 H, H-2_A, H-3_A, H-3_B, H-4_C, H-4_B, H-4_A), 3,91-3,96 (m, 2 H, H-5_A, H-5_C), 3,84-3,89 (m, 1 H, H-5_B), 3,77 (dt, J=9,7, 6,8 Гц, 1 H, -O-CH_{2b}), 3,57-3,63 (m, 1 H, , -O-CH_{2a}), 3,33 (t, J=6,2 Гц, 2 H, -CH_{2g}), 2,82 (t, J=6,2 Гц, 2 H, -CH_{2h}), 2,33 (t, J=7,4 Гц, 2 H, -CH_{2f}), 1,64-1,74 (m, 4 H, -CH_{2e}, -CH_{2c}), 1,39-1,49 (m, 2 H, -CH_{2d}), 1,25-1,35 (m, 9 H, 3×H-6); ¹³C ЯМР (126 МГц, D₂O): δ 178,3, 168,8(×2), 165,8(×2), 103,0, 102,9, 101,6, 99,3, 78,6, 78,3, 78,2, 78,1, 69,9, 69,2, 69,0, 68,9, 68,8(×2), 68,6(×2), 68,5, 68,4, 57,7, 53,0, 52,8(×2), 52,7, 42,1, 42,1, 40,7, 36,7, 29,1, 26,0, 25,9, 17,9(×2), 17,8(×2), 17,7(×2), 17,6 ppm; HRMS (ESI): m/z, расчетное для C₂₉H₅₁N₅O₁₄Na [M+Na]⁺: 716,3325, выявленное: 716,333.

1-[(2'-Аминоэтиламино)карбонилпентил-4,6-дидезокси-4-формамино-α-D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формамино-α-D-маннопиранозил (1→2) 4,6-дидезокси-4-формамино-α-D-маннопиранозид]-2-бутоксциклобутен-3,4-дион (S25)

К перемешиваемому раствору **S24** (0,015 г, 0,022 ммоль) в воде (0,5 мл) и EtOH (0,5 мл) добавляли раствор 3,4-дибутоксциклобутен-1,2-диона (20% в

этаноле, 70 мкл) и pH доводили до 8 осторожным добавлением водного раствора NaHCO_3 (1%). Спустя 1 час масс-спектрометрия демонстрировала, что реакция завершилась; реакцию смесь нейтрализовали с помощью CH_3COOH (10%) и концентрировали под вакуумом. Остаток очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке C18 в градиенте воды - ацетонитрила и лиофилизировали с получением искомого соединения **S25** (0,0133 г, 73,2%) в виде белой пены. Аналитические данные для **S25**: ^1H ЯМР (700 МГц, D_2O): δ 8,21-8,23 (Z) и 8,05 (E) (m, 3H, NCHO), 5,19 (s, 1 H, H-1_B), 5,07 (s, 1 H, H-1_C), 4,90-4,92 (m, 1 H, H-1_A), 4,68-4,75 (m, 2 H, $-\text{CH}_{2i}$), 4,14-4,19 (m, 1 H, H-2_B), 4,07-4,13 (m, 2 H, H-2_C, H-3_C), 3,92-4,02 (m, 6 H, H-2_A, H-3_A, H-3_B, H-4_C, H-4_B, H-4_A), 3,89 (m, 2 H, H-5_A, H-5_C), 3,79-3,85 (m, 1 H, H-5_B), 3,73 (t, $J=5,0$ Гц, 1 H, $-\text{CH}_{2g}$), 3,65-3,71 (m, 1 H, $-\text{O}-\text{CH}_{2b}$), 3,62 (t, $J=5,0$ Гц, 1 H, $-\text{CH}_{2g}$), 3,51 (dd, $J=9,6, 6,5$ Гц, 1 H, $-\text{O}-\text{CH}_{2a}$), 3,40-3,45 (m, 2 H, $-\text{CH}_{2h}$), 2,19-2,27 (m, 2 H, $-\text{CH}_{2f}$), 1,77-1,84 (m, 2 H, $-\text{CH}_{2j}$), 1,51-1,64 (m, 4 H, $-\text{CH}_{2e}$, $-\text{CH}_{2c}$), 1,46 (dt, $J=15,5, 7,9$ Гц, 2 H, $-\text{CH}_{2k}$), 1,30-1,36 (m, 2 H, $-\text{CH}_{2d}$), 1,20-1,30 (m, 9 H, $3\times\text{H-6}$), 0,94-0,98 (m, 3 H, $-\text{CH}_{2l}$); ^{13}C ЯМР (176 МГц, D_2O): δ 189,7, 184,1, 178,4, 177,8, 174,5, 168,6, 165,7, 165,7, 102,8, 101,5, 99,1, 98,9, 78,4, 78,1, 75,2, 75,1, 69,8, 69,1, 68,8, 68,7, 68,6, 68,4, 68,3($\times 2$), 57,8, 52,9, 52,7, 52,5, 45,0, 44,9, 40,2, 40,0, 36,6, 32,3, 29,1, 26,0, 25,9, 25,8, 25,7, 19,0, 18,9, 17,8($\times 2$), 17,7($\times 2$), 17,6, 17,5, 13,8 ppm; HRMS (ESI): m/z, расчетное для $\text{C}_{37}\text{H}_{59}\text{N}_5\text{O}_{17}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 868,3798, выявленное: 868,3808.

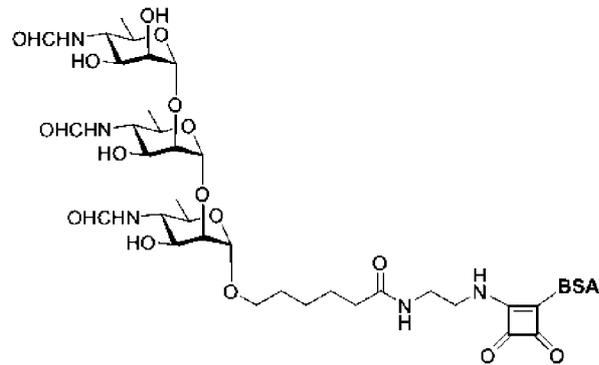
Получение конъюгата **5** с BSA: BSA (15 мг) и скварат трисахарида **S25** (3,8 мг, 6,77 мкмоль) растворяли в 0,1 М PBS-буфере, pH 9 (600 мкл), и медленно перемешивали при 21 С в течение 3 дней. Затем реакцию смесь разводили водой Milli-Q, фильтровали через трубку для ультратонкой фильтрации (10000 MWCO, 4×10 мл), лиофилизировали и получали конъюгат **5** с BSA в виде белой пены (17,6 мг). Масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF демонстрировал, что конъюгат **5** имел в среднем 16,2 дисахарида на молекулу BSA.

Формула изобретения

1. Диагностический конъюгат, содержащий трисахарид, состоящий из трех звеньев из 4,6-дидезокси-4-ациламидо- α -пиранозы и содержащий только C₁-C₂-связи, и/или содержащий дисахарид, состоящий из двух звеньев из 4,6-дидезокси-4-ациламидо- α -пиранозы, соединенных C₁-C₂-связью, и/или моносахарид, состоящий из одного звена из 4,6-дидезокси-4-ациламидо- α -пиранозы, при этом трисахарид, и/или дисахарид, и/или моносахарид соединен с несахаридным носителем через восстанавливающий конец.

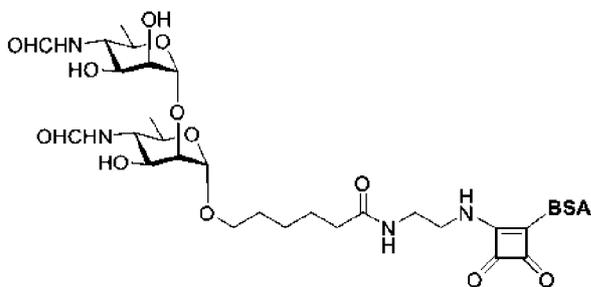
2. Диагностический конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что любая 4,6-дидезокси-4-ациламидо- α -пираноза может представлять собой 4,6-дидезокси-4-формамидо- α -пиранозу, например, 4,6-дидезокси-4-формамидо- α -D-маннопиранозу.

3. Диагностический конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что трисахарид

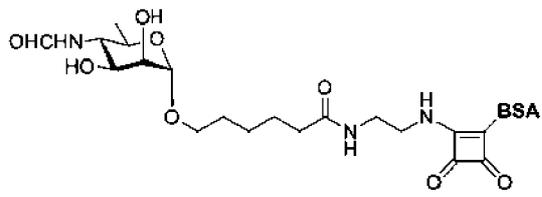


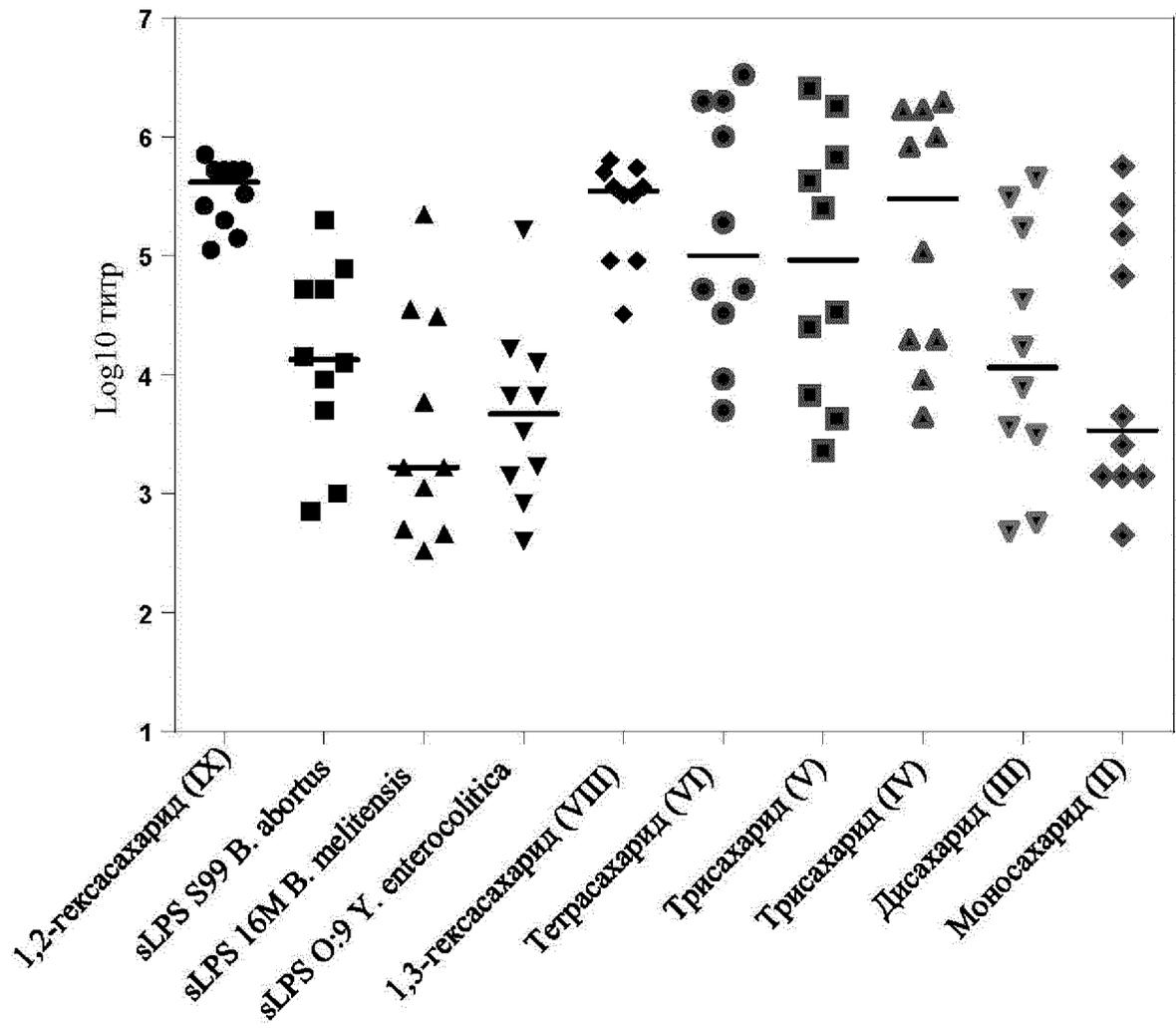
представляет собой структуру XII

и/или дисахарид представляет собой структуру XI

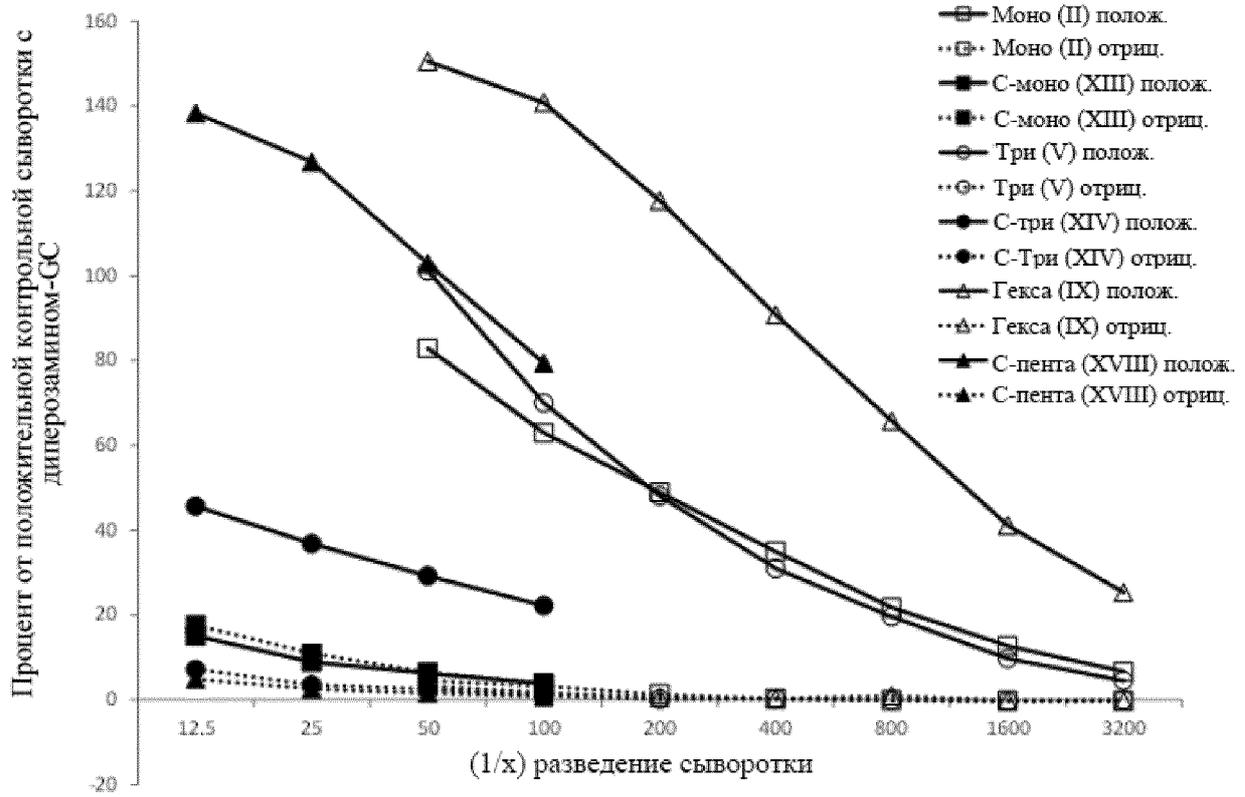


и/или моносахарид представляет собой структуру II

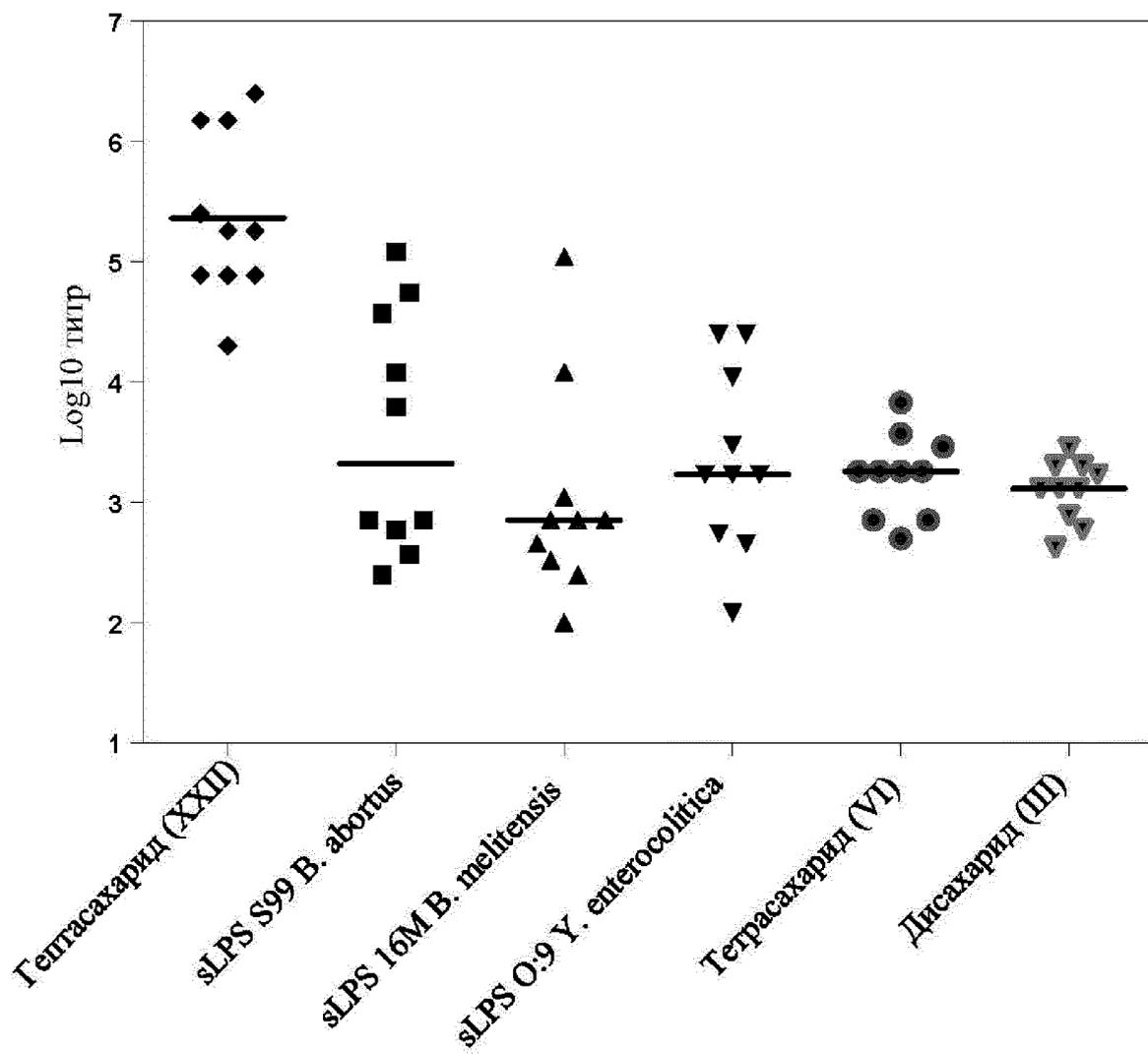




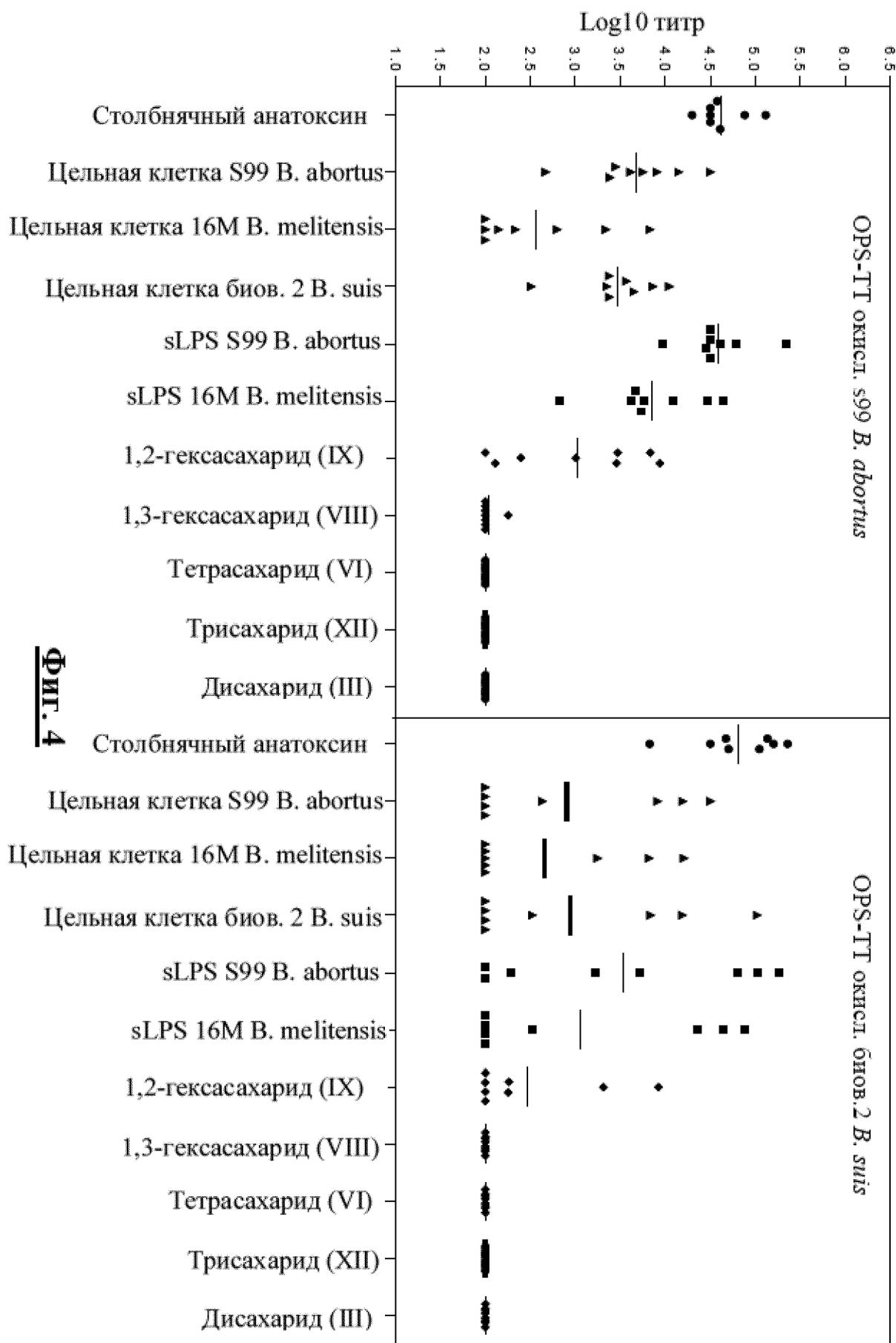
Фиг. 1



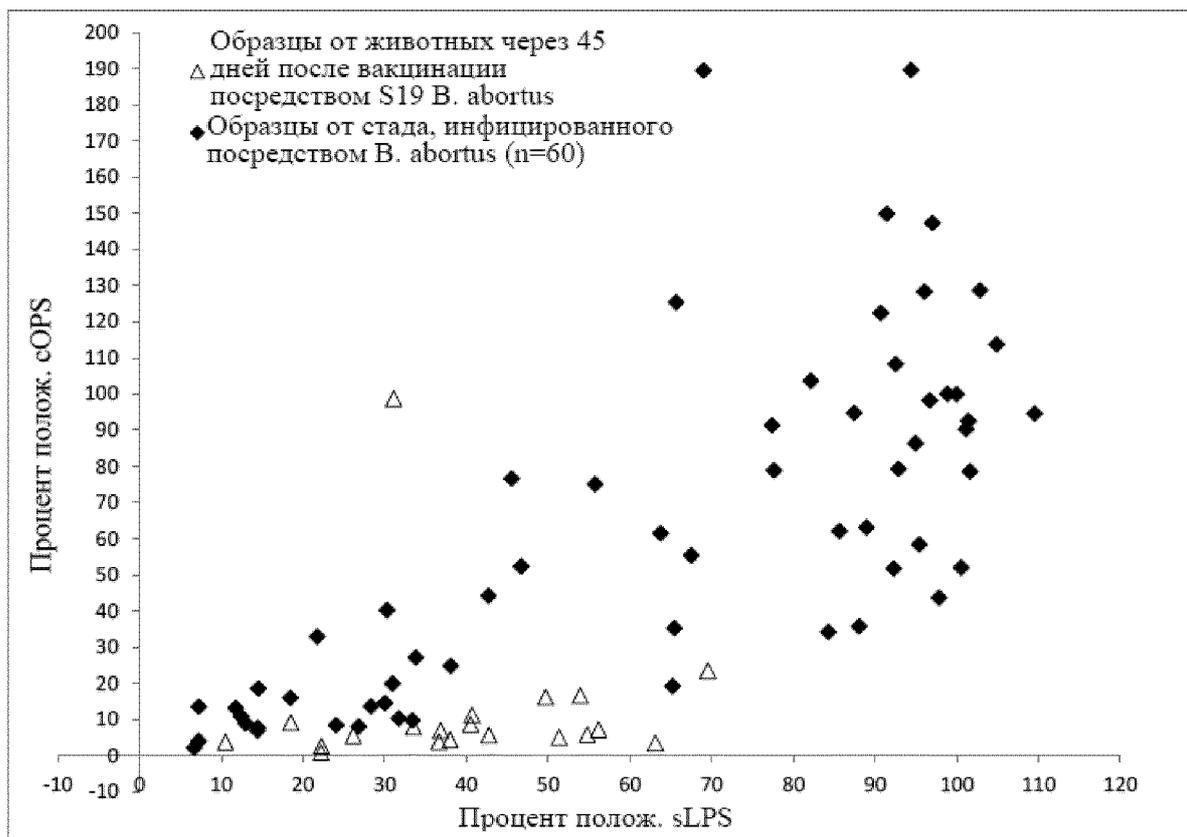
Фиг. 2

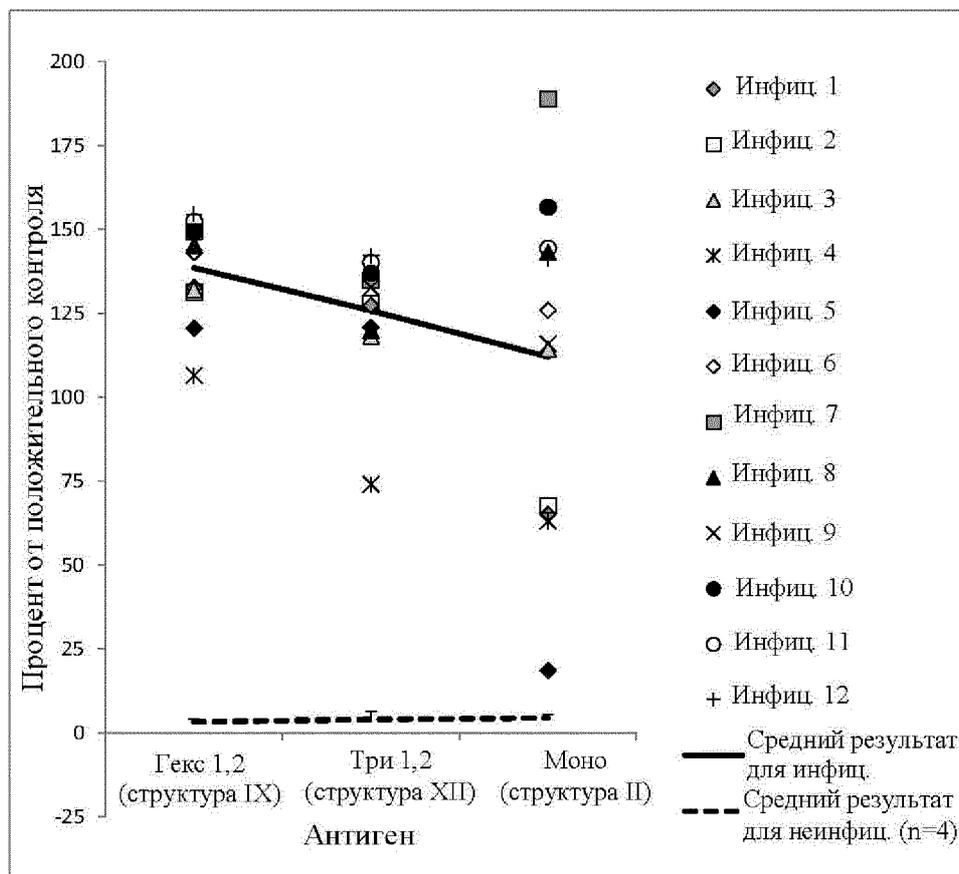


Фиг. 3

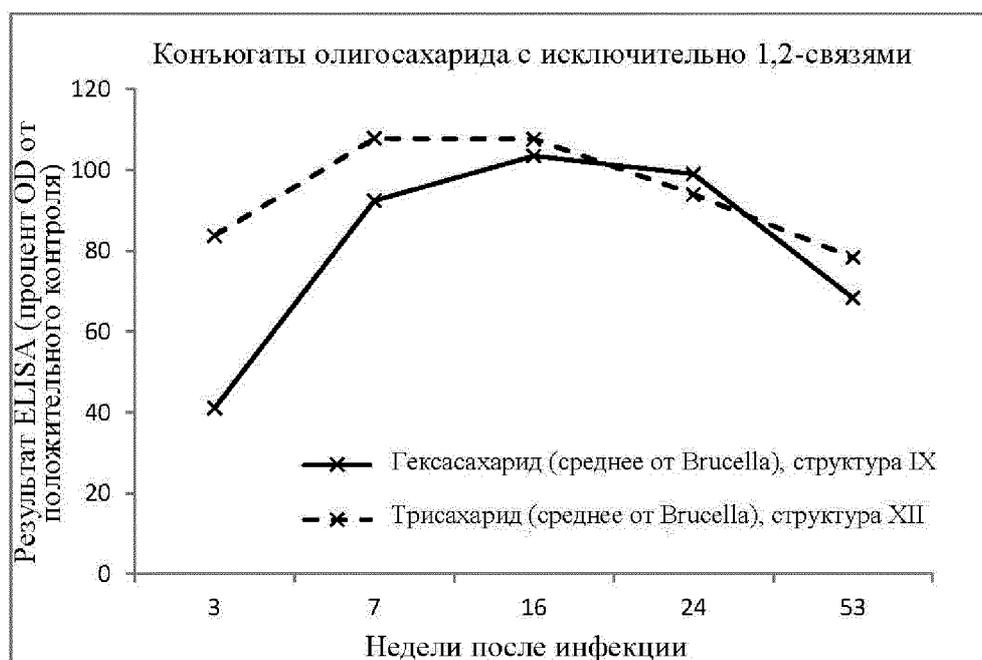


Фиг. 4

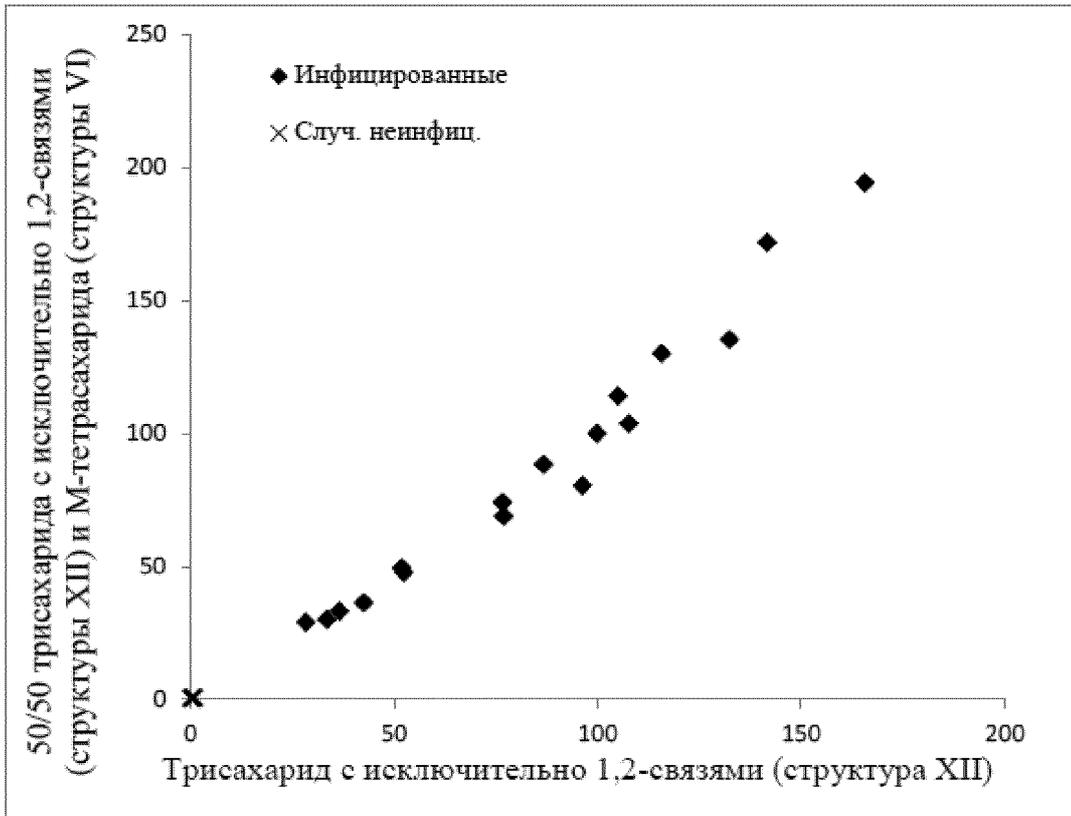
**Фиг. 5**



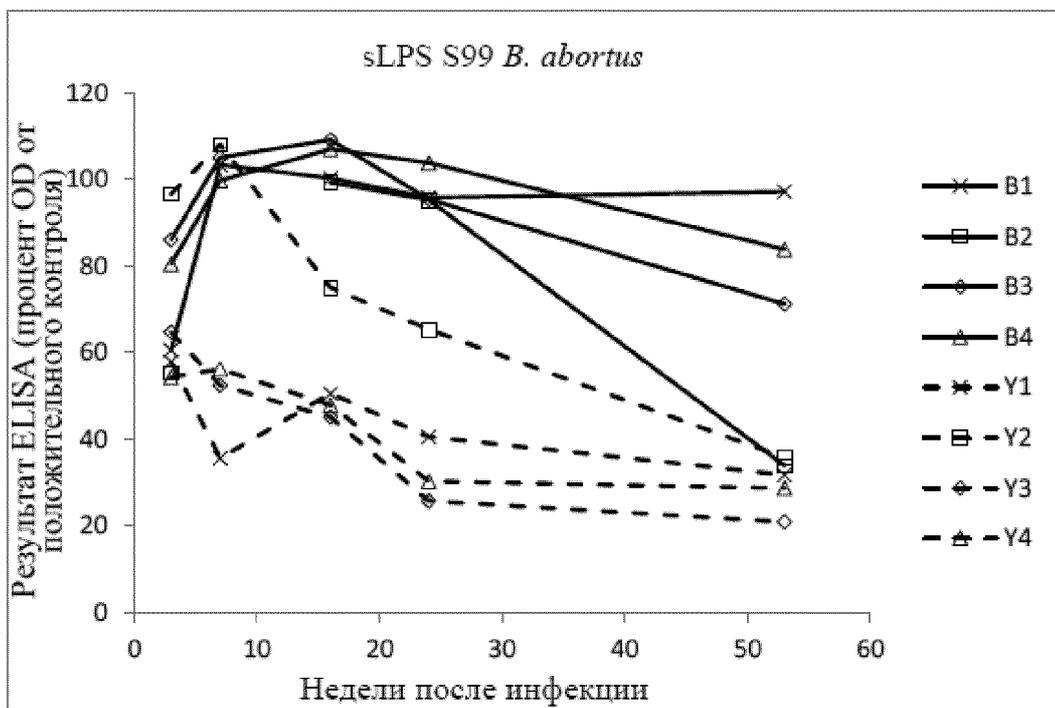
Фиг. 6



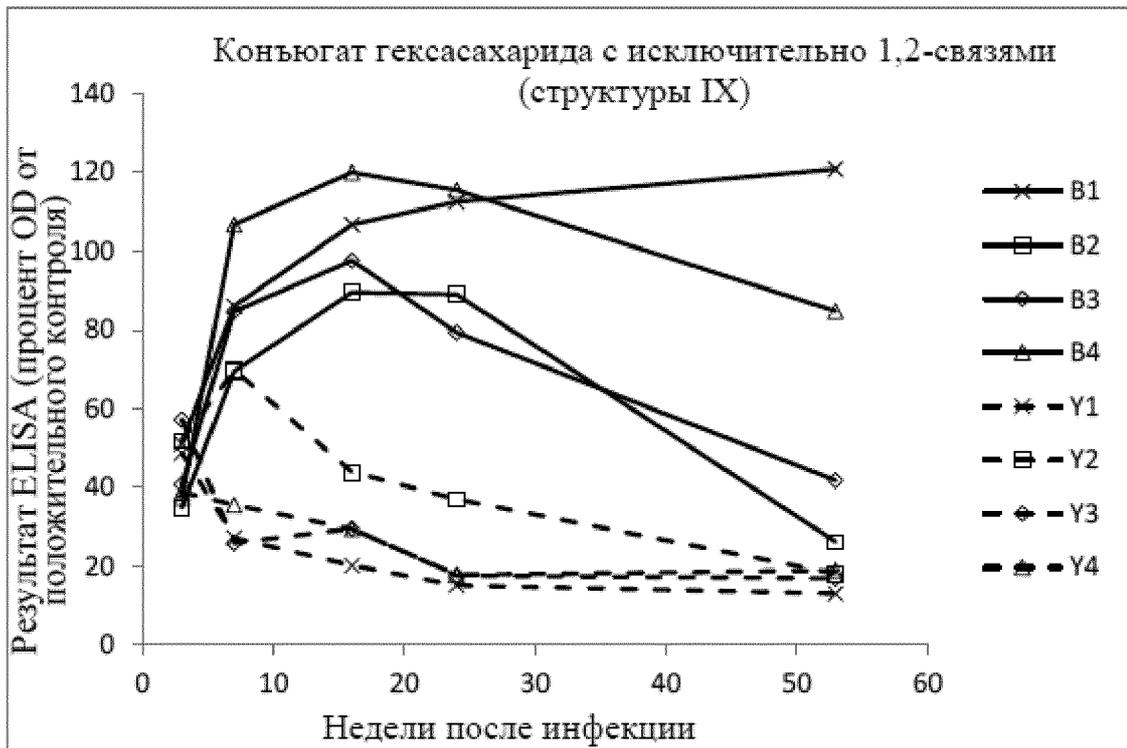
Фиг. 7



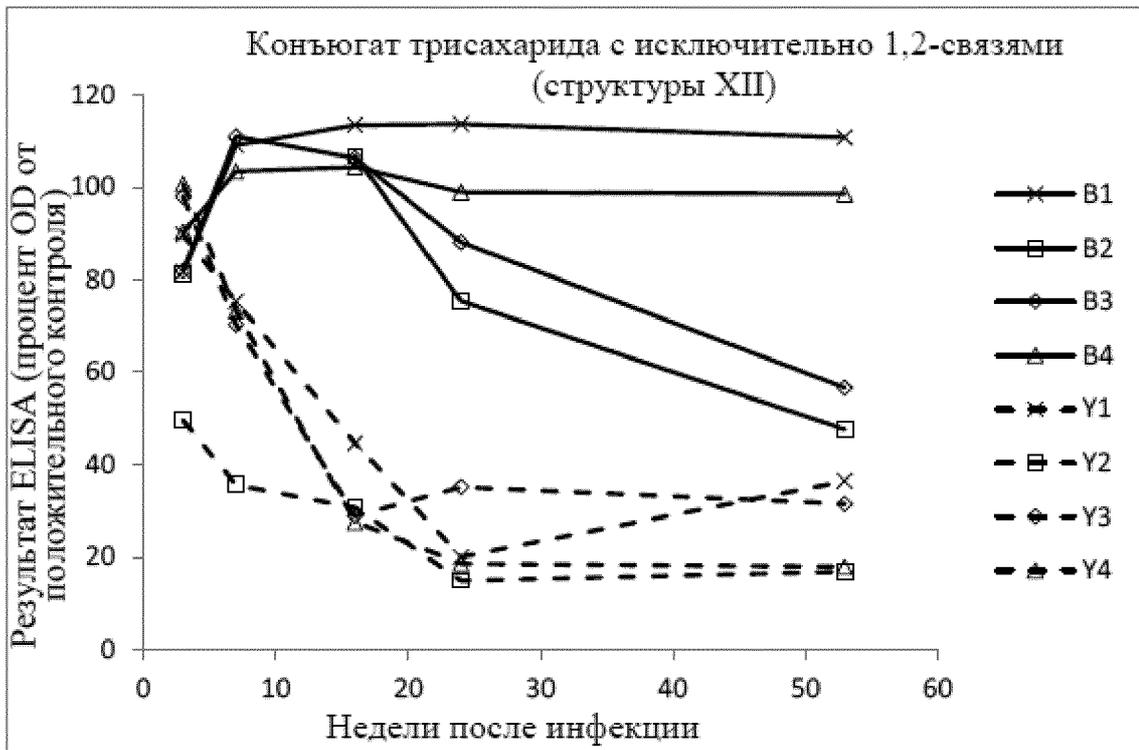
Фиг. 8



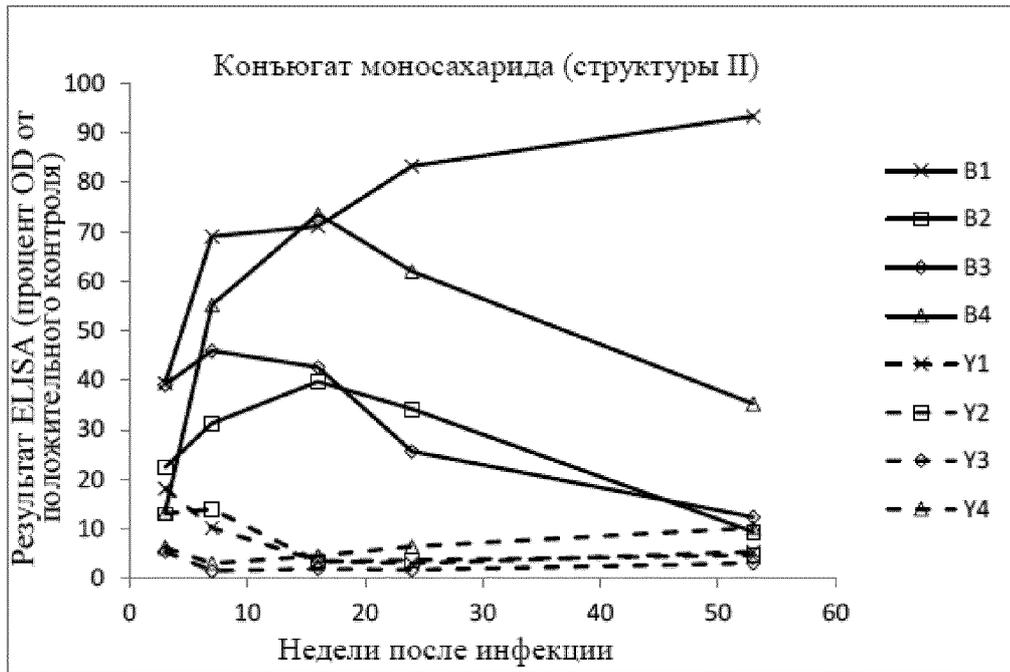
Фиг. 9



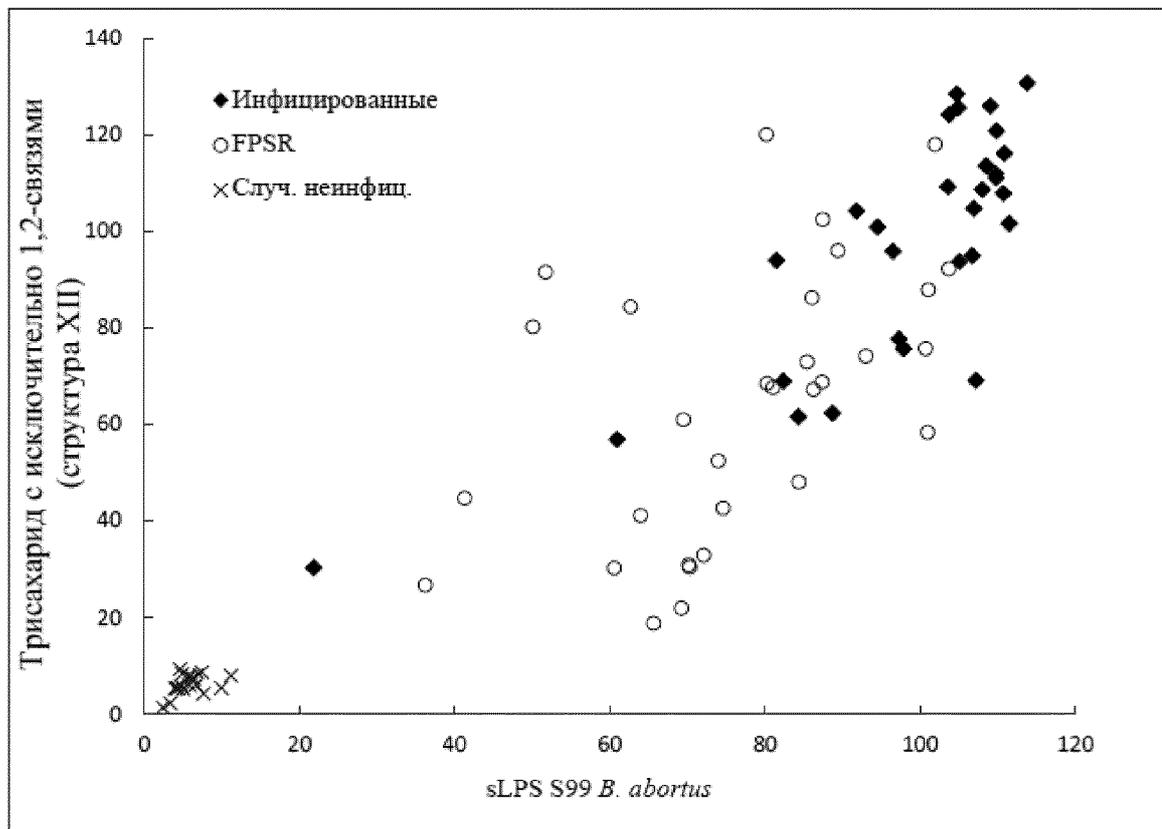
Фиг. 10



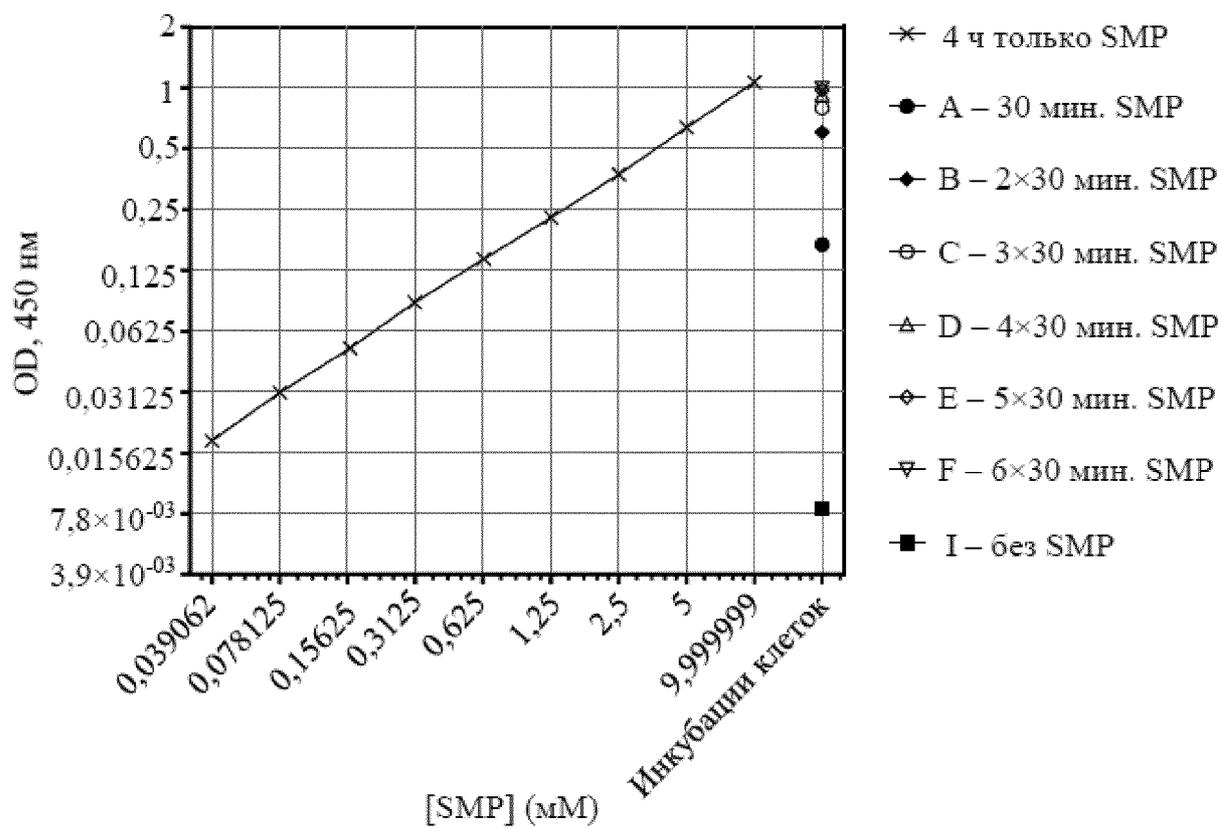
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

**Фиг. 16**