

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390345 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.19

(22) Дата подачи заявки
2021.08.23

(51) Int. Cl. A61K 39/095 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C07K 14/22 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) ПЯТИВАЛЕНТНАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ NEISSERIA MENINGITIDIS, СОДЕРЖАЩАЯ
СИНТЕТИЧЕСКИЙ АНТИГЕН MEN A

(31) 2013262.7

(32) 2020.08.25

(33) GB

(86) PCT/EP2021/073217

(87) WO 2022/043238 2022.03.03

(71) Заявитель:
ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛС СА (BE)

(72) Изобретатель:

Адамо Роберто, Романо Мария
Розария, Тонтини Марта (IT)

(74) Представитель:

Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Дмитриев
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.
(RU)

(57) Изобретением предложена комбинированная вакцина для иммунизации против бактериального менингита, вызванного несколькими патогенами.

A1

202390345

202390345

A1

РСТ/ЕР2021/073217

МПК *A61K 39/095* (2006.01) *C07K 14/22* (2006.01)*A61P 31/04* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)

**ПЯТИВАЛЕНТНАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ NEISSERIA MENINGITIDIS,
СОДЕРЖАЩАЯ СИНТЕТИЧЕСКИЙ АНТИГЕН MEN A**

Все документы, цитируемые в настоящей заявке, полностью включены в нее посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к иммунизации против бактериального менингита и, в частности, к комбинированной вакцине для иммунизации против бактериального менингита, вызванного несколькими патогенами.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Neisseria meningitidis является основной причиной бактериального менингита и сепсиса во всем мире, способной вызывать вспышки и эпидемии инвазивного заболевания. Инвазивное менингококковое заболевание встречается во всем мире. Хотя частота случаев различна в разных регионах мира, младенцы, дети и подростки наиболее подвержены развитию инвазивного заболевания. Симптомы заболевания быстро прогрессируют и часто приводят к тяжелым исходам. На основании антигенных различий капсульного полисахарида было выявлено 12 серогрупп *N. meningitidis*. Практически все связанные с заболеванием изоляты являются инкапсулированными, при этом серогруппы А, В, С, W, X и Y являются причиной более 90% инвазивных менингококковых инфекций во всем мире. Распределение этих серогрупп различно в зависимости от территории и времени.

Менингит В является серьезным и часто смертельным заболеванием, поражающим в основном младенцев и молодых людей. Его легко можно неверно диагностировать, он может привести к летальному исходу в течение 24 часов после начала заболевания и вызвать серьезные пожизненные нарушения здоровья, несмотря на проводимое лечение.

В настоящее время существуют две разрешенные к применению вакцины, разработанные для иммунизации против менингококка серогруппы В: Бексеро (BEXSERO) от GSK и Труменба (TRUMENBA) от Pfizer.

Бексеро (также известный как C4MenB) содержит препарат везикул наружной мембраны (OMV) из эпидемического штамма менингококка группы NZ98/254 совместно с пятью менингококковыми антигенами: нейссерияльный гепаринсвязывающий белок А (NHBA), связывающий фактор Н белок (fHbp), вариант 1.1, нейссерияльный адгезивный белок А (NadA) и вспомогательные белки GNA1030 и GNA2091. Четыре из этих антигенов представлены в виде слитых белков (слитый белок NHBA-GNA1030 и слитый белок GNA2091-fHbp). Бексеро (BEXSERO®) описан в литературе (например, см. Bai *et al.* (2011) *Expert Opin Biol Ther.* 11:969-85, Su & Snape (2011) *Expert Rev Vaccines* 10:575-88).

Труменба (TRUMENBA®) содержит два липидированных антигена fHbp MenB (v1.55 и v3.45), адсорбированных на фосфате алюминия.

fHbp (также взаимозаменяемо называемый в данной области техники геномным антигеном *Neisseria* (GNA) 1870, LP2086 и белком «741») связывается с фактором Н человека (hfH), который представляет собой крупный (180 кДа) мультидоменный растворимый гликопротеин, состоящий из 20 модулей белка контроля комплемента (ССР), соединенных короткими линкерными последовательностями. hfH циркулирует в плазме человека и регулирует альтернативный путь активации системы комплемента. Функциональное связывание fHbp с hfH зависит преимущественно от модулей (или доменов) ССР 6-7 hfH и повышает способность бактерии сопротивляться опосредованному комплементом уничтожению. Таким образом, экспрессия fHbp обеспечивает выживание в крови и сыворотке человека *ex vivo*.

Поскольку были предложены различные схемы классификации fHbp, существует специальная база данных с унифицированной номенклатурой fHbp для включения новых субвариантов: HyperText Transfer Protocol (протокол гипертекстовой передачи) (<http://neisseria.org/nm/typing/fhbp> (также HyperText Transfer Protocol (<https://pubmlst.org/neisseria/fHbp/>)).

fHbp классифицируют с выделением трех (основных) вариантов 1, 2 и 3, которые далее подразделяют на суб/варианты fHbp-1.x, fHbp-2.x и fHbp-3.x, где x обозначает конкретный суб/вариант пептида. В другой схеме классификации суб/варианты объединены в подсемейство А (соответствующее вариантам 2 и 3) и подсемейство В (соответствующее варианту 1) на основе различия последовательностей.

Согласно прогнозам, Бексеро обеспечит широкий охват штаммов MenB, циркулирующих по всему миру (Medini D *et al.*, *Vaccine* 2015; 33:2629–2636; Vogel U *et*

al. Lancet Infect Dis 2013;13:416–425; Křížová *et al.*, *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2014; 63:103–106; Tzanakaki G *et al. BMC Microbiol* 2014;14:111; Wasko I *et al. Vaccine* 2016;34:510–515; 6. Simões MJ *et al. PLoS ONE* 12(5): e0176177; and Parikh SR *et al. Lancet Infect Dis* 2017; 17:754–62). Кроме того, после введения Бексеро в национальную программу иммунизации младенцев Великобритании в сентябре 2015 г. полученные за 10 месяцев данные показали эффективность вакцины, составляющую 83%, в отношении всех штаммов MenB после введения двух доз (Parikh SR *et al.*, *Lancet* 2016; 388:2775–82).

Несмотря на то, что бактерицидная активность является специфичной в зависимости от варианта; антитела, вырабатываемые против одного варианта, не обязательно обеспечивают перекрестную защиту от других вариантов, хотя была описана некоторая перекрестная реактивность между fHbp v2 и v3 (Maignani V *et al.*, *J Exp Med* 2003; 197:789–799). Антитела, вырабатываемые против суб/варианта fHbpv1.1, входящего в состав вакцины Бексеро, обладают высокой перекрестной реактивностью в отношении fHbp v1 и низкой перекрестной реактивностью в отношении fHbp v2 и v3 (Brunelli B *et al.*, *Vaccine* 2011; 29:1072–1081).

Таким образом, несмотря на эффективность разрешенных к применению вакцин против менингококка серогруппы B, таких как Бексеро, остается потребность в разработке вакцин с расширенным охватом штаммов MenB и улучшенной иммуногенностью без ущерба для сильных сторон, например, Бексеро.

В WO2020/030782 описано, как можно улучшить охват штаммов и иммуногенность вакцины против MenB путем включения дополнительных вариантов fHbp в иммуногенную композицию совместно с антигенами Бексеро. В частности, в WO2020/030782 раскрыта иммуногенная композиция, содержащая слитый белок fHbp, содержащий модифицированные полипептиды fHbp v2, v3 и v1.13 или v1.15.

Подходы к иммунизации с применением вакцин против серогрупп A, C, W и Y, как правило, направлены на капсульные полисахариды (CPS) *Neisseria meningitidis*. В целом CPS являются независимыми от Т-клеток антигенами, что означает, что они могут вызывать иммунный ответ без участия Т-клеток. Этот ответ лишен нескольких важных свойств, которые характеризуют Т-клеточно-зависимый иммунный ответ, таких как иммунологическая память, переключение класса иммуноглобулинов с IgM на IgG и созревание аффинности. Однако, если полисахаридная часть связана с белком-носителем, она запускает клеточный иммунный ответ, который создает эффект памяти, а также обеспечивает защиту у детей раннего возраста. Такие полисахариды, связанные

с белком-носителем, часто называют гликоконъюгатами, и они особенно полезны для применения в качестве вакцин. В этом аспекте особенно эффективные вакцины (гликоконъюгатные вакцины) могут быть получены путем ковалентного присоединения сахара к белку-носителю через линкерный фрагмент (или спейсер) или даже путем прямого связывания сахара с выбранным белком-носителем. В любом случае гликоконъюгаты могут индуцировать Т-клеточно-зависимый иммунный ответ, включающий память, а также обеспечивать эффект у детей раннего возраста, тогда как неконъюгированный CPS обычно не обеспечивает ни эффекта памяти у взрослых, ни какого-либо существенного иммуногенного эффекта у младенцев.

Имеющиеся в настоящее время вакцины против серогруппы С (Менюгейт (MENJUGATE) [Costantino *et al.* (1992) *Vaccine* 10:691-698, Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49], MENINGITEC и NEISVAC-C) содержат конъюгированные сахара. Менюгейт (MENJUGATE) и MENINGITEC содержат олигосахаридные антигены, конъюгированные с носителем CRM₁₉₇, тогда как в NEISVAC-C используют полный полисахарид (де-О-ацетилированный), конъюгированный с носителем - столбнячным анатоксином.

Все вакцинные продукты, реализуемые под торговыми наименованиями Менвео (MENVEO), Менактра (MENACTRA) и Нименрикс (NIMENRIX), содержат конъюгированные капсульные сахаридные антигены каждой из серогрупп Y, W135, C и A.

В Менвео (также в общем случае известном как менингококковая (группы A, C, Y и W-135) олигосахаридная конъюгированная с дифтерийным белком CRM₁₉₇ вакцина) каждый из антигенов A, C, W135 и Y конъюгирован с носителем CRM₁₉₇.

В Менактре (MENACTRA) (также в общем случае известной как менингококковая (группы A, C, Y и W-135) полисахаридная конъюгированная с дифтерийным анатоксином вакцина) каждый из антигенов A, C, W135 и Y конъюгирован с носителем - дифтерийным анатоксином.

В Нименриксе (также в общем случае известном как конъюгированная вакцина, содержащая менингококковые полисахариды групп A, C, W-135 и Y) каждый из антигенов A, C, W135 и Y конъюгирован с носителем - столбнячным анатоксином.

Известно, что среди капсульных полисахаридов *N. meningitidis* капсульный полисахарид *N. meningitidis* серогруппы A (CPS MenA) подвержен обусловленной его природой химической нестабильности в воде (см., например, Frasci *et al.* *Adv. Biotechnol.*

Processes, 1990, 12, 123-145). Вследствие нестабильности антигены серогруппы А обеспечивают в твердой лиофилизированной форме. Следовательно, вакцины, содержащие антигены серогруппы А, такие как Менвео, в настоящее время должны поставляться в 2 флаконах, которые объединяют (растворяют), после чего осуществляют введение. Компонент MenCYW-135 конъюгированной вакцины представлен в виде жидкости, которую применяют для растворения лиофилизированного компонента MenA конъюгированной вакцины с получением готового вакцинного продукта непосредственно перед введением. Однако такая форма выпуска вакцинного продукта неудобна, и наиболее предпочтительным является полностью жидкий единый состав.

Кроме того, было бы предпочтительным обеспечить полностью жидкую композицию пентавалентной вакцины, обеспечивающую иммунную защиту от инфекции каждой из серогрупп А, В, С, W135 и Y *N. meningitidis*.

CPS MenA состоит из (1→6)-связанных повторяющихся звеньев 2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-маннопиранозилфосфата, и гидролитическая нестабильность полисахарида MenA в основном связана с атомом кислорода кольца и стимулируемым N-ацетамидом гидролизом фосфодиэфирной связи. Фактически было замечено, что как атом кислорода в кольце, так и N-ацетильная группа (NHAc) дестабилизируют фосфодиэфирную гликозидную связь, и аксиальное положение NHAc также способствует этому механизму, как показано на представленной ниже схеме А (Berti et al. Vaccine, 2012, 30, 6409-6415):

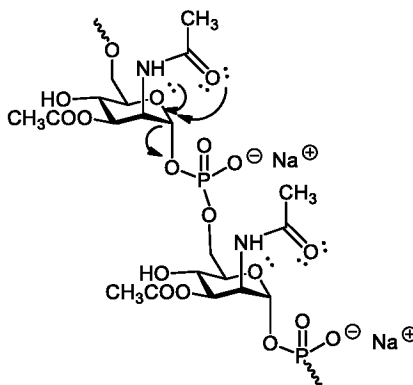


Схема А

Доступность устойчивых к гидролизу миметиков полисахарида MenA является привлекательной с точки зрения разработки более стабильных конъюгированных вакцин. Стабилизация CPS может быть достигнута различными способами, и в уровне техники сообщалось об аналогах CPS MenA, в которых атом кислорода в кольце заменен на метиленовую группу. В частности, в этом аспекте, когда атом кислорода в кольце

заменен на атом углерода, это предупреждает дестабилизацию, представленную на схеме А, показанным на схеме В образом:

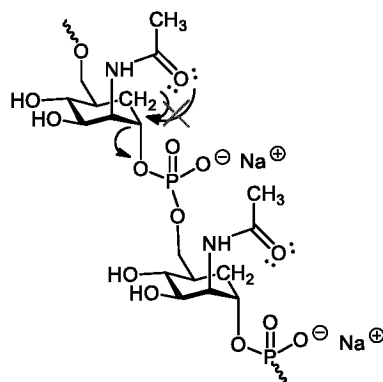


Схема В

В документе Toma *et al.* Org. Biomol. Chem., 2009, 7, 3734-3740 описано получение мономерного О-(2-ацетамидо-2-дезоксигидро-5а-карба-альфа-D-маннопиранозил)фосфата, где метиленовая группа заменяет атом кислорода пиранозы в повторяющемся звене CPS MenA. Указанная публикация относится только к получению самого мономера путем химического синтеза.

В источниках Gao *et al.* (Org. Biomol. Chem. 2012, 10(33), 6673, and ACS Chem. Biol. 2013, 8(11), 2561) и Ramella D. *et al.* (Eur J. Org. Chem, 2014, 5915-5924) описана стабилизация гликозил-1-О-фосфатов с помощью карбасахаров, где метиленовая группа заменяет атом кислорода пиранозы. В них также сообщается о конъюгировании синтетического карба-тримера с белком-носителем, однако без дальнейшего исследования поведения карба-аналогов, имеющих более высокую степень полимеризации. Также отсутствует упоминание о карба-аналоге, который имеет конкретный уровень ацетилирования и/или конкретный характер ацетилирования. Более того, рассматриваемый тример продемонстрировал низкую эффективность в отношении ингибирования связывания антител к CPS MenA, что указывает на то, что описанные производные являются относительно слабыми синтетическими антигенами. Предполагается, что для нативных полисахаридов MenA рекомендуемая степень ацетилирования составляет 75–90%, а в руководствах ВОЗ рекомендуется, чтобы содержащие MenA вакцины имели степень О-ацетилирования по меньшей мере 61,5%. Однако авторы также сообщают, что ацетилирование приводит к значительным изменениям гидрофобности О-ацетилированного конъюгированного полисахарида. Соответственно, учитывая структурные конформационные изменения и конформационные различия с природными полисахаридами, невозможно однозначно

предсказать уровень и характер ацетилирования, оптимальные для карба-аналогов. Это также подтверждается недавними исследованиями *in silico*, которые указывают на конформационные различия между карба-аналогами и природным полисахаридом при увеличении длины олигомера (Carbohydrate Research, 486 (2019) 107838).

Таким образом, существует потребность в выявлении полисахаридных производных - аналогов carbaMenA, которые обладают хорошей стабильностью, демонстрируют подходящий профиль иммуногенности, и которые могут быть получены с помощью надежного и удобного синтетического подхода, а также являются подходящими для включения в полностью жидкую композицию пятивалентной вакцины, обеспечивающей иммунную защиту от инфекции каждой из серогрупп A, B, C, W135 и Y *N. meningitidis*.

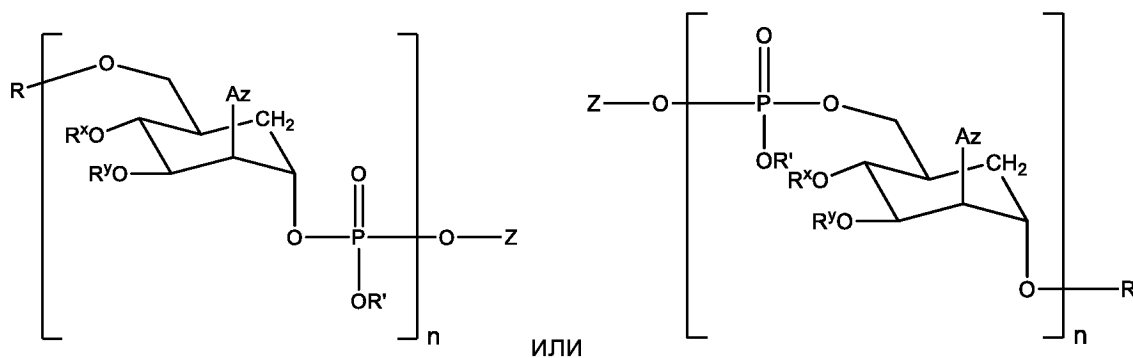
КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте настоящего изобретения предложена водная иммуногенная композиция, которая после введения субъекту способна индуцировать иммунный ответ, который является бактерицидным в отношении серогрупп A, B, C, W135 и Y *Neisseria meningitidis*, при этом указанная композиция содержит:

- i. конъюгированный антиген серогруппы A;
- ii. конъюгированный антиген серогруппы C;
- iii. конъюгированный антиген серогруппы W135;
- iv. конъюгированный антиген серогруппы Y, а также
- v. один или более чем один полипептидный антиген из серогруппы B,

где (ii), (iii) и (iv) представляют собой капсульные сахаридные антигены, и где (i) представляет собой синтетический аналог капсульного сахара серогруппы A.

В одном из предпочтительных воплощений первого аспекта конъюгированный антиген серогруппы A представляет собой конъюгат олигомера и содержит олигомер формулы (Ia) или (Ib):



(Ia)

(Ib)

При этом в указанном олигомере

n больше или равно 6;

R представляет собой H или $-P(O)(OR'')_2$, где R'' представляет собой H или фармацевтически приемлемый противоион для фосфатной группы;

R' представляет собой H или фармацевтически приемлемый противоион для фосфатной группы;

R^x представляет собой H или $-C(O)CH_3$ и может быть одинаковым или различным в каждом повторяющемся звене;

R^y представляет собой H или $-C(O)CH_3$ и может быть одинаковым или различным в каждом повторяющемся звене;

где по меньшей мере один из R^x или R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном повторяющемся звене;

Az представляет собой азаместитель, выбранный из группы, состоящей из $-NH(CO)R^1$, $-N(R^1)_2$ и $-N_3$, где R^1 независимо выбран из группы, состоящей из H , линейного или разветвленного C_1 - C_6 -алкила и линейного или разветвленного C_1 - C_6 -галогеналкила;

Z представляет собой (i) защитную группу,

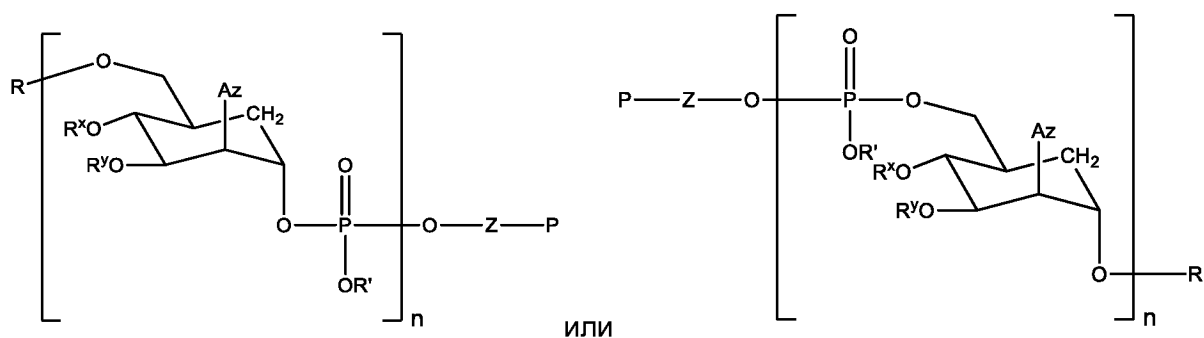
(ii) функциональный линкер для конъюгирования с белком

или (iii) линейный или разветвленный C_1 - C_6 алкил, возможно замещенный фенил, $-C(O)Y$ либо линейный или разветвленный C_1 - C_6 -алкил- X ,

где Y представляет собой H , линейный или разветвленный C_1 - C_6 -алкил либо защитную группу, и

где X представляет собой $-NH_2$, $-N_3$, $-C\equiv CH$, $-CH=CH_2$, $-SH$ или $-S-C\equiv N$.

В одном из предпочтительных воплощений первого аспекта конъюгированный антиген серогруппы A представляет собой конъюгат олигомера формулы (IIa) или (IIb):



(IIa)

(IIb)

При этом в указанном олигомере

n больше или равно 6;

R представляет собой H или $-P(O)(OR'')_2$, где R'' представляет собой H или фармацевтически приемлемый противоион для фосфатной группы;

R' представляет собой H или фармацевтически приемлемый противоион для фосфатной группы;

R^x представляет собой H или $-C(O)CH_3$ и может быть одинаковым или различным в каждом повторяющемся звене;

R^y представляет собой H или $-C(O)CH_3$ и может быть одинаковым или различным в каждом повторяющемся звене;

где по меньшей мере один из R^x или R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном повторяющемся звене;

Az представляет собой азаместитель, выбранный из группы, состоящей из $-NH(CO)R^1$, $-N(R^1)_2$ и $-N_3$, где R^1 независимо выбран из группы, состоящей из H , линейного или разветвленного C_1 - C_6 -алкила и линейного или разветвленного C_1 - C_6 -галогеналкила;

Z представляет собой (i) функциональный линкер или связь; и

P представляет собой белок.

Во втором аспекте настоящего изобретения предложен способ индуцирования иммунного ответа у млекопитающего, включающий введение иммуногенной композиции согласно первому аспекту.

В третьем аспекте настоящего изобретения предложена иммуногенная композиция согласно первому аспекту для применения в медицине.

В четвертом аспекте настоящего изобретения предложена иммуногенная композиция согласно первому аспекту для применения в качестве вакцины.

В пятом аспекте настоящего изобретения предложена иммуногенная композиция согласно первому аспекту для применения в способе индуцирования иммунного ответа у млекопитающего.

В шестом аспекте настоящего изобретения предложена иммуногенная композиция согласно первому аспекту для применения для иммунизации млекопитающего против инфекции *N. meningitidis*.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На ФИГ. 1 представлен ^1H -ЯМР-мониторинг трех стадий реакции произвольного О-ацетилирования (то есть когда олигомер ацетилирован по одному или более чем одному R^x и/или R^y , другими словами, когда по меньшей мере один из R^x и/или R^y представляет собой $-\text{C}(\text{O})\text{Me}$) карба-аналога DP8, то есть соединения формулы (Ia), где $n = 8$.

На ФИГ. 2 представлен спектр ^1H -ЯМР конечного произвольно О-ацетилированного карба-аналога DP8 (то есть соединения формулы (Ia), где $n = 8$) с результатами интегрирования для определения % ацетилирования.

На ФИГ. 3 представлен спектр ^{31}P ЯМР конечного произвольно О-ацетилированного карба-аналога DP8 (формула (Ia)). Спектр показывает одновременное ацетилирование, происходящее до степени 44%, в положениях C3+C4, а также ацетилирование либо в положении C3, либо в положении C4 до степени 28%. 27% молекулы не ацетилировано.

На ФИГ. 4 изображена схема конъюгирования олигомера согласно настоящему изобретению с CRM₁₉₇ и результаты электрофореза SDS-page для неочищенной реакционной смеси.

На ФИГ. 5 показано ингибирование связывания антител к MenA с CPS. Конкурентный иммуноферментный анализ (ELISA) с mAb к MenA (ФИГ. 5A), поликлональной сывороткой к MenA (ФИГ. 5B) с применением неацетилированных олигомеров carbaMenA различной длины в качестве ингибиторов и CPS в качестве адсорбированного агента. (ФИГ. 5C) Конкурентный анализ методом SPR связывания mAb к MenA и иммобилизованного биотинилированного CPS. В А и В в качестве положительных контролей использовали CPS MenA и deOAc CPS, а в качестве отрицательного контроля использовали бета-глюкан ламинарин. В С в качестве положительных контролей использовали CPS MenA и его фрагменты, а анти-MenC mAb помещали на чип в качестве отрицательного контроля.

На ФИГ. 6A, 6B, 6C и 6D. Иммунный ответ, вызванный неогликоконъюгатами. На ФИГ. 6A, 6B и 6C на панелях показаны титры антител, представленные в виде среднего геометрического (горизонтальная планка) с доверительным интервалом (ДИ) 95% (вертикальная планка). На ФИГ. 6D на панели показаны титры rSBA, представленные в виде среднего геометрического (горизонтальная планка) с ДИ 95% (вертикальная планка). Для сравнения рангов использовали двусторонний критерий Манна-Уитни; $n=10$. Показатель до иммунизации использовали в качестве

отрицательного контроля в обоих типах анализа. ФИГ. 6А) Титры IgG к MenA, определенные в сыворотке отдельных мышей после второй бустерной иммунизации против природного CPS MenA. $p < 0,0001$ между конъюгатами avDP~15 MenA и carbaDP6/DP8. ФИГ. 6В) Титры IgG к deOAc MenA, определенные в отношении де-О-ацетилизованного CPS MenA, конъюгированного с HSA. При сравнении конъюгатов $p = 0,002$ между конъюгатами avDP~15 и carbaDP8, а также между конъюгатами avDP8,5 и carbaDP6; $p = 0,003$ между конъюгатами avDP8,5 и carbaDP8; и $p = 0,004$ между конъюгатами avDP~15 и carbaDP6. ФИГ. 6С) Титры IgG к MenA, определенные в отдельных сыворотках после второй бустерной иммунизации с применением CPS MenA в качестве адсорбированного агента. $p = 0,0011$ при сравнении конъюгатов avDP15 и Ac-carbaDP8. ФИГ. 6D) Бактерицидные титры для сыворотки человека и кролика, определенные после третьей инъекции в объединенной сыворотке и сыворотках отдельных мышей, соответственно. Не было обнаружено значимых различий при сравнении рангов. Иммунизацию проводили в двух повторностях, и на чертеже приведены данные репрезентативного эксперимента. *Титры для SBA человека и кролика, определенные после третьей инъекции в объединенной сыворотке; ** Титры для SBA человека и кролика, определенные после третьей инъекции в объединенной сыворотке ответивших мышей. По оси Y указаны «IgG к CPS Men A (геометрическое среднее, ДИ 95%)».

На ФИГ. 7 представлены титры ELISA, определенные после трех введений доз вакцины: антитела IgG к полисахариду MenA оценивали при применении CRM₁₉₇-конъюгатов произвольно О-ацетилизованного аналога carbaMenA DP8 в сравнении с CRM₁₉₇-конъюгатами селективно 3-О-ацетилизованного carbaMenA DP8 и с содержащей нативный MenA-CRM₁₉₇ вакциной в качестве эталона (то есть положительного контроля).

На ФИГ. 8А и 8В представлены титры ELISA после введения двух и трех доз вакцин. р-Значения относятся к сравнению эталонного нативного MenA-CRM₁₉₇ и других групп вакцинации.

На ФИГ. 9 представлены титры SBA после трех введений доз вакцины: опосредованные комплементом человека бактерицидные титры определяли в сыворотках, индуцированных CRM₁₉₇-конъюгатом произвольно О-ацетилизованного аналога carbaMenA DP8, в сравнении с CRM₁₉₇-конъюгатами селективно

3-О-ацетилированного carbaMenA DP8 и с содержащей нативный MenA-CRM₁₉₇ вакциной в качестве эталона (то есть положительного контроля).

На ФИГ. 10 представлены титры SBA после двух и трех введений доз вакцины согласно настоящему изобретению (DP8-ОАс), а также для вакцины, не соответствующей настоящему изобретению (DP6-ОАс), полученные с комплементом кролика (rSBA) и человека (hSBA).

На ФИГ. 11 показаны титры общего IgG в отдельных и объединенной сыворотках, определенные с помощью HT-ELISA для эталонных составов MenABCWY и MenA, содержащих твердый (лиофилизированный) компонент MenA, по сравнению с соответствующими полностью жидкими составами, содержащими произвольно ацетилированные антигены carbaMenA.

На ФИГ. 12 показаны ответы в виде выработки функциональных антител, определенные с помощью rSBA и SBA для эталонных составов MenABCWY и MenA, содержащих твердый (лиофилизированный) компонент MenA, по сравнению с соответствующими полностью жидкими составами, содержащими произвольно ацетилированные антигены carbaMenA.

На ФИГ. 13 показаны характеристики конъюгатов carbaMenA DP8 и DP10, определенные методами электрофореза SDS-page и вестерн-блоттинга.

На ФИГ. 14 показаны титры ELISA, определенные после введения трех доз вакцины с произвольно О-ацетилированным аналогом carbaMenA DP10 в комбинации с BNGCWY, в сравнении с применением вакцины ABNGCWY в качестве эталона (то есть положительного контроля). На ФИГ. 14А показаны антитела IgG к полисахариду MenA, на ФИГ. 14В антитела IgG к полисахаридам MenC, MenW и MenY, на ФИГ. 14С показаны антитела IgG к NadA, FHbp var.1.1, NHBA, 231.13NB и белкам OMV, где для каждого антигена результат для эталонной вакцины ABNGCWY показан в левом столбце, а результат для произвольно О-ацетилированного аналога carbaMenA DP10 в комбинации с BNGCWY показан в правом столбце.

На ФИГ. 15 показаны титры SBA после введения трех доз вакцины. На ФИГ. 15А показаны опосредованные комплементом человека бактерицидные титры, определенные в сыворотках, индуцированные произвольно О-ацетилированным аналогом carbaMenA DP10 в комбинации с BNGCWY, в сравнении с применением вакцины ABNGCWY в качестве эталона (то есть положительного контроля) с использованием штаммов MenA 3125 и F8238. На ФИГ. 15В показаны опосредованные комплементом человека

бактерицидные титры, определенные в сыворотках, индуцированные произвольно О-ацетилованным аналогом carbaMenA DP10 в комбинации с BNGCWY, в сравнении с применением вакцины ABNGCWY в качестве эталона (то есть положительного контроля) с использованием штаммов C11 (для MenC), 240070 (для MenW) и 860800 (для MenY). На ФИГ. 15С показаны опосредованные комплементом человека бактерицидные титры, определенные в сыворотках, индуцированные произвольно О-ацетилованным аналогом carbaMenA DP10 в комбинации с BNGCWY, в сравнении с применением вакцины ABNGCWY в качестве эталона (то есть положительного контроля) с использованием штаммов 96217 (для NadA), M14459 (для fHbp var1.1), M13530 (для NHBA), M08-240104 (для fHbp var2), M01-240320 (для fHbp var3), M15-240084 и M08-0240264 (для fHbp var1.13), а также NZ98/254.

ПОДРОБНОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложена водная иммуногенная композиция, которая после введения субъекту способна индуцировать иммунный ответ, который является бактерицидным в отношении серогрупп А, В, С, W135 и Y *Neisseria meningitidis*. Преимущество заключается в том, что указанная композиция обеспечивается в виде полностью жидкого состава, что означает, что каждый из антигенных компонентов может присутствовать в комбинации в стабильном состоянии без необходимости лиофилизации. Указанная иммуногенная композиция содержит:

- i. конъюгированный антиген серогруппы А;
 - ii. конъюгированный антиген серогруппы С;
 - iii. конъюгированный антиген серогруппы W135;
 - iv. конъюгированный антиген серогруппы Y, и
 - v. один или более чем один полипептидный антиген из серогруппы В,
- где (ii), (iii) и (iv) представляют собой капсульные сахаридные антигены, и где (i) представляет собой синтетический аналог капсульного сахара серогруппы А. Предпочтительно сахаридные антигены представляют собой олигосахариды.

Конъюгированный антигенный компонент серогруппы А

Антигенный компонент серогруппы А иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению представляет собой синтетический карба-аналог полисахарида (то есть тот, в котором атом кислорода в кольце звена маннозамина заменен на метилен). В одном из предпочтительных воплощений карба-аналог полисахарида имеет степень полимеризации по меньшей мере 6, и предпочтительно при этом первый мономер

аналога соединен со вторым мономером аналога через 1,6-связь, которая соединяет С-1 первого звена с С-6 второго звена, и при этом 1,6-связь включает фосфонатный фрагмент.

Следует отметить, что такие производные не только способны имитировать нативный полисахарид из серогруппы MenA, но также ожидается, что они будут обладать улучшенной стабильностью по сравнению с нативным CPS.

Значение термина «олигосахарид» охватывает полисахариды, содержащие от 3 до 10 моносахаридных звеньев, что является общеизвестным в данной области техники (см., например, <https://en.wikipedia.org/wiki/Oligosaccharide>).

Термин «олигомер» относится к карба-аналогам полисахаридов, в которых внутрикольцевой атом кислорода заменен на метиленовую (-CH₂-) группу, что обеспечивает циклогексановый остов.

«Степень полимеризации» (DP) указывает на количество мономеров, соединенных вместе с получением конечного олигомера. В настоящем изобретении, если не указано иное, DP обозначается как «n» в формулах (I) и (II).

«Средняя степень полимеризации» (avDP) указывает на среднее количество повторяющихся звеньев, составляющих олигомер.

Если не указано иное, термин «конъюгирование» обозначает соединение или связывание подвергаемых воздействию объектов, в частности, олигомеров согласно настоящему изобретению, имеющих n (то есть DP), большее или равное 6, и выбранного белка.

В настоящем документе термин «алкил» обозначает насыщенную линейную или разветвленную углеводородную группировку. Термин «C₁-C₆-алкил» относится к алкильной группировке, содержащей от 1 до 6 атомов углерода.

В настоящем документе термин «галогеналкил» обозначает насыщенную линейную или разветвленную углеводородную группировку, в которой один или более чем один атом водорода заменен на атом галогена. В частности, указание на «галогеналкил» является указанием на «фторалкил», где галоген представляет собой атом фтора. Термин «C₁-C₆-галогеналкил» относится к алкильной группировке, содержащей от 1 до 6 атомов углерода, в которой один или более чем один атом водорода заменен на атом галогена. Примеры включают -CF₃, -CH₂F, -CH₂CF₃ и так далее.

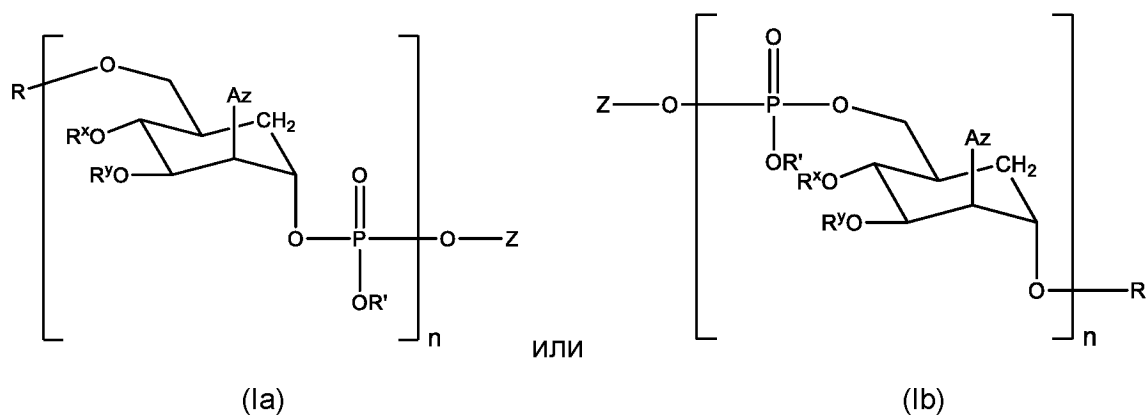
В настоящем документе, в частности, согласно определению Z, фенил может быть возможно замещен. Фенильная группа может быть возможно замещена одной или более

чем одной реакционноспособной функциональной группой с обеспечением возможности конъюгирования, такой как N_3 , NH_2 , SH . Другие подходящие группы хорошо известны специалисту в данной области техники.

В настоящем документе термин «защитная группа» обозначает любую подходящую защитную группу в соответствии с целевым назначением. Выбор и применение таких защитных групп, а также подробная информация об их применении доступны, например, в Greene, T.W. and Wuts, P.G.M., “Protective Groups in Organic Synthesis”. Подходящие защитные группы хорошо известны специалисту в данной области техники.

В настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый противоион для фосфатной группы» обозначает любой противоион, подходящий для фосфатной группы, то есть катион металла, который находится в рамках разумного медицинского суждения, подходящий для применения в контакте с тканями человека и животных, не вызывающий чрезмерной токсичности, раздражения или других проблем или осложнений, в соответствии с разумным отношением польза/риск. Фармацевтически приемлемый противоион для фосфатной группы может представлять собой металл группы 1 или группы 2. Конкретными примерами такого фармацевтически приемлемого противоиона для фосфатной группы являются натрий (Na^+) и калий (K^+). Предпочтительным является, чтобы противоион представлял собой натрий, например, когда олигомер или конъюгат согласно настоящему изобретению находится в буфере.

В одном из воплощений настоящее изобретение относится к конъюгированному антигену серогруппы А, который представляет собой конъюгат олигомера и содержит олигомер формулы (Ia) или (Ib):



При этом в указанном олигомере
n больше или равно 6;

R представляет собой H или $-P(O)(OR'')_2$, где R'' представляет собой H или фармацевтически приемлемый противоион для фосфатной группы;

R' представляет собой H или фармацевтически приемлемый противоион для фосфатной группы;

R^x представляет собой H или $-C(O)CH_3$ и может быть одинаковым или различным в каждом повторяющемся звене;

R^y представляет собой H или $-C(O)CH_3$ и может быть одинаковым или различным в каждом повторяющемся звене;

где по меньшей мере один из R^x или R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном повторяющемся звене;

Az представляет собой азаместитель, выбранный из группы, состоящей из $-NH(CO)R^1$, $-N(R^1)_2$ и $-N_3$, где R¹ независимо выбран из группы, состоящей из H, линейного или разветвленного C₁-C₆-алкила и линейного или разветвленного C₁-C₆-галогеналкила;

Z представляет собой (i) защитную группу,

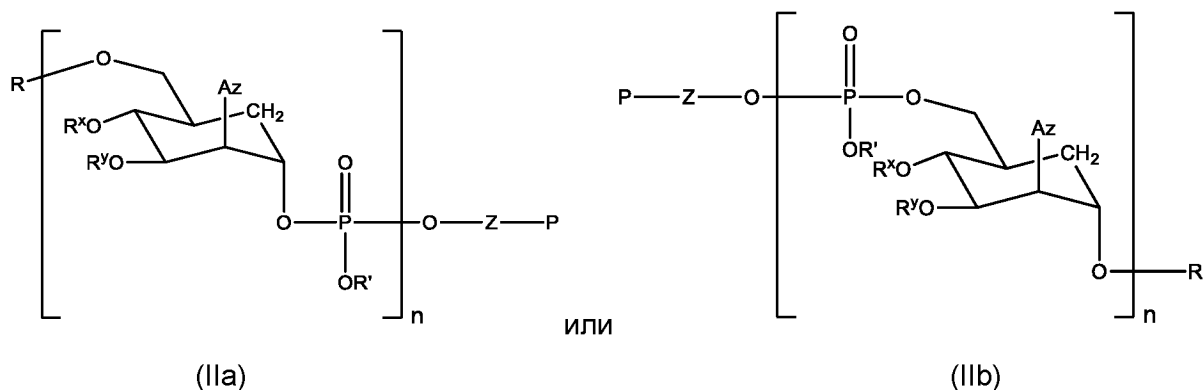
(ii) функциональный линкер для конъюгирования с белком

или (iii) линейный или разветвленный C₁-C₆ алкил, возможно замещенный фенил, $-C(O)Y$ либо линейный или разветвленный C₁-C₆-алкил-X,

где Y представляет собой H, линейный или разветвленный C₁-C₆-алкил либо защитную группу, и

где X представляет собой $-NH_2$, $-N_3$, $-C\equiv CH$, $-CH=CH_2$, $-SH$ или $-S-C\equiv N$.

В другом воплощении конъюгированный антиген серогруппы A представляет собой конъюгат олигомера формулы (IIa) или (IIb):



При этом в указанном олигомере

n больше или равно 6;

R представляет собой H или $-P(O)(OR'')_2$, где R'' представляет собой H или фармацевтически приемлемый противоион для фосфатной группы;

R' представляет собой H или фармацевтически приемлемый противоион для фосфатной группы;

R^x представляет собой H или $-C(O)CH_3$ и может быть одинаковым или различным в каждом повторяющемся звене;

R^y представляет собой H или $-C(O)CH_3$ и может быть одинаковым или различным в каждом повторяющемся звене;

где по меньшей мере один из R^x или R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном повторяющемся звене;

Az представляет собой азаместитель, выбранный из группы, состоящей из $-NH(CO)R^1$, $-N(R^1)_2$ и $-N_3$, где R¹ независимо выбран из группы, состоящей из H, линейного или разветвленного C₁-C₆-алкила и линейного или разветвленного C₁-C₆-галогеналкила;

Z представляет собой (i) функциональный линкер или связь; и

P представляет собой белок.

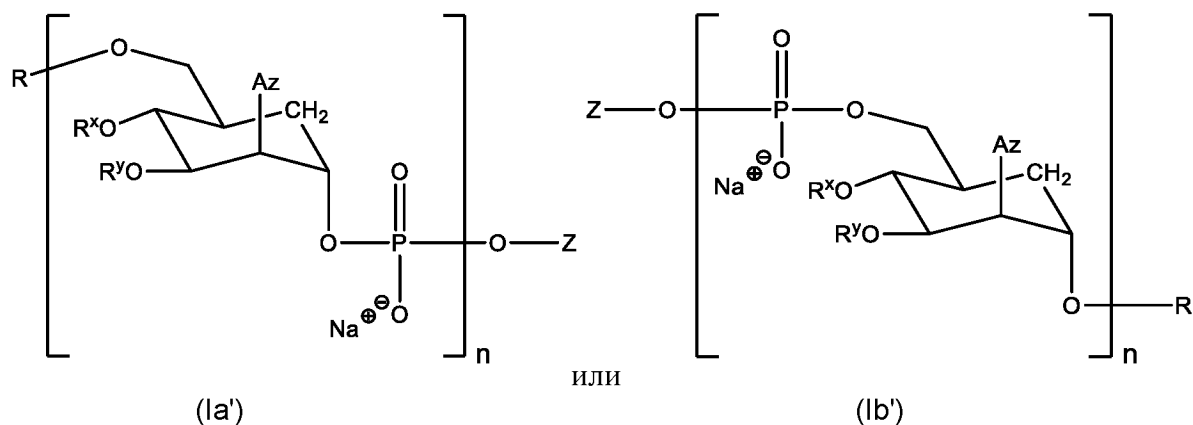
В одном из предпочтительных воплощений олигомер определен формулой (Ia).

Как определено выше n больше или равно 6, предпочтительно больше или равно 8. В одном из воплощений n составляет от 8 до 30. В другом воплощении n составляет от 8 до 20. В конкретном воплощении n составляет от 8 до 15. В частности, n представляет собой 8 или 10. В одном из воплощений n составляет 8. В одном из воплощений n представляет собой 10.

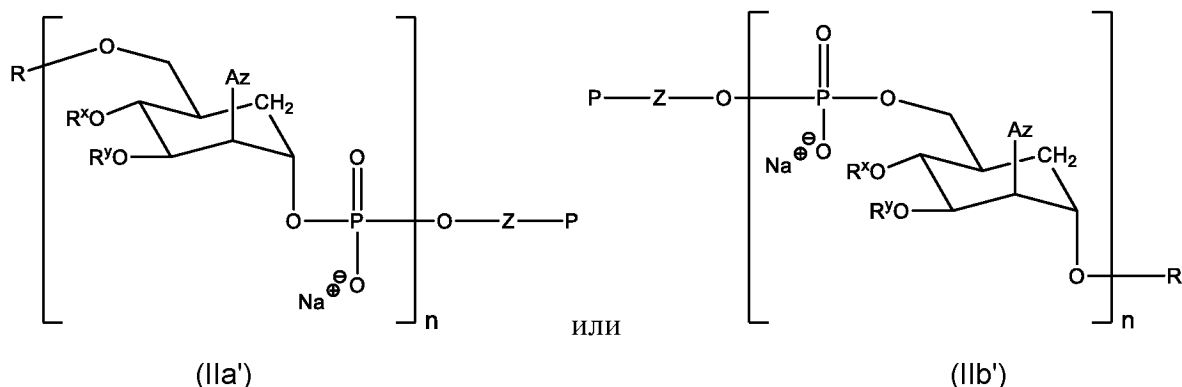
В одном из воплощений R представляет собой H или $-P(O)(OR'')_2$, где по меньшей мере один R'' представляет собой Na⁺. В одном из воплощений R представляет собой H.

В одном из воплощений R представляет собой $NHC(O)CH_3$.

В одном из воплощений R' представляет собой Na⁺, в результате чего олигомер согласно настоящему изобретению определяется в соответствии с формулой (Ia') или (Ib'), предпочтительно формулой (Ia'):



В свою очередь, из этого следует, что в одном из воплощений антиген, представляющий собой конъюгат олигомера согласно настоящему изобретению, определяется в соответствии с формулой (IIa') или формулой (IIb'), предпочтительно формулой (IIa'):



Как определено выше, R^x представляет собой H или $-C(O)CH_3$ и может быть одинаковым или различным в каждом повторяющемся звене, и R^y представляет собой H или $-C(O)CH_3$ и может быть одинаковым или различным в каждом повторяющемся звене, при этом по меньшей мере один из R^x или R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном повторяющемся звене. Таким образом, следует понимать, что формулы, определенные внутри квадратных скобок в соответствии с формулами (Ia), (IIa), (Ib) и (IIb), означают, что каждое звено олигомера имеет эту основную цепь, однако мономерное звено, определенное квадратными скобками, не обязательно одно и то же, принимая во внимание, что различные варианты для R^x и R^y могут быть выбраны для каждого повторяющегося звена, определенного квадратными скобками. Поэтому следует понимать, что может быть достигнут различный % ацетилирования в зависимости от n и выбора H или $-C(O)CH_3$ для R^x и R^y . Например, каждое повторяющееся звено олигомера, определенное квадратными скобками, может быть

одинаковым или различным в зависимости от уровня ацетилирования, то есть в зависимости от выбора H или $-C(O)CH_3$ для каждого из R^x и R^y .

В одном из воплощений в олигомере R^x представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном повторяющемся звене. В одном из воплощений в олигомере R^x представляет собой H и R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене.

В одном из воплощений в олигомере R^x представляет собой $-C(O)CH_3$ и R^y представляет собой H по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене.

В одном из воплощений в олигомере R^x и R^y оба представляют собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене.

В одном из воплощений в олигомере R^x представляет собой H и R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене, и R^x представляет собой $-C(O)CH_3$ и R^y представляет собой H по меньшей мере в другом одном и том же повторяющемся звене.

В одном из воплощений в олигомере R^x представляет собой H, и R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ в рамках одного повторяющегося звена по меньшей мере в четырех повторяющихся звеньях. В одном из воплощений в олигомере R^x представляет собой H, и R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ в рамках одного повторяющегося звена по меньшей мере в шести повторяющихся звеньях. В одном из воплощений в олигомере R^x представляет собой H, и R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ в рамках одного повторяющегося звена по меньшей мере в восьми повторяющихся звеньях. В одном из воплощений в олигомере R^x представляет собой H, и R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ в рамках одного повторяющегося звена по меньшей мере в десяти повторяющихся звеньях.

В одном из воплощений в олигомере R^x представляет собой $-C(O)CH_3$, и R^y представляет собой H в рамках одного повторяющегося звена по меньшей мере в четырех повторяющихся звеньях.

В одном из воплощений в олигомере R^x представляет собой H, и R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ в рамках одного повторяющегося звена в четырех повторяющихся звеньях, и R^x представляет собой $-C(O)CH_3$, и R^y представляет собой H в рамках одного повторяющегося звена в четырех повторяющихся звеньях.

В одном из воплощений олигомер может иметь R^x или R^y , представляющий собой $-C(O)CH_3$, во всех повторяющихся звеньях, другими словами, ацетилирование

повторяющихся звеньев в положении 3 или 4 в каждом повторяющемся звене характеризует селективно ацетилированные звенья.

В одном из воплощений в олигомере R^x представляет собой H и R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене, R^x представляет собой $-C(O)CH_3$ и R^y представляет собой H по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене, и R^x и R^y оба представляют собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене.

В одном из воплощений в совокупности примерно от 50 до 90% R^x и R^y в олигомере представляют собой $-C(O)CH_3$. Другими словами, общая степень ацетилирования олигомера составляет примерно от 50 до 90%. Другими словами, в олигомере согласно настоящему изобретению по меньшей мере один из R^x и один из R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ в одном и том же повторяющемся звене или в различных повторяющихся звеньях с общей степенью ацетилирования в положениях 3 (R^y представляет собой $-C(O)CH_3$) и 4 (R^x представляет собой $-C(O)CH_3$), составляющей примерно от 50 до 90%. Во избежание сомнений, как было отмечено выше, R^x и R^y могут быть одинаковыми или различными в каждом повторяющемся звене олигомера.

В другом воплощении в совокупности примерно от 60 до 80% R^x и R^y в олигомере представляют собой $-C(O)CH_3$. Другими словами, общая степень ацетилирования олигомера составляет примерно от 60 до 80%. Во избежание сомнений, как было отмечено выше, R^x и R^y могут быть одинаковыми или различными в каждом повторяющемся звене олигомера.

В одном из воплощений оба из R^x и R^y представляют собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене олигомеров согласно изобретению, и предпочтительно примерно в 40-50% повторяющихся звеньев олигомера, примерно от 10 до 30% оставшихся повторяющихся звеньев могут содержать один из R^x или R^y , который представляет собой $-C(O)CH_3$, при этом остальные повторяющиеся звенья в олигомере содержат $R^x = R^y = H$.

Как определено выше, Az представляет собой азаместитель, выбранный из группы, состоящей из $-NH(CO)R^1$, $-N(R^1)_2$ и $-N_3$, где R^1 независимо выбран из группы, состоящей из H, линейного или разветвленного C_1 - C_6 -алкила и линейного или разветвленного C_1 - C_6 -галогеналкила. Атом азота непосредственно присоединен к повторяющемуся звену карба-аналога.

Примеры таких заместителей Az включают $-N_3$, $-NH_2$, $-NH-C_1-C_6$ алкил, $-N-(C_1-C_6 \text{ алкил})_2$ и $-NH(CO)-C_1-C_6$ алкил. В одном из воплощений $-C_1-C_6$ алкил представляет собой $-C_1-C_4$ алкил, в частности, $-CH_3$. Таким образом, согласно одному из воплощений Az представляет собой $-NH(CO)-C_1-C_6$ алкил, в частности, $-NH(CO)-CH_3$, также обозначаемый как $-NHAc$ (где Ac означает ацетат, то есть $-C(O)CH_3$).

Z может иметь различные значения в зависимости от того, конъюгированы ли олигомеры согласно настоящему изобретению с белком или нет.

Согласно формуле (Ia) или (Ib), олигомер согласно настоящему изобретению не конъюгирован с белком. Следовательно, как определено выше, согласно формуле (Ia) или (Ib) Z представляет собой одно из следующего:

- (i) защитную группу,
- (ii) линейный или разветвленный C_1-C_6 алкил, возможно замещенный арил, $-C(O)Y$ либо линейный или разветвленный C_1-C_6 -алкил-X, или
- (iii) функциональный линкер для конъюгирования с белком.

Таким образом, согласно одному из воплощений Z представляет собой агент для кэпирования (capping) концевого сахаридного звена, так что он может быть нереакционноспособным или реакционноспособным, например, для дальнейшего удлинения цепи или для последующей модификации.

Когда Z предназначен для кэпирования концевого звена карбоаналога, он может содержать защитные группы или кэпирующие группы, такие как линейный или разветвленный C_1-C_6 алкил, возможно замещенный фенил, $-C(O)-Y$, или линейный или разветвленный $-C_1-C_6$ алкил-X, где X представляет собой $-NH_2$, $-N_3$, $-C\equiv CH$, $-CH=CH_2$, $-SH$ или $-S-C\equiv N$, и где Y представляет собой H, линейный или разветвленный C_1-C_6 -алкил или защитную группу.

Как определено в настоящем документе, Z может представлять собой функциональный линкер для конъюгирования с белком. В этом случае «функциональный линкер» относится к любому известному в данной области техники линкеру, применяемому для конъюгирования сахара с белком.

В одном из воплощений X представляет собой $-NH_2$.

В одном из воплощений Z согласно формуле (Ia) или (Ib) выбран из: $-(CH_2)_6-NH_2$, $-(CH_2)_4-NH_2$, $-(CH_2)_3-NH_2$ и $-(CH_2)_2-NH_2$, где аминогруппа возможно защищена подходящей защитной группой, например, $-C(O)CH_3$ (выбор и применение таких

защитных групп, а также подробная информация об их применении доступны, например, в Greene, T.W. and Wuts, P.G.M., “Protective groups in organic synthesis”).

Олигомеры согласно настоящему изобретению могут быть получены с помощью синтетических методов, известных в органическом синтезе для получения карба-аналогов полисахаридов. В целом, получение олигомеров согласно настоящему изобретению может быть достигнуто путем соединения по меньшей мере 6 структурных блоков карба-аналога маннозамина требуемым образом путем образования 1,6-альфа-связи между повторяющимися звеньями с получением таким образом олигомера, имеющего степень полимеризации по меньшей мере 6. Как показано в формуле (I), мономеры соединены посредством альфа-(1→6)-фосфатной связи, и такое соединение может быть осуществлено с применением стандартных методик полимеризации, таких как, среди прочего, методика, описанная в источнике Gao et al., *Org. Biomol. Chem.*, 2012, 10, 6673.

Структурные блоки карба-аналога маннозамина могут содержать ацетат в положении 3 или защитную группу, которая может быть заменена на ацетат на любой стадии синтеза.

В качестве альтернативы и согласно одному из воплощений настоящее изобретение относится к способу получения олигомеров формулы (I), включающему следующие стадии:

- a. Получение мономера, имеющего фосфодиэфирную связь;
- b. Реакция удлинения полученного таким образом мономера с применением, например, фосфорамидита.
- c. О-ацетилирование олигомера.

В одном из воплощений, когда R^y представляет собой $C(O)CH_3$, стадии (b) и (c) могут быть выполнены в обратном порядке, таким образом, проводят О-ацетилирование, после чего проводят реакцию удлинения.

Более подробно, указанный способ может включать стадии, показанные на схеме 1:

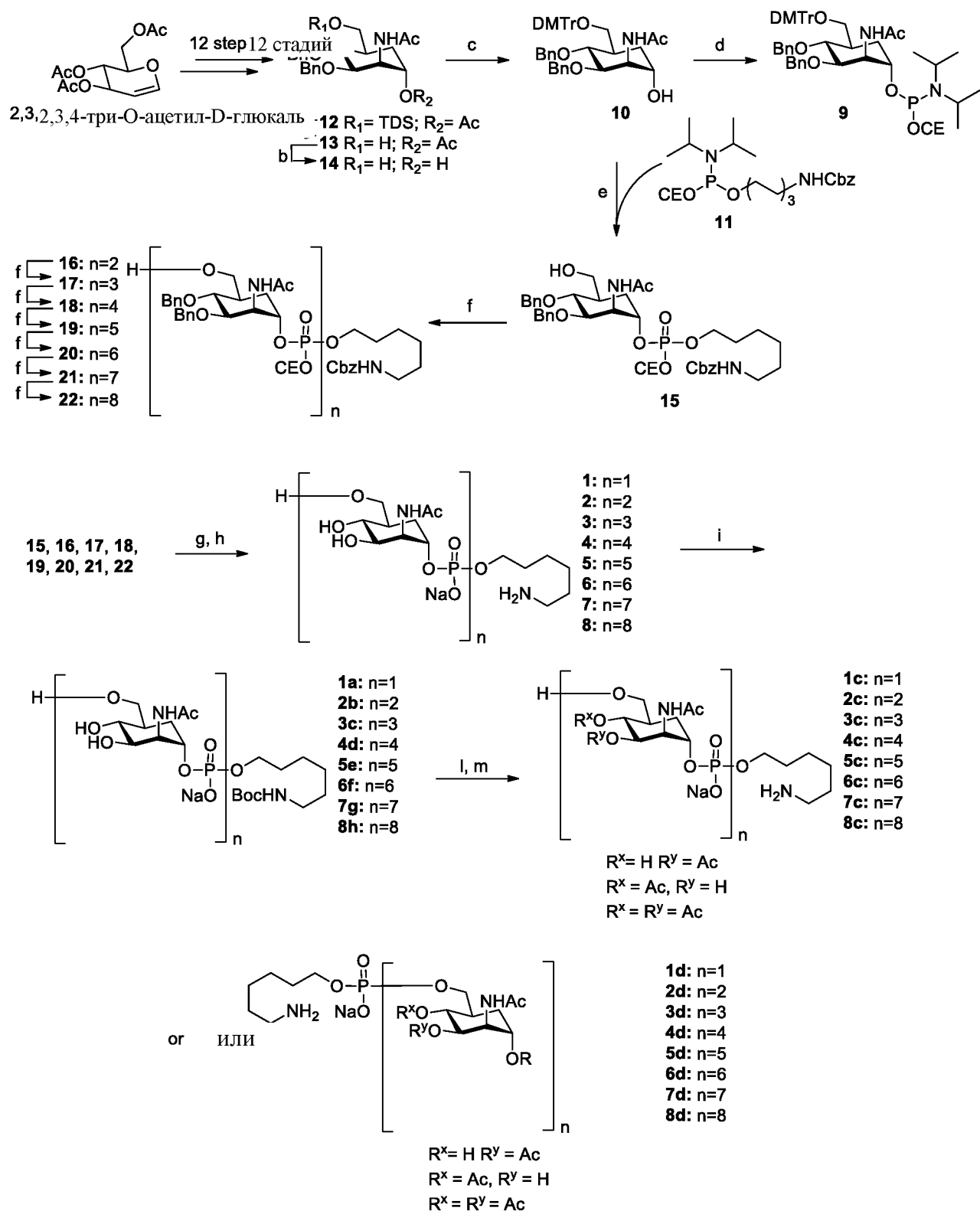


Схема 1: Способ получения олигосахарида согласно настоящему изобретению.

(a) TBAF, THF, 0°C → к. т., 92%. (b) MeONa, MeOH, к. т., 85%. (c) DMTrCl, Et₃N, DCM, к. т., 91%. (d) 2-цианоэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит, N,N-

диизопропилэтиламин, DCM, к. т., **9** (94%). (e) I. **11**, DCI, MeCN, II. CSO, MeCN, III. TCA, DCM, H₂O, 94%. (f) I. **9**, DCI, MeCN, II. CSO, MeCN, III. TCA, DCM, H₂O, **16** (82%), **17** (95%), **18** (90%), **19** (92%), **20** (88%), **21** (86%), **22** (87%). (g) NH₄OH, H₂O, диоксан. (h) H₂, Pd black, H₂O, AcOH, **1** (99%), **2** (76%), **3** (69%), **4** (39%), **5** (88%), **6** (83%), **7** (77%), **8** (44%), (i): (Boc)₂O, NaHCO₃, к. т., 16 ч; (l): Ac₂O/имидазол, 40°C, ~9d; (m); TFA, к. т., 1 ч.

Во избежание сомнений, Ac предназначен для обозначения ацетильной группы, то есть -C(O)CH₃.

В частности, применение фосфорамидитных структурных блоков более эффективно для получения фосфодиэфирных связей. Авторы изобретения предпочли применение диметокситритилового (DMTr) простого эфира, чтобы временно замаскировать первичные спиртовые функциональные группы, подлежащие удлинению. Каждая стадия удлинения имеет в основе цикл, представляющий собой трехстадийную последовательность, включающую связывание фосфорамидита со спиртом с растущей цепью, окисление промежуточного фосфита с получением соответствующего фосфодиэфира и демаскирование первичного гидроксила в полученном (n+1) олигомере. Как показано на схеме 1, ключевой структурный блок **9** получают из промежуточного продукта **10**, который, в свою очередь, получают в три стадии из известного карбасахара **12** (см., например, Q. Gao et al. Org. Biomol. Chem., 2012, 10, 6673-6681). Последний структурный блок карба-маннозы может быть получен из коммерчески доступного 3,4,6-три-*O*-ацетил-*D*-глюкала в соответствии с методиками, известными из уровня техники. Таким образом, группу первичного силилового простого эфира и группу ацетилового сложного эфира удаляли из соединения **12** последовательным воздействием фторида тетрабутиламмония (TBAF) и NaOMe с получением диола **14** с выходом 85%. Затем региоселективно вводили группу DMTr с получением спирта **10** с выходом 91%. Это соединение превращали в фосфорамидит блока удлинения **9** путем взаимодействия с 2-цианоэтил-*N,N*-диизопропилхлорфосфорамидитом. Имея в наличии структурные блоки, проводили сборку целевых олигомеров. Синтез начинали с введения аминоксаноолового спейсера в спирт **10** с применением известного фосфорамидита **11**. Структурные блоки соединяли в ходе двухстадийной реакции в одном сосуде с применением дицианимидазола (DCI) в качестве активатора для активации фосфорамидита. Окисление образовавшегося *in situ* фосфита проводили с применением (1S)-(+)-(10-камфорсульфонил)-оксазиридина (CSO). DCI (pK_a 5,2) был более предпочтителен, чем обычно используемый тетразол (pK_a 4,9), поскольку он менее

кислый и подходит для применения в комбинации с кислотонеустойчивой группой DMTr. Вместо йода применяли CSO по причине его более высокой растворимости в неводных растворителях, таких как ацетонитрил. Неочищенный фосфодиэфирный продукт обрабатывали TCA с отщеплением группы DMTr. Полученный продукт очищали с помощью эксклюзионной хроматографии (Sephadex LH-20) с получением имеющего спейсер мономера **15** с выходом 94%. Все последующие реакции сочетания выполняли в соответствии с процедурой, описанной выше, до достижения требуемой степени полимеризации 8 или выше. Для удлинения олигомеров большей длины использовали большее количество фосфорамидита **9** и увеличивали время реакции сочетания, чтобы обеспечить полное превращение спирта. Выход для каждого цикла удлинения являлся хорошим или превосходным и находился в диапазоне от 82% до 95%. Октамер **22** получали с общим выходом 40%, используя в качестве исходного вещества **10**. Удаление защитных групп фрагментов **16-22** выполняли в две последовательные стадии. Сначала удаляли цианоэтильные группы (CE) с применением водного раствора аммиака (33%). Затем все оставшиеся защитные группы (бензиловые простые эфиры и карбоксибензилкарбамат) на полученных таким образом фосфодиэфирах отщепляли путем гидрогенолиза над палладиевой чернью с получением целевых неацетилированных олигомеров **1-8**.

Полученные неацетилированные олигомеры **1-8** могут быть О-ацетилированы произвольным образом в положении 3 и/или 4, то есть таким образом, что в совокупности примерно от 50 до 90% R^x и R^y в олигомере будут представлять собой $-C(O)CH_3$. Это может быть достигнуто посредством (i) введения защитной группы BOC для свободной аминогруппы; (ii) О-ацетилирования с применением, например, Ac_2O /имидазола; и (iii) удаления защитной группы с получением ацетилированных олигомеров **1c-8c** или **1d-8d**. Затем такие ацетилированные олигомеры могут быть активированы линкерной группой, такой как бис-сукцинимидиладипат (также известный как SIDEA), и конъюгированы с белком, таким как CRM₁₉₇.

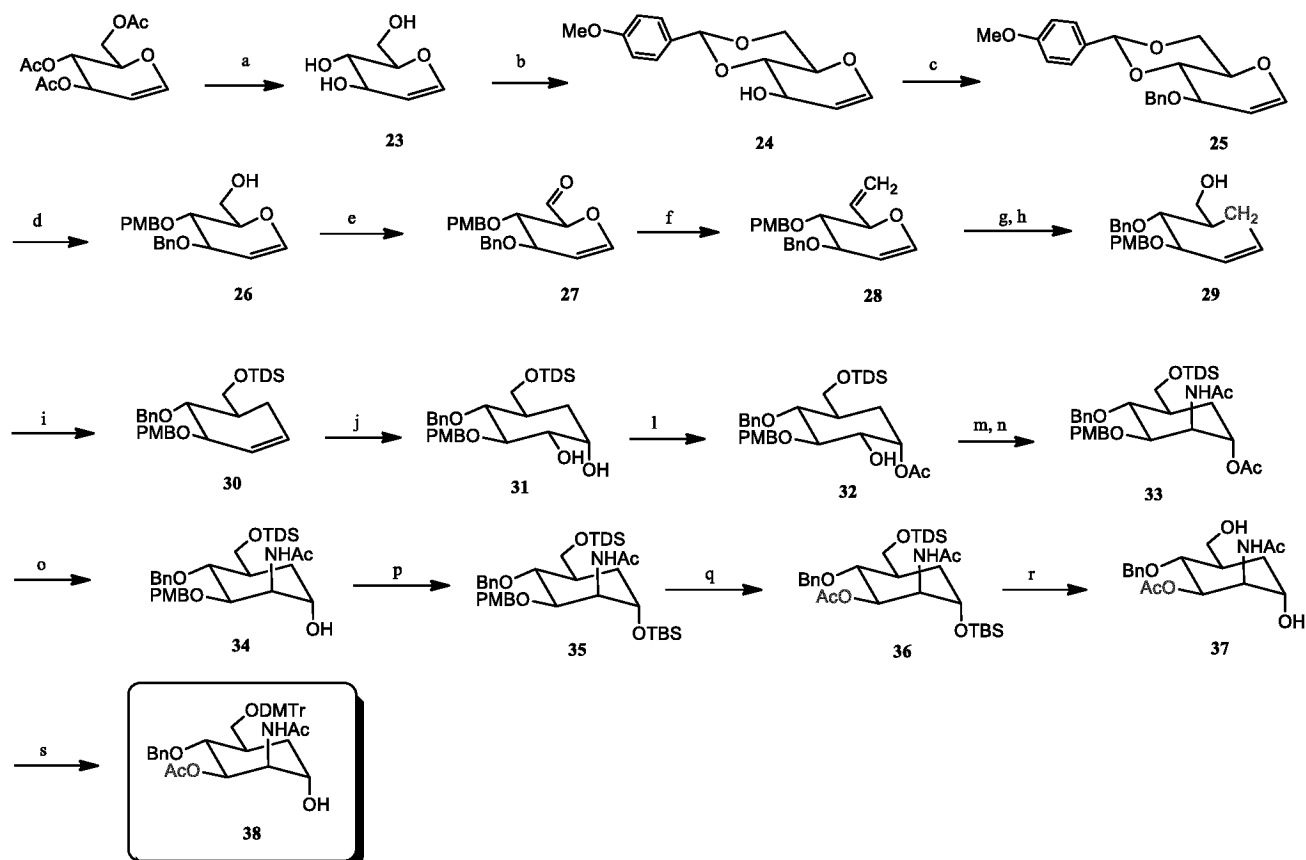


Схема 2. Способ, обеспечивающий получение 3-O-ацетилированного мономерного структурного блока.

(a) K_2CO_3 , MeOH; (b) PMBCH(OMe)₂, PTS; (c) BnBr, NaH; (d) DIBAL-H, DCM; (e) DMP, DCM; (f) PPh₃CH₃I, KHMDS, THF, -78°C; (g) м-дихлорбензол, t, μ -волны; (h) NaBH₄, EtOH/THF; (i) TDSCl, Im, DCM; (j) OsO₄, TMANO, 3:1 ацетон-H₂O; (l) (MeO)₃Cme, PTSA, CAN, затем 80% AcOH; (m) Tf₂O, DCM/пу, от -20°C до к.т.; затем NaN₃, 19:1 DMF-H₂O; (n) PPh₃, THF, 60°C, H₂O; затем Ac₂O, MeOH; (o) NaOMe/MeOH; (p) TBSOTf, 2,6-лутидин, DCM; (q) DDQ, затем Ac₂O, пу; (r) HF/пиридин, THF; (s) DMTrCl, пиридин, DCM.

В качестве альтернативы, 3-О-ацетилированные мономерные структурные блоки и 4-О-ацетилированные структурные блоки могут быть получены с помощью способа, изображенного на следующей схеме 3:

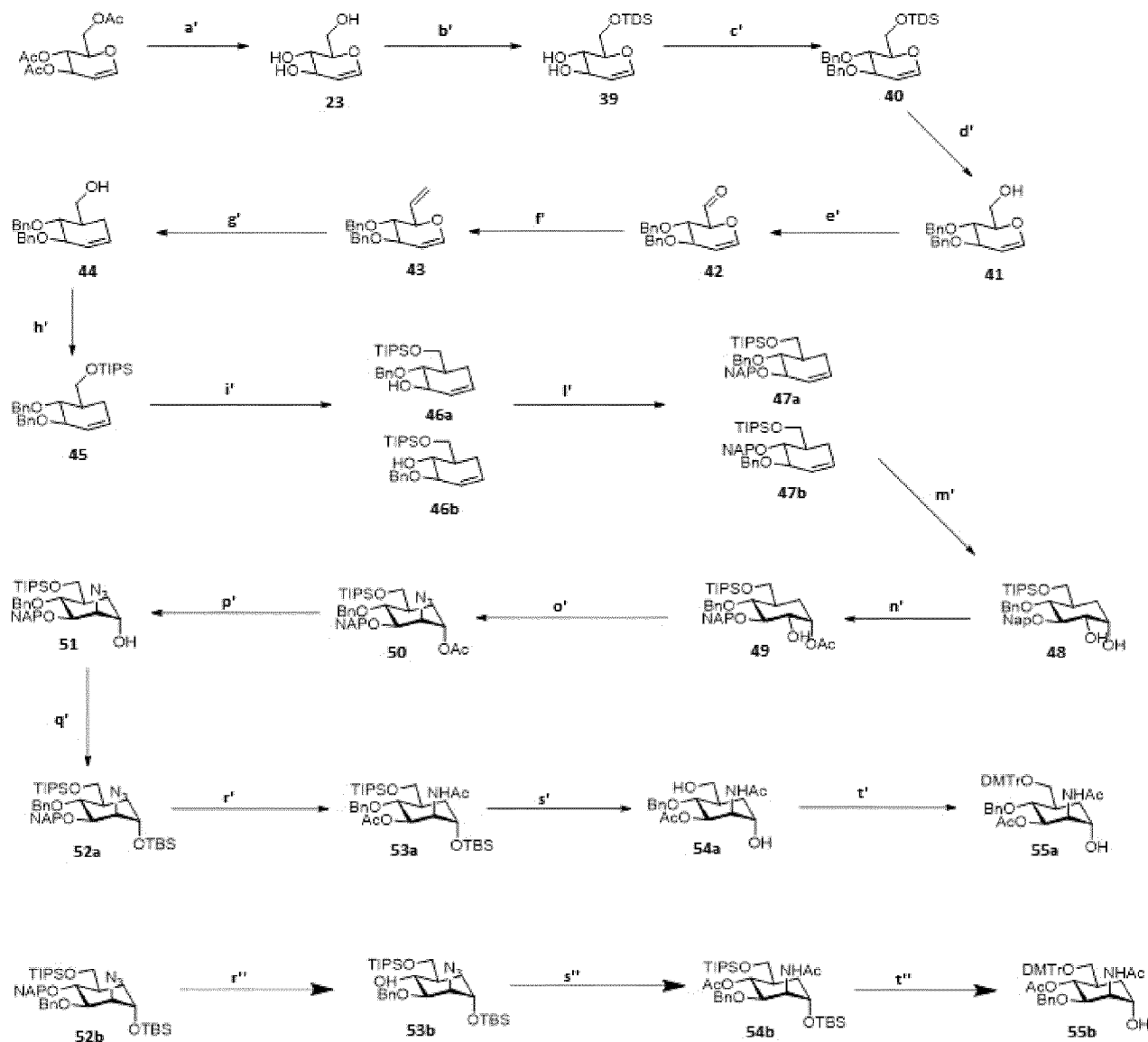


Схема 3. Способ, обеспечивающий получение 3-О-ацетилированного и 4-О-ацетилированного мономерного структурного блока.

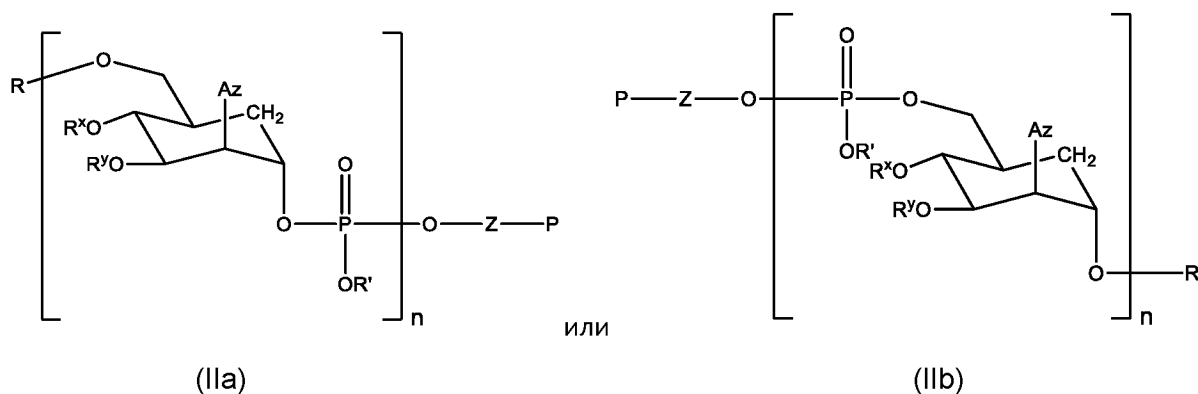
(a') K_2CO_3 , MeOH; (b') TDSCl, имидазол, DMF, $-30^\circ C$; (c') BnBr, NaH, DMF, $0^\circ C$; (d') TBAF, THF; (e') IBX, AcOEt; (f') PPh_3CH_3I , KHMDS, THF, от $-78^\circ C$ до к.т.; (g') 1,3-дихлорбензол, $NaBH_4$, EtOH/THF, $230^\circ C$; (h') TIPSCl, имидазол, DMF; (i') $TiCl_4$, DCM/толуол 2:8, $-70^\circ C$; (l') NapBr, NaH, DMF, $0^\circ C$; (m') $Me_3NO \cdot 2H_2O$, ацетон/ H_2O 3:1, OsO_4 ; (n') $(MeO)_3CMe$, PTSA, ACN; (o') Tf_2O , DCM/Py, от $-20^\circ C$ до к.т.; затем NaN_3 , 19:1 DMF- H_2O ; (p') NaOMe, MeOH; (q') TBSOTf, $-10^\circ C$ до $70^\circ C$, Pyr, DMAP; (r') Pd/C, H_2 ,

AcOH, затем Ac₂O, Pyr; (s') HF pyr, Pyr; (t') DMTrCl, Pyr, 0°C; (r'') DDQ, DCM, H₂O; (s'') PPh₃, H₂O, THF, затем DMTrCl, Pyr.

Ацетилированные структурные блоки **38**, **55a**, **55b** и полностью ацетилированные структурные блоки (то есть имеющие группы О-Ас как в положении С3, так и С4 в рамках одного звена) могут быть преобразованы в олигомерные варианты путем превращения в фосфоримидат и последующего связывания, как описано выше в отношении соединения **9**.

Важным условием иммуногенности карба-аналогов согласно настоящему изобретению является их способность имитировать соответствующий капсульный сахарид MenA. Для исследования этого был проведен конкурентный ELISA с применением карба-аналогов с различной степенью полимеризации.

Олигомеры согласно настоящему изобретению могут быть введены хозяину, включая хозяина-млекопитающего и предпочтительно хозяина-человека, либо сами по себе, либо связанными с белком-носителем, либо в виде гомополимера или гетерополимера звеньев карба-аналога маннозы. В конкретном воплощении олигомеры согласно настоящему изобретению используют в виде конъюгатов с белками. Таким образом, в следующем аспекте настоящее изобретение включает конъюгированное производное, содержащее олигомеры согласно настоящему изобретению формулы (I), соединенные с белком в соответствии с общей формулой (IIa) или (IIb):



где n, Az, R, R', R^x и R^y являются такими, как определено выше;

Z представляет собой линкер или связь; и

P представляет собой белок.

Олигомеры общей формулы (Ia) или (Ib) особенно полезны, когда они конъюгированы с белком, предпочтительно через фрагмент Z, соединенный с атомом углерода C-1 первого повторяющегося звена через фосфатный фрагмент. Полученные таким образом конъюгированные производные формулы (IIa) или (IIb) олигомер-белок

потенциально полезны для получения композиций, способных вызывать иммуногенные ответы у младенцев, а также, возможно, способных вызывать клеточные ответы, которые обеспечивают эффект памяти для продления эффективности вакцинации.

В одном из воплощений конъюгат олигомера предпочтительно определен формулой (IIa), где белок конъюгирован в положении 1, а не в положении 6 карба-аналога.

Белок (или белок-носитель) может влиять на иммуногенный ответ и даже влиять на конкретные свойства антител, которые образуются в результате лечения млекопитающего одним или более чем одним соединением согласно настоящему изобретению при доставке в виде конъюгатов. Подходящими белками являются белки, которые имеют функциональные группы, способные взаимодействовать с концевой частью фрагмента Z с получением, таким образом, конъюгатов производных согласно настоящему изобретению. Предпочтительно указанные функциональные группы выбраны из $-NH_2$ и $-SH$, которые могут быть присоединены к фрагменту Z с получением амидной связи или простого тиоэфира. Более предпочтительно белок имеет группы $-NH_2$, подходящие для получения амидной связи при взаимодействии с Z.

Подходящие для применения белки хорошо известны в данной области техники. Однако в одном из воплощений Р представляет собой инактивированный бактериальный токсин, выбранный из дифтерийного анатоксина (DT), столбнячного анатоксина (TT), CRM₁₉₇, ST *E. coli* и экзотоксина *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA), или Р представляет собой полиаминокислоту, такую как поли(лизин:глутаминовая кислота), или Р представляет собой коровый белок вируса гепатита В или SPR96-2021, или антиген fHbp-231 серогруппы В *N. meningitidis* (то есть слитый белок варианта 2, варианта 3 и варианта 1 связывающего фактор Н белка (fHbp), как определено в WO 2015/128480, который настоящим включен в настоящий документ посредством ссылки).

В одном из воплощений Р представляет собой TT, DT или CRM₁₉₇.

В конкретном воплощении Р представляет собой CRM₁₉₇.

Как определено выше, согласно формуле (IIa) или (IIb), Z представляет собой линкер или связь. Когда Z представляет собой линкер, он может быть получен из любого подходящего линкера, известного в данной области техники, который подходит для конъюгирования олигосахарида с белком.

Другими словами, Z в непрореагировавшей форме, то есть когда он не связан с олигомером и белком, может иметь функциональные группы, позволяющие ему

выполнять функцию линкера между олигомерами согласно настоящему изобретению и белком, так что Z представляет собой функциональный линкер (как определено согласно формуле (Ia) и формуле (Ib)). Предпочтительно Z получают из соединения, содержащего аминную, карбоксилатную или гидроксильную группу для сочетания с комплементарной группой белка-носителя, но также рассматриваются другие группы, известные в данной области техники для обеспечения способа конъюгирования олигосахарида с белком.

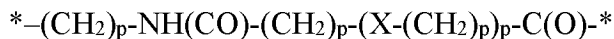
Когда олигомеры согласно настоящему изобретению конъюгированы с белком, предпочтительный фрагмент Z в формуле (IIa) или (IIb) является производным линкера, который представляет собой аминзамещенную алкоксигруппу, возможно в защищенной форме. В этой форме амин ацетилирован или алкилирован бифункциональным реагентом, другой конец которого схожим образом присоединен к белку.

В одном из воплощений, согласно формуле (IIa) или (IIb), Z является производным линкера, либо гомобифункционального, либо гетеробифункционального, способного соединять олигомер согласно настоящему изобретению с белком. С этой точки зрения бифункциональные линкеры, подходящие для применения в конъюгатах согласно настоящему изобретению, включают линкеры, известные в данной области техники, такие как дикарбоновые кислоты, предпочтительно малоновая, янтарная, адипиновая и субериновая кислоты, или их активированные формы. В качестве альтернативы могут быть применены сложные эфиры сквариковой кислоты. Эти типы реагентов особенно удобны для связывания с белком соединения, в котором спейсерный фрагмент содержит амин. Предпочтительно указанные бифункциональные линкеры являются производными N-гидроксисукцинимидного сложного диэфира адипиновой кислоты (SIDEA) и BS(PEG)5.

В некоторых воплощениях Z имеет длину по меньшей мере два или три атома. Некоторые неограничивающие примеры линкеров включают: $-(CH_2)_m-A$, $-Ph-A$, $-(CH_2)_a-Ph-(CH_2)_a-A$ и их замещенные формы, где каждый Ph представляет собой возможно замещенную фенильную группу, и каждый из a и m независимо представляет собой целое число от 1 до 10. «A» представляет собой функциональную группу или ее остаток, способный связываться с белком, например, $-NH_2$, $-OH$ или $-SH$, сложноэфирную, амидную или другую карбоксил-содержащую группу, диен или диенофил, малеимид, алкин, циклоалкин. Z может содержать OR' , SR' или $N(R')_2$, где

каждый R' независимо представляет собой Н или C₁-C₆-алкильную, ацильную, арильную, арилалкильную, гетероацильную, гетероарильную или гетероарилалкильную группу, и может дополнительно содержать А.

В одном из воплощений Z в формуле (IIa) или (IIb) представляет собой гетеробифункциональный линкер, имеющий следующую формулу:



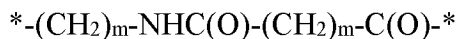
где * обозначает точку присоединения, и где

p независимо выбран из целых чисел от 1 до 10; и

X выбран из -O-, -S- и -NH-.

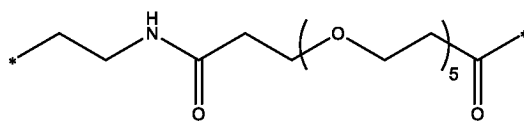
В одном из воплощений Z имеет формулу $*(\text{CH}_2)_6\text{NHCO}(\text{CH}_2)_4\text{CO}*$.

В другом воплощении Z представляет собой линкер, имеющий следующую формулу:



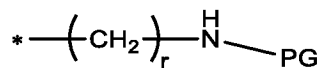
где * обозначает точку присоединения, и где m независимо выбран из целых чисел от 1 до 10.

В альтернативном воплощении Z имеет следующую формулу:



Линкер Z, как правило, вводят в мономер, подлежащий связыванию с белком, до присоединения удлиняющих мономеров, и возможно вводят в защищенной форме, чтобы он не воздействовал на последующие реакции удлинения и не участвовал в них.

Следовательно, в одном из воплощений Z представляет собой двухвалентный линкер, имеющий общую формулу:

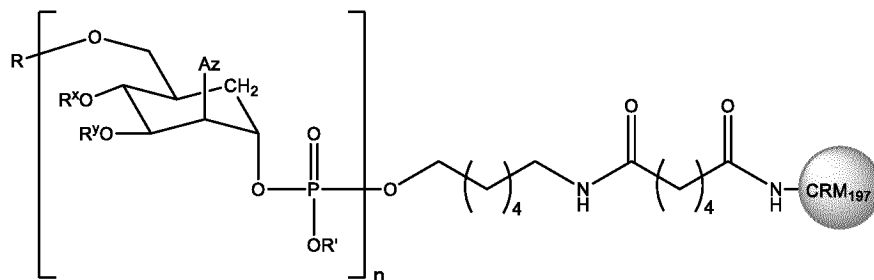


где r представляет собой целое число от 2 до 6, (*) представляет собой точку присоединения к олигомеру, и PG представляет собой атом водорода или защитную группу, предпочтительно выбранную из: алкоксикарбонила, метоксикарбонила, *m*-бутилоксикарбонила или бензилоксикарбонила. Белок присоединяется через амин.

Если PG присутствует, он может быть соответствующим образом удален для обеспечения взаимодействия фрагмента Z с белком с получением его конъюгата. В качестве альтернативы, PG может быть удален, и полученная таким образом свободная

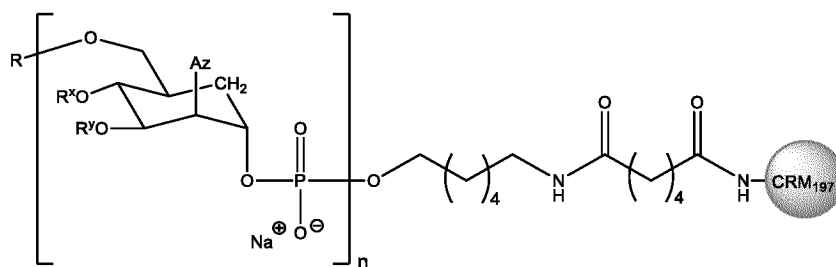
аминогруппа может быть дополнительно функционализирована, например, путем введения дополнительных спейсерных фрагментов, подходящих для соединения с белком.

В одном из воплощений предложен конъюгат олигомера согласно следующей формулы:



где n , Az, R, R', R^x и R^y являются такими, как определено выше.

В одном из воплощений настоящего изобретения предложен конъюгат олигомера согласно следующей формуле, то есть в котором R' представляет собой Na⁺:



где n , Az, R, R^x и R^y являются такими, как определено выше.

Когда представленный конъюгат произвольно ацетилированного олигомера вводят в композицию вакцины, он демонстрирует более высокую стабильность процента ацетилирования, чем конъюгат нативного MenA, при этом менее 5% ацетилирования может быть утрачено при включении указанного карба-аналога в состав вакцины.

Во избежание сомнений следует отметить, что олигомеры согласно настоящему изобретению могут быть конъюгированы с белком любым подходящим способом, известным в данной области техники, например, в соответствии со способами, которые приведены в "The design of semi-synthetic and synthetic glycoconjugate vaccines", P. Constantino et al., *Expert Opin. Drug. Discov.*

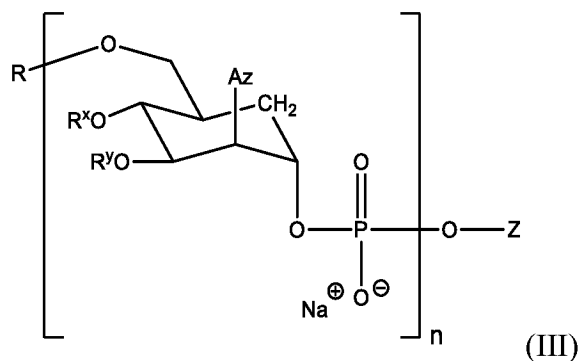
Реакция конъюгирования также может быть осуществлена с применением способов конъюгирования, подобных тем, которые применяют для конъюгирования сахара MenA с белком-носителем, и, например, описаны в WO 2004/067030. В одном из воплощений олигомеры согласно настоящему изобретению могут быть соединены с

CRM₁₉₇ с применением процедуры конъюгирования, в которой эффективно применяют ди-N-гидроксисукцинимидиладипатный линкер, описанной, например, в Berti et al., ACS Chem. Biol., 2012, 7, 1420-1428. После обработки выбранным линкером в DMSO, содержащем триметиламин, полученные активированные олигомеры могут быть очищены методом совместного осаждения с ацетоном и использованы для конъюгирования. Таким образом, целевой неоконъюгат может быть получен путем инкубирования в течение ночи с CRM₁₉₇ при молярном отношении олигомер/белок 100:1. Указанное конъюгирование может предполагать активацию олигомера формулы (Ia)/(Ib) с последующим конъюгированием с выбранным белком или активацию соответствующей функциональной группы белка и последующее конъюгирование с олигосахаридами согласно настоящему изобретению, как правило, через фрагмент Z. Таким образом, согласно одному из воплощений олигомеры согласно настоящему изобретению сначала активируют подходящим активирующим агентом, после чего осуществляют связывание с остатком -NH₂ выбранного белка в соответствии со способами, известными в данной области техники.

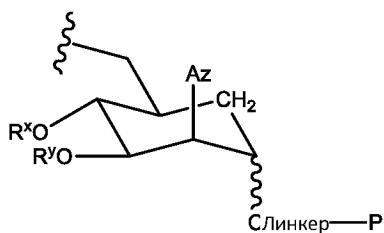
В одном из воплощений группу Z активируют путем взаимодействия с первой концевой частью линкера, в результате чего другой конец линкера может быть соединен с выбранным белком. Например, согласно одному из воплощений указанный способ может включать активацию олигомеров согласно настоящему изобретению с помощью SIDEA в присутствии триэтиламина с получением активированного сложного эфира исходного олигомера. Затем такой активированный сложный эфир может быть приведен во взаимодействие с CRM₁₉₇ в присутствии фосфонатного буфера с получением целевого конъюгата.

После конъюгирования конъюгат олигомер-белок может быть очищен с помощью различных методик, известных в данной области техники. Одной из целей стадии очистки является удаление несвязавшихся олигомеров из конъюгата олигомер-белок. Как правило, конъюгаты согласно настоящему изобретению могут быть очищены от непрореагировавших белка и олигомеров с помощью любого числа стандартных методик, включая, среди прочего, эксклюзионную хроматографию, центрифугирование в градиенте плотности, хроматографию гидрофобного взаимодействия или фракционирование с применением сульфата аммония, как описано, например, в источниках Anderson, P.W., *et al.* J. Immunol. (1986) 137:1181-1186, и Jennings, H.J. *et al.*, J. Immunol. (1981) 127:1011-1018.

В дополнительном воплощении Z может представлять собой моносахарид, предпочтительно маннозамин, как описано ниже. Таким образом, в следующем воплощении настоящее изобретение также относится к олигомерам, имеющим следующую формулу (III), где:

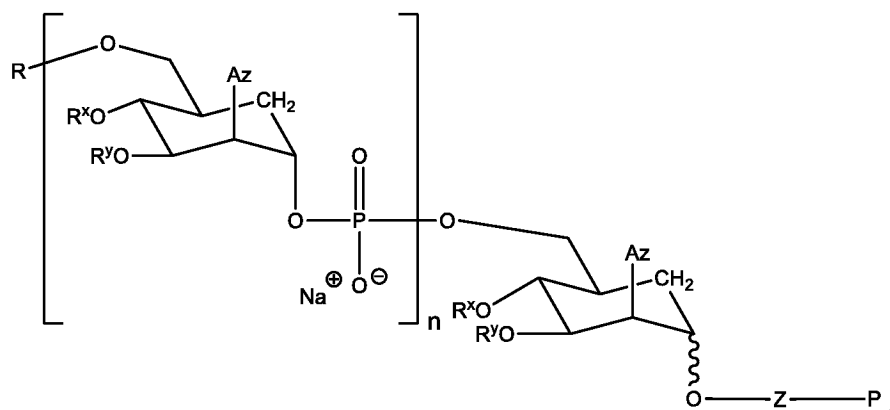


где R, Az и n являются такими, как определено выше, и Z представляет собой:



и P и линкер являются такими, как определено выше в отношении определения Z для формул (I) и (II).

Например, пример конъюгата, определенного таким образом, выглядит следующим образом:



Согласно этому воплощению производные согласно настоящему изобретению могут быть связаны с выбранным белком непосредственно через фрагмент -О-линкер Z, что приводит к получению производных конъюгатов, имеющих фрагмент -Олинкер--P, непосредственно связанный с атомом углерода конечного мономера. Что касается

линкера, то он может представлять собой любой подходящий двухвалентный линкер в соответствии с указанными выше линкерами Z. В качестве альтернативы, Z может представлять собой амин для конъюгирования с белком, дериватизированным линкерами, содержащими кетогруппу или альдегидную группу.

Конъюгированный антигенный компонент серогрупп C, W135 и Y

Иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению содержат капсульные сахаридные антигены из каждой из серогрупп менингококка C, W135 и Y, при этом указанные антигены конъюгированы с белком-носителем (белками-носителями) и/или представляют собой олигосахариды. Капсульные сахараиды могут быть использованы в форме олигосахаридов. Их удобно получать путем фрагментации очищенного капсульного полисахарида (например, путем гидролиза), после чего обычно следует очистка фрагментов требуемого размера.

Во избежание сомнений, термин «капсульные полисахариды/сахариды» (CPS) обозначает те сахараиды, которые расположены в слое, лежащем с наружной стороны клеточной оболочки бактерий, и таким образом, являются частью наружной оболочки самой бактериальной клетки. CPS экспрессируются на самой наружной поверхности широкого спектра бактерий, и в некоторых случаях даже у грибов.

Значение термина «олигосахарид» охватывает полисахариды, содержащие от 3 до 10 моносахаридных звеньев, что является общеизвестным в данной области техники (см., например, <https://en.wikipedia.org/wiki/Oligosaccharide>).

В целом, конъюгирование повышает иммуногенность сахаридов, поскольку оно превращает их из Т-независимых антигенов в Т-зависимые антигены, что позволяет инициировать иммунологическую память. Конъюгирование особенно полезно для педиатрических вакцин и представляет собой хорошо известную методику.

Методики получения капсульных полисахаридов из менингококков известны уже много лет (см., например, WO2005/032583 и WO03/007985).

Типичными белками-носителями являются бактериальные токсины, такие как дифтерийный или столбнячный токсины, или анатоксины, или их мутантные формы. Мутант дифтерийного токсина CRM₁₉₇ [сообщение об исследовании (*Research Disclosure*) № 453077 (январь 2002 г.)] пригоден для использования и является носителем в вакцине против *Streptococcus pneumoniae*, продаваемой под торговым наименованием PREVNAR™. Другие подходящие белки-носители включают белковый комплекс наружной мембраны *N. meningitidis* [EP-A-0372501], синтетические пептиды [EP-A-

0378881, EP-A-0427347], белки теплового шока [WO93/17712, WO94/03208], белки возбудителя коклюша [WO98/58668, EP-A-0471177], цитокины [WO91/01146], лимфокины [WO91/01146], гормоны [WO91/01146], факторы роста [WO91/01146], искусственные белки, содержащие множественные эпитопы CD4⁺ Т-клеток человека из различных антигенов патогенного происхождения [Falugi *et al.* (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824], такие как N19 [Baraldo *et al.* (2004) *Infect Immun* 72(8):4884-7], белок D из *H.influenzae* [EP-A-0594610, Ruan *et al.* (1990) *J Immunol* 145:3379-3384], пневмолизин [Kuo *et al.* (1995) *Infect Immun* 63:2706-13] или его нетоксичные производные [Michon *et al.* (1998) *Vaccine* 16:1732-41], поверхностный белок пневмококка PspA [WO02/091998], белки захвата железа [WO01/72337], токсин А или В *C.difficile* [WO00/61761], рекомбинантный экзопротеин А *P.aeruginosa* (rEPA) [WO00/33882] и так далее.

Может быть использована любая подходящая реакция конъюгирования с любым подходящим линкером, если это необходимо.

Сахарид, как правило, активируют или функционализируют, после чего осуществляют конъюгирование. Активация может быть проведена с применением, например, цианилирующих реагентов, таких как CDAP (например, тетрафторборат 1-циано-4-диметиламинопиридиния [Lees *et al.* (1996) *Vaccine* 14:190-198, WO95/08348 *etc.*]). В других подходящих методиках применяют карбодиимиды, гидразиды, активные сложные эфиры, норборан, *n*-нитробензойную кислоту, N-гидроксисукцинимид, S-NHS, EDC, TSTU и так далее.

Присоединение через линкерную группу может быть выполнено с применением любой известной процедуры, например, процедур, описанных в US 4882317 и US 4695624. Один из типов связывания включает восстановительное аминирование полисахарида, связывание полученной аминогруппы с одним концом линкерной группы адипиновой кислоты, и затем связывание белка с другим концом линкерной группы адипиновой кислоты [Porro *et al.* (1985) *Mol Immunol* 22:907-919, EP0208375]. Другие линкеры включают В-пропионамидо [WO00/10599], нитрофенилэтиламин [Gever *et al.* *Med. Microbiol. Immunol*, 165: 171-288 (1979)], галогенацилгалогениды [US 4057685], гликозидные связи [US 4673574; US 4761283; US 4808700], 6-аминокапроновую кислоту [US 4459286], ADH [US 4965338], C₄-C₁₂ группировки [US 4663160] и так далее. В качестве альтернативы применению линкера можно использовать непосредственное связывание. Непосредственное связывание с белком

может включать окисление полисахарида с последующим восстановительным аминированием белком, как описано, например, в US 4761283 и US 4356170.

Предпочтительным является способ, включающий введение аминогрупп в сахарид (например, путем замены концевых групп $=O$ на $-NH_2$) с последующей дериватизацией адипиновым сложным диэфиром (например, N-гидроксисукцинимидоэфиром адипиновой кислоты) и реакцией с белком-носителем. В другой предпочтительной реакции используют активацию CDAP с помощью носителя-белка D, например, для MenC.

Имеющиеся в настоящее время вакцины против серогруппы C (Менюгейт (Menjugate™ [Costantino *et al.* (1992) *Vaccine* 10:691-698, Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49], Meningitec™ и NeisVac-C™) содержат конъюгированные сахараиды. Менюгейт (Menjugate™) и Meningitec™ содержат олигосахаридные антигены, конъюгированные с носителем CRM₁₉₇, тогда как в NeisVac-C™ используют полный полисахарид (де-О-ацетилованный), конъюгированный с носителем - столбнячным анатоксином.

Все вакцинные продукты, реализуемые под торговыми наименованиями Менвео, Менактра и Нименрикс, содержат конъюгированные капсульные сахаридные антигены каждой из серогрупп Y, W135, C и A.

В Менвео (также в общем случае известном как менингококковая (группы A, C, Y и W-135) олигосахаридная конъюгированная с дифтерийным белком CRM₁₉₇ вакцина) каждый из антигенов A, C, W135 и Y конъюгирован с носителем CRM₁₉₇.

В одном из предпочтительных воплощений настоящего изобретения каждый из олигосахаридных антигенов серогруппы C, W135 и Y конъюгирован с CRM₁₉₇. Предпочтительно каждый из конъюгированных капсульных сахаридных антигенов серогрупп C, W135 и Y соответствует конъюгированным с CRM₁₉₇ антигенным компонентам серогрупп C, W135 и Y разрешенной к применению вакцины Менвео.

В Менактре (MENACTRA) (также в общем случае известной как менингококковая (группы A, C, Y и W-135) полисахаридная конъюгированная с дифтерийным анатоксином вакцина) каждый из антигенов A, C, W135 и Y конъюгирован с носителем - дифтерийным анатоксином.

В одном из предпочтительных воплощений настоящего изобретения каждый из олигосахаридных антигенов серогруппы C, W135 и Y конъюгирован с носителем - дифтерийным анатоксином. Предпочтительно каждый из конъюгированных капсульных

сахаридных антигенов серогрупп С, W135 и Y соответствует конъюгированным с носителем - дифтерийным анатоксином антигенным компонентам серогрупп С, W135 и Y разрешенной к применению вакцины Менактра.

В Нименриксе (также в общем случае известном как конъюгированная вакцина, содержащая менингококковые полисахариды групп А, С, W-135 и Y) каждый из антигенов А, С, W135 и Y конъюгирован с носителем - столбнячным анатоксином.

В одном из предпочтительных воплощений настоящего изобретения каждый из олигосахаридных антигенов серогруппы С, W135 и Y конъюгирован с носителем - столбнячным анатоксином. Предпочтительно каждый из конъюгированных капсульных сахаридных антигенов серогрупп С, W135 и Y соответствует конъюгированным с носителем - столбнячным анатоксином антигенным компонентам серогрупп С, W135 и Y разрешенной к применению вакцины Нименрикс.

Антигенный компонент серогруппы В

Вакцинный продукт Бексеро (также известный как C4MenB) содержит препарат OMV из эпидемического штамма менингококка группы NZ98/254, B:4:P1.7b,4. Такие же OMV присутствуют в вакцине MeNZB™ и упоминаются в настоящем документе как OMVnz. Кроме того, Бексеро содержит пять менингококковых антигенов: NHBA (287; субвариант 1.2), fHbp (741; субвариант 1.1), NadA (961; субвариант 3.1), GNA1030 (953) и GNA2091 (936). Четыре из этих антигенов представлены в виде слитых белков (слитый белок NHBA-GNA1030 (287-953) и слитый белок GNA2091-fHbp (936-741)). Доза Бексеро (BEXSERO®) объемом 0,5 мл содержит 50 мкг каждого из NHBA, NadA и fHbp, адсорбированных на 1,5 мг адьюванта - гидроксида алюминия, и 25 мкг OMV из штамма NZ98/254 *N. meningitidis*. Бексеро описан в литературе (например, см. Bai *et al.* (2011) *Expert Opin Biol Ther.* 11:969-85, Su & Snape (2011) *Expert Rev Vaccines* 10:575-88).

В одном из предпочтительных воплощений антигенный компонент серогруппы В иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению содержит один или более чем один белковый антигенный компонент Бексеро.

В одном из предпочтительных воплощений иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению содержит все менингококковые антигенные компоненты Бексеро, описанные выше (белковые антигены и OMV).

В еще одном предпочтительном воплощении иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению содержит полный вакцинный продукт, реализуемый под торговым наименованием Бексеро.

В еще одном предпочтительном воплощении иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению содержит один или более чем один антиген fHbp, который отличаются от компонента Бексера fHbp v1.1. Предпочтительно дополнительные антигены fHbp находятся в форме слитого полипептида fHbp 231. Предпочтительно дополнительные антигены fHbp представляют собой антигены, раскрытые в WO 2020/030782. Этот антигенный компонент fHbp может быть включен в иммуногенную композицию согласно настоящему изобретению в качестве единственного антигенного компонента MenB композиции или, что более предпочтительно, в дополнение к одному или более чем одному антигену Бексера или полному вакцинному продукту Бексера.

Липопротейн, представляющий собой связывающий фактор Н белок (fHbp), экспрессируется на поверхности всех штаммов MenB. fHbp связывается с регулирующим комплемент белком - фактором Н человека (hfn), образуя комплекс, который защищает бактерии от комплемент-опосредованного уничтожения и обеспечивает механизм выживания *N. meningitidis* в кровотоке человека. Антитела против fHbp выполняют двойную роль: они являются бактерицидными сами по себе, а также, предотвращая связывание с hfn, делают штаммы более восприимчивыми к уничтожению бактерий. Снижение или устранение способности fHbp связываться с hfn повышает иммуногенность антигена fHbp за счет предупреждения образования защитных комплексов между fHbp и hfn, которые потенциально могут маскировать эпитопы fHbp и предотвращать связывание антител.

fHbp существует в трех различных генетических и иммуногенных вариантах (v1, v2 и v3) с рядом субвариантов. Большинство штаммов MenB, которые не охватываются Бексера, экспрессируют fHbp в субвариантах v2, v3 или v1, имеющих низкую степень родства с var1.1 (var1.1 представляет собой антиген fHbp, включенный в Бексера).

В WO2020/030782 описаны полипептиды мутантного варианта 1 (v1) fHbp, которые являются иммуногенными и могут быть объединены с существующими менингококковыми вакцинами с обеспечением улучшенного охвата штаммов *N. meningitidis*. В частности, эти полипептиды v1 представляют собой субварианты варианта 1 fHbp, которые генетически отличаются от антигена fHbp v1.1, включенного в Бексера.

Кроме того, полипептиды v1, раскрытые в WO2020/030782, подвергнуты мутациям для уменьшения связывания с hfn по сравнению с соответствующим

полипептидом v1 дикого типа. Напротив, антиген fHbp v1.1, включенный в Бексеро, и антигены fHbp v1.55 и v3.45, включенные в Труменба (TRUMENBA), связываются с hfH.

Полипептиды v1, раскрытые в WO2020/030782, могут быть обеспечены сами по себе или в виде компонента слитого белка совместно с мутантными формами вариантов 2 и 3 fHbp, которые были модифицированы для повышения стабильности, а также для уменьшения связывания fHbp. Путем обеспечения единого слитого белка, содержащего эти антигены v2 и v3 совместно с антигеном v1 согласно настоящему изобретению, авторы настоящего изобретения увеличивают охват штаммов. Для ясности, ни один из антигенов v2 и v3 не представлены, например, в Бексеро. Присутствие антигенов v2 и v3 в слитых белках согласно настоящему изобретению увеличивает охват штаммов по сравнению, например, с Бексеро.

Полипептиды v1 и слитые белки предпочтительно применяют в комбинации с менингококковым антигеном NHBA, менингококковым антигеном NadA, менингококковым антигеном fHbp и везикулами наружной мембраны менингококка (например, в комбинации с композицией Бексеро) с получением комбинированной иммуногенной композиции, обладающий повышенной иммуногенностью (за счет добавления/включения несвязывающих форм вариантов fHbp) и увеличенным охватом штаммов *N. meningitidis* серотипа B (за счет добавления новых вариантов/субвариантов fHbp) по сравнению с одним Бексеро отдельно.

Мутантные менингококковые полипептиды fHbp v1.13

Авторы изобретения WO2020/030782 выявили остатки в последовательности fHbp v1.13, которые можно модифицировать для уменьшения связывания с hfH. В настоящем документе такие мутанты обозначены как несвязывающие (NB) мутанты. Авторы указанного изобретения также выявили комбинации мутаций в последовательности v1.13, которые особенно полезны для уменьшения связывания с hfH. fHbp v1.13 также известен в данной области техники как вариант fHbp B09.

Зрелый липопротеин fHbp v1.13 дикого типа из штамма M982 (номер доступа в GenBank AAR84475.1) имеет следующую аминокислотную последовательность, подчеркнута N-концевая сигнальная полиглициновая последовательность:

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQ
GAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTAL
QTEQVQDSEDSGKMOVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGK

LTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYS
LGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ (SEQ ID NO: 1)

Зрелый липопроtein v1.13 отличается от полноразмерной последовательности дикого типа тем, что полноразмерный полипептид имеет дополнительную N-концевую лидерную последовательность из 19 остатков, которая отщепляется от зрелого полипептида. Таким образом, полноразмерный fHbp v1.13 дикого типа имеет следующую аминокислотную последовательность (жирным шрифтом выделена N-концевая лидерная последовательность):

MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLD
QSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGKLITLES
GFEQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSAT
YRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVIS
GSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ (SEQ ID NO: 31)

В ΔG-форме зрелого липопроteина v1.13 отсутствует N-концевая полиглициновая последовательность зрелого полипептида, то есть отсутствуют первые 7 аминокислот SEQ ID NO: 1, и отсутствуют первые 26 аминокислот SEQ ID NO: 31.

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQD
SEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQA
QEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ (SEQ ID NO: 2)

Следовательно, в одном из воплощений антигенный компонент серогруппы В иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению содержит мутантный менингококковый полипептид fHbp v1.13, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере $k\%$ идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, при условии, что указанная аминокислотная последовательность указанного мутантного менингококкового полипептида fHbp v1.13 содержит мутацию по типу замены в одном или более чем одном из остатков E211, S216 или E232 SEQ ID NO: 2.

Значение k может быть выбрано из 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100. Предпочтительно оно составляет 80 (то есть аминокислотная последовательность мутантного fHbp v1.13 имеет составляющую по меньшей мере 80% идентичность с SEQ ID NO: 2), и более предпочтительно составляет 85, более

предпочтительно 90 и более предпочтительно 95. Наиболее предпочтительно аминокислотная последовательность мутантного fHbp v1.13 имеет составляющую по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с SEQ ID NO: 2.

Предпочтительно указанная аминокислотная последовательность отличается от SEQ ID NO: 2 по меньшей мере одной или более чем одной из замен E211A, S216R и E232A. Наиболее предпочтительно указанная аминокислотная последовательность содержит замены в нескольких остатках, выбранные из следующих: (i) E211A и E232A, или (ii) E211A и S216R. Наиболее предпочтительно указанная аминокислотная последовательность содержит замены в остатках E211A и S216R относительно SEQ ID NO: 2.

Без ограничения какой-либо теорией, замена на аланин (A) глутаминовой кислоты (E) в остатке 211 SEQ ID NO: 2 приводит к удалению отрицательно заряженного остатка, который вовлечен в рекрутировании hfH, тем самым способствуя устранению связывания fH. Замена на серин (S) аргинина (R) в остатке 216 SEQ ID NO: 2 приводит к замене аминокислоты дикого типа на соответствующий остаток из *N. gonorrhoeae*, который не связывает hfH.

В предпочтительных воплощениях мутантный полипептид v1.13 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (v1.13 ΔG E211A/E232A) или SEQ ID NO: 4 (v1.13 ΔG (E211A/S216R)). Более предпочтительно мутантный полипептид v1.13 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Мутантный полипептид v1.13 после введения животному-хозяину, предпочтительно млекопитающему, и более предпочтительно человеку, может индуцировать выработку антител, которые способны распознавать полипептиды менингококка fHbp дикого типа с SEQ ID NO: 1. Наиболее предпочтительно эти антитела являются бактерицидными (см. ниже).

Мутантные менингококковые полипептиды fHbp v1.15

Авторы изобретения WO2020/030782 также выявили остатки в последовательности fHbp v1.15, которые можно модифицировать для предотвращения связывания с hfH. В настоящем документе такие мутанты обозначены как несвязывающие (NB) мутанты. Авторы указанного изобретения выявили комбинации мутаций в последовательности v1.15, которые особенно полезны для предотвращения

связывания с hfH. fHbp v1.15 также известен в данной области техники как вариант fHbp B44.

Зрелый липопроtein fHbp v1.15 дикого типа из штамма NM452 (номер доступа в GenBank ABL14232.1) имеет следующую аминокислотную последовательность, подчеркнута N-концевая сигнальная полиглициновая последовательность:

CSSGGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSSISQNGTLTL
SAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFD FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSH
SALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDV MATYRGTAFGS
DDAGGKLT YTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQ
AEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLA AKQ (SEQ ID NO: 5)

Зрелый липопроtein v1.15 отличается от полноразмерной последовательности дикого типа тем, что полноразмерный полипептид имеет дополнительную N-концевую лидерную последовательность из 19 остатков, которая отщепляется от зрелого полипептида. Таким образом, полноразмерный fHbp v1.15 дикого типа имеет следующую аминокислотную последовательность (жирным шрифтом выделена N-концевая лидерная последовательность):

MNRTTFCCLSLTAALILTACSSGGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHK
DKGLKSLTLEDSSISQNGTLTL**SAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFD**FIRQIE
VDGQLITLESGEFQVYKQSH**SALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTS**
FGKLPKDV MATYRGTAFGS**DDAGGKLT YTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAA**
DIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLA AK
Q (SEQ ID NO: 32)

В ΔG-форме зрелого липопроteина v1.15 отсутствует N-концевая полиглициновая последовательность, то есть отсутствуют первые 12 аминокислот SEQ ID NO: 5, а также отсутствуют первая 31 аминокислота SEQ ID NO: 32.

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSSISQNGTLTL**SAQGAERTFKAG**
DKDNSLNTGKLKNDKISRFD FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSH**SALTALQTEQVQ**
DSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDV MATYRGTAFGS**DDAGGKLT YTIDF**
AAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGG
QAQEVAGSAEVETANGIRHIGLA AKQ (SEQ ID NO: 6)

Следовательно, в одном из воплощений антигенный компонент серогруппы В иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере *k*% идентичности

последовательности с SEQ ID NO: 6, при условии, что указанная аминокислотная последовательность указанного мутантного менингококкового полипептида fHbp v1.15 содержит мутацию по типу замены в одном или более чем одном из остатков E214, S219 или E235 SEQ ID NO: 6

Значение k может быть выбрано из 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100. Предпочтительно оно составляет 80 (то есть аминокислотная последовательность мутантного fHbp v1.15 имеет составляющую по меньшей мере 80% идентичность с SEQ ID NO: 6), и более предпочтительно составляет 85, более предпочтительно 90 и более предпочтительно 95. Наиболее предпочтительно аминокислотная последовательность мутантного fHbp v1.15 имеет составляющую по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с SEQ ID NO: 6.

Предпочтительно указанная аминокислотная последовательность отличается от SEQ ID NO: 6 по меньшей мере одной или более чем одной из замен E214A, S219R и E235A. Наиболее предпочтительно указанная аминокислотная последовательность содержит замены в остатках, выбранные из следующих: (i) S219R, (ii) E214A и S219R, и (iii) E214A и E235A.

В предпочтительных воплощениях мутантный полипептид v1.15 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 (v1.15_S219R), SEQ ID NO: 8 (v1.15_E214A/S219R) или SEQ ID NO: 9 (v1.15_E214A/E235A).

Мутантный полипептид v1.15 после введения животному-хозяину, предпочтительно млекопитающему, и более предпочтительно человеку, может индуцировать выработку антител, которые способны распознавать полипептиды менингококка fHbp дикого типа с SEQ ID NO: 5. В идеале эти антитела являются бактерицидными (см. ниже).

Слитый полипептид

В WO2020/030782 также раскрыт слитый полипептид, содержащий все три менингококковых полипептида fHbp v1, v2 и v3, где варианты последовательности fHbp расположены в порядке v2-v3-v1 от N-конца к С-концу. В одном из предпочтительных воплощений антигенный компонент серогруппы В иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению содержит такой слитый полипептид fHbp.

Предпочтительно слитый полипептид fHbp имеет аминокислотную последовательность формулы $\text{NH}_2\text{—A—}[\text{X—L}]_3\text{—B—COOH}$, где каждый X представляет собой различный вариант последовательности fHbp, L представляет собой необязательную линкерную аминокислотную последовательность, A представляет собой необязательную N-концевую аминокислотную последовательность, и B представляет собой необязательную C-концевую аминокислотную последовательность.

Полипептидный компонент fHbp v1 белка слияния представляет собой либо мутантный полипептид fHbp v1.13, либо мутантный полипептид fHbp v1.13, описанные выше.

Полипептидные компоненты fHbp v2 и v3 слитого белка предпочтительно представляют собой мутантные полипептиды v2 и v3, обладающие повышенной стабильностью и пониженной способностью связываться с hfH по сравнению с полипептидами v2 и v3 дикого типа. Как объяснено выше, снижение связывания fHbp с hfH является преимуществом, поскольку предотвращает образование защитных комплексов между fHbp и hfH, которые могут маскировать эпитопы fHbp, и тем самым повышает иммуногенность полипептидного антигена.

Остатки в последовательностях v2 и v3, которые можно модифицировать для повышения стабильности полипептида, а также для снижения связывания с hfH, были идентифицированы и подробно описаны в WO2015/128480.

Полноразмерный fHbp v2 дикого типа из штамма 2996 имеет следующую аминокислотную последовательность (лидерная последовательность выделена жирным шрифтом, а полиглициновая последовательность подчеркнута):

MNR**TAFCC****SLTAALILTA****CSSGGGGV****AADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQ**
SLTLDQSVRKNEKLKLA**AQGA****EKTYGNGDSLNTGKLKNDK****VS****RFD****FIRQIEVDGQLI**
TLESGEFQIYKQDHS**AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGK**
AEYHGKAFSSDDAGGKLT**YTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQ****NVELAAAELKADEKSH**
AVILGDTRYGSEEKGT**YHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ** (SEQ ID NO: 10)

В зрелом липопротеине отсутствуют первые 19 аминокислот SEQ ID NO: 10:

CSSGGGGV**AADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQ****SLTLDQSVRKNEKLKLA****AQG**
AEKTYGNGDSLNTGKLKNDK**VS****RFD****FIRQIEVDGQLIT****LESGEFQIYKQDHS****AVVALQ**
IEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGK**AEYHGKAFSSDDAGGKLT****YTI**

DFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALF
GDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 11)

В ΔG-форме SEQ ID NO: 10 отсутствуют первые 26 аминокислот:

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSADVVALQIEKINNP
DKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAK
QGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALF
GDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 12)

В одном из предпочтительных воплощений слитый полипептид содержит мутантный полипептид fHbp v2, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере $k\%$ идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12, при условии, что аминокислотная последовательность fHbp v2 содержит мутацию по типу замены в остатках S32 и L123 SEQ ID NO: 12. Предпочтительно указанные замены представляют собой S32V и L123R.

Значение k может быть выбрано из 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100. Предпочтительно оно составляет 80 (то есть аминокислотная последовательность мутантного fHbp v2 имеет составляющую по меньшей мере 80% идентичность с SEQ ID NO: 12), и более предпочтительно составляет 85, более предпочтительно 90 и более предпочтительно 95.

В некоторых воплощениях полипептид fHbp v2, включенный в слитый белок, является укороченным относительно SEQ ID NO: 12. По сравнению со зрелой последовательностью дикого типа SEQ ID NO: 12 уже является укороченной с N-конца, в том числе с исключенной полиглициновой последовательности включительно, (ср. SEQ ID NO: 11 и 12), однако SEQ ID NO: 12 может быть укорочена с C-конца и/или дополнительно укорочена с N-конца.

В одном из предпочтительных воплощений полипептид fHbp v2, включенный в слитый белок, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или состоит из нее.

Полипептид fHbp v2, включенный в слитый белок, в тех же экспериментальных условиях обладает более высокой стабильностью, чем тот же полипептид, но без отличий в последовательности в остатках S32 и L123, например, более высокой стабильностью, чем менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из SEQ ID NO: 10. Мутация S32V стабилизирует структуру за счет введения благоприятных гидрофобных

взаимодействий. Мутация L123R устраняет связывание fH за счет создания конфликтов между fH и неподходящими зарядами.

Повышение стабильности может быть оценено с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), например, как описано в Johnson (2013) *Arch Biochem Biophys* 531:100-9 и Bruylants *et al. Current Medicinal Chemistry* 2005; 12:2011-20. DSC ранее использовали для оценки стабильности fHbp v2 (Johnson *et al. PLoS Pathogen* 2012; 8: e1002981). Подходящие условия для DSC для оценки стабильности могут включать 20 мкМ полипептида в буферном растворе (например, 25 мМ Трис) с pH от 6 до 8 (например, 7-7,5) с добавлением 100-200 мМ NaCl (например, 150 мМ).

Об увеличении стабильности свидетельствует увеличение средней точки теплового перехода (T_m) по меньшей мере на 5°C, например, по меньшей мере на 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C или более, по меньшей мере одного пика по сравнению с полипептидом дикого типа при оценке методом DSC. fHbp дикого типа демонстрирует два пика DSC во время разворачивания (один для N-концевого домена и один для C-концевого домена), и, если полипептид v2, включенный в слитый белок согласно настоящему изобретению, включает оба таких домена, «увеличение стабильности» относится к увеличению T_m N-концевого домена по меньшей мере на 5°C. В случае последовательностей v2 дикого типа T_m N-концевого домена может соответствовать 40°C или даже ниже (Johnson *et al. (2012) PLoS Pathogen* 8: e1002981), тогда как C-концевые домены могут иметь T_m 80°C или более. Так, мутантная аминокислотная последовательность fHbp v2, включенная в слитый белок согласно настоящему изобретению, предпочтительно имеет N-концевой домен с T_m по меньшей мере 45°C, например, большей или равной 50°C, большей или равной 55°C, большей или равной 60°C, большей или равной 65°C, большей или равной 70°C, большей или равной 75°C или даже большей или равной 80°C.

Полноразмерный fHbp v3 дикого типа из штамма M1239 имеет следующую аминокислотную последовательность (лидерная последовательность выделена жирным шрифтом, а полиглициновая последовательность подчеркнута):

MNRTAFCCLSLTALILTACSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHK
 DKGLKSLTLEDSPQNGTLTLAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVQKI
 EVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAF
 NQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAEK

ADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ
(SEQ ID NO: 13)

В зрелом липопротеине отсутствуют первые 19 аминокислот SEQ ID NO: 13:

CSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLED SIPQNGTLTL
SAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVFQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQN
HSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDD
PNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEE
KGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 14)

В Δ G-форме SEQ ID NO: 13 отсутствует первая 31 аминокислота (то есть отсутствуют сигнальная последовательность и полиглициновая последовательность):

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLED SIPQNGTLTL SAQGAEKTFKAG
DKDNSLNTGKLKNDKISRFDVFQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQN HSAVVALQIEKIN
NPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDD PNGRLHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTLEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDR
AQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 15)

В одном из предпочтительных воплощений слитый полипептид содержит мутантный полипептид fHbp v3, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере $k\%$ идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15, при условии, что аминокислотная последовательность fHbp v3 содержит мутации по типу замены в остатках S32 и L126 SEQ ID NO: 15. Предпочтительно указанные замены представляют собой S32V и L126R.

Значение k может быть выбрано из 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100. Предпочтительно оно составляет 80 (то есть аминокислотная последовательность мутантного fHbp v2 имеет составляющую по меньшей мере 80% идентичность с SEQ ID NO: 15), и более предпочтительно составляет 85, более предпочтительно 90 и более предпочтительно 95.

В некоторых воплощениях полипептид fHbp v3, включенный в слитый белок, является укороченным относительно SEQ ID NO: 15. По сравнению со зрелой последовательностью дикого типа SEQ ID NO: 15 уже является укороченной с N-конца, в том числе с исключенной полиглициновой последовательностью включительно (ср. SEQ ID NO: 14 и 15), однако SEQ ID NO: 15 может быть укорочена с C-конца и/или дополнительно укорочена с N-конца.

В одном из предпочтительных воплощений полипептид fHbp v3, включенный в слитый белок, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или состоит из нее.

Полипептид fHbp v3, включенный в слитый белок, в тех же экспериментальных условиях обладает более высокой стабильностью, чем тот же полипептид, но без отличий в последовательности в остатках S32 и L126, например, более высокой стабильностью, чем менингококковый полипептид дикого типа, состоящий из SEQ ID NO: 13. Мутация S32V стабилизирует структуру за счет введения благоприятных гидрофобных взаимодействий. Мутация L126R устраняет связывание fH устраняет связывание fH за счет создания конфликтов между fH и неподходящими зарядами.

Повышение стабильности может быть оценено с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), например, как описано в источнике Johnson (2013) *Arch Biochem Biophys* 531:100-9 and Bruylants *et al.* (2005) *Current Medicinal Chemistry* 12:2011-20. DSC ранее использовали для оценки стабильности fHbp v3 (van der Veen *et al.* (2014) *Infect Immun* PMID 24379280). Подходящие условия для DSC для оценки стабильности могут включать 20 мкМ полипептида в буферном растворе (например, 25 мМ Трис) с pH от 6 до 8 (например, 7-7,5) с добавлением 100-200 мМ NaCl (например, 150 мМ).

Об увеличении стабильности свидетельствует увеличение средней точки теплового перехода (T_m) по меньшей мере на 5°C, например, по меньшей мере на 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C или более, по меньшей мере одного пика по сравнению с полипептидом дикого типа при оценке методом DSC. fHbp дикого типа демонстрирует два пика DSC во время разворачивания (один для N-концевого домена и один для C-концевого домена), и, если полипептид v3, включенный в слитый белок согласно настоящему изобретению, включает оба таких домена, «увеличение стабильности» относится к увеличению T_m N-концевого домена по меньшей мере на 5°C. В случае последовательностей v3 дикого типа T_m N-концевого домена может соответствовать примерно 60°C или менее (Johnson *et al.* (2012) *PLoS Pathogen* 8:e1002981), тогда как C-концевые домены могут иметь T_m 80°C или более. Так, мутантная аминокислотная последовательность fHbp v3 согласно настоящему изобретению, предпочтительно имеет N-концевой домен с T_m по меньшей мере 65°C, например, большей или равной 70°C, большей или равной 75°C или даже большей или равной 80°C.

Как описано выше, в одном из предпочтительных воплощений слитый полипептид fHbp имеет аминокислотную последовательность формулы $\text{NH}_2\text{—A—}[\text{X—L}]_3\text{—B—COOH}$, где каждый X представляет собой различный вариант последовательности fHbp и L представляет собой необязательную линкерную аминокислотную последовательность. В одном из предпочтительных воплощений линкерная аминокислотная последовательность «L» представляет собой глициновый полимерный линкер или глицин-сериновый полимерный линкер.

Примеры линкеров включают, но не ограничиваются ими, «GGSG», «GGSGG», «GSGSG», «GSGGG», «GGGSG», «GSSSG» и «GSGGGG». Другие подходящие глициновые или глицин-сериновые полимерные линкеры будут очевидны специалисту. В предпочтительном слитом полипептиде согласно настоящему изобретению последовательности v2 и v3, а также последовательности v3 и v1 соединены глицин-сериновым полимерным линкером «GSGGGG».

В одном из предпочтительных воплощений слитый полипептид содержит одну из следующих аминокислотных последовательностей или состоит из нее (последовательности глицин-сериновых линкеров подчеркнуты, а подвергнутые мутации остатки выделены жирным шрифтом):

fHbp 23S_1.13_E211A/E232A (SEQ ID NO: 18)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAQAQGAEKTYG
 NGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNP
 DKIDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAK
 QGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRA
 QEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ**GSGGGG**VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSL
 TLEDVIPQNGTLTLAQAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVFQKIEVDGQTI
 TLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGG
 KAEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAELKADEKSH
 AVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ**GSGGGGV**
 AADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGK
 MVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHG
 KIEHLKSPELVNELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDAKGSYSLGIFGGQAQEVAGS
 AAVETANGIHHIGLAQKQ

fHbp 23S_1.13_E211A/S216R (SEQ ID NO: 19)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAAQGAEKTYG
 NGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNP
 DKIDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAK
 QGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRA
 QEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSL
 TLEDVIPQNGTLTLAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVFQKIEVDGQTI
 TLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGG
 KAEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAELKADEKSH
 AVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGV
 AADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNT
 GKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGK
 MVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHG
 KIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDAKGSYRLGIFGGQAQEVAGS
 AEVETANGIHHIGLAAKQ

fHbp_23S_1.15_S231R (SEQ ID NO: 20)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAAQGAEKTYG
 NGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNP
 DKIDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAK
 QGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRA
 QEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSL
 TLEDVIPQNGTLTLAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVFQKIEVDGQTI
 TLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGG
 KAEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAELKADEKSH
 AVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGV
 AADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLAQGAERTFKAGDKDNS
 LNTGKLKNDKISRFDVFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSG
 KMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQG
 HGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYRLGIFGGQAQEV
 AGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

fHbp_23S_1.15_E214A/S219R (SEQ ID NO: 21)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAAQGAEKTYG
 NGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNP
 DKIDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAK

QGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRA
 QEIAGSATVKIGEEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSL
 TLEDVIPQNGTLTLAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVFQKIEVDGQTI
 TLASGEFQIYKQNHSVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGG
 KAEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAEKKADEKSH
 AVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEEKVHEIGIAGKQGSGGGGV
 AADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLAQGAERTFKAGDKDNS
 LNTGKLKNDKISRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSG
 KMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQG
 HGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAAKGSYRLGIFGGQAQEV
 AGSAEVTANGIRHIGLAAKQ

fHbp_23S_1.15_E214A/E235A (SEQ ID NO: 22)

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAAQGAEKTYG
 NGDSLNTGKLKNDKVSRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNP
 DKIDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAK
 QGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRA
 QEIAGSATVKIGEEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSL
 TLEDVIPQNGTLTLAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVFQKIEVDGQTI
 TLASGEFQIYKQNHSVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGG
 KAEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAEKKADEKSH
 AVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEEKVHEIGIAGKQGSGGGGV
 AADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLAQGAERTFKAGDKDNS
 LNTGKLKNDKISRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSG
 KMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQG
 HGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAAKGSYSLGIFGGQAQEV
 AGSAAVETANGIRHIGLAAKQ

В одном из предпочтительных воплощений слитый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 19. В альтернативном предпочтительном воплощении слитый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 18.

Слитый полипептид после введения животному-хозяину, предпочтительно млекопитающему, и более предпочтительно человеку, может индуцировать выработку антител, которые способны распознавать полипептиды менингококка fHbp дикого типа,

в частности, полипептиды с SEQ ID NO: 31, 32, 10 и/или 13. Наиболее предпочтительно эти антитела являются бактерицидными (см. ниже).

Как описано выше, в одном из предпочтительных воплощений слитый полипептид fHbp имеет аминокислотную последовательность формулы $\text{NH}_2\text{—A—}[\text{X-L}]_3\text{—B—COOH}$, где каждый X представляет собой различный вариант последовательности fHbp и A представляет собой необязательную N-концевую аминокислотную последовательность. В предпочтительных воплощениях слитые белки, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат следующую N-концевую аминокислотную последовательность, преимуществом которой является обеспечение эффективной экспрессии слитого белка:

MGPDSDRLQQRR (SEQ ID NO. 34)

Любой из описанных в настоящем документе слитых белков (например, SEQ ID NO: 18-22, 29 и 30) может быть модифицирован с включением аминокислотной последовательности SEQ ID NO. 34 с N-конца слитого полипептида, то есть аминокислотную последовательность SEQ ID NO. 34 добавляют к N-концу компонента fHbp v2 слитого полипептида.

В одном из предпочтительных воплощений антигенный компонент серогруппы В иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению содержит полный вакцинный продукт Бексера совместно со слитым полипептидом fHbp, определенным выше. Наиболее предпочтительно слитый полипептид fHbp представляет собой fHbp 23S_1.13_E211A/S216R. Предпочтительно антигенный компонент серогруппы В представлен в виде единого полностью жидкого состава.

Бактерицидные ответы

Предпочтительные полипептиды v1.13, v1.15 и/или слитые полипептиды, описанные выше, могут вызывать ответы в виде выработки антител, которые являются бактерицидными в отношении менингококков. Бактерицидные ответы в виде выработки антител удобно определять у мышей, и они являются стандартным показателем эффективности вакцины (например, см. примечание 14 в Pizza *et al.* (2000) *Science* 287:1816-1820; а также WO2007/028408).

Описанные выше полипептиды предпочтительно могут вызывать ответ в виде выработки антител, который является бактерицидным в отношении штамма *N.meningitidis* серогруппы В, который экспрессирует последовательность fHbp v1.13.

Предпочтительные полипептиды, описанные выше, могут индуцировать у мышей антитела, которые являются бактерицидными в отношении штамма *N.meningitidis*, который экспрессирует последовательность fHbp v1.13, в анализе бактерицидной активности сыворотки.

Описанные выше полипептиды предпочтительно могут вызывать ответ в виде выработки антител, который является бактерицидным в отношении штамма *N.meningitidis* серогруппы В, который экспрессирует последовательность fHbp v1.15.

Предпочтительные полипептиды, описанные выше, могут индуцировать у мышей антитела, которые являются бактерицидными в отношении штамма *N.meningitidis*, который экспрессирует последовательность fHbp v1.15, в анализе бактерицидной активности сыворотки.

Например, иммуногенная композиция, содержащая эти полипептиды, может обеспечить бактерицидный титр сыворотки, больший или равный 1:4, при использовании анализа Goldschneider с компонентом человека [Goldschneider *et al.* (1969) *J. Exp. Med.* 129:1307-26, Santos *et al.* (2001) *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8:616-23, и Frasc *et al.* (2009) *Vaccine* 27S:B112-6], и/или обеспечить бактерицидный титр сыворотки, больший или равный 1:128, при использовании компонента крольчат.

Полипептиды

Полипептиды, описанные выше, могут быть получены различными способами, например, химическим синтезом (по меньшей мере частично), расщеплением полипептидов большей длины с помощью протеаз, путем трансляции на матрице РНК, путем выделения из культуры клеток (например, при рекомбинантной экспрессии или из культуры *N. meningitidis*) и так далее. Предпочтительным путем экспрессии является гетерологичная экспрессия в хозяине *E.coli*.

Наиболее предпочтительно полипептиды имеют длину по меньшей мере 100 аминокислот (АК), например, 150 АК, 175 АК, 200 АК, 225 АК или более. Они включают аминокислотную последовательность мутантного fHbp v1, v2 и/или v3, и указанная аминокислотная последовательность мутантного fHbp v1, v2 или v3 также должна иметь длину по меньшей мере 100 аминокислот, например, 150 АК, 175 АК, 200 АК, 225 АК или более.

fHbp в природных условиях является липопротеином *N. meningitidis*. Также было обнаружено, что он липидируется при экспрессии в *E.coli* с его нативной лидерной

последовательностью или с гетерологичными лидерными последовательностями. Полипептиды согласно настоящему изобретению могут иметь N-концевой остаток цистеина, который может быть липидирован, например, содержать пальмитоильную группу, обычно образующую трипальмитоил-S-глицерилцистеин. В других воплощениях полипептиды не липидированы.

Полипептиды предпочтительно получают в по существу чистой или в по существу выделенной форме (то есть по существу не содержащей других полипептидов *Neisseria* или клеток-хозяев). Как правило, полипептиды обеспечивают в неприродной среде, то есть они отделены от своего природного окружения. В некоторых воплощениях полипептид находится в композиции, которая обогащена полипептидом по сравнению с исходным материалом. Таким образом, обеспечивают очищенный полипептид, где очищенный означает, что полипептид находится в композиции, которая по существу не содержит других экспрессированных полипептидов, где по существу не содержащая означает, что более 50% (например, больше или равно 75%, больше или равно 80%, больше или равно 90%, больше или равно 95%, или больше или равно 99%) от всех полипептидов в композиции составляет полипептид согласно настоящему изобретению.

Полипептиды могут иметь различные формы (например, нативные, слитые, гликозилированные, негликозилированные, липидированные, содержащие дисульфидные мостики и так далее).

Если полипептид получают путем трансляции в биологическом хозяине, требуется иницирующий кодон, который обеспечивает N-концевой остаток метионина в большинстве хозяев. Таким образом, полипептид будет, по меньшей мере на стадии формирования, содержать остаток метионина, расположенный до указанной последовательности SEQ ID NO.

Расщепление формирующихся последовательностей означает, что аминокислотная последовательность мутантного fHbp v1, v2 или v3 может самостоятельно обеспечивать N-конец полипептида. Однако в других воплощениях полипептид может содержать N-концевую последовательность, расположенную до аминокислотной последовательности мутантного fHbp v1, v2 или v3. В некоторых воплощениях полипептид имеет один остаток метионина на N-конце, сразу за которым следует аминокислотная последовательность мутантного fHbp v1, v2 или v3; в других воплощениях может быть применена предшествующая последовательность большей длины. Такая предшествующая последовательность может быть короткой (например, 40

или менее аминокислот, то есть 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Примеры включают лидерные последовательности для определения направления миграции белка или короткие пептидные последовательности, которые облегчают клонирование или очистку (например, гистидиновая метка, то есть His_n, где n = 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более). Другие подходящие N-концевые аминокислотные последовательности будут очевидны специалистам в данной области техники.

Полипептид также может содержать аминокислоты, расположенные после последней аминокислоты аминокислотной последовательности мутантного fHbp v1, v2 или v3. Такие C-концевые удлинения могут быть короткими (например, 40 или менее аминокислот, то есть 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Примеры включают последовательности для определения направления миграции белка или короткие пептидные последовательности, которые облегчают клонирование или очистку (например, содержащие гистидиновую метку, то есть His_n, где n = 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более), или последовательности, которые повышают стабильность полипептида. Другие подходящие C-концевые аминокислотные последовательности будут очевидны специалистам в данной области техники.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение исключает полипептиды, которые содержат гистидиновую метку (см. Johnson *et al.* (2012) *PLoS Pathogen* 8:e1002981, и Rajon *et al.* (2012) *Infect Immun* 80:2667-77), и, в частности, гексагистидиновую метку на C-конце.

Термин «полипептид» относится к полимерам аминокислот, имеющим любую длину. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может прерываться неаминокислотными компонентами. Эти термины также охватывают полимер аминокислот, который был модифицирован естественным образом или путем воздействия; например, образованием дисульфидной связи, гликозилированием, липидированием, ацетилированием, фосфорилированием или любыми другими манипуляциями или модификациями, такими как конъюгирование с метящим компонентом. Также в указанное определение включены, например, полипептиды, содержащие один или более чем один аналог аминокислоты (включая, например, неприродные аминокислоты и так далее), а также

другие модификации, известные в данной области техники. Полипептиды могут встречаться в виде одиночных цепей или ассоциированных цепей.

Полипептиды могут быть присоединены к твердому носителю или иммобилизованы на нем.

Полипептиды могут содержать обнаруживаемую метку, например, радиоактивную метку, флуоресцентную метку или биотиную метку. Это особенно полезно для применения в методиках иммуноанализа.

Полипептиды, как правило, состоят из искусственной аминокислотной последовательности, а именно последовательности, которая отсутствует у каких-либо встречающихся в природе видов менингококка.

Аффинность к фактору Н может быть количественно оценена с помощью поверхностного плазмонного резонанса (например, как описано в источнике Schneider *et al.* (2009) *Nature* 458:890-5) с иммобилизованным fH человека. Предпочтительными являются мутации, которые приводят к снижению аффинности (то есть увеличению константы диссоциации, K_D) по меньшей мере в 10 раз, и наиболее предпочтительно по меньшей мере в 100 раз (при определении в одинаковых экспериментальных условиях по сравнению с тем же полипептидом, но не имеющим мутации).

Иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению

Иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению представляет собой пентавалентную композицию, содержащую антигенные компоненты против пяти различных серотипов менингококка (A, B, C, W135 и Y). Каждый из этих компонентов является таким, как определено выше.

В одном из предпочтительных воплощений пентавалентная иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению содержит следующее:

- антиген серогруппы A, который представляет собой синтетический аналог капсульного сахара серогруппы A, конъюгированный с CRM 197, как определено выше;
- антиген серогруппы C, конъюгированный с CRM 197, как определено выше;
- антиген серогруппы W135, конъюгированный с CRM 197, как определено выше;
- антиген серогруппы Y, конъюгированный с CRM 197, как определено выше; и

- комбинацию антигенов серогруппы В, содержащую антигены разрешенной к применению вакцины Бексери совместно со слитым белком fHbP 231, как определено выше.

В одном из предпочтительных воплощений пятивалентная иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению представлена в виде полностью жидкого (водного) состава. Во избежание сомнений это означает, что каждый из компонентов находится в жидкой форме и ни один из компонентов иммуногенной композиции не находится в твердой (лиофилизированной) форме.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена иммуногенная композиция, содержащая вышеописанное и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

В общем случае фармацевтически приемлемый эксципиент может представлять собой любое вещество, которое само по себе не индуцирует выработку антител и не является опасным для пациента, получающего композицию, и которое может быть введено без проявления чрезмерной токсичности. Фармацевтически приемлемыми носителями и эксципиентами являются носители и эксципиенты, применяемые в данной области техники, и они могут включать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. Согласно уровню техники, в таких переносящих средах также могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты, буферные вещества для поддержания pH и тому подобное.

Иммуногенная композиция может дополнительно содержать адъювант. Адъювант может представлять собой адъювант на основе алюминия, такой как гидроксид алюминия или фосфат алюминия.

Иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению может быть введена в комбинации с другими фармацевтически активными веществами или другими вакцинами. Композиции для введения могут содержать другие типы иммуногенных соединений, такие как гликоконъюгаты, например, вызывающие иммунный ответ с обеспечением защиты от других патогенов *N. meningitidis*.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена вакцина, содержащая иммуногенную композицию, описанную выше.

Указанные иммуногенные композиции пригодны для применения для иммунизации млекопитающего, предпочтительно человека, против инфекции *Neisseria meningitidis*.

Иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению применяют для иммунизации млекопитающего против инфекции и/или заболевания, вызванного *серогруппами A, B, C, W125 и/или Y Neisseria meningitidis*, вследствие чего у реципиентов указанной иммуногенной композиции возникает иммунный ответ, который обеспечивает защиту от инфицирования бактериями *Neisseria meningitidis* и/или от заболевания, вызванного ими.

Таким образом, иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению применяют в способах профилактики для иммунизации субъектов против инфекции и/или заболевания, вызванного *Neisseria meningitidis*. Указанные иммуногенные композиции также могут быть применены в способах терапии (например, для лечения инфекции *Neisseria meningitidis*).

В настоящем изобретении также предложен способ индуцирования иммунного ответа *in vivo* против инфекции *Neisseria meningitidis* у млекопитающего, включающий введение указанному млекопитающему иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению. В настоящем изобретении также предложены полипептиды согласно настоящему изобретению для применения в таких способах.

Иммунный ответ предпочтительно является защитным и предпочтительно включает в себя антитела и/или клеточно-опосредованный иммунитет. Предпочтительно иммунный ответ представляет собой бактерицидный гуморальный иммунный ответ. Способ может индуцировать вторичный иммунный ответ. При индуцировании иммунного ответа *in vivo* млекопитающее может быть защищено от заболевания, вызываемого *Neisseria* (в частности, менингококковой инфекции).

В настоящем изобретении также предложен способ защиты млекопитающего от инфекции *Neisseria* (например, менингококковой инфекции), включающий введение млекопитающему иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению.

Иммунологические композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно готовят в виде вакцинных продуктов, которые являются подходящими для терапевтического (то есть для лечения инфекции) или профилактического (то есть для предупреждения инфекции) применения. Вакцины, как правило, являются профилактическими.

Млекопитающее предпочтительно представляет собой человека. Человек может являться взрослым, подростком или ребенком (например, ребенком до трех лет или

младенцем). Вакцина, предназначенная для детей, также может быть введена взрослым, например, с целью оценки безопасности, определения дозы, иммуногенности и так далее.

Указанные применения и способы особенно полезны для предупреждения/лечения заболеваний, включая, но не ограничиваясь этим, менингит (в частности, бактериальный менингит, такой как менингококковый менингит) и бактериемию. Например, они подходят для активной иммунизации субъектов против инвазивного менингококкового заболевания, вызываемого *N. meningitidis* (особенно против серогрупп A, B, C, W135 и Y).

Степень защиты от *N. meningitidis* может быть определена эпидемиологически, например, в клиническом исследовании, однако удобно использовать косвенный показатель для подтверждения того, что иммуногенная композиция индуцирует ответ в виде выработки бактерицидных антител (бактерицидная активность сыворотки, SBA) в сыворотке реципиентов. В тесте SBA сыворотки от реципиентов композиции инкубируют с бактериями-мишенями (в настоящем изобретении *N. meningitidis*) в присутствии комплемента (предпочтительно комплемента человека, хотя вместо него часто используют комплемент крольчат) и оценивают уничтожение бактерий при различных разведениях сыворотки для определения активности SBA. Результаты, наблюдаемые в тесте SBA, могут быть подкреплены проведением конкурентного теста SBA, чтобы получить дополнительные косвенные доказательства иммуногенной активности исследуемого антигена (антигенов). В конкурентном тесте SBA сыворотки от реципиентов иммуногенной композиции, содержащей антиген (антигены), предварительно инкубируют с указанным антигеном (антигенами) и затем инкубируют с бактериями-мишенями в присутствии комплемента человека. Затем оценивают уничтожение бактерий, и оно будет уменьшено или устранено, если бактерицидные антитела в сыворотке реципиентов связываются с исследуемыми антигенами во время фазы предварительного инкубирования и, следовательно, не могут связываться с поверхностным антигеном бактерий.

Нет необходимости, чтобы композиция обеспечивала защиту от всех без исключения штаммов *N. meningitidis* или чтобы каждый реципиент композиции был защищен. Такая всеобъемлющая защита не является принятым стандартом в этой области. Вместо этого защиту обычно оценивают в отношении панели референтных лабораторных штаммов, часто отбираемых в зависимости от страны и, возможно, меняющихся со временем, и определяют ее в популяции реципиентов.

Предпочтительные композиции согласно настоящему изобретению могут обеспечивать у пациента титр антител, который превосходит критерий серологической защиты в отношении каждого антигенного компонента у приемлемого процента субъектов-людей. Антигены и соответствующий титр антител, выше которого хозяин считается сероконвертированным по отношению к данному антигену, хорошо известны, и такие титры публикуются такими организациями, как ВОЗ. Предпочтительно, чтобы сероконвертированными являлись более 80% статистически значимой выборки субъектов, более предпочтительно более 90%, еще более предпочтительно более 93%, и наиболее предпочтительно 96-100%.

Иммуногенные композиции содержат иммунологически эффективное количество иммуногена, а также любые другие указанные компоненты, если это необходимо.

Под «иммунологически эффективным количеством» подразумевается, что введение такого количества субъекту либо в виде однократной дозы, либо в виде части серии доз является эффективным для лечения или предупреждения.

Термин «предупреждение» означает, что уменьшается и/или устраняется прогрессирование заболевания, или что исключается начало заболевания. Например, иммунная система субъекта может быть примирована (например, путем вакцинации) для запуска иммунного ответа и сопротивления инфекции, вследствие чего исключается начало заболевания. Таким образом, вакцинированный субъект может быть инфицирован, но он более способен противостоять инфекции, чем контрольный субъект. Это количество является различным в зависимости от здоровья и физического состояния субъекта, подлежащего введению, возраста, таксономической группы субъекта, подлежащего введению (например, нечеловекообразный примат, примат и так далее), способности иммунной системы субъекта синтезировать антитела, желаемой степени защиты, состава вакцины, оценки медицинской ситуации лечащим врачом и других соответствующих факторов. Ожидается, что это количество будет находиться в относительно широком диапазоне, который можно определить в ходе обычных испытаний. Композиция может быть введена совместно с другими иммунорегуляторными агентами.

Эффективность вакцины

Иммуногенные композиции для применения в настоящем изобретении предпочтительно обладают эффективностью вакцины в отношении по меньшей мере одного штамма *N. meningitidis*, составляющей по меньшей мере 10%, например больше

или равно 20%, больше или равно 30%, больше или равно 40%, больше или равно 50%, больше или равно 60%, больше или равно 70%, больше или равно 80%, больше или равно 85%, больше или равно 90% или более.

Эффективность вакцины определяется снижением относительного риска развития менингококкового заболевания у субъектов, получающих композицию согласно настоящему изобретению, по сравнению с субъектами, не получающими такую композицию (например, неиммунизированными или получающими плацебо либо отрицательный контроль). Таким образом, частоту случаев менингококкового заболевания в популяции, которая была иммунизирована согласно настоящему изобретению, сравнивают с частотой случаев в контрольной популяции, которая не была иммунизирована согласно настоящему изобретению, с получением относительного риска, и эффективность вакцины составляет 100% за вычетом этой величины.

Эффективность вакцины определяют для популяции, а не для отдельного субъекта. Таким образом, это полезный эпидемиологический метод, но он не позволяет прогнозировать индивидуальную защиту. Например, отдельный субъект может подвергаться воздействию очень большого количества инокулята инфекционного агента или может иметь другие факторы риска, которые делают его более подверженным инфекции, но это не отрицает достоверности или пригодности показателя эффективности. Размер популяции, которую иммунизируют согласно настоящему изобретению и для которой определяют эффективность вакцины, наиболее предпочтительно составляет по меньшей мере 100 и, возможно, больше, например по меньшей мере 500 субъектов. Размер контрольной группы также должен составлять по меньшей мере 100, например по меньшей мере 500.

Введение

Композиции согласно настоящему изобретению в общем случае будут непосредственно введены пациенту. Прямая доставка может быть осуществлена путем парентерального инъекционного введения (например, подкожно, внутривенно, внутримышечно или в межклеточное пространство ткани) или путем ректального, перорального, вагинального, местного, чрескожного, интраназального, офтальмологического введения, введения в слуховой проход, легочного введения или введения через другие слизистые оболочки. Предпочтительным является введение путем инъекции. Предпочтительным является внутримышечное введение в бедро или плечо.

Инъекция может быть осуществлена с помощью иглы (например, иглы для подкожных инъекций), но в качестве альтернативы может быть осуществлена безыгольная инъекция.

Предпочтительно композиция согласно настоящему изобретению упакована в одну герметично укупоренную емкость, предпочтительно флакон или шприц.

Вызываемые *Neisseria* инфекции поражают различные участки организма, поэтому композиции могут быть приготовлены в различных формах. Например, композиции могут быть приготовлены в виде инъекционных лекарственных форм, либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий. Также могут быть приготовлены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких переносящих средах для последующего введения путем инъекции. Композиция может быть приготовлена для местного применения, например, в виде мази, крема или порошка. Композиция может быть приготовлена для перорального введения, например, в виде таблетки или капсулы, или в виде сиропа (возможно, с корригентами). Композиция может быть приготовлена для легочного введения, например, в виде ингалятора, с применением тонкодисперсного порошка или спрея. Композиция может быть приготовлена в виде суппозитория или пессария. Композиция может быть приготовлена для назального введения, введения в слуховой проход или офтальмологического введения, например, в виде капель. Наиболее предпочтительными являются композиции, подходящие для парентерального введения путем инъекции.

Наиболее предпочтительно иммуногенную композицию согласно настоящему изобретению обеспечивают в виде полностью жидкого состава, то есть ни один из антигенных компонентов композиции согласно настоящему изобретению не находится в лиофилизированной форме.

Настоящее изобретение может быть применено для индукции системного иммунитета и/или иммунитета слизистых оболочек.

В настоящем документе «доза» композиции представляет собой объем композиции, подходящий для введения субъекту в качестве однократной иммунизации. Вакцины для человека, как правило, вводят в дозе объемом примерно 0,5 мл, хотя могут быть введены дробные дозы (например, детям). Объем дозы может дополнительно различаться в зависимости от концентрации антигенов в композиции.

Композиция может быть обеспечена в наборе «для многократного введения», то есть в одной емкости, содержащей достаточное количество композиции для нескольких иммунизаций. Препараты для многократного введения могут включать консервант, или

емкость для многократного введения может иметь асептический адаптер для высвобождения отдельных доз композиции.

Введение может включать схему с однократным введением дозы, но обычно включает схему с многократным введением доз. Предпочтительно применяют схему с введением по меньшей мере трех доз. Подходящие интервалы между примирующими дозами могут быть определены рутинным образом, например, от 4 до 16 недель, как то один месяц или два месяца. Например, Бексеро (BEXSERO®) можно вводить в возрасте 2, 4 и 6 месяцев или в возрасте 2, 3 и 4 месяцев с возможной четвертой дозой в 12 месяцев.

Иммунизируемый субъект представляет собой человека, который может иметь любой возраст, например, может быть в возрасте 0-12 месяцев, 1-5 лет, 5-18 лет, 18-55 лет или более 55 лет. Предпочтительно иммунизируемый субъект является подростком (например, в возрасте 12-18 лет) или взрослым (в возрасте 18 лет или старше).

Субъект возможно представляет собой подростка или взрослого, который был иммунизирован против *N.meningitidis* в детстве (например, до возраста 12 лет) и который получает бустерную дозу иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению.

Неантигенные компоненты

Иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению обычно содержит фармацевтически приемлемый носитель, который может представлять собой любое вещество, которое само по себе не индуцирует выработку антител, вредных для пациента, получающего композицию, и которое может быть введено без проявления чрезмерной токсичности. Фармацевтически приемлемые носители могут включать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. В таких переносящих средах также могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты, буферные вещества для поддержания pH и тому подобное. Всестороннее обсуждение подходящих носителей доступно в источнике Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.

Предпочтительно композиция является стерильной. Предпочтительно она является апиrogenной. Предпочтительно она имеет является забуференной, например, имеет pH от 6 до 8, обычно pH составляет примерно 7. Когда композиция содержит соль гидроксида алюминия, предпочтительно применение гистидинового буфера

[WO03/009869]. Композиции согласно настоящему изобретению могут быть изотоническими применительно к человеку.

Адьюванты, которые могут быть использованы в композициях согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, нерастворимые соли металлов, эмульсии типа масло-в-воде (например, MF59 или AS03, обе содержат сквален), сапонины, нетоксичные производные LPS (такие как монофосфорил-липид А или 3-О-деацилированный MPL), иммуностимулирующие олигонуклеотиды, обезвреженные бактериальные АДФ-рибозилирующие токсины, микрочастицы, липосомы, имидазохинолоны или их смеси. Другие вещества, которые выполняют функции иммуностимулирующих агентов, описаны в главе 7 *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.

Применение адьюванта на основе гидроксида алюминия и/или фосфата алюминия является особенно предпочтительным, и полипептиды обычно адсорбируют на этих солях. Эти соли включают оксигидроксиды и гидроксифосфаты (например, см. главы 8 и 9 *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum). Указанные соли могут иметь любую подходящую форму (например, гелеобразную, кристаллическую, аморфную и так далее).

Общие понятия

В настоящем изобретении и формуле изобретения определенные и неопределенные формы единственного числа включают формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное; то есть форма единственного числа означает «один или более чем один», если не указано иное.

Предполагается, что термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А и/или В», включает «А и В», «А или В», «А» и «В». Схожим образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих воплощений: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

Термин «содержащий» охватывает «включающий», а также «состоящий», например, композиция, «включающая» Х, может состоять исключительно из Х или может включать дополнительные объекты, например, Х + Y. Указания на «содержащий» (или «содержит» и так далее) могут быть в ряде случаев заменены на указания на «состоящий из» (или «состоит из» и так далее). Термин «по существу состоящий из» ограничивает объем формулы изобретения указанными веществами или стадиями «и

теми, которые существенно не влияют на основную и новую характеристику (характеристики)» заявленного изобретения.

Если не указано иное, все обозначения «А%-В%», «А-В%», «от А% до В%», «от А до В%», «А%-В», «от А% до В» приведены в их обычном и общепринятом значении. В некоторых воплощениях эти обозначения являются синонимами.

Термины «по существу» или «существенный» означают, что описанное или заявленное условие действует во всех важных аспектах как описанный стандарт. Следовательно, подразумевается, что «по существу не содержащий» охватывает условия, которые действуют во всех важных аспектах как условия отсутствия, даже если числовые значения указывают на присутствие некоторых примесей или веществ. «Существенный» обычно указывает на значение более чем 90%, предпочтительно более чем 95%, наиболее предпочтительно более чем 99%. Если в настоящем описании и формуле изобретения используются конкретные значения, если не указано иное, термин «по существу» означает наличие приемлемого диапазона погрешности для конкретного значения.

Термин «примерно» по отношению к числовому значению x является необязательным и означает, например, $x \pm 10\%$.

Если в настоящем изобретении упоминается «эпитоп», этот эпитоп может представлять собой эпитоп В-клетки и/или эпитоп Т-клетки, но обычно будет представлять собой эпитоп В-клетки. Такие эпитопы могут быть идентифицированы экспериментальным путем (например, с помощью PEPSCAN (например, см. Geysen *et al.* (1984) *PNAS USA* 81:3998-4002 и Carter (1994) *Methods Mol Biol* 36:207-23) или подобных методов), или они могут быть спрогнозированы (например, с помощью антигенного индекса Джеймсона-Вольфа (Jameson, BA *et al.* 1988, *CABIOS* 4(1):181-186), матричных подходов (Raddrizzani & Hammer (2000) *Brief Bioinform* 1(2):179-89), MAPITOPE (Bublil *et al.* (2007) *Proteins* 68(1):294-304), TERITOPE (De Lalla *et al.* (1999) *J. Immunol.* 163:1725-29 и Kwok *et al.* (2001) *Trends Immunol* 22:583-88), нейронных сетей (Brusic *et al.* (1998) *Bioinformatics* 14(2):121-30), OptiMer & EpiMer (Meister *et al.* (1995) *Vaccine* 13(6):581-91 и Roberts *et al.* (1996) *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(7):593-610), ADEPT (Maksyutov & Zagrebelnaya (1993) *Comput Appl Biosci* 9(3):291-7), Tsites (Feller & de la Cruz (1991) *Nature* 349(6311):720-1), гидрофильности (Hopp (1993) *Peptide Research* 6:183-190) или антигенного индекса (Welling *et al.* (1985) *FEBS Lett.* 188:215-218)). Эпитопы представляют собой части антигена, которые распознаются антигенсвязывающими

сайтами антител или Т-клеточных рецепторов и связываются с ними, и они также могут называться «антигенными детерминантами».

В настоящем документе указание на «процент идентичности последовательности» между искомой аминокислотной последовательностью и рассматриваемой аминокислотной последовательностью следует понимать как количественное значение идентичности, которое рассчитывают с помощью подходящего алгоритма или программного обеспечения, известного в данной области техники для выполнения попарного выравнивания последовательностей.

Искомая аминокислотная последовательность может быть описана аминокислотной последовательностью, указанной в одном или более чем одном пункте формулы изобретения в настоящем документе. Искомая последовательность может быть на 100% идентична рассматриваемой последовательности или может содержать вплоть до определенного целого числа модификаций аминокислот (например, точечных мутаций, замен, делеций, вставок и так далее) по сравнению с рассматриваемой последовательностью, вследствие чего % идентичности составляет менее 100%. Например, искомая последовательность по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична рассматриваемой последовательности.

Предпочтительными средствами выравнивания, используемыми для выполнения выравнивания и вычисления процента (%) идентичности последовательностей, являются средства локального выравнивания, такие как алгоритмы Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Программное обеспечение для проведения анализа BLAST находится в открытом доступе в рамках Национального центра биотехнологической информации (www.ncbi.nlm.nih.gov). Выравнивание может быть определено с помощью алгоритма поиска гомологии Смита-Уотермана с использованием поиска аффинного гэпа со штрафом за открытие гэпа 12 и штрафом за продление гэпа 2, матрицей BLOSUM 62. Алгоритм поиска гомологии Смита-Уотермана раскрыт в источнике Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489. Другими предпочтительными средствами выравнивания являются Water (EMBOSS) и Marcher (EMBOSS). В качестве альтернативы, предпочтительными средствами выравнивания, используемыми для выполнения выравнивания и вычисления процента (%) идентичности последовательностей, являются обеспечивающие наиболее точное соответствие средства выравнивания, такие как GENEPAST, также известный как алгоритм KERR.

Чтобы вычислить процент идентичности, искомую и рассматриваемую последовательности можно сравнить и выровнять для максимального соответствия в обозначенной области (например, области длиной по меньшей мере примерно 40, 45, 50, 55, 60, 65 или более аминокислот, вплоть до полной длины рассматриваемой аминокислотной последовательности). Указанная обозначенная область должна включать область искомой последовательности, содержащую любые указанные точечные мутации в аминокислотной последовательности. В качестве альтернативы, процент идентичности последовательности можно рассчитать по «полной длине» рассматриваемой последовательности. Любые N-концевые или C-концевые удлинения из аминокислот, которые могут присутствовать в искомой последовательности, такие как сигнальные пептиды или лидерный пептид, или C-концевые или N-концевые метки, должны быть исключены из выравнивания.

Термин «фрагмент» в отношении полипептидных последовательностей означает, что указанный полипептид представляет собой часть полноразмерного белка. В настоящем документе фрагмент мутантного полипептида также содержит мутацию (мутации). Фрагменты могут обладать выраженной в качественной форме биологической активностью, общей с полноразмерным белком, например, «иммуногенный фрагмент» содержит или кодирует один или более чем один эпитоп, такой как иммунодоминантный эпитоп, что позволяет индуцировать иммунный ответ на фрагмент, идентичный или схожий с ответом на полноразмерную последовательность. Полипептидные фрагменты обычно имеют амино(N)-концевую часть и/или карбокси(C)-концевую часть, имеющую делецию по сравнению с нативным белком, но при этом оставшаяся аминокислотная последовательность фрагмента идентична аминокислотной последовательности нативного белка. Полипептидные фрагменты могут содержать, например: примерно 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 24, 26, 28, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262 следующих друг за другом аминокислот, включая все промежуточные целые числа, исходной полипептидной последовательности, например, от 50 до 260, от 50 до 255, от 50 до 250, от 50 до 200, от 50 до 150 следующих друг за другом аминокислот исходной полипептидной последовательности. Термин «фрагмент» явно исключает полноразмерные полипептиды fHbp и соответствующие зрелые липопотеины.

После серогруппы классификация менингококков включает серотип, сероподтип, а затем иммунотип, и в стандартной номенклатуре указывают серогруппу, серотип, сероподтип и иммунотип, каждый из которых отделен двоеточием, например, В:4:P1.15:L3,7,9. В пределах серогруппы В некоторые линии часто вызывают заболевание (гиперинвазивные), некоторые линии вызывают более тяжелые формы заболевания, чем другие (гипервирулентные), а другие в целом редко вызывают заболевание. Выявлено семь гипервирулентных линий, а именно подгруппы I, III и IV-1, комплекс ET-5, комплекс ET-37, кластер A4 и линия 3. Они были определены с помощью мультилокусного электрофореза ферментов (MLEE), но для классификации менингококков также использовали мультилокусное типирование последовательности (MLST). Четыре основных гипервирулентных кластера представляют собой комплексы ST32, ST44, ST8 и ST11.

В настоящем документе указания на «увеличенную стабильность», или «более высокую стабильность», или «повышенную стабильность» означают, что раскрытые в настоящем документе мутантные полипептиды обладают более высокой относительной термостабильностью (в ккал/моль) по сравнению с немутантным полипептидом (дикого типа) в одинаковых экспериментальных условиях. Повышение стабильности может быть оценено с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), например, как описано в Bruylants *et al.* (*Differential Scanning Calorimetry in Life Sciences: Thermodynamics, Stability, Molecular Recognition and Application in Drug Design*, 2005 Curr. Med. Chem. 12: 2011-2020) и “Characterizing Protein stability by DSC” от Calorimetry Sciences Corporation (Life Sciences Application Note, Doc. No. 20211021306 February 2006) или с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF). Увеличение стабильности можно охарактеризовать как увеличение средней точки теплового перехода (T_m) по меньшей мере примерно на 5°C по данным DSC или DSF. См., например, Thomas *et al.*, *Effect of single-point mutations on the stability and immunogenicity of a recombinant ricin A chain subunit vaccine antigen*, 2013 Hum. Vaccin. Immunother. 9(4): 744-752.

«Эффективное количество» означает количество, достаточное для того, чтобы вызвать указанный эффект или исход. «Эффективное количество» может быть определено экспериментально и рутинным образом с применением известных методик в отношении заявленной цели.

Под «иммунологически эффективным количеством» или «терапевтически эффективным количеством» подразумевается, что введение такого количества субъекту либо в виде однократной дозы, либо в виде части серии доз является эффективным для лечения или предупреждения. Это количество может быть различным в зависимости от здоровья и физического состояния субъекта, подлежащего введению, возраста, таксономической группы субъекта, подлежащего введению (например, нечеловекообразный примат, примат и так далее), способности иммунной системы субъекта синтезировать антитела, требуемой степени защиты, состава вакцины, оценки медицинской ситуации лечащим врачом и других соответствующих факторов. Ожидается, что это количество будет находиться в относительно широком диапазоне, который можно определить в ходе обычных испытаний.

Термин «лечение» означает одно или более чем одно из следующего: (i) предупреждение инфекции или повторной инфекции, как в случае традиционной вакцины, (ii) снижение тяжести симптомов или их устранение, (iii) задержка рецидива симптомов и (iv) существенное или полное устранение соответствующего патогена или расстройства у субъекта. Таким образом, лечение может быть профилактическим (до инфицирования) или терапевтическим (после инфицирования).

Термин «% масс./масс.» означает массовую долю данного соединения в процентах по отношению к другому соединению или ко всему содержимому композиции, согласно указанному.

Схожим образом, термин «% об./об.» означает объемную долю данного соединения в процентах по отношению к другому соединению или ко всему содержимому композиции, согласно указанному.

Все публикации, цитируемые в настоящей заявке, полностью включены в нее посредством ссылки.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO: 1 [зрелый полипептид v1.13 из штамма M982]

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQ
GAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTAL
QTEQVQDSEDSGKMOVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGK
LTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYS
LGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 2 [v1.13 ΔG]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYG
 NGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQD
 SEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFA
 AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQA
 QEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 3 [v1.13 ΔG (E211A/E232A)]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYG
 NGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQD
 SEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFA
 AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDAKGSYSLGIFGGQ
 AQEVAGSAAVETANGIHHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 4 [v1.13 ΔG (E211A/S216R)]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYG
 NGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQD
 SEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFA
 AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDAKGSYRLGIFGGQ
 AQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 5 [зрелый полипептид v1.15 из штамма NM452]

CSSGGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSSISQNGTLTL
 SAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDIFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSH
 SALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGS
 DDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQ
 AEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 6 [v1.15 ΔG]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSSISQNGTLTLAQGAERTFKAG
 DKDNSLNTGKLKNDKISRFDIFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQ
 DSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDF
 AAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGG
 QAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 7 [v1.15 ΔG (S219R)]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSSISQNGTLTLAQGAERTFKAG
 DKDNSLNTGKLKNDKISRFDIFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQ
 DSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDF

AAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYRLGIFGG
QAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 8 [v1.15 ΔG (E214A/S219R)]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLAQGAERTFKAG
DKDNSLNTGKLKNDKISRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQ
DSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDF
AAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAAKGSYRLGIFGG
QAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 9 [v1.15 ΔG (E214A/E235A)]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLAQGAERTFKAG
DKDNSLNTGKLKNDKISRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQ
DSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDF
AAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAAKGSYSLGIFGG
QAQEVAGSAAVETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 10 [v2 дикого типа из штамма 2996]

MNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSL
TLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKISRFDFFIRQIEVDGQLITL
ESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAE
YHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVI
LGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 11 [зрелый полипептид v2]

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQ
AEKTYGNGDSLNTGKLKNDKISRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQ
IEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTITI
DFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALF
GDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 12 [v2 ΔG]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKISRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNP
DKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAK
QGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRA
QEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 13 [v3 дикого типа из штамма M1239]

MNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKD
KGLKSLTLED SIPQNGTLTL SAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVQKIE
VDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFN
QLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKA
DEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 14 [зрелый v3]

CSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLED SIPQNGTLTL
SAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNH
SAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDD
PNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEE
KGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 15 [v3 ΔG]

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLED SIPQNGTLTL SAQGAEKTFKAG
DKDNSLNTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKIN
NPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTK
KQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDR
AQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 16 [v2 ΔG S32V/L123R]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAQAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKVSRFDVFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNP
DKIDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAK
QGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRA
QEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 17 [v3 ΔG S32V/L126R]

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTL SAQGAEKTFKA
GDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKI
NNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDF
TKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGD
RAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID NO: 18 [(23S_1.13_E211A/E232A)]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAQAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKVSRFDVFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNP
DKIDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAK

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAQAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSVVVALQIEKINNP
DKIDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAK
QGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRA
QEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGS~~GGGG~~VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSL
TLEDVIPQNGTLTLAQAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRDFVQKIEVDGQTI
TLASGEFQIYKQNHSVVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPGG
KAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAELKADEKSH
AVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGS~~GGGG~~V
AADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGK
MVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHG
KIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDAKGSYRLGIFGGQAQEVAGS
AEVETANGIHHIGLAAKO

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNP
DKIDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAK
QGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRA
QEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSL
TLEDVIPQNGTLTLSAOGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVFQKIEVDGOTI

TLASGEFQIYKQNHS AVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSF**RV**SGLGGEHTAFNQLPGG
 KAEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAEKKADEKSH
 AVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGK**QGS****GGGGV**
 AADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDsisQNGTLTL**SA**QGAERTFKAGDKDNS
 LNTGKLKNDKISRFD**FIR**QIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSG
 K**MV**AKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMATYRGTA**FG**SDDAGGKLT**YTID**FAAKQG
 HGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSY**RL**GIFGGQAQEV
 AGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 21 [23S_1.15_ E214A/S219R]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQ**VVR**KNEKLKLAAQGAEKTYG
 NGDSLNTGKLKNDKVSRFD**FIR**QIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHS AVVALQIEKINNP
 DKIDSLINQRSF**RV**SGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLT**YTID**FAAK
 QGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRA
 QEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGK**QGS****GGGGV**VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSL
 TLED**VIP**QNGTLTL**SA**QGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFD**FV**KIEVDGQTI
 TLASGEFQIYKQNHS AVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSF**RV**SGLGGEHTAFNQLPGG
 KAEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAEKKADEKSH
 AVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGK**QGS****GGGGV**
 AADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDsisQNGTLTL**SA**QGAERTFKAGDKDNS
 LNTGKLKNDKISRFD**FIR**QIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSG
 K**MV**AKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMATYRGTA**FG**SDDAGGKLT**YTID**FAAKQG
 HGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAAKGSY**RL**GIFGGQAQEV
 AGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 22 [23S_1.15_ E214A/E235A]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQ**VVR**KNEKLKLAAQGAEKTYG
 NGDSLNTGKLKNDKVSRFD**FIR**QIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHS AVVALQIEKINNP
 DKIDSLINQRSF**RV**SGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLT**YTID**FAAK
 QGHGKIEHLKTPEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRA
 QEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGK**QGS****GGGGV**VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSL
 TLED**VIP**QNGTLTL**SA**QGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFD**FV**KIEVDGQTI
 TLASGEFQIYKQNHS AVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSF**RV**SGLGGEHTAFNQLPGG
 KAEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAEKKADEKSH
 AVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGK**QGS****GGGGV**

AADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLAQGAERTFKAGDKDNS
LNTGKLKNDKISRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSG
KMQAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQG
HGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAAKGSYSLGIFGGQAQEV
AGSAAVETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 23 [v1.1 ΔG + His-метка]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKVSRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQD
SEHSGKMQAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFA
AKQGNKGKIEHLKSPELGLAAKQLNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYS
LGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHLEHHHHHH

SEQ ID NO: 24 [v1.13 ΔG + His-метка]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKVSRFDFFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQD
SEDSGKMQAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQA
QEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQLEHHHHHH

SEQ ID NO: 25 [v1.13 ΔG (E211A)]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKVSRFDFFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQD
SEDSGKMQAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDAKGSYSLGIFGGQ
AQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQLEHHHHHH

SEQ ID NO: 26 [v1.13 ΔG (S216R)]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKVSRFDFFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQD
SEDSGKMQAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFA
AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYRLGIFGGQ
AQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQLEHHHHHH

SEQ ID NO: 27 [v1.15 ΔG + His-метка]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLAQGAERTFKAG
DKDNSLNTGKLKNDKISRFDFFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQ
DSEHSGKMQAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDF

AAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGG
QAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQLEHHHHHH

SEQ ID NO: 28 [v1.15 ΔG (E214A)+ His-метка]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLAQGAERTFKAG
DKDNSLNTGKLKNDKISRFD FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQ
DSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDV MATYRGTAFGSDDAGGKLT YTIDF
AAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAAKGSYSLGIFGG
QAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQLEHHHHHH

SEQ ID NO: 29 [слитый полипептид fHbp 231 дикого типа]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLA AQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKVSFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHS AVVALQIEKINNP
KIDSLINQRSFLV SGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLT YTIDFAAKQ
GHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQE
IAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGS GGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTL
EDSIPQNGTLTLAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFD FVQKIEVDGQTITL
ASGEFQIYKQNHS AVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLV SGLGGEHTAFNQLPGGKA
EYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAV
ILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQE IAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGS GGGGVA
ADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLA AQGAEKTYGNGSLNTGK
LKNDKVS RFD FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVA
KRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT YTIDFAAKQNGKIE
HLKSPELNVDLAAAIPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGKAQEVAGSAEVK
TVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 30 [слитый полипептид fHbp 231S]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKLKLA AQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKVSFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHS AVVALQIEKINNP
KIDSLINQRSFRV SGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLT YTIDFAAKQ
GHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQE
IAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGS GGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTL
EDVIPQNGTLTLAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFD FVQKIEVDGQTITL
ASGEFQIYKQNHS AVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRV SGLGGEHTAFNQLPGGKA
EYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAV
ILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQE IAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGS GGGGVA

DIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVSKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGSLNTGK
LKNNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVA
KRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNKIE
HLKSPELNVDLAAAIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGKAQEVAGSAEVK
TVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 31 [полноразмерная последовательность v1.13 дикого типа]

MNRTAFCCFSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSL
TLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNNDKVSRLFDFIRQIEVDGKLIT
LESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKG
GSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKR
HAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 32 [полноразмерная последовательность v1.15 дикого типа]

MNRTTFCCLSLTAALILTACSSGGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKD
KGLKSLTLEDSSISQNGTLTSAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLNNDKISRDFIRQIEV
DGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSF
GKLPKDVMATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAAD
IKPDEKHHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID NO: 33 [зрелый fHbp v1.1]

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQA
GAEKTYGNGDSLNTGKLNNDKVSRLFDFIQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQ
TEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
YTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSL
GIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

**SEQ ID NO: 34 [необязательная N-концевая аминокислотная
последовательность]**

MGPDSDRLQRR

**SEQ ID NO: 35 [SEQ ID NO: 34 + SEQ ID NO: 19; 23S_1.13_E211A/S216R с
дополнительной N-концевой аминокислотной последовательностью]**

MGPDSDRLQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQVVRKNEKL
KLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHS
AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFRVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAG
GKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKG
TYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGTGLADALTAP

LDHKDKGLKSLTLEDVIPQNGTLTLQAQGAETFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFD
 FVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFRVSGLG
 EHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELA
 AAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIA
 GKQ**GSGGGG**VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGA
 EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQT
 EQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLT
 YTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLNQNDAKGSYRL
 GIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHIGLAAKQ

ВАРИАНТЫ ВОПЛОЩЕНИЯ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Далее настоящее изобретение будет дополнительно описано со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

ПРИМЕРЫ

Синтез и определение характеристик конъюгированного антигена серогруппы А

Общие методы и материалы

Все химические реагенты (Acros, Biosolve, Sigma-Aldrich и TCI) использовали без дополнительной обработки, и все реакции проводили в атмосфере аргона при температуре окружающей среды (22°C), если не указано иное. Для анализа методом тонкослойной хроматографии (TLC) использовали алюминиевые пластины (Merck, силикагель 60 F254 для TLC), опрысканные раствором H₂SO₄ (20%) в EtOH, или раствором (NH₄)₆Mo₇O₂₄•4H₂O (25 г/л) и (NH₄)₄Ce(SO₄)₄•2H₂O (10г/л) в 10% водной H₂SO₄, или раствором KMnO₄ (2%) и K₂CO₃ (1%) в H₂O с последующим нагреванием при ≈ 140°C. Для колоночной хроматографии использовали силикагель с размером частиц 40-63 мкм и размером пор 60Å (SD Screening Devices). Спектры ЯМР (¹H, ¹³C и ³¹P) регистрировали на спектрометре Bruker AV-400liq, или Bruker AV-500, или Bruker AV-600. Масс-спектры высокого разрешения получали методом прямого ввода пробы на масс-спектрометре (Thermo Finnigan LTQ Orbitrap), оснащенном электрораспылительным источником ионов, в режиме детекции положительно заряженных ионов (напряжение источника 3,5 кВ, поток оболочного газа 10, температура капилляра 250°C) с разрешением R= 60000 при m/z 400 (диапазон массовых чисел m/z= 150-2000) и диоктилфталатом (m/z= 391,28428) в качестве фиксированной массы.

Сокращения

AcOH = уксусная кислота

ACN = ацетонитрил

DCM = дихлорметан

DMTrCl = 4,4'-диметокситритилхлорид

EtOAc = этилацетат

THF = тетрагидрофуран

TBAF = фторид тетрабутиламмония

Пример 1: Получение олигомеров формулы (Ia) согласно настоящему изобретению в соответствии со схемой 1.

Ацетида-3,4-ди-О-бензил-2-дезокси-6-О-тесилдиметилсиллил-5а-карба-α-D-маннопираноза (13)

Силиловый эфир **12** может быть получен в соответствии с процедурой, описанной в Q. Gao et al. Org. Biomol. Chem., 2012, 10, 6673.

Силиловый эфир **12** (1,6 г, 2,7 ммоль) растворяли в безводном THF (20 мл). Смесь охлаждали до 0°C. Медленно добавляли 0,1 М раствор TBAF (4,1 мл, 4,1 ммоль) в THF. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 3 часов. К реакционной смеси добавляли AcOH (0,31 мл). Полученный раствор 3 раза подвергали экстракции DCM и один раз промывали рассолом. Органический слой сушили над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Полученный неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (EtOAc/гексан) с получением продукта **13** (1,1 г, 2,52 ммоль) с выходом 92%. Результаты спектроскопии соответствовали опубликованным данным.

2-Ацетида-3,4-ди-О-бензил-2-дезокси-5а-карба-α-D-маннопираноза (14)

Спирт **13** (1,12 г, 2,5 ммоль) растворяли в MeOH (32 мл). К полученной смеси добавляли NaOMe (0,03 г, 0,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Добавляли смолу Amberlite H⁺ до достижения нейтрального pH. Полученную суспензию фильтровали и концентрировали в вакууме. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ= 1,70 – 1,85 (m, 2H, H-5a), 1,90 (s, 3H, AcNH), 2,19 – 2,23 (m, 1H, H-5), 3,60 – 3,79 (m, 3H, H-6, H-1), 3,83 – 3,90 (m, 1H, H-2), 3,91 – 3,99 (m, 1H, H-4), 4,14 – 4,23 (m, 1H, H-3), 4,33 – 4,41 (m, 1H, CHH Bn), 4,54 – 4,72 (m, 3H, CH₂ Bn, CHH Bn), 5,79 (m, 1H, NHAc), 7,22 – 7,42 (m, 10H, H аром). ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃) δ= 23,5 (CH₃ AcNH), 30,6 (CH₂ C-5a), 39,5 (CH C-5), 53,5 (CH C-3), 64,1 (CH₂ C-6), 67,9 (CH C-

4), 72,4 (CH₂ Bn), 73,8 (CH₂ Bn), 75,5 (CH C-1), 79,0 (CH C-4), 127,3 – 128,9 (CH аром), 171,8 (C=O AcNH). МСВР: [C₂₃H₂₉NO₅ + H]⁺ требуется 400,21251, обнаружено 400,21179.

2-Ацетамидо-3,4-ди-О-бензил-2-дезоксигалакто-6-О-(бис(4-метоксифенил)(фенил))-5-карба-α-D-маннопираноза (10)

Диол **14** (0,9 г, 2,25 ммоль) растворяли в безводном DCM (30 мл). К полученной смеси добавляли Et₃N (1,9 мл, 13,5 ммоль). Добавляли DMTrCl (1,16 г, 3,38 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов. К реакционной смеси добавляли H₂O и один раз промывали рассолом. Органический слой сушили над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Полученный неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (EtOAc/гексан) с получением продукта **10** (1,6 г, 2,04 ммоль) с выходом 91%. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃CN) δ= 1,70 – 1,85 (m, 1H, 5a'-H), 1,91 (s, 3H, AcNH), 2,00 – 2,21 (m, 2H, 5a-H, 5-H), 3,01 – 3,19 (m, 1H, 6'-H), 3,27 – 3,37 (m, 1H, 6-H), 3,51 – 3,67 (m, 1H, H-4), 3,73 (с, 7H, H-3, 2x OMe), 4,06 – 4,20 (m, 1H, H-1), 4,22 – 4,32 (m, 1H, CHH Bn), 4,40 – 4,62 (m, 3H, CH₂ Bn, H-2), 4,65 – 4,73 (m, 1H, CHH Bn), 6,35 – 6,44 (m, 1H, NHAc), 6,78 – 7,47 (m, 23H, H аром). ¹³C ЯМР (100 МГц, CD₃CN) δ= 23,2 (CH₃ AcNH), 31,6 (CH₂ C-5a), 38,6 (CH C-5), 53,3 (CH C-2), 55,8 (2x CH₃ OMe), 64,6 (CH₂ C-6), 67,6 (CH C-1), 72,1 (CH₂ Bn), 73,8 (CH₂ Bn), 77,2 (CH C-4), 79,8 (CH C-3), 86,5 (Cq DMTr), 113,9 (CH аром), 127,3 – 130,7 (CH аром), 137,2 – 159,4 (5x Cq DMTr), 171,1 (C=O AcNH). МСВР: [C₄₄H₄₇NO₇ + H]⁺ требуется 724,32501, обнаружено 724,32483.

1-О-((N,N-диизопропиламино)-О-2-цианоэтилфосфорамидит))-2-ацетамидо-3,4-ди-О-бензил-2-дезоксигалакто-6-О-(бис(4-метоксифенил)(фенил))-5а-карба-α-D-маннопираноза (9)

Спирт **10** (1,5 г, 2,14 ммоль) 3 раза упаривали совместно с ACN и растворяли в безводном DCM (22 мл). К полученной смеси добавляли свежеактивированные MS3Å и DIPEA (0,6 мл, 3,2 ммоль). К полученной смеси добавляли 2-цианоэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит (0,6 мл, 2,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов. К раствору добавляли H₂O и однократно промывали раствором рассола/NaHCO₃ 1:1. Органический слой сушили над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Полученный неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (DCM/ацетон/Et₃N) с получением продукта **9** (1,81 г, 2,0 ммоль) с выходом 94% (смесь диастереоизомеров). ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃CN) δ= 1,04 – 1,24 (m, 12H, 4x изопропиламино), 1,70 – 1,85 (m, 1H, 5a'-H), 1,92 (s, 3H, AcNH), 2,00 – 2,21 (m, 2H, 5a-H,

5-Н), 2,55 – 2,75 (m, 2H, CH₂ цианоэтил), 2,98 – 3,10 (m, 1H, 6'-H), 3,27 – 3,37 (m, 1H, 6-Н), 3,47 – 3,70 (m, 3H, 2x СН изопропиламино, Н-4), 3,70 – 3,88 (m, 9H, Н-3, CH₂ цианоэтил, 2x OMe), 4,06 – 4,20 (m, 1H, Н-1), 4,22 – 4,32 (m, 1H, СНН Bn), 4,40 – 4,62 (m, 3H, CH₂ Bn, Н-2), 4,65 – 4,73 (m, 1H, СНН Bn), 6,35 – 6,44 (m, 1H, NHAc), 6,78 – 7,47 (m, 23H, Н аром). ¹³C ЯМР (100 МГц, CD₃CN) δ = 20,7 (CH₂ цианоэтил), 22,9 (CH₃ AcNH), 24,5 – 24,7 (2x CH₃ изопропиламино), 30,6 (CH₂ C-5a), 38,5 (CH C-5), 43,7 (2x СН изопропиламино), 51,7 (CH C-2), 55,5 (2x CH₃ OMe), 59,1 (CH₂ цианоэтил), 64,2 (CH₂ C-6), 70,5 (CH C-1), 71,5 (CH₂ Bn), 74,3 (CH₂ Bn), 77,8 (CH C-4), 79,5 (CH C-3), 86,2 (Cq DMTr), 113,6 (CH аром), 127,3 – 130,7 (CH аром), 136,8 – 159,2 (5x Cq DMTr), 170 (C=O AcNH). ³¹P ЯМР (162 МГц, CD₃CN) δ = 146,9, 147,26.

Общая процедура сочетания с фосфорамидитом, окисления и детритилирования в типичном масштабе (0,03–0,3 ммоль)

Исходный спирт 3 раза упаривали совместно с ACN и добавляли свежеактивированные MS3Å и DCI (0,25 М раствор в ACN, 1,5 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 15 мин. К смеси добавляли фосфорамидитный реагент (0,1 – 0,16 М раствор в ACN, 1,3 – 3 экв.) и перемешивали до полного превращения исходного вещества (≈2 часа). Затем к реакционной смеси добавляли CSO (0,5 М раствор в ACN, 2 экв.) и перемешивали в течение 15 мин. Смесь разбавляли EtOAc и промывали раствором соли/NaHCO₃ 1:1. Водный слой 2 раза подвергали экстракции EtOAc. Органический слой сушили над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Полученный неочищенный продукт 3 раза выпаривали совместно с ACN и растворяли в DCM (5 - 10 мл). К полученному раствору добавляли TCA (0,18 М раствор в DCM) и перемешивали в течение 1 часа. К реакционной смеси добавляли H₂O и перемешивали в течение 15 мин. Реакционную смесь промывали раствором рассола/NaHCO₃ 1:1. Водный слой 3 раза подвергали экстракции DCM. Органический слой сушили над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Полученный неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (DCM/ацетон) или эксклюзионной хроматографии (Sephadex LH-20, MeOH/DCM 1:1).

1-О-((2-ацетамидо-3,4-ди-О-бензил-2-дезоксидезокси-5а-карба-α-D-маннопиранозил-1-О-фосфорил)-2-цианоэтил)-6-гексилбензил-карбамат (15)

Спирт **10** (0,21 г, 0,3 ммоль) подвергали сочетанию с фосфорамидитом **11** (2,5 мл 0,16 М в ACN, 0,45 ммоль), окислению, детритилированию с помощью общей процедуры, описанной выше. Полученный неочищенный продукт очищали с помощью

флэш-хроматографии (DCM/ацетон) с получением продукта **15** (0,216 г, 0,282 ммоль) с выходом 94%. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃CN) δ = 1,24 – 1,40 (m, 4H, 2x CH₂ гексильный спейсер), 1,40 – 1,51 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 1,58 – 1,70 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 1,80 – 1,92 (m, 4H, 5a'-H, AcNH), 1,96 – 2,02 (m, 2H, 5a-H, 5-H), 2,72 – 2,82 (m, 2H, CH₂ цианоэтил), 2,96 (bs, 1H, OH), 3,02 – 3,12 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 3,56 – 3,74 (m, 3H, H-6, H-4), 3,76 – 3,84 (m, 1H, H-3), 3,95 – 4,07 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 4,08 – 4,20 (m, 2H, CH₂ цианоэтил), 4,44 – 4,63 (m, 5H, H-1, H-2, CH₂ Bn, CHH Bn), 4,72 – 4,80 (m, 1H, CHH Bn), 5,03 (s, 2H, CH₂ Bn-спейсер), 5,70 (bs, 1H, NH), 6,49 – 6,60 (m, 1H, NHAc), 7,23 – 7,44 (m, 15H, H аром). ¹³C ЯМР (100 МГц, CD₃CN) δ = 19,9 (CH₂ цианоэтил), 22,8 (CH₃ AcNH), 25,4 (CH₂ гексильный спейсер), 26,4 (CH₂ гексильный спейсер), 30,0 (CH₂ C-5a), 30,4 (CH₂ гексильный спейсер), 30,5 (CH₂ гексильный спейсер), 40,0 (CH C-5), 41,0 (CH₂ гексильный спейсер), 51,1 (CH C-2), 62,9 (CH₂ C-6), 63,0 (CH₂ цианоэтил), 66,3 (CH₂ Bn-спейсер), 68,8 (CH₂ гексильный спейсер), 72,2 (CH₂ Bn), 74,0 (CH₂ Bn), 75,1 (CH C-1), 76,7 (CH C-4), 79,3 (CH C-3), 128,1 – 129,1 (CH аром), 138,9 – 139,7 (3x Cq Bn), 170,8 (C=O AcNH). ³¹P ЯМР (162 МГц, CD₃CN) δ = -2,40, -2,36. МСВР: [C₄₀H₅₂N₃O₁₀P + H]⁺ требуется 766,34707, обнаружено 766,34707.

1-О-ди-((2-ацетамидо-3,4-ди-О-бензил-2-дезоксигалакто- α -D-маннопиранозил-1-О-фосфорил)2-цианоэтил)-6-гексилбензилкарбамат (16)

Спирт **15** (0,186 г, 0,24 ммоль) подвергали сочетанию с фосфорамидитом **9** (2,3 мл 0,16 М в ACN, 0,37 ммоль), окислению, детритилированию с помощью общей процедуры, описанной выше. Полученный неочищенный продукт очищали с помощью эксклюзионной хроматографии (Sephadex LH-20, DCM/MeOH 1:1) с получением продукта **16** (0,255 г, 0,199 ммоль) с выходом 82%. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃CN) δ = 1,25 – 1,40 (m, 4H, 2x CH₂ гексильный спейсер), 1,40 – 1,51 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 1,58 – 1,71 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 1,80 – 1,92 (m, 8H, 2x 5a'-H, 2x AcNH), 1,96 – 2,02 (m, 4H, 2x 5a-H, 2x 5-H), 2,70 – 2,81 (m, 4H, 2x CH₂ цианоэтил), 2,96 (bs, 1H, OH), 3,01 – 3,12 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 3,56 – 3,87 (m, 6H, 2x H-6, 2x H-4), 3,94 – 4,28 (m, 8H, 2x H-3, CH₂ гексильный спейсер, 2x CH₂ цианоэтил), 4,29 – 4,85 (m, 12H, 2x H-1, 2x H-2, 4x CH₂ Bn), 5,03 (s, 2H, CH₂ Bn-спейсер), 5,75 (bs, 1H, NH), 6,52 – 6,62 (m, 1H, NHAc), 6,85 – 6,99 (m, 1H, NHAc), 7,21 – 7,41 (m, 25H, H аром). ¹³C ЯМР (100 МГц, CD₃CN) δ = 19,9 – 20,0 (2x CH₂ цианоэтил), 22,9 – 23,0 (2x CH₃ AcNH), 25,5 (CH₂ гексильный спейсер), 26,5 (CH₂ гексильный спейсер), 29,1 – 29,2 (2x CH₂ C-5a), 30,1

(CH₂ гексильный спейсер), 30,5 (CH₂ гексильный спейсер), 38,1 – 40,0 (2х CH C-5), 41,1 (CH₂ гексильный спейсер), 50,9 – 51,4 (2х CH C-2), 62,5 – 62,6 (2х CH₂ C-6), 63,0 – 63,2 (2х CH₂ цианоэтил), 66,3 (CH₂ Bn-спейсер), 68,9 (CH₂ гексильный спейсер), 72,1 – 72,3 (4х CH₂ Bn), 75,0 – 75,4 (2х CH C-1), 75,5 – 76,9 (2х CH C-4), 79,2 – 79,5 (2х CH C-3), 128,2 – 129,1 (CH аром), 138,9 – 139,6 (5х Cq Bn), 170,8 (2х C=O AcNH). 31P ЯМР (162 МГц, CD₃CN) δ = –2,60, –2,58, –2,34, –2,32, –2,22, –2,17. МСВР: [C₆₆H₈₃N₅O₁₇P₂ + H]⁺ требуется 1280,53320, обнаружено 1280,53320.

1-О-три-((2-ацетамидо-3,4-ди-О-бензил-2-дезоксипентозид-5-а-карба- α -D-маннопиранозил-1-О-фосфорил)2-цианоэтил)-6-гексилбензилкарбамат (17)

Спирт **16** (0,215 г, 0,167 ммоль) подвергали сочетанию с фосфорамидитом **9** (1,6 мл 0,16 М в ACN, 0,25 ммоль), окислению, детритилированию с помощью общей процедуры, описанной выше. Полученный неочищенный продукт очищали с помощью эксклюзионной хроматографии (Sephadex LH-20, DCM/MeOH 1:1) с получением продукта **17** (0,285 г, 0,158 ммоль) с выходом 95%. 1H ЯМР (400 МГц, CD₃CN) δ = 1,25 – 1,40 (m, 4H, 2х CH₂ гексильный спейсер), 1,40 – 1,51 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 1,58 – 1,71 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 1,80 – 1,92 (m, 12H, 3х 5a'-H, 3х AcNH), 1,96 – 2,30 (m, 6H, 3х 5a-H, 3х 5-H), 2,68 – 2,83 (m, 6H, 3х CH₂ цианоэтил), 2,93 (bs, 1H, OH), 3,00 – 3,11 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 3,59 – 3,89 (m, 9H, 3х H-6, 3х H-4), 3,96 – 4,22 (m, 11H, 3х H-3, CH₂ гексильный спейсер, 3х CH₂ цианоэтил), 4,31 – 4,86 (m, 18H, 3х H-1, 3х H-2, 6х CH₂ Bn), 5,03 (s, 2H, CH₂ Bn-спейсер), 5,78 (bs, 1H, NH), 6,55 – 6,65 (m, 1H, NHAc), 6,9 – 7,15 (m, 2H, 2х NHAc), 7,19 – 7,40 (m, 35H, H аром). 13C ЯМР (100 МГц, CD₃CN) δ = 20,0 – 20,1 (3х CH₂ цианоэтил), 22,9 – 23,0 (3х CH₃ AcNH), 25,5 (CH₂ гексильный спейсер), 26,5 (CH₂ гексильный спейсер), 28,9 – 29,2 (3х CH₂ C-5a), 30,1 (CH₂ гексильный спейсер), 30,5 (CH₂ гексильный спейсер), 38,0 – 40,0 (3х CH C-5), 41,1 (CH₂ гексильный спейсер), 50,8 – 51,4 (3х CH C-2), 62,5 – 63,0 (3х CH₂ C-6), 63,0 – 63,3 (3х CH₂ цианоэтил), 66,3 (CH₂ Bn-спейсер), 68,4 (CH₂ гексильный спейсер), 72,1 – 74,1 (6х CH₂ Bn), 75,2 – 75,5 (3х CH C-1), 75,5 – 76,1 (3х CH C-4), 79,3 – 79,5 (3х CH C-3), 128,2 – 129,1 (CH аром), 138,9 – 139,7 (7х Cq Bn), 170,9 – 171,2 (3х C=O AcNH). 31P ЯМР (162 МГц, CD₃CN) δ = –2,82, –2,77, –2,62, –2,58, –2,36, –2,33, –2,24, –2,20, –2,16. МСВР: [C₉₂H₁₁₄N₇O₂₄P₃ + H]⁺ требуется 1795,72333, обнаружено 1795,22333.

1-О-тетра-((2-ацетамидо-3,4-ди-О-бензил-2-дезоксипентозид-5-а-карба- α -D-маннопиранозил-1-О-фосфорил)2-цианоэтил)-6-гексилбензилкарбамат (18)

Спирт **17** (0,267 г, 0,148 ммоль) подвергали сочетанию с фосфорамидитом **9** (1,4 мл 0,16 М в ACN, 0,22 ммоль), окислению, детритилированию с помощью общей процедуры, описанной выше. Полученный неочищенный продукт очищали с помощью эксклюзионной хроматографии (Sephadex LH-20, DCM/MeOH 1:1) с получением продукта **18** (0,299 г, 0,129 ммоль) с выходом 87%. ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂CO) δ= 1,31 – 1,47 (m, 4H, 2x CH₂ гексильный спейсер), 1,47 – 1,57 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 1,62 – 1,75 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 1,85 – 2,02 (m, 16H, 4x 5a'-H, 4x AcNH), 2,07 – 2,17 (m, 8H, 4x 5a-H, 4x 5-H), 2,82 – 3,00 (m, 8H, 4x CH₂ цианоэтил), 3,08 – 3,18 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 3,66 – 4,01 (m, 12H, 4x H-6, 4x H-4), 4,04 – 4,36 (m, 14H, 4x H-3, CH₂ гексильный спейсер, 4x CH₂ цианоэтил), 4,40 – 4,94 (m, 24H, 4x H-1, 4x H-2, 8x CH₂ Bn), 5,05 (s, 2H, CH₂ Bn-спейсер), 6,39 (bs, 1H, NH), 7,17 – 7,42 (m, 45H, H аром), 7,42 – 7,80 (m, 4H, NHAc). ¹³C ЯМР (100 МГц, (CD₃)₂CO) δ= 20,0 – 20,1 (4x CH₂ цианоэтил), 23,1 – 23,2 (4x CH₃ AcNH), 25,8 (CH₂ гексильный спейсер), 26,8 (CH₂ гексильный спейсер), 29,2 – 29,8 (4x CH₂ C-5a), 30,8 (CH₂ гексильный спейсер), 30,8 (CH₂ гексильный спейсер), 38,3 – 40,3 (4x CH C-5), 41,4 (CH₂ гексильный спейсер), 51,2 – 51,5 (4x CH C-2), 62,6 – 63,4 (4x CH₂ C-6), 63,4 – 63,6 (4x CH₂ цианоэтил), 66,2 (CH₂ Bn-спейсер), 68,8 (CH₂ гексильный спейсер), 72,0 – 75,0 (8x CH₂ Bn), 75,6 – 75,8 (4x CH C-1), 76,5 – 77,2 (4x CH C-4), 79,7 – 79,8 (4x CH C-3), 128,1 – 129,1 (CH аром), 139,3 – 140,1 (9x Cq Bn), 170,7 – 171,2 (4x C=O AcNH). ³¹P ЯМР (162 МГц, CD₃)₂CO) δ= –2,84, –2,77, –2,68, –2,47, –2,42, –2,37, –2,30, –1,96, –1,91, –1,89. МСВР: [C₁₁₈H₁₄₅N₉O₃IP₄ + 2H]⁺ требуется 1155,45892, обнаружено 1155,45892.

1-О-пента-((2-ацетамидо-3,4-ди-О-бензил-2-дезоксипентозил-1-О-фосфорил)2-цианоэтил)-6-гексилбензилкарбамат (19)

Спирт **18** (0,277 г, 0,120 ммоль) подвергали сочетанию с фосфорамидитом **9** (1,1 мл 0,16 М в ACN, 0,18 ммоль), окислению, детритилированию с помощью общей процедуры, описанной выше. Полученный неочищенный продукт очищали с помощью эксклюзионной хроматографии (Sephadex LH-20, DCM/MeOH 1:1) с получением продукта **19** (0,31 г, 0,110 ммоль) с выходом 92%. ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂CO) δ= 1,31 – 1,46 (m, 4H, 2x CH₂ гексильный спейсер), 1,46 – 1,58 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 1,62 – 1,75 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 1,84 – 2,02 (m, 20H, 5x 5a'-H, 5x AcNH), 2,07 – 2,19 (m, 10H, 5x 5a-H, 5x 5-H), 2,82 – 2,97 (m, 10H, 5x CH₂ цианоэтил), 3,08 – 3,18 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 3,67 – 4,02 (m, 15H, 5x H-6, 5x H-4), 4,04 – 4,36 (m, 17H, 5x H-3, CH₂ гексильный спейсер, 5x CH₂ цианоэтил), 4,38 – 4,95 (m, 30H, 5x H-1,

5x H-2, 10x CH₂ Bn), 5,05 (s, 2H, CH₂ Bn-спейсер), 6,43 (bs, 1H, NH), 7,16 – 7,41 (m, 55H, H аром), 7,42 – 7,86 (m, 5H, NHAc). ¹³C ЯМР (100 МГц, (CD₃)₂CO) δ= 19,8 – 20,0 (5x CH₂ цианоэтил), 23,0 – 23,1 (5x CH₃ AcNH), 25,7 (CH₂ гексильный спейсер), 26,7 (CH₂ гексильный спейсер), 29,2 – 30,0 (5x CH₂ C-5a), 30,7 (CH₂ гексильный спейсер), 30,7 (CH₂ гексильный спейсер), 38,2 – 40,2 (5x CH C-5), 41,2 (CH₂ гексильный спейсер), 51,0 – 51,4 (5x CH C-2), 62,5 – 63,2 (5x CH₂ C-6), 63,3 – 63,5 (5x CH₂ цианоэтил), 66,1 (CH₂ Bn-спейсер), 68,7 (CH₂ гексильный спейсер), 72,0 – 75,0 (10x CH₂ Bn), 75,6 – 75,8 (5x CH C-1), 76,5 – 77,2 (5x CH C-4), 79,7 – 79,8 (5x CH C-3), 128,0 – 129,0 (CH аром), 139,2 – 140,0 (11x Cq Bn), 170,7 – 171,2 (5x C=O AcNH). ³¹P ЯМР (162 МГц, CD₃)₂CO) δ= –2,84, –2,77, –2,68, –2,47, –2,42, –2,37, –2,30, –1,96, –1,88, –1,89, –1,86, –1,84, –1,79. МСВР: [C₁₄₄H₁₇₆N₁₁O₃₈P₅ + 2H] ++ требуется 1412,55219, обнаружено 1412,55219.

1-О-гекса-((2-ацетамидо-3,4-ди-О-бензил-2-дезоксипентозил-1-О-фосфорил)-6-гексилбензилкарбамат (20)

Спирт **19** (0,280 г, 0,099 ммоль) подвергали сочетанию с фосфорамидитом **9** (1,24 мл 0,16 М в ACN, 0,20 ммоль), окислению, детритилированию с помощью общей процедуры, описанной выше. Полученный неочищенный продукт очищали с помощью эксклюзионной хроматографии (Sephadex LH-20, DCM/MeOH 1:1) с получением продукта **20** (0,29 г, 0,087 ммоль) с выходом 88%. ¹H ЯМР (500 МГц, (CD₃)₂CO) δ= 1,31 – 1,46 (m, 4H, 2x CH₂ гексильный спейсер), 1,46 – 1,57 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 1,63 – 1,74 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 1,84 – 2,02 (m, 24H, 6x 5a'-H, 6x AcNH), 2,07 – 2,30 (m, 12H, 6x 5a-H, 6x 5-H), 2,82 – 2,97 (m, 12H, 6x CH₂ цианоэтил), 3,09 – 3,18 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 3,67 – 4,04 (m, 18H, 6x H-6, 6x H-4), 4,04 – 4,38 (m, 20H, 6x H-3, CH₂ гексильный спейсер, 6x CH₂ цианоэтил), 4,38 – 5,00 (m, 36H, 6x H-1, 6x H-2, 12x CH₂ Bn), 5,05 (s, 2H, CH₂ Bn-спейсер), 6,42 (bs, 1H, NH), 7,16 – 7,41 (m, 65H, H аром), 7,42 – 7,89 (m, 6H, NHAc). ¹³C ЯМР (100 МГц, (CD₃)₂CO) δ= 19,9 – 20,0 (6x CH₂ цианоэтил), 23,0 – 23,1 (6x CH₃ AcNH), 25,7 (CH₂ гексильный спейсер), 26,8 (CH₂ гексильный спейсер), 29,2 – 30,2 (6x CH₂ C-5a), 30,4 (CH₂ гексильный спейсер), 30,7 (CH₂ гексильный спейсер), 38,2 – 40,2 (6x CH C-5), 41,3 (CH₂ гексильный спейсер), 51,0 – 51,4 (6x CH C-2), 62,5 – 63,4 (6x CH₂ C-6), 63,4 – 63,5 (6x CH₂ цианоэтил), 66,2 (CH₂ Bn-спейсер), 68,7 (CH₂ гексильный спейсер), 72,2 – 75,6 (12x CH₂ Bn), 75,6 – 75,8 (6x CH C-1), 76,5 – 77,2 (6x CH C-4), 79,7 – 79,8 (6x CH C-3), 128,1 – 129,1 (CH аром), 139,2 – 140,0 (13x Cq Bn), 170,7 – 171,2 (6x C=O AcNH). ³¹P ЯМР (162 МГц, CD₃)₂CO) δ= –2,84,

–2,77, –2,68, –2,45, –2,42, –2,37, –2,31, –1,94, –1,81, –1,78. МСВР: [C170H207N13O45P6 + NH4]⁺ требуется 3356,312, обнаружено 3357,010.

Для получения олигомера, где n=6, после описанной выше стадии может быть осуществлена описанная ниже общая процедура снятия защиты.

1-О-гепта-((2-ацетида-3,4-ди-О-бензил-2-дезокси-5а-карба-α-D-маннопиранозил-1-О-фосфорил)2-цианоэтил)-6-гексилбензилкарбамат (21)

Спирт **20** (0,140 г, 0,042 ммоль) подвергали сочетанию с фосфорамидитом **9** (0,8 мл 0,1 М в АСН, 0,84 ммоль), окислению, детритилированию с помощью общей процедуры, описанной выше. Полученный неочищенный продукт очищали с помощью эксклюзионной хроматографии (Sephadex LH-20, DCM/MeOH 1:1) с получением продукта **21** (0,139 г, 0,036 ммоль) с выходом 86%. ¹H ЯМР (500 МГц, (CD₃)₂СО) δ= 1,31 – 1,46 (m, 4H, 2x CH₂ гексильный спейсер), 1,46 – 1,57 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 1,63 – 1,74 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 1,84 – 2,02 (m, 28H, 7x 5а'-H, 7x AcNH), 2,07 – 2,30 (m, 14H, 7x 5а-H, 7x 5-H), 2,82 – 2,97 (m, 14H, 7x CH₂ цианоэтил), 3,09 – 3,18 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 3,67 – 4,04 (m, 21H, 7x H-6, 7x H-4), 4,04 – 4,38 (m, 23H, 7x H-3, CH₂ гексильный спейсер, 7x CH₂ цианоэтил), 4,38 – 5,00 (m, 42H, 7x H-1, 7x H-2, 14x CH₂ Bn), 5,05 (s, 2H, CH₂ Bn-спейсер), 6,42 (bs, 1H, NH), 7,16 – 7,41 (m, 75H, H аром), 7,42 – 7,89 (m, 7H, NHAc). ¹³C ЯМР (125 МГц, (CD₃)₂СО) δ= 19,9 – 20,0 (7x CH₂ цианоэтил), 23,0 – 23,1 (7x CH₃ AcNH), 25,7 (CH₂ гексильный спейсер), 26,8 (CH₂ гексильный спейсер), 29,2 – 30,2 (7x CH₂ C-5а), 30,4 (CH₂ гексильный спейсер), 30,7 (CH₂ гексильный спейсер), 38,2 – 40,2 (7x CH C-5), 41,3 (CH₂ гексильный спейсер), 51,0 – 51,4 (7x CH C-2), 62,5 – 63,4 (7x CH₂ C-6), 63,4 – 63,5 (7x CH₂ цианоэтил), 66,2 (CH₂ Bn-спейсер), 68,7 (CH₂ гексильный спейсер), 72,2 – 75,6 (14x CH₂ Bn), 75,6 – 75,8 (7x CH C-1), 76,5 – 77,2 (7x CH C-4), 79,7 – 79,8 (7x CH C-3), 128,1 – 129,1 (CH аром), 139,2 – 140,0 (15x Cq Bn), 170,7 – 171,2 (7x C=O AcNH). ³¹P ЯМР (202 МГц, CD₃)₂СО) δ= –2,84, –2,77, –2,68, –2,45, –2,42, –2,37, –2,31, –1,94, –1,81, –1,78. МСВР: [C196H238N15O52P7 + 2H]⁺⁺ требуется 1926,73908, обнаружено 1926,73908.

1-О-окта-((2-ацетида-3,4-ди-О-бензил-2-дезокси-5а-карба-α-D-маннопиранозил-1-О-фосфорил)2-цианоэтил)-6-гексилбензилкарбамат (22) n = 8

Спирт **22** (0,105 г, 0,027 ммоль) подвергали сочетанию с фосфорамидитом **9** (0,7 мл 0,1 М в АСН, 0,68 ммоль), окислению, детритилированию с помощью общей процедуры, описанной выше. Полученный неочищенный продукт очищали с помощью эксклюзионной хроматографии (Sephadex LH-20, DCM/MeOH 1:1) с получением

продукта **22** (0,103 г, 0,023 ммоль) с выходом 87%. ¹H ЯМР (500 МГц, (CD₃)₂CO) δ= 1,31 – 1,46 (m, 4H, 2x CH₂ гексильный спейсер), 1,46 – 1,57 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 1,63 – 1,74 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 1,84 – 2,02 (m, 32H, 8x 5a'-H, 8x AcNH), 2,07 – 2,30 (m, 16H, 8x 5a-H, 8x 5-H), 2,82 – 2,97 (m, 16H, 8x CH₂ цианоэтил), 3,09 – 3,18 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 3,67 – 4,04 (m, 24H, 8x H-6, 8x H-4), 4,04 – 4,38 (m, 26H, 8x H-3, CH₂ гексильный спейсер, 8x CH₂ цианоэтил), 4,38 – 5,00 (m, 48H, 8x H-1, 8x H-2, 16x CH₂ Bn), 5,05 (s, 2H, CH₂ Bn-спейсер), 6,42 (bs, 1H, NH), 7,16 – 7,41 (m, 85H, H аром), 7,42 – 7,89 (m, 8H, NHAc). ¹³C ЯМР (125 МГц, (CD₃)₂CO) δ= 19,9 – 20,0 (8x CH₂ цианоэтил), 23,0 – 23,1 (8x CH₃ AcNH), 25,7 (CH₂ гексильный спейсер), 26,8 (CH₂ гексильный спейсер), 29,2 – 30,2 (8x CH₂ C-5a), 30,4 (CH₂ гексильный спейсер), 30,7 (CH₂ гексильный спейсер), 38,2 – 40,2 (8x CH C-5), 41,3 (CH₂ гексильный спейсер), 51,0 – 51,4 (8x CH C-2), 62,5 – 63,4 (8x CH₂ C-6), 63,4 – 63,5 (8x CH₂ цианоэтил), 66,2 (CH₂ Bn-спейсер), 68,7 (CH₂ гексильный спейсер), 72,2 – 75,6 (16x CH₂ Bn), 75,6 – 75,8 (8x CH C-1), 76,5 – 77,2 (8x CH C-4), 79,7 – 79,8 (8x CH C-3), 128,1 – 129,1 (CH аром), 139,2 – 140,0 (17x Cq Bn), 170,7 – 171,2 (8x C=O AcNH). ³¹P ЯМР (202 МГц, CD₃)₂CO) δ= -2,84, -2,77, -2,68, -2,45, -2,42, -2,37, -2,31, -1,94, -1,81, -1,78. MS/MS: [C₂₂₂H₂₆₉N₁₇O₅₉P₈ + 2H]⁺ + требуется 2184,33410, обнаружено 2184,33410.

Общая процедура снятия защиты в типичном масштабе (5–40 мкмоль)

Исходный спирт растворяли в NH₃ (водный 30–33% раствор, 1 мл на 10 мкмоль) и диоксане (до полного растворения). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Исследование методами ¹H ЯМР и ³¹P ЯМР показало полное превращение в частично защищенное промежуточное соединение. Полученный неочищенный продукт растворяли в MilliQ H₂O и пропускали через колонку, содержащую катионообменную смолу Dowex Na⁺ (тип: 50WX4-200, которую хранили в 0,5 М NaOH в H₂O, перед использованием промывали MilliQ H₂O и MeOH). Полученный неочищенный продукт растворяли в MilliQ H₂O (2 мл на 10 мкмоль). К реакционной смеси добавляли 4-5 капель ледяной AcOH. Через смесь пропускали Ar. К раствору добавляли катализатор Pd black. Через реакционную смесь пропускали H₂ в течение нескольких секунд, и перемешивали в атмосфере H₂ в течение 3 дней. К полученной смеси добавляли целит. Полученный раствор фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученный неочищенный продукт очищали с помощью эксклюзионной хроматографии (Toyopearl HW-40). Полученное чистое соединение растворяли в MilliQ H₂O, пропускали через колонку, содержащую катионообменную

смолю Dowex Na⁺ (тип: 50WX4-200, которую хранили в 0,5 М NaOH в H₂O, перед использованием промывали MilliQ H₂O и MeOH) и подвергали лиофильной сушке.

1-*O*-окта-(2-ацетамидо-2-дезоксид-5а-карба-α-D-маннопиранозил-1-*O*-фосфорил)-6-гексиламин (8) n = 8

Спирт **22** (23,2 мкмоль) подвергали снятию защиты с помощью общей методики, описанной выше. Получали чистый олигомер **8** с выходом 44% (25,9 мг, 10,2 мкмоль). ¹H ЯМР (500 МГц, D₂O) δ= 1,33 – 1,43 (m, 4H, 2x CH₂ гексильный спейсер), 1,57 – 1,69 (m, 4H, 2x CH₂ гексильный спейсер), 1,73 – 2,08 (m, 48H, 8x 5a'-H, 8x 5a-H, 8x 5-H, 8x AcNH), 2,92 – 3,00 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 3,48 – 3,68 (m, 8H, 8x H-4), 3,68 – 3,76 (m, 2H, CH₂ гексильный спейсер), 3,81 – 4,22 (m, 24H, 8x H-3, 8x H-6), 4,25 – 4,36 (m, 8H, 8x H-1), 4,37 – 4,53 (m, 8H, 8x H-2). ¹³C ЯМР (126 МГц, D₂O) δ= 21,9 (8x CH₃ AcNH), 24,4 (CH₂ гексильный спейсер), 25,1 (CH₂ гексильный спейсер), 26,6 (CH₂ гексильный спейсер), 28,0 (8x CH₂ C-5a), 29,5 (CH₂ гексильный спейсер), 38,6 (8x CH C-5), 39,4 (CH₂ гексильный спейсер), 53,5 (8x CH C-2), 61,9 (8x CH₂ C-6), 66,2 (CH₂ гексильный спейсер), 70,1 (8x CH C-1), 70,4 (8x CH C-4), 71,9 (8x CH C-3), 174,7 (8x C=O AcNH). ³¹P ЯМР (202 МГц, D₂O) δ= 0,25, 0,37, 0,41, 0,44, 0,48. МСВР: [C₇₈H₁₄₅N₉O₅₇P₈ + H]⁺⁺ требуется 1183,83071, обнаружено 1183,83071.

Получение произвольно ацетилированных карба-олигомеров согласно настоящему изобретению

1. Защита аминогруппы путем получения производного Вос

Высушенные карба-аналоги DP6 (n=6), DP7 (n=7) и DP8 (n=8) солюбилизировали в H₂O:диоксане 1:1 об./об., затем добавляли NaHCO₃ (2,95 экв.) и (Вос)₂O (1,13 экв.) при 4°C. Затем реакционные смеси выдерживали при перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре в течение ночи, затем полученные продукты очищали с помощью колонки Sephadex G10 (элюент: H₂O), и фракции, содержащие соединения, сушили.

2. Произвольное О-ацетилирование

Высушенные Вос-защищенные карба-аналоги со стадии 1 ресуспендировали в ацетонитриле, затем добавляли уксусный ангидрид (3,6 экв. на каждую группу -ОН в молекуле) и имидазол (1,8 экв.). Реакционные смеси выдерживали при 40 °C, и время реакции ацетилирования продлевали до достижения целевого % ацетилирования (~75%) (осуществляли мониторинг с помощью ¹H-ЯМР). Затем неочищенные ацетилированные соединения сушили.

Во избежание сомнений, «произвольное О-ацетилирование» подразумевает отсутствие абсолютного контроля над тем, какие именно и сколько из R^x и R^y представляют собой $-C(O)CH_3$. Однако с помощью методик ЯМР можно определить общий % О-ацетилирования в олигомере.

Указанный олигомер также обозначен в настоящем документе как Ac-CarbaMenA с соответствующей степенью полимеризации (DP) олигомера, например, Ac-CarbaMenA DP8.

3. Удаление защитной группы Boc

Высушенные неочищенные О-ацетилированные карба-аналоги со стадии 2 солюбилизировали в CH_2Cl_2 :TFA 4:1 об./об., и реакционные смеси выдерживали при перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем неочищенные реакционные смеси сушили, повторно солюбилизировали в H_2O и очищали на колонке Sephadex G10 (элюент: H_2O).

Протокол ЯМР для определения % ацетилирования

Образцы сушили в вакууме, растворяли в 0,6 мл D_2O и переносили в ампулы для ЯМР диаметром 5 мм. Спектры протонного ЯМР получали с помощью стандартной одномерной программы импульсов при 400 МГц и 25 °С. Сбор и обработку данных выполняли с помощью программного обеспечения TopSpin, Bruker.

Определение % О-ацетилирования в карба-аналогах выполняли путем интегрирования пиков H_3+H_4 О-Ас (то есть Н ацетатных групп) при 5-5,4 м.д.(миллионных долей) и триплета CH_2 вблизи NH_2 линкера при ~3 м.д, которому присвоено значение 2. Исходя из ФИГ. 1, если предположить, что О-ацетилирование составляет 100%, полученное при интегрировании H_3+H_4 О-Ас значение должно составлять 12 в случае DP6 (14 в случае DP7 и 16 в случае DP8), и может быть использована следующая пропорция:

$$12 : 100 = 9.04 : X, \text{ где } X = \% \text{ ацетилирования}$$

Конечные продукты характеризовали с помощью 1H -ЯМР для подтверждения идентичности структуры и определения % О-ацетилирования синтетических сахаров (ФИГ. 2 и таблица 1)

На ФИГ. 2 показан спектр 1H ЯМР конечного произвольно ацетилированного карба-аналога с результатами интегрирования для определения % ацетилирования, где $n = 8$.

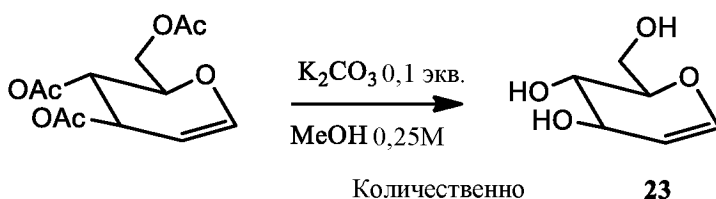
Карба-аналог	Степень произвольного О-ацетилирования, % (по данным ^1H -ЯМР)
DP 6	75
DP 7	78
DP 8	75

Таблица 1

Для того же произвольно ацетилированного карба-аналога формулы (Ia) с $n=8$ распределение ацетильных групп между положениями 3 и 4 определяли с помощью ^{31}P ЯМР-спектроскопии (101 МГц, D_2O). Зарегистрированный спектр показан на ФИГ. 3: он показывает одновременное ацетилирование, происходящее до степени 44% в положениях C3 и C4 (то есть R^x и R^y в одном и том же повторяющемся звене олигомера оба представляют собой $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), а также ацетилирование либо в положении C3, либо в положении C4 (то есть R^x представляет собой $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, и R^y представляет собой H, или R^x представляет собой H, и R^y представляет собой $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ в одном и том же повторяющемся звене) до степени 28%; и 27% повторяющихся звеньев не ацетилированы.

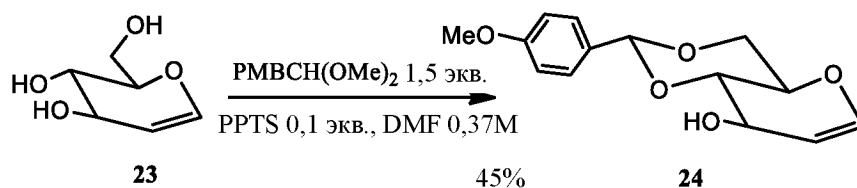
Пример 2: Получение селективно ацетилированного карба-мономерного структурного блока в соответствии со схемой 2 (например, где R^x представляет собой H, а R^y представляет собой $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$)

D-глюкаль (23)



К смеси 3,4,6-три-*O*-ацетил-*D*-глюкаля (10,0 г, 36,7 ммоль) добавляли K_2CO_3 (508 мг, 3,67 ммоль) в $\text{MeOH}_{\text{сух.}}$ (150 мл), и затем перемешивали в атмосфере N_2 при комнатной температуре. Через 1 час реакция завершалась, и ее останавливали добавлением уксусной кислоты до достижения pH 7. Растворитель выпаривали при пониженном давлении, и неочищенный продукт *D*-глюкаля, прозрачную маслянистую жидкость, непосредственно применяли на следующей стадии.

4,6-*O*-(4-метоксибензилиден)-*D*-глюкаль (24)



К неочищенному соединению **23** в безводном DMF (100 мл) добавляли диметилацеталь анисового альдегида (9,40 мл, 55,1 ммоль) и затем *n*-толуолсульфонат пиридина (922 мг, 3,67 ммоль) в атмосфере N₂. Реакцию проводили при 25-30°C в вакууме (180 мбар) в течение 2,5-3 часов на ротационном испарителе. Затем DMF выпаривали при пониженном давлении, и неочищенный продукт экстрагировали 100 мл DCM. Органический слой последовательно промывали 50 мл NH₄Cl, 50 мл дистиллированной воды и 50 мл рассола. Затем собранные водные слои подвергали экстракции 50 мл DCM. Затем полученную смесь сушили над Na₂SO₄ и упаривали при пониженном давлении с получением 4,6-О-(4-метоксибензилиден)-D-глюкаля в виде порошка белого цвета с выходом 45%.

δ ¹H (400 МГц; CDCl₃)

7,43 (2H, тд, J 8,6, J 4,7, 8-H), 6,90 (2H, дт, J 8,8, J 4,9, 9-H), 6,33 (1H, ддд, J 6,1, J 1,6, J 0,4, 1-H), 5,55 (1H, s, 7-H), 4,76 (1H, дд, J 6,1, J 2,0, 2-H), 4,49 (1H, уш. д, J 7,3, 3-H), 4,35 (1H, дд, J 10,3, J 5,0, 5-H), 3,93-3,87 (1H, m, 6-H), 3,83-3,79 (1H, m, 6-H), 3,80 (3H, s, -OMe), 3,77-3,75 (1H, m, 4-H), 2,47 (1H, s, -OH).

δ ¹³C (100 МГц; CDCl₃)

159,4 (11-C), 143,3 (1-C), 128,6 (8-C), 126,7 (9-C), 112,8 (10-C), 102,7 (2-C), 100,9 (7-C), 79,8 (4-C), 68,9 (5-C), 67,6 (6-C), 65,7 (3-C), 54,4 (OMe).

3-О-бензилокси-4,6-О-(4-метоксибензилиден)-D-глюкаль (25)



К раствору **24** (16,05 г, 60,7 ммоль) в DMF (350 мл) при 0°C порциями добавляли 60% гидрид натрия в минеральном масле (7,29 г, 182 ммоль) - NaH может быть предварительно 3 раза отмыт от минерального масла безводным *n*-гексаном. После 30 минут перемешивания при той же температуре баню со льдом удаляли. Добавляли бензилбромид (14,4 мл, 121 ммоль), и реакционную смесь перемешивали в течение ночи,

при этом температура повышалась до комнатной температуры. Затем полученную смесь гасили метанолом (20 мл) и выпаривали DMF при пониженном давлении. Органическую фазу экстрагировали 100 мл EtOAc, и затем органический слой промывали NH_4Cl , NaHCO_3 и рассолом (50 мл каждого). Органический слой сушили над Na_2SO_4 , и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии на силикагеле ($\text{EtOAc/гексан}=3:7$) с получением 3-О-бензилокси-4,6-О-(4-метоксибензилиден)-D-глюкала (18,43 г, 86%) в виде порошка белого цвета.

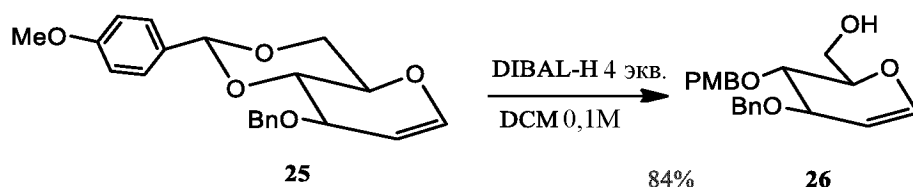
δ ^1H (400 МГц; CDCl_3)

7,42 (2H, дт, J 8,5, J 4,6, 8-H), 7,37-7,23 (7H, м, H аром), 6,90 (2H, дт, J 8,9, J 4,9, 9-H), 6,34 (1H, dd, J 6,2, J 1,4, 1-H), 5,58 (1 H, s, 7-H), 4,81 (1H, dd, J 6,17, J 2,06, 2-H), 4,79 (1H, d, J 12,1, 10-H CH_2 Ph), 4,70 (1H, d, J 12,1, 10-H CH_2 Ph), 4,36–4,32 (2H, м, 3-H, 6a-H), 4,00 (1H, dd, J 9,8, J 7,4, 6b-H), 3,88 (1H, td, J 10,1, J 4,7, 5-H), 3,81 (1H, t, J 10,1, 4-H), 3,80 (3H, s, -OMe).

δ ^{13}C (100 МГц; CDCl_3)

160,2 (11-C), 144,5 (1-C), 138,6 (13-C), 129,9 (8-C), 129,9-127,2 ($\text{C}_{\text{аром}}$ 9, 14, 15, 16-C), 113,7 (10-C), 102,4 (2-C), 101,3 (7-C), 80,1 (5-C), 73,2 (4-C), 72,1 (6-C), 68,8 (3-C), 68,4 (12-C), 55,4 (-OMe).

3-О-бензилокси-4-О-(4-метоксибензилокси)-D-глюкаль (26)



Глюкаль **25** (780 мг, 2,20 ммоль) растворяли в DCM (20 мл), охлаждали до 0°C и перемешивали в течение 20 минут при к.т. (комнатной температуре). Затем по каплям добавляли 1M DIBAL-H в гексане (11,0 мл, 11,0 ммоль) при 0°C . Полученную смесь перемешивали в течение 2 ч при 0°C . Реакцию останавливали раствором тетрагидрата тартрата калия-натрия, обычно называемого солью Рошеля (Rochelle salt), в дистиллированной воде (1,5 г тартрата в 7,5 мл воды) в течение 20 минут. Затем смесь подвергали экстракции DCM (30 мл), и органический слой дважды промывали дистиллированной водой, а также рассолом (40 мл каждого). Затем водные слои подвергали экстракции DCM (20 мл). Органические фазы объединяли и сушили над Na_2SO_4 . Растворитель выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали с

помощью флэш-хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан=1:3) с получением 3-О-бензилокси-4-О-(4-метоксибензилокси)-D-глюколя в виде твердого вещества белого цвета с выходом 84%.

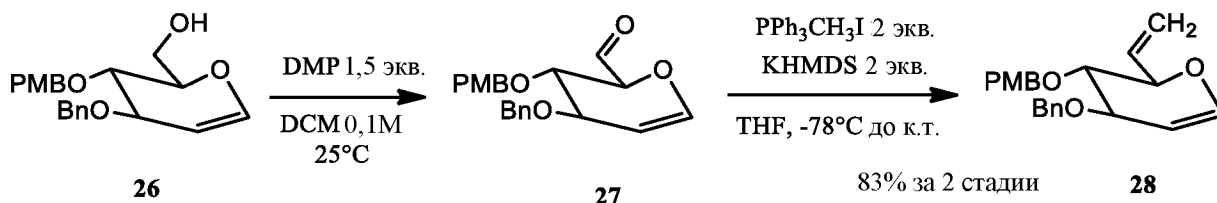
δ ^1H (400 МГц; CDCl_3)

7,34-7,20 (7H, м, H аром), 6,83 (2H, дт, J 8,7, J 4,8, 9-H), 6,34 (1H, dd, J 6,1, J 1,2, 1-H), 4,82 (1H, dd, J 6,1, J 2,6, 2-H), 4,75 (1H, d, J 11,1, 10-H CH_2 Ph), 4,63 (1H, d, J 11,1, 10-H CH_2 Ph), 4,61 (1H, d, J 11,8, 7-H CH_2 Ph(4-OMe)), 4,52 (1H, d, J 11,8, 7-H CH_2 Ph(4-OMe)), 4,19 (1H, ддд, J 6,3, J 2,4, J 2,3, 3-H), 3,87 (1H, дт, J 8,8, J 4,2, 5-H), 3,81-3,79 (2H, м, 6-H), 3,77 (1H, dd, J 8,7, J 6,3, 4-H), 3,71 (3 H, s, -OMe), 2,65 (1H, s, -OH).

δ ^{13}C (100 МГц; CDCl_3)

159,2 (11-C), 144,4 (1-C), 138,1 (13-C), 130,1 (8-C), 129,7-127,6 ($\text{C}_{\text{аром}}$ 9, 14, 15, 16-C), 113,7 (10-C), 100,1 (2-C), 77,5 (5-C), 75,6 (3-C), 74,1 (4-C), 73,3 (12-C), 70,4 (7-C), 61,4 (6-C), 55,1 (-OMe).

1,5-Ангидро-3-О-бензилокси-4-О-(4-метоксибензилокси)-2,6,7-тридезоксид-арабино-гепт-1,6-диенит (28)



К раствору ранее полученного спирта **26** (650 мг, 1,82 ммоль) в безводном DCM (6,1 мл) добавляли DMP (926 мг, 2,18 ммоль). Затем полученную смесь перемешивали при комнатной температуре (25°C) в течение 1 часа.

В то же время получали илид с использованием свежего $\text{PPh}_3\text{CH}_3\text{I}$ (1,48 г, 3,65 ммоль) в безводном THF (12,0 мл) при -78°C и перемешивали в течение 25 минут. Затем по каплям добавляли KHMDS (7,3 мл, 3,65 ммоль, 0,5 М в толуоле) при -78°C. Смесь последовательно перемешивали при -78°C в течение 20 мин, при 0°C в течение 50 мин, и затем при -78°C в течение 30 мин с получением илида.

Наряду с этим реакцию окисления останавливали раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (30 мл) и NaHCO_3 (30 мл) в течение 10 мин. Затем альдегид обрабатывали DCM (3×40 мл), сушили над Na_2SO_4 , и выпаривали DCM при пониженном давлении.

Затем к илиду по каплям добавляли альдегид в безводном THF (11,0 мл) при -78°C. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Смесь обрабатывали NH_4Cl (20

мл) и DCM (50 мл). Затем органический слой снова подвергали экстракции DCM (2×30 мл), промывали NaCl (80 мл) и сушили над Na₂SO₄. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (н-гексан/EtOAc=7:3) с получением алкена в виде маслянистой жидкости желтого цвета с выходом 83% за 2 стадии.

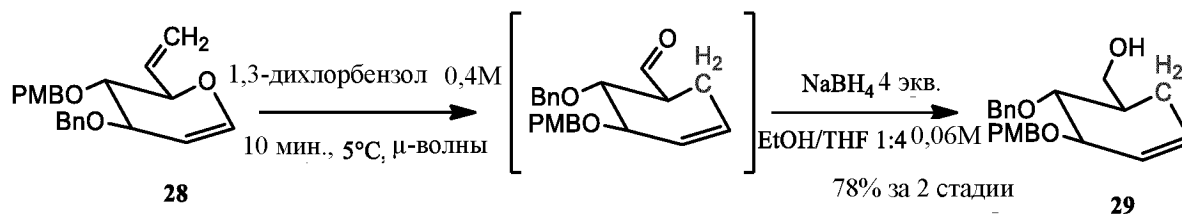
δ ¹H (400 МГц; CDCl₃)

7,37-7,27 (4H, м, H аром), 7,24 (2H, дт, J 8,6, J 5,5, 9-H), 6,86 (2H, тд, J 8,7, J 5,5, 10-H), 6,41 (1H, dd, J 6,1, J 1,3, 1-H), 6,04 (1H, ддд, J 17,2, J 10,6, J 6,6, 6-H), 5,43 (1H, дт, J 2,9, J 17,3, 7b-H), 5,31 (1H, дт, J 2,6, J 10,6, 7a-H), 4,88 (1H, dd, J 6,2, J 2,7, 2-H), 4,70 (1H, d, J 10,9, 11-H, CH₂ Ph), 4,64 (1H, d, J 11,7, 8-H, CH₂ Ph(4-OMe)), 4,62 (1H, d, J 10,9, 11-H CH₂ Ph), 4,58 (1H, d, J 11,7, 8-H CH₂ Ph(4-OMe)), 4,31 (1H, dd, J 7,1, J 8,0, 5-H), 4,19 (1H, ддд, J 6,2, J 2,5, J 1,5, 3-H), 3,79 (3H, s, -OMe), 3,59 (1H, dd, J 8,6, J 6,2, 4-H).

δ ¹³C (100 МГц; CDCl₃)

159,4 (12-C), 144,6 (1-C), 138,5 (14-C), 134,5 (6-C), 130,3 (9-C), 129,8-127,8 (C_{аром} 10, 15, 16, 17-C), 118,4 (7-C), 113,9 (11-C), 100,5 (2-C), 78,2 (5-C), 78,0 (4-C), 75,5 (3-C), 73,6 (8-C), 70,8 (13-C), 55,4 (-OMe).

(3R,4R,5R)-4-O-бензилокси-3-O-(4-метоксибензилокси)-5-(гидроксиметил)циклогексен (29)



Алкен **28** (200 мг, 0,57 ммоль) растворяли в *m*-DCB (1,43 мл, 0,4 М) при к. т. Затем проводили перегруппировку Кляйзена в условиях микроволнового нагрева при 265°C в течение 10 мин. После исчезновения желтой окраски раствор реакционноспособного альдегида немедленно выливали в смесь NaBH₄ (86 мг, 2,27 ммоль) в THF/EtOH (10 мл, 4:1) и перемешивали в течение 1 ч при к. т. (одиночное пятно на TLC, раствор оранжевого цвета). Реакцию гасили дистиллированной водой (10 мл). Водную фазу увеличивали на 10 мл дистиллированной воды и подвергали экстракции DCM (3×20 мл). Затем органические слои сушили над Na₂SO₄. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (н-гексан/EtOAc=8:2) с получением спирта **7** в виде бесцветной маслянистой жидкости с выходом 78% за 2 стадии.

δ ¹H (400 МГц; CDCl₃)

7,28-7,16 (7H, м, H аром), 6,79 (2H, уш. д, J 8,3, 14-H), 5,67-5,64 (1H, м, 1-H), 5,64-5,59 (1H, м, 2-H), 4,88 (1H, d, J 11,3, 8-H CH₂ Ph), 4,64 (1H, d, J 11,3, 8-H CH₂ Ph), 4,56 (1H, d, J 11,2, 12-H CH₂ Ph(4-OMe)), 4,48 (1H, d, J 11,7, 12-H CH₂ Ph(4-OMe)), 4,12 (1H, уш. д, 4-H), 3,71 (3H, s, -OMe), 3,57-3,47 (3H, м, 3-H, 6-H), 2,35 (1H, s, -OH), 2,07-2,00 (1H, м, 7-H), 1,97-1,88 (1H, м, 5-H), 1,82-1,75 (1H, м, 7-H), $\delta^{13}\text{C}$ (100 МГц; CDCl₃)

$\delta^{13}\text{C}$ (100 МГц; CDCl₃)

159,4 (17-C), 138,5 (9-C), 132,1 (14-C), 130,5-128,0 (C_{аром} 10, 11, 12, 15-C), 127,7 (1-C), 126,1 (2-C), 114,0 (16-C), 82,3 (3-C), 80,9 (4-C), 74,4 (8-C), 71,1 (13-C), 65,9 (6-C), 55,4 (-OMe), 40,7 (5-C), 28,1 (7-C).

4-О-бензил-3-О-(4-метоксибензилокси)-6-О-тексилдиметилсилил-5-метилциклогексен (30)



Спирт **29** (715 мг, 2,02 ммоль) растворяли в безводном THF (17 мл) при к. т. Добавляли имидазол (125 мг, 1,83 ммоль), и полученную смесь перемешивали при к. т. в течение 5 минут и затем при 0°C в течение 10 минут. Затем по каплям добавляли тексилдиметилсилилхлорид (1,19 мл, 6,05 ммоль), обращая внимание на образование осадка белого цвета. При этом баню со льдом удаляли в начале осаждения и медленно добавляли к смеси оставшийся TDSCl, оставляли для нагревания до к. т. и перемешивали в течение ночи. Ход реакции отслеживали с помощью TLC (Pent/AcOEt 3:1). Органическую фазу подвергали экстракции EtOAc, и затем промывали дистиллированной водой (5 раз). Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (н-гексан/AcOEt 95:5) с получением соединения **30** в виде маслянистой жидкости желтого цвета с количественным выходом.

$\delta^1\text{H}$ (400 МГц; CDCl₃)

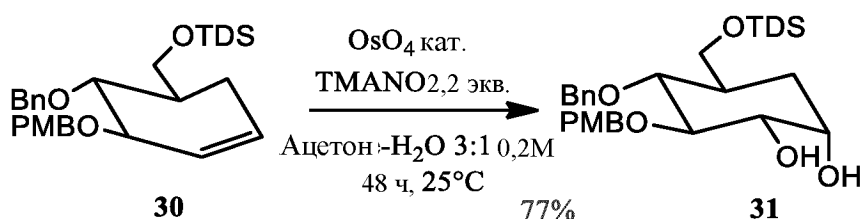
7,37-7,16 (7H, м, H аром), 6,88-6,84 (2H, м, 14-H), 5,75 (1H, ddкв, J 9,0, J 4,3, J 2,4, 1-H), 5,64 (1H, уш. д, 2-H), 4,91 (1H, d, J 11,0, 8-H CH₂ Ph), 4,68 (1H, d, J 11,0, 8-H CH₂ Ph), 4,64 (1H, d, J 11,3, 12-H CH₂ Ph(4-OMe)), 4,60 (1H, d, J 11,3, 12-H CH₂ Ph(4-OMe)), 4,16 (1H, ddкв, J 7,1, J 3,6, J 1,8, 3-H), 3,86 (1H, dd, J 9,8, J 4,8, 6-H), 3,79 (3H, s, -OMe), 3,64 (1H, dd, J 10,0, J 6,6, 4-H), 3,63-3,58 (1H, м, 6-H), 2,28-2,16 (1H, м, 7-H), 2,10 (1H, дт,

J 18,4, J 5,3, 7-H), 1,91 (1H, ттд, J 10,5, J 5,1, J 2,7, 5-H), 1,64 (1H, гепт, J 6,9, 17-H), 0,90 (6H, d, J 6,9, 18-H), 0,87 (6H, s, 16-H), 0,13 (6H, s, 15-H).

$\delta^{13}\text{C}$ (100 МГц; CDCl_3)

159,3 (14-C), 139,3 (9-C), 133,8 (17-C), 131,0-128,0 ($\text{C}_{\text{аром}}$ 10, 11, 12, 15-C), 127,6 (1-C), 126,3 (2-C), 113,9 (16-C), 81,5 (3-C), 79,7 (4-C), 74,7 (8-C), 71,5 (13-C), 62,6 (6-C), 55,4 (-OMe), 41,4 (5-C), 34,3 (21-C), 28,7 (7-C), 25,3 (19-C), 20,5-20,3 (20-C), 18,8-18,7 (22-C), -3,27- -3,46 (18-C).

4-*O*-бензил-3-*O*-(4-метоксибензилокси)-6-*O*-тексилдиметилсилил-5а-карба- α -D-глюкопираноза (31)



Соединение **30** (230 мг, 0,46 ммоль) растворяли в смеси ацетона (1,69 мл) и воды (562 мкл). Добавляли раствор OsO_4 (537 мкл из расчета приготовления 250 мг OsO_4 в 4,5 мл H_2O и 18 мл ацетона) и TMANO (116 мг, 1,02 ммоль) при к. т. Реакцию проводили при 25°C в течение 48 ч. Добавляли насыщенный водный раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (2 мл), и полученную смесь перемешивали при к. т. с восстановлением OsO_4 . Органическую фазу подвергали экстракции CHCl_3 (15 мл), промывали рассолом (10 мл) и затем сушили над Na_2SO_4 . Полученный неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (н-гексан/ AcOEt , 8:2) с получением диола **31** в виде бесцветной маслянистой жидкости с выходом 77%.

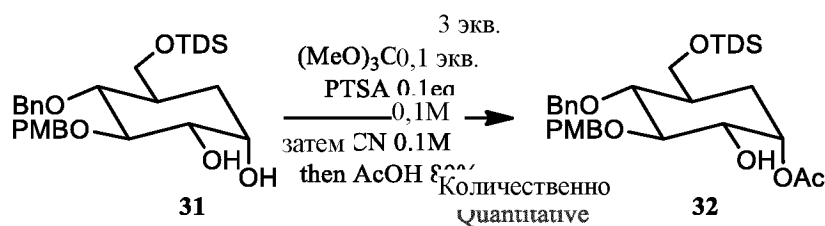
$\delta^1\text{H}$ (400 МГц; CDCl_3)

7,37-7,15 (7H, м, H аром), 6,87 (2H, уш. д, J 8,7, 14-H), 4,90 (1H, d, J 12, 8-H CH_2 Ph), 4,88 (1H, d, J 8, 12-H CH_2 Ph(4-OMe)), 4,69 (1H, d, J 10,9, 8-H CH_2 Ph), 4,61 (1H, d, J 11,1, 12-H CH_2 Ph(4-OMe)), 4,05 (1H, уш. д, J 2,7, 1-H), 3,96 (1H, dd, J 10,0, J 3,3, 6-H), 3,78 (3H, s, -OMe), 3,71 (1H, t, J 9,4, 3-H), 3,48 (2H, т, J 10,0, 6-H, 4-H), 3,43 (1H, dd, J 2,3, J 9,4, 2-H), 2,64 (1H, s, -OH), 2,58 (1H, s, -OH), 2,09-2,03 (1H, м, 5-H), 1,77 (1H, дт, J 14,5, J 3,6, 7-H), 1,62 (1H, гепт, J 6,9, 17-H), 1,59-1,52 (1H, м, 7-H), 0,88 (6H, d, J 6,9, 18-H), 0,85 (6H, d, д 1,2, 16-H), 0,07 (6H, s, 15-H).

$\delta^{13}\text{C}$ (100 МГц; CDCl_3)

159,5 (14-C), 138,9 (9-C), 130,9 (17-C), 129,7-127,7 ($C_{аром}$ 10, 11, 12, 15-C), 114,2 (16-C), 83,4 (3-C), 81,0 (4-C), 75,1 (13-C), 74,9 (8-C), 74,6 (2-C), 68,5 (1-C), 62,1 (6-C), 55,3 (-OMe), 38,9 (5-C), 34,3 (21-C), 30,4 (7-C), 25,2 (19-C), 20,5-20,4 (20-C), 18,8-18,7 (22-C), -3,35- -3,56 (18-C).

**1-*O*-ацетил-4-*O*-бензил-3-*O*-(4-метоксибензилокси)-6-*O*-
тексилдиметилсилил-5а-карба- α -D-глюкопираноза (32)**



Соединение **31** (155 мг, 0,29 ммоль) растворяли в ацетонитриле (2,9 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота. К смеси последовательно добавляли триметилортоацетат (115 мкл, 0,88 ммоль) и PTSA (5 мг, 0,03 ммоль) и затем перемешивали в течение 60 минут при комнатной температуре в атмосфере азота. После завершения реакции добавляли 80% раствор AcOH (2,32 мл AcOH + 0,58 мл H₂O). Последующая реакция ацетилирования полностью завершалась в течение 60 мин. Органическую фазу подвергали экстракции DCM (5 мл) затем промывали водой (5 мл) и NaHCO₃ (5 мл) и затем сушили над Na₂SO₄. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (н-гексан/AcOEt) с получением соединения **32**, селективно ацетилированного в псевдоаномерном положении, в виде бесцветной маслянистой жидкости с количественным выходом.

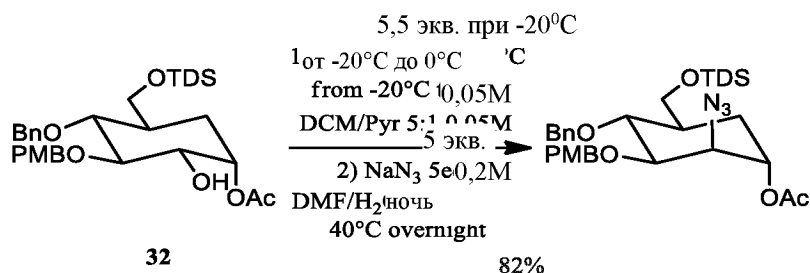
δ ¹H (400 МГц; CDCl₃)

7,39-7,13 (7H, м, H аром), 6,87 (2H, дт, J 8,7, J 5,0, 14-H), 5,26 (1H, dd, J 5,7, J 3,0, 1-H), 4,91 (1H, d, J 10,6, 8-H CH₂ Ph), 4,90 (1H, d, J 10,9, 12-H CH₂ Ph(4-OMe)), 4,70 (1H, d, J 10,0, 8-H CH₂ Ph), 4,68 (1H, d, J 10,5, 12-H CH₂ Ph(4-OMe)), 3,95 (1H, dd, J 10,0, J 3,5, 6-H), 3,80 (3H, s, -OMe), 3,75 (1H, t, J 9,3, 3-H), 3,58 (1H, уш. д, J 9,6, 2-H), 3,53 (1H, dd, J 9,1, J 10,1, 4-H), 3,50 (1H, dd, J 9,8, J 2,4, 6-H), 2,28 (1H, s, -OH), 2,08 (3H, s, -OAc), 1,95-1,88 (1H, m, 5-H), 1,85 (1H, дт, J 14,8, J 7,6, 7-H), 1,61 (1H, дт, J 13,8, J 6,9, 7-H), 1,61 (1H, гепт, J 6,9, 17-H), 0,88 (6H, d, J 6,8, 18-H), 0,84 (6H, d, J 1,7, 16-H), 0,07 (6H, d, J 4,4, 15-H).

δ ¹³C (100 МГц; CDCl₃)

170,9 (C(O), -OAc), 159,5 (14-C), 138,7 (9-C), 130,8 (17-C), 129,8-127,9 (С_{аром} 10, 11, 12, 15-C), 114,8 (16-C), 84,0 (3-C), 80,5 (4-C), 75,4 (13-C), 75,3 (8-C), 73,4 (2-C), 71,8 (1-C), 61,8 (6-C), 55,4 (-OMe), 39,6 (5-C), 34,3 (21-C), 28,8 (7-C), 25,3 (19-C), 21,4 (CH₃, -OAc), 20,5-20,4 (20-C), 18,8-18,7 (22-C), -3,28- -3,53 (18-C).

1-О-ацетил-2-азидо-4-О-бензилокси-3-О-(4-метоксибензилокси)-6-О-тексилдиметилсилил-5а-карба-α-D-маннопираноза



Соединение **32** (220 мг, 0,38 ммоль) растворяли в смеси DCM/пиридин (5:1, 0,05 М) и перемешивали в течение 10 мин при -10°C в атмосфере азота. По каплям добавляли трифлатный ангидрид (355 мкл, 2,11 ммоль) при -10°C . Смесь последовательно перемешивали в течение 30 мин до медленного достижения 0°C и еще 30 мин при 0°C . После завершения реакции органическую фазу промывали NaHCO_3 и рассолом. Органический слой сушили над Na_2SO_4 , и полученный неочищенный продукт после совместного выпаривания с толуолом (3 раза) непосредственно применяли на следующей стадии. Затем сухой неочищенный продукт растворяли в $\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$ (19:1, 0,2 М) при 40°C . Добавляли азид натрия (125 мг, 1,92 ммоль) и 15-краун-5 (15,2 мкл, 0,08 ммоль) при комнатной температуре, и проводили реакцию в течение ночи при 40°C . После полного исчезновения промежуточного трифлатного соединения растворитель выпаривали, и затем остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (н-гексан/ EtOAc) с получением азида указанного в заголовке соединения с выходом 82% в виде бесцветной маслянистой жидкости.

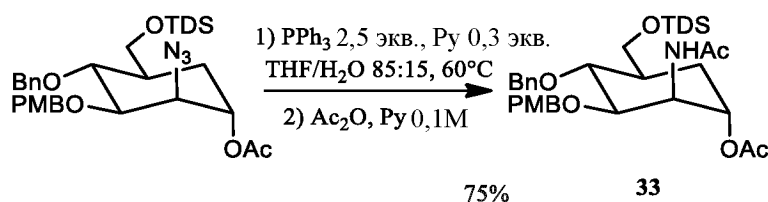
δ ^1H (400 МГц; CDCl_3)

7,38-7,14 (7H, м, H аром), 6,86 (2H, дт, J 8,6, J 4,9, 14-H), 4,98-4,94 (1H, м, 1-H), 4,88 (1H, d, J 10,7, 8-H CH_2 Ph), 4,66 (1H, d, J 19,1, 12-H CH_2 Ph(4-OMe)), 4,63 (1H, d, J 19,5, 12-H CH_2 Ph(4-OMe)), 4,59 (1H, d, J 10,9, 8-H CH_2 Ph), 3,87-3,84 (1H, м, 2-H), 3,84 (1H, dd, J 6,3, J 2,7, 6-H), 3,80 (3H, s, -OMe), 3,82-3,75 (2H, м, 4-H, 3-H), 3,52 (1H, dd, J 9,9, J 2,1, 6-H), 2,00 (3H, s, -OAc), 1,91-1,82 (2H, м, 5-H, 7-H), 1,65-1,57 (2H, м, 7-H, 17-H), 0,89 (6H, d, J 6,9, 18-H), 0,85 (6H, d, J 1,2, 16-H), 0,07 (6H, d, J 4,1, 15-H).

$\delta^{13}\text{C}$ (100 МГц; CDCl_3)

169,8 (C(O), -OAc), 159,6 (14-C), 138,9 (9-C), 130,2 (17-C), 129,8-127,8 ($\text{C}_{\text{аром}}$ 10, 11, 12, 15-C), 114,0 (16-C), 81,1 (4-C), 77,0 (3-C), 75,4 (8-C), 72,9 (13-C), 70,6 (1-C), 62,2 (6-C), 61,4 (2-C), 55,4 (-OMe), 39,8 (5-C), 34,4 (21-C), 27,1 (7-C), 25,3 (19-C), 21,2 (CH_3 , -OAc), 20,6-20,5 (20-C), 18,8-18,7 (22-C), -3,35- -3,52 (18-C).

1-*O*-ацетил-2-ацетамид-4-*O*-бензилокси-3-*O*-(4-метоксибензилокси)-6-*O*-тексилдиметилсилил-5а-карба- α -D-маннопираноза (33)



К смеси вышепредставленного азида (334 мг, 0,56 ммоль) добавляли PPh_3 (366 мг, 1,40 ммоль) и каталитическое количество пиридина (13,6 мкл, 0,17 ммоль) в $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ (85:15, 0,14 М) и перемешивали при 60°C в течение 24 ч. После исчезновения исходного вещества полученный амин сушили с удалением растворителя и затем растворяли в пиридине (5,6 мл). Добавляли уксусный ангидрид (1,06 мл, 11,2 ммоль), и раствор снова перемешивали в течение 24 ч. Полученный неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (н-гексан/ AcOEt) с получением ацетамида **33** в виде маслянистой жидкости желтого цвета с выходом 75%.

$\delta^1\text{H}$ (400 МГц; CDCl_3)

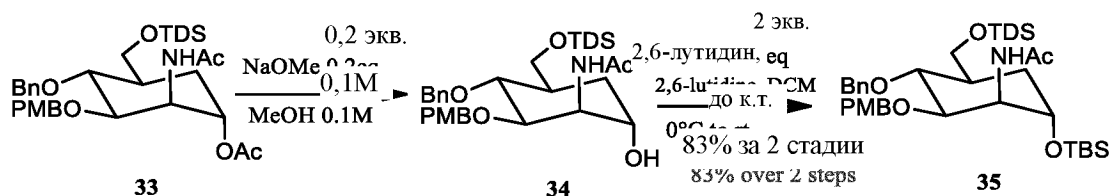
7,39-7,28 (5H, м, H аром), 7,19 (2H, дт, J 9,4, J 4,6, 13-H), 6,86 (2H, дт, J 9,4, J 4,8, 14-H), 5,59 (1H, d, J 8,1, NHAc), 5,12 (1H, td, J 7,2, J 3,9, 1-H), 4,71 (1H, d, J 11,3, 8-H CH_2 Ph), 4,56 (1H, d, J 11,3, 8-H CH_2 Ph), 4,50 (1H, d, J 11,2, 12-H CH_2 Ph(4-OMe)), 4,42 (1H, td, J 7,7, J 4,1, 2-H), 4,36 (1H, d, J 11,2, 12-H CH_2 Ph(4-OMe)), 3,84 (1H, dd, J 2,4, J 4,0, 3-H), 3,85-3,82 (1H, м, 6-H), 3,80 (3H, s, -OMe), 3,72 (1H, t, J 6,3, 4-H), 3,60 (1H, dd, J 9,9, J 5,5, 6-H), 2,09-2,02 (1H, м, 5-H), 2,01 (3H, s, -OAc), 1,90 (3H, s, -NHAc), 1,82 (2H, тdd, J 14,2, J 7,4, J 4,6, 7-H), 1,66-1,57 (1H, гепт, J 6,9, 17-H), 0,89 (6H, d, J 6,9, 18-H), 0,84 (6H, s, 16-H), 0,08 (6H, d, J 6,2, 15-H).

$\delta^{13}\text{C}$ (100 МГц; CDCl_3)

170,7 (C(O), -NHAc), 170,1 (C(O), -OAc), 159,6 (14-C), 138,6 (9-C), 130,0 (15-C), 129,9 (17-C), 128,6-127,8 ($\text{C}_{\text{аром}}$ 10, 11, 12-C), 114,1 (16-C), 78,7 (3-C), 74,4 (4-C), 73,6 (8-

C), 71,9 (13-C), 69,6 (1-C), 62,5 (6-C), 55,4 (-OMe), 50,6 (2-C), 39,9 (5-C), 34,4 (21-C), 27,1 (7-C), 25,2 (19-C), 23,5 (CH₃, -NHAc), 21,3 (CH₃, -OAc), 20,5 (20-C), 18,8 (22-C), -3,37- - 3,48 (18-C).

1-*O*-трет-бутилсилил-2-ацетамид-4-*O*-бензил-2-дезоксиг-3-*O*-(4-метоксибензилокси)-6-*O*-тесилдиметилсилил-5а-карба-α-D-маннопираноза (35)



Соединение **33** (582 мг, 0,95 ммоль) растворяли в MeOH (9,5 мл). К полученной смеси добавляли NaOMe (11 мг, 0,2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при к. т. Добавляли ионообменную смолу Amberlite H⁺ до достижения нейтрального pH. Полученную суспензию фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученный неочищенный продукт 3 раза выпаривали совместно с толуолом.

В токе газообразного N₂ в колбу помещали раствор **34** (0,95 ммоль) в DCM (4 мл). При 0°C по каплям добавляли 2,6-лутидин (2,37 ммоль) и затем TBSOTf (437 мкл, 1,9 ммоль). Смесь перемешивали, обеспечивая нагревание до комнатной температуры. После завершения реакции реакционную смесь охлаждали до к.т., гасили MeOH, и полученную смесь разбавляли хлороформом. Смесь промывали 10% водн. раствором CuSO₄ (2х), H₂O и рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Очистка с помощью колоночной хроматографии (н-гексан/EtOAc) обеспечивала получение указанного в заголовке соединения **35** в виде маслянистой жидкости оранжевого цвета с выходом 83% за 2 стадии.

J. D. C. Codée et al., J. Org. Chem, 2017, 82, **2**, 848-868.

δ ¹H (400 МГц; CDCl₃)

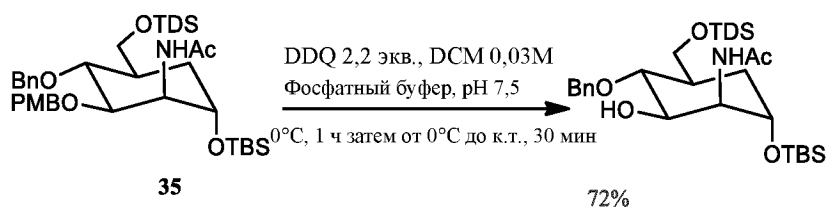
7,41-7,24 (5H, м, H аром), 7,19 (2H, дт, J 9,5, J 4,6, 13-H), 6,86 (2H, дт, J 9,4, J 4,8, 14-H), 5,57 (1H, d, J 5,7, NHAc), 4,93 (1H, d, J 10,6, 8-H CH₂ Ph), 4,58 (1H, d, J 10,5, 8-H CH₂ Ph), 4,56 (1H, d, J 11,1, 12-H CH₂ Ph(4-OMe)), 4,48 (1H, d, J 11,1, 12-H CH₂ Ph(4-OMe)), 4,27 (1H, dd, J 5,2, J 2,3, 2-H), 4,25-4,21 (1H, м, 1-H), 4,03 (1H, dd, J 9,6, J 4,5, 3-H), 3,97 (1H, dd, J 9,7, J 3,6, 6-H), 3,81 (3H, s, -OMe), 3,54 (1H, t, J 9,9, 4-H), 3,48 (1H, dd, J 9,7, J 2,2, 6-H), 2,09-2,02 (1H, м, 5-H), 2,01 (3H, s, -NHAc), 1,78-1,69 (1H, м, 7-H), 1,69-1,59

(1H, m, 17-H), 1,52-1,45 (1H, m, 7-H), 0,93 (6H, d, J 6,9, 18-H), 0,87 (6H, s, 16-H), 0,86 (6H, s, 20-H), 0,84 (6H, s, 16-H), 0,12 (6H, d, J 12,0, 19-H), 0,09 (6H, d, J 9,4, 15-H).

$\delta^{13}\text{C}$ (100 МГц; CDCl_3)

170,7 (C(O), -NHAc), 159,5 (14-C), 139,1 (9-C), 130,2 (17-C), 130,0 (15-C), 128,6-127,7 ($\text{C}_{\text{аром}}$ 10, 11, 12-C), 114,0 (16-C), 78,5 (3-C), 77,6 (4-C), 75,5 (8-C), 71,4 (13-C), 67,7 (2-C), 62,6 (6-C), 55,4 (-OMe), 53,4 (1-C), 38,6 (5-C), 34,6 (21-C), 30,4 (7-C), 25,9 (25-C), 25,2 (19-C), 23,6 (CH_3 -NHAc), 20,7-20,6 (20-C), 18,9-18,8 (22-C), 18,0 (24-C), -3,37- -3,58 (18-C), -4,82- -4,92 (23-C).

1-*O*-трет-бутилсиллил-2-ацетамид-4-*O*-бензилокси-3-*O*-(4-метоксибензилокси)-6-*O*-тесилдиметилсиллил-5а-карба- α -D-маннопираноза



К охлажденному (0°C) раствору **14** (71 мг, 0,10 ммоль) в DCM (3,4 мл) добавляли свежеприготовленный фосфатный буфер (362 мкл, pH 7,5, 10 mM). Небольшими порциями добавляли свежеприготовленный DDQ (50,0 мг, 0,22 ммоль) в течение 1 ч, после чего смесь оставляли для нагревания до к.т. и перемешивали в течение 30 мин. Смесь разбавляли NaHCO_3 и водный слой дважды подвергали экстракции DCM. Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Очистка с помощью колоночной хроматографии (н-гексан/ EtOAc) обеспечивала получение соединения **15** в виде твердого вещества оранжевого цвета с выходом 72%.

Dan Van Der Es, Thesis, 2016, Universiteit Leiden, pp160.

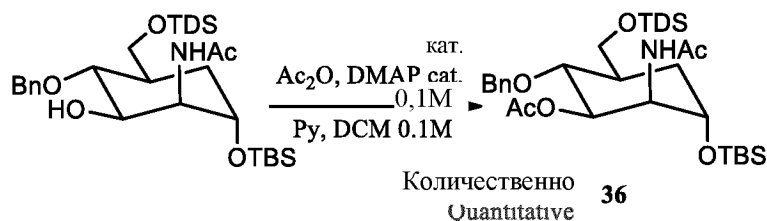
$\delta^1\text{H}$ (400 МГц; CDCl_3)

7,41-7,27 (5H, м, H аром), 5,52 (1H, d, J 5,4, NHAc), 4,73 (2H, s, 8-H CH_2 Ph), 4,26 (1H, уш. д, J 2,7, 1-H), 4,16 (1H, дт, J 9,0, J 3,8, 3-H), 4,06 (1H, dd, J 9,0, J 4,5, 2-H), 3,94 (1H, dd, J 9,9, J 3,7, 6-H), 3,53 (1H, dd, J 10,0, J 2,1, 6-H), 3,46 (1H, t, J 9,5, 4-H), 2,73 (1H, s, -OH), 2,10-2,03 (1H, м, 5-H), 2,00 (3H, s, -NHAc), 1,81-1,69 (1H, м, 7-H), 1,69-1,59 (1H, м, 14-H), 1,51 (1H, дт, J 13,7, J 3,2, 7-H), 0,93 (6H, d, J 6,9, 15-H), 0,88 (6H, s, 17-H), 0,87 (6H, s, 13-H), 0,14-0,04 (12H, м, 16-H, 12-H).

$\delta^{13}\text{C}$ (100 МГц; CDCl_3)

170,1 (C(O), -NHAc), 138,8 (9-C), 128,7-127,7 (C_{аром} 10, 11, 12-C), 79,6 (4-C), 74,8 (8-C), 70,7 (3-C), 67,6 (1-C), 62,9 (6-C), 56,5 (2-C), 38,5 (5-C), 34,6 (16-C), 31,2 (7-C), 25,9 (20-C), 25,3 (14-C), 23,6 (CH₃, -NHAc), 20,7-20,6 (15-C), 18,9-18,8 (17-C), 18,0 (19-C), -3,37- -3,53 (13-C), -4,80- -4,90 (18-C).

**1-*O*-трет-бутилсиллил-2-ацетамид-4-*O*-бензилокси-6-*O*-
тексилдиметилсиллил-5а-карба- α -D-маннопираноза (36)**



Представленный выше спирт (180 мг, 0,32 ммоль), растворяли в безводном DCM (3,2 мл) при к. т. в атмосфере азота. Последовательно добавляли пиридин (257 мкл, 3,18 ммоль), уксусный ангидрид (601 мкл, 6,36 ммоль) и каталитическое количество DMAP (7,8 мг, 0,06 ммоль), и полученную смесь перемешивали до окончания реакции. Раствор гасили MeOH и затем концентрировали при пониженном давлении. Очистка с помощью флэш-хроматографии (н-гексан/EtOAc) обеспечивала получение соединения **36** в виде маслянистой жидкости желтого цвета с количественным выходом.

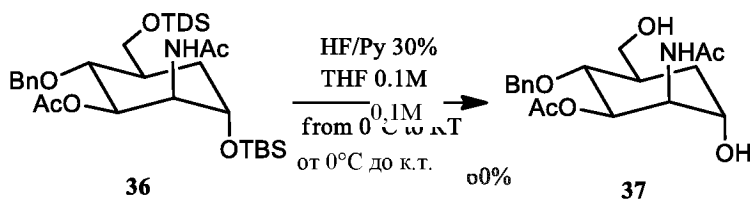
δ ¹H (400 МГц; CDCl₃)

7,37-7,13 (5H, м, H аром), 5,44 (1H, dd, J 10,3, J 4,5, 3-H), 5,27 (1H, d, J 7,4, NHAc), 4,70 (2H, d, J 10,9, 8-H CH₂ Ph), 4,61 (1H, d, J 10,9, 8-H CH₂ Ph), 4,31 (1H, дт, J 7,3, J 3,8, 2-H), 4,10 (1H, уш. д, J 2,7, 1-H), 3,97 (1H, dd, J 9,8, J 3,2, 6-H), 3,61 (1H, t, J 10,3, 4-H), 3,46 (1H, dd, J 9,8, J 2,0, 6-H), 2,18-2,11 (1H, м, 5-H), 2,00 (3H, s, -NHAc), 1,98 (3H, s, -OAc), 1,79-1,70 (1H, м, 7-H), 1,70-1,61 (1H, м, 14-H), 1,52 (1H, дт, J 14,3, J 2,8, 7-H), 0,95 (6H, d, J 6,9, 15-H), 0,90 (6H, s, 17-H), 0,88 (6H, s, 13-H), 0,13 (6H, d, J 15,1, 16-H), 0,09 (6H, d, J 14,8, 12-H).

δ ¹³C (100 МГц; CDCl₃)

170,0 (C(O), -NHAc), 169,8 (C(O), -OAc), 138,7 (9-C), 128,6-127,6 (C_{аром} 10, 11, 12-C), 76,2 (4-C), 75,1 (8-C), 73,2 (3-C), 68,1 (1-C), 62,3 (6-C), 54,0 (2-C), 38,7 (5-C), 34,6 (16-C), 30,6 (7-C), 25,8 (20-C), 25,3 (14-C), 23,6 (CH₃, -NHAc), 21,2 (CH₃, -OAc), 20,7-20,6 (15-C), 19,0-18,9 (17-C), 18,1 (19-C), -3,41- -3,62 (13-C), -4,90- -4,99 (18-C).

2-ацетамид-4-*O*-бензилокси-5а-карба- α -D-маннопираноза (37)



Соединение **36** (120 мг, 0,20 ммоль) растворяли в безводном THF (2,0 мл) при 0°C. По каплям добавляли раствор 30% HF/Py (420 мкл), и реакционную смесь оставляли при перемешивании в течение ночи при медленном нагревании от 0°C до к. т. Затем смесь гасили NaHCO₃ (3 мл). Органический слой дважды подвергали экстракции EtOAc, промывали рассолом и сушили над Na₂SO₄. Полученное неочищенное соединение **37** фильтровали через силикагель с получением твердого вещества белого цвета с выходом 60%.

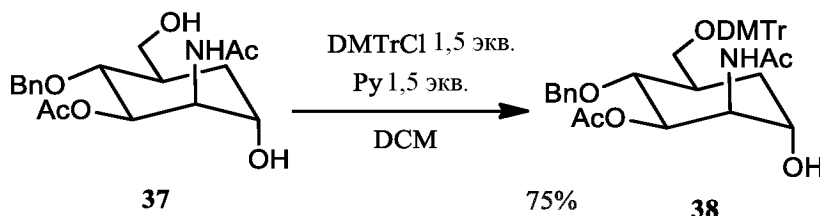
δ ¹H (400 МГц; CD₃OD)

7,37-7,26 (5H, м, H аром), 5,33 (1H, dd, J 8,4, J 4,4, 3-H), 4,72 (2H, d, J 11,4, 8-H CH₂ Ph), 4,66 (1H, d, J 11,4, 8-H CH₂ Ph), 4,45 (1H, t, J 4,8, 2-H), 4,10 (1H, уш. д, J 2,7, 1-H), 3,87 (1H, кв, J 4,5, 1-H), 3,78-3,73 (2H, м, 4-H, 6-H), 3,68 (1H, dd, J 10,6, J 4,2, 6-H), 2,17-2,09 (1H, м, 5-H), 2,04 (1H, s, -OH), 2,03 (1H, с -OH), 2,02 (3H, s, -NHAc), 1,98 (3H, s, -OAc), 1,83 (2H, dd, J 7,8, J 3,8, 7-H).

δ ¹³C (100 МГц; CDCl₃)

173,6 (C(O), -NHAc), 172,0 (C(O), -OAc), 140,0 (9-C), 129,3-128,6 (C_{аром} 10, 11, 12-C), 77,2 (4-C), 74,9 (8-C), 74,7 (3-C), 68,2 (1-C), 63,1 (6-C), 54,0 (2-C), 40,7 (5-C), 30,9 (7-C), 22,5 (CH₃, -NHAc), 21,1 (CH₃, -OAc).

2-ацетамид-4-О-бензилокси-6-О-диметокситритил-5а-карба-α-D-маннопираноза (**38**)



Соединение **37** (15 мг, 42,7 мкмоль) растворяли в безводном DCM в атмосфере азота при к. т. Последовательно добавляли сухой пиридин (5,2 мкл, 64,0 мкмоль) и DMTrCl (217 мг, 64,0 мкмоль), и затем полученную смесь перемешивали 3 ч при к. т. Затем к реакционной смеси добавляли H₂O. Органический слой один раз промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Очистка с помощью флэш-

хроматографии (н-гексан/АсОEt, 0,1% ТЕА) обеспечивала получение соединения **38** в виде твердого вещества белого цвета с выходом 74%.

δ ^1H (400 МГц; CD_3OD)

7,40-7,05 (14H, м, Н аром), 6,79 (4H, dd, J 8,9, J 1,7, 13-H), 5,24 (1H, dd, J 7,9, J 4,3, 3-H), 4,53 (1H, d, J 11,3, 8-H CH_2 Ph), 4,38 (1H, t, J 4,8, 2-H), 4,31 (1H, d, J 11,3, 8-H CH_2 Ph), 3,79 (1H, кв, J 5,2, 1-H), 3,72 (3H, s, -OMe), 3,72 (3H, s, -OMe), 3,61 (1H, t, J 8,1, 4-H), 3,34-3,26 (1H, м, 6-H), 3,05 (1H, t, J 8,3, 6-H), 2,34-2,24 (1H, м, 5-H), 2,08-1,98 (1H, м, 7-H), 1,95 (3H, s, -NHAc), 1,86 (3H, s, -OAc), 1,85-1,79 (1H, м, 7-H).

δ ^{13}C (100 МГц; CD_3OD)

173,6 (C(O), -NHAc), 172,0 (C(O), -OAc), 160,0 (17-C), 146,7 (9-C), 137,6 (14-C), 137,5 (14-C), 137,3 (9-C), 131,4 (18-C), 129,9-126,3 ($\text{C}_{\text{аром}}$ 10, 11, 12, 15, 19, 20, 21-C), 114,0 (16-C), 87,2 (13-C), 77,3 (4-C), 74,5 (3-C), 74,4 (8-C), 68,0 (1-C), 65,0 (6-C), 55,7 (-OMe), 54,1 (2-C), 39,2 (5-C), 31,9 (7-C), 22,5 (CH_3 , -NHAc), 21,1 (CH_3 , -OAc).

Пример 3 (Ссылочный пример): Получение конъюгата олигомера без ацетилирования – CRM-MenA DP6 (без OAc) и CRM-MenA DP8 (без OAc)

Исходные олигомеры (DP6 и DP8) сушили в вакууме, сольбилизовали в растворе $\text{H}_2\text{O}:\text{DMSO}$ 1:9 с получением конечной концентрации аминогрупп 40 ммоль/мл и приводили во взаимодействие с 12-кратным молярным избытком линкера ди-N-гидроксисукцинимидиладипата (SIDEA) в присутствии 5-кратного молярного избытка триэтиламина относительно аминогрупп. Реакционную смесь выдерживали при осторожном перемешивании при комнатной температуре в течение 3 ч. Активированные олигосахариды очищали путем осаждения 4 объемами этилацетата с последующим десятикратным промыванием осадка 1 мл того же растворителя. Наконец, осадок сушили в вакууме и определяли содержание введенных групп сложного эфира N-гидроксисукцинимидов.

Конъюгаты получали в 50 mM NaH_2PO_4 , pH 7, при молярном соотношении активный сложный эфир (AE):белок 40:1, реакцию проводили в течение ночи при комнатной температуре при осторожном перемешивании. Полученные конъюгаты очищали с помощью тангенциальной поточной фильтрации (Vivaspin) с порогом отсека 30 кДа и с применением PBS, pH 7,2, в качестве буфера. Характеристики конъюгатов определяли с помощью электрофореза в ПААГ с добавлением SDS, микрометода с бичинхониновой кислотой (micro BCA) (Smith, P.K., et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150:76-85) для определения

общего содержания белка и анализа матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI) для определения общего содержания сахара. Как показано в таблице 2 ниже, молярное отношение сахарид/белок, составляющее 16,9 и 10,4, было определено методом MALDI TOF MS для двух конъюгатов, полученных из карба DP6 и DP8, соответственно.

Конъюгат	Сахарид/белок	Сахарид/белок
	масс./масс. (мг/мл)	моль/моль
(avDP15) MenA-CRM ₁₉₇	0,53	6,3
Carba DP6-CRM ₁₉₇	0,63	16,9
Carba DP8-CRM ₁₉₇	0,50	10,5

Таблица 2

Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-Page). SDS-Page выполняли с использованием готовых 3-8% полиакриламидных гелей (NuPAGE® Invitrogen). Циклы электрофореза выполняли в Трис-ацетатном электродном буфере с добавлением SDS (NuPAGE® Invitrogen), каждый образец вносили в количестве 5 мкг белка, использовали электрофоретическую камеру с напряжением 150В в течение примерно 40 минут. Образцы готовили путем добавления 3 мкл буфера для образцов NuPAGE® LDS. После прохождения цикла электрофореза гель 3 раза промывали в H₂O, и затем окрашивали кумасси.

Пример 4: Получение конъюгата олигомера согласно настоящему изобретению в соответствии с формулой (IIa)

Произвольно О-ацетилированные карба-аналоги активировали с помощью ди-N-гидроксисукцинимидиладипатного линкера (SIDEA), и % активации, полученный для олигосахаридов, оценивали как 56% для DP6OAc, 79% для DP7OAc и 84% для DP8OAc.

Активированные олигосахариды (то есть активированные О-ацетилированные карба-аналоги) подвергали лиофилизации для подготовки к стадии конъюгирования. Конъюгаты получали с помощью химического процесса, представленного на ФИГ. 4, и на этой же фигуре показаны результаты исследования с помощью SDS-page, где можно наблюдать зоны конъюгатов.

Очищенные гликоконъюгаты (то есть те, которые включают О-ацетилированные карба-аналоги) характеризовали в отношении содержания белка с помощью MicroBCA (Smith, P.K., et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150:76-85) и в отношении содержания сахара с помощью НРАЕС-PAD, как показано в таблице 3.

	Сах./белок масс./масс.	Сахарид/белок моль/моль
Carba DP6 OAc – CRM₁₉₇	0,25	6,6
Carba DP7 OAc – CRM₁₉₇	0,27	6,2
Carba DP8 OAc – CRM₁₉₇	0,13	2,5

Таблица 3

Пример 5: Выбор длины олигомера *in vitro*

Важным условием иммуногенности карба-аналогов является их способность имитировать природные CPS MenA. С целью исследования этого свойства *in vitro* было протестировано связывание олигомеров различной длины с бактерицидным mAb к MenA (JW-A1) в сравнении с CPS и олигомером средней длины с avDP ~15, как описано в источниках Giuntini, S. et al., *PLoS One*, 2012, 7, e34272; Tsang, R. S. et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2005, **12**, 152-156; и Reyes, F. et al., *Biologicals*, 2013, **41**, 275-278.

Примечательно, что, как показано на ФИГ. 5А, в то время как DP с 4 по 7 не распознавали mAb, наблюдалось связывание с DP8, хотя и с IC₅₀ на 4 порядка выше по сравнению с нативным CPS. Де-О-ацетилирование CPS MenA приводило к снижению распознавания, что свидетельствует о специфичности указанного mAb к ацетилированным эпитопам.

Схожее поведение наблюдали при анализе ингибиторов с поликлональной сывороткой к MenA, полученной при иммунизации мышей конъюгатом MenA-CRM₁₉₇ (ФИГ. 5В), когда carba DP8 действовал как ингибитор сопоставимо с deOAc CPS.

Это подтверждало склонность carba DP8 к связыванию с антителами к MenA. Затем тестировали различные фрагменты в отношении сыворотки к deOAc MenA. В этом случае deOAc CPS (IC₅₀ = 1,86 × 10⁻⁶) ингибировал подобно Ac-аналогу, что указывает на специфичность сыворотки к основной цепи CPS независимо от характера ацетилирования. Наиболее важно, что распознавание наблюдали в случае всех аналогов

carba DP4-8, что указывает на то, что все они имеют сходство с участками деацетилированного CPS MenA.

Следует отметить, что аффинность связывания carba DP8 ($IC_{50} = 1,59 \times 10^{-2}$ мМ) была на один порядок выше, чем для DP7 ($IC_{50} = 1,84 \times 10^{-1}$ мМ). На основании этих результатов для конъюгирования с белком-носителем были выбраны DP8 и DP6, чтобы сравнить способность этих двух олигомеров, первый из которых явно связывался с антителами к MenA, а второй не демонстрировал распознавания, вызывать образование антител у мышей.

Пример 6: Конъюгирование carbaMenA DP6 и DP8 с CRM₁₉₇.

Соединения CarbaMenA DP6 и DP8 связывали с CRM₁₉₇ с помощью процедуры конъюгирования, ранее описанной в источнике Adamo et al. (*ACS Chem. Biol.*, 2012, 7, 1420-1428) и Adamo et al., (*J. Carbohydr. Chem.*, 2011, 30, 249-280), с использованием N-гидроксисукцинимидиладипатного линкера. Известно, что конъюгаты, полученные этим способом, не вызывают образования антител к линкеру (Adamo et al., *Chem. Sci.*, 2014, 5, 4302-4311). После обработки аминогрупп соединений DP6 и DP8 спейсером в DMSO, содержащем триэтиламин, полученный активированный олигомер очищали методом совместного осаждения с ацетоном и использовали для конъюгирования. Инкубирование в течение ночи с CRM₁₉₇ при молярном отношении гликан/белок 100:1 (соответствует отношению активный сложный эфир:белок 40-50 по данным количественного определения NHS) в забуференном растворе с pH 7,2 обеспечивало, согласно данным электрофореза в геле с добавлением SDS, получение целевого неогликоконъюгата, который очищали путем диализа с применением мембраны с порогом отсека по молекулярной массе 30 кДа. Молярное отношение сахарид/белок, составляющее 16,9 и 10,4, было определено методом MALDI TOF MS для двух конъюгатов, полученных из карба DP6 и DP8, соответственно.

Иммуногенность конъюгатов carbaMenA CRM₁₉₇.

Для исследования иммуногенности конъюгированных carbaMenA DP6 и DP8 группы из восьми самок мышей BALB/c иммунизировали указанными неогликоконъюгатами в соответствии с методологией, более подробно описанной ниже. В качестве контроля использовали конъюгаты, приготовленные, как описано ранее, из нормированного по размеру полисахарида MenA с avDP8,5 и ~15.

Мышам подкожно (п/к) вводили три дозы (2 мкг в расчете на сахарид) с интервалом в две недели. Неогликоконъюгат индуцировал иммунный ответ на 3 неделе,

что наблюдали путем анализа ответа сыворотки, вызванного конъюгатом, в отношении того же продукта, нанесенного на планшеты для ELISA. При исследуемых разведениях сыворотки не обнаруживались антител к CRM197. Каждый из конъюгатов обеспечивал выработку антител, распознающих конъюгированный антиген, и специфичность этого распознавания была подтверждена методом конкурентного ELISA. Связывание с сывороткой к carbaMenA DP8 ингибировалось неконъюгированным октамером в большей степени, чем его конъюгированной формой, вследствие поливалентной экспозиции антигена. Кроме того, это связывание ингибировалось примерно на 25% deOAc CPS и почти в равной степени природным образом ацетилированным аналогом, что позволяет предположить эффективность индуцированных антител в распознавании капсульных структур.

Для определения способности индуцированных антител к перекрестной реактивности с основной цепью CPS, лишенной ацетильных заместителей, сыворотки анализировали в отношении неацетилированного CPS, конъюгированного с сывороточным альбумином человека (HSA). Конъюгаты carbaMenA явно демонстрировали иммунный ответ к deOAc CPS, но титры IgG были ниже, чем титры, индуцируемые конъюгированными avDP8,5 и ~15, используемыми в качестве контролей ($p \leq 0,003$, ФИГ. 6B). Ответ на два указанных конъюгата карба-аналогов статистически не различался, однако количество мышей, ответивших на конъюгат DP8, было выше, чем ответивших на конъюгат DP6.

В случае проведения ELISA с применением ацетилированного CPS в качестве нанесенного на поверхность реагента различие между титрами IgG к нативному MenA, индуцированными неогликоконъюгатами carbaMenA DP6 и DP8, и контролями было еще более очевидным ($p < 0,0001$, ФИГ. 6A).

Затем функциональную активность индуцированных антител оценивали с использованием объединенных сывороток путем определения опосредованного комплементом лизиса бактерий, экспрессирующих ацетилированный CPS, как указано в источниках в in Gao, Q et al., *CS Chem. Biol.*, 2013, **8**, 2561-2567; и Adamo, R. et al., *Glycoconj. J.*, 2014, **31**, 637-647. Этот анализ считается прогностическим для менингококковых вакцин в отношении защиты у человека.

Он выявил низкую бактерицидную активность объединенной сыворотки ответивших мышей, индуцированной с применением конъюгатов carbaMenA DP6 и DP8 (1024 и 512, соответственно). При определении бактерицидной активности сыворотки

(SBA) с применением комплемента человека carba DP8-CRM₁₉₇ продемонстрировал титр 128, значительно более низкий, чем SBA сыворотки, полученной с использованием эталонной вакцины на основе природного CPS MenA avDP~15. Эти результаты (показанные на ФИГ. 6А) согласуются с опубликованным в литературе наблюдением, согласно которому антитела, индуцированные конъюгатом deOAc CPS MenA, практически не функциональны (Berry, D. S et al., *Infect. Immun.*, 2002, **70**, 3707-3713).

В совокупности эти данные показали, что carbaMenA DP8 является эффективным стабильным миметиком CPS MenA, способным связываться с антителами к CPS MenA. Конъюгат carbaMenA DP8 индуцировал антитела, способные активировать адсорбцию комплемента человека, в то время как carbaMenA DP6 не обладал такой способностью, что выделяет молекулу DP8 в качестве лидерного антигена. Однако вакцина на основе неогликоконъюгата carbaMenA DP8 индуцировала лишь низкие уровни бактерицидных антител к MenA. Принимая во внимание, что CPS MenA в различной степени О-ацетилирован в положениях 3 и 4, авторы настоящего изобретения стремились дополнительно увеличить сходство с природным полисахаридом и увеличить выработку защитных антител путем произвольного О-ацетилирования лидерной молекулы carbaMenA DP8.

Пример 7: Оптимизация содержащей гликомиметик кандидатной вакцины

Чтобы ввести сложноэфирные ацетильные группы в carbaMenA DP8, авторы настоящего изобретения сначала ввели временную защитную группу Вос в аминогруппу линкера. Затем полученное соединение осторожно ацетилировали путем обработки Ac₂O/имидазолом до достижения уровня ацетилирования 75%, подобно природному CPS. Последующее удаление защитной группы Вос обеспечивало готовый к конъюгированию Ac-carbaMenA DP8. ЯМР-анализ показал, что ацетильные группы находятся либо в положении C-3, либо в положении C-4, а также одновременное ацетилирование в положениях C-3/4 до степени 44%. Для исследования этого соединения в качестве потенциального антигена авторы настоящего изобретения сначала оценили связывание с mAb к CPS MenA в эксперименте с конкурентным поверхностным плазмонным резонансом (SPR). Этот SPR был оптимизирован для повышения чувствительности анализа по сравнению с ранее проведенным стандартным ELISA.

Ac-carbaMenA DP8 конъюгировали с CRM₁₉₇ посредством двухстадийной процедуры, применяемой для неацетилированных олигомеров, включающей реакцию с

ди-N-гидроксисукцинимидиладипатным спейсером и инкубирование с CRM₁₉₇. Очищенный неогликоконъюгат применяли в исследовании по иммунизации десяти самок мышей BALB/c с применением конъюгата avDP~15 CRM₁₉₇ в качестве эталона. После трех п/к инъекций (2 мкг в расчете на сахарид) собирали сыворотку и анализировали на содержание бактерицидных IgG. Как показано на ФИГ. 6C, Ac-carbaDP8-CRM₁₉₇ продемонстрировал на 4-log более высокую активность в качестве ингибитора по сравнению с его неацетилированным аналогом carbaDP8-CRM₁₉₇ (показано на ФИГ. 6A), и связывание с mAb было практически сравнимо с таковым для природных олигомеров avDP8 и avDP~15.

Примечательно, что конъюгат Ac-carbaMenA DP8-CRM₁₉₇ индуцировал более высокие уровни антител к CPS MenA по сравнению с контролем. Титры SBA, проанализированные у отдельных мышей, также показали, что указанный синтетический антиген был способен индуцировать опосредованное комплементом кролика бактерицидное уничтожение бактерий MenA, статистически не уступающее таковому для эталонной вакцины (ФИГ. 6D). Анализ с объединенными сыворотками подтвердил, что опосредованная комплементом человека бактерицидная активность также была сравнима для Ac-carbaMenA DP8 и природного avDP~15, что указывает на то, что Ac-carbaMenA DP8 является истинным и эффективным миметиком CPS MenA, который может быть применен для получения содержащей стабилизированный неогликоконъюгат вакцины.

Пример 8: Иммунологическая оценка произвольно O-ацетилированных карба-аналогов MenA DP6 и DP8

Для исследования иммуногенности конъюгированных карба-аналогов DP6 и DP8 с произвольным ацетилированием и без него группы из восьми самок мышей BALB/c иммунизировали указанными неогликоконъюгатами. Конъюгированный нормированный по размеру полисахарид MenA применяли в качестве контроля. Мышей иммунизировали тремя вводимыми подкожно (п/к) дозами (2 мкг в расчете на сахарид) с интервалом в две недели. Оценивали ответ на CPS MenA, и результаты показали отсутствие ответа для конъюгатов, полученных с применением сахаридного антигена carbaMenA без O-ацетилирования, при обеих длинах сахарных цепей 6 (n = 6) и 8 (n = 8). Напротив, конъюгаты carbaMenA, полученные после произвольного O-ацетилирования олигомера, индуцировали значительно более выраженный ответ в отношении нативного CPS MenA по сравнению с неацетилированной вакциной (таблица 4). Для сравнения,

ответ, индуцированный О-ацетилированными вакцинами, был ниже, чем в случае эталонного конъюгата MenA-CRM197, но лишь в 2 раза ниже в случае DP8, который обеспечил лучший ответ среди исследованных агентов.

Состав вакцины, применяемый в случае конъюгатов carba MenA, был следующим:

К исследуемому конъюгату добавляли 324,96 мкл AlPO_4 (4,43 мг/мл, содержал 2 мг/мл NaCl). Объем доводили до 1,2 мл при концентрации AlPO_4 1,2 мг/мл путем добавления буфера PBS с pH 7,2. Затем раствор разбавляли PBS 1:1 об./об. с получением объема 2,4 мл при конечной концентрации AlPO_4 0,6 мг/мл. Вводили 200 мкл состава на мышь. Эту процедуру также применяли для приготовления MenA-CRM197 из стокового раствора.

Ответ по данным ELISA после двух и трех введений доз представлен в таблице 4. Можно видеть, что группы 2 и 3 соответствуют настоящему изобретению. Для группы 2 применяли конъюгат олигомера, имеющий $n=6$ и произвольное ацетилирование, как описано выше. Для группы 3 применяли конъюгат олигомера, имеющий $n=8$ и произвольное ацетилирование, как описано выше. Уровень ацетилирования конъюгатов групп 2 и 3 составлял примерно 75%.

	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
	Нативный MenA– CRM₁₉₇	carbaMenA DP6OAc–CRM₁₉₇ (произвольное OAc)	carbaMenA DP8OAc–CRM₁₉₇ (произвольное OAc)	carbaMen A DP6– CRM₁₉₇ (без OAc)	carbaMen A DP8– CRM₁₉₇ (без OAc)
	После 2/после 3	После 2/после 3	После 2/после 3	После 2/после 3	После 2/после 3
GMT	1670/6202	174/1317	400/5480	2/2	2/100
	272/3200	400/3200	1396/4635	2/2	2/2
	1165/5434	800/5266	381/1350	2/100	2/2
	3200/12800	275/1600	186/1063	2/2	2/2
	400/6400	687/800	800/5398	2/2	13/100
	3200/11275	80/1600	670/3200	2/2	50/100

3200/11708	200/1600	400/1428	2/2	2/2
2526/12232	742/4351	168/1600	2/2	2/2
800/4472	270/2397	800/2932	2/2	2/2
1222/192	274/2990	400/1009	2/2	2/2
1328/5114	314/2165	463/2306	2/3	3/6

Таблица 4

На ФИГ. 8А и ФИГ. 8В представлены титры по данным ELISA после введения двух и трех доз. *p*-Значения относятся к сравнению эталонного нативного MenA-CRM197 и других групп.

Второе иммунологическое исследование проводили, как описано ниже, путем сравнения указанного выше произвольно О-ацетилированного аналога carbaMenA DP8 согласно настоящему изобретению с carbaMenA DP8, селективно О-ацетилированным только в положении 3 при степени О-ацетилирования примерно 70%, и с вакциной MenA в качестве положительного контроля, все агенты конъюгированы с CRM197.

Три группы из десяти мышей Balb/C иммунизировали указанными выше конъюгатами. Мышей иммунизировали тремя вводимыми подкожно (п/к) дозами (2 мкг в расчете на сахарид; 200 мкл состава на мышь) с интервалом в две недели. Состав вакцины, применяемый в случае конъюгатов carba MenA, был таким же, как описано выше для первого иммунологического исследования. Оценивали ответ на CPS MenA, и данные (представленные в таблице 5) показали, что общий ответ IgG после третьей иммунизации примерно в 10 раз ниже в случае 3-О-ацетилированного carbaMenA DP8, чем в случае эталонной вакцины MenA. Напротив, конъюгат произвольно О-ацетилированного carbaMenA DP8 согласно настоящему изобретению индуцировал значительно более выраженный ответ в отношении нативного CPS MenA по сравнению с 3-О-ацетилированным конъюгатом и по существу эквивалентный ответу эталонной вакцины MenA (см. ФИГ. 7).

	Группа 1	Группа 2	Группа 3
	Нативный MenA CRM ₁₉₇	DP8 carbaMenA CRM ₁₉₇ (3-ОАс)	DP8 carbaMenA CRM ₁₉₇ (произвольное ОАс)

GMT по данным ELISA (min;max)	7787 (3056;16016)	618 (50;2086)	19648 (10158;32933)
GMT SBA (min;max)	4350 (1310;9892)	63 (8;526)	2644 (6788;630)

Таблица 5

На ФИГ. 9 показаны опосредованные комплементом человека бактерицидные титры в сыворотке, индуцированные CRM₁₉₇-конъюгатами селективно 3-О-ацетилированного carbaMenA DP8 и произвольно ацетилированного carbaMenA DP8 согласно настоящему изобретению, после введения трех доз. Вакцину MenA-CRM₁₉₇ применяли в качестве положительного контроля.

Титры SBA, индуцированные конъюгатом произвольно О-ацетилированного CarbaMenA-CRM₁₉₇, были статистически сравнимы с таковыми для эталонной вакцины MenA после введения трех доз, в то время как конъюгат 3-О-ацетилированного CarbaMenA-CRM₁₉₇ индуцировал гораздо более низкие титры SBA в сыворотках по сравнению с эталонной вакциной, что было определено с использованием как комплемента крольчат, так и с комплемента человека.

Результаты, представленные на ФИГ. 10 и в таблице 6, указывают на способность антитела к MenA проявлять бактерицидные свойства против штамма MenA. В частности, содержащая нативный MenA-CRM₁₉₇ вакцина и вакцины, полученные с применением двух О-ацетилированных синтетических карба-аналогов (группа 2 (DP6) и группа 3 (DP8)), были способны поддерживать значительную бактерицидную активность также при определении с применением комплемента человека. О-ацетилированный синтетический карба-аналог DP8 согласно настоящему изобретению (группа 3) продемонстрировал лучшую бактерицидную активность, чем О-ацетилированный синтетический карба-аналог DP6 (группа 2). На ФИГ. 10 представлены титры SBA после двух и трех введений доз, полученные с комплементом кролика (rSBA) и человека (hSBA).

После 2	Группа 1 Натив- ный MenA- CRM	Группа 2 carbaMenA DP6OAc- CRM (произволь- ное OAc)	Группа 3 carbaMenA DP8OAc- CRM (произволь- ное OAc)	Группа 4 carbaMen A DP6- CRM (без OAc)	Группа 5 carbaMenA DP8-CRM (без OAc)
rSBA	4096	512	1024	<16	128

hSBA (донор комплемента человека 2)	2048	128	256	<16	<16
После 3					
rSBA	16384	2048	4096	128	1024
hSBA (донор комплемента человека 1)	8192	1024	4096	<16	<16
hSBA (донор комплемента человека 2)	8192	512	1024	<16	<16

Таблица 6

Заключение

На основании полученных данных можно заключить, что олигомеры carba MenA согласно настоящему изобретению могут быть использованы для разработки более стабильных версий вакцин MenA, и фрагмент ОАс в совокупности с длиной олигомера являются ключевыми факторами для индукции функционального иммунного ответа против штаммов MenA.

СПОСОБЫ

Получение неогликоконъюгатов. Аминоолигосахариды сушили в вакууме, солюбилизировали в растворе H₂O: DMSO 1:9 с получением конечной концентрации аминок групп 40 ммоль мл⁻¹ и приводили во взаимодействие с 12-кратным молярным избытком линкера ди-N-гидроксисукцинимидиладипата (SIDEA) в присутствии 5-кратного молярного избытка триэтиламина относительно аминок групп. Реакционную смесь выдерживали при осторожном перемешивании при комнатной температуре в течение 3 ч. Активированные олигосахариды очищали путем осаждения 4 объемами этилацетата с последующим десятикратным промыванием осадка 1 мл того же растворителя. Затем осадок сушили в вакууме и определяли содержание введенных групп сложного эфира N-гидроксисукцинимидида.

Конъюгаты получали в 50 mM NaH₂PO₄, pH 7, при молярном отношении активный сложный эфир (АЕ):белок 40:1, реакцию проводили в течение ночи при комнатной температуре при осторожном перемешивании. Полученные конъюгаты очищали с помощью тангенциальной поточной фильтрации (Vivaspin) с порогом отсечения 30 кДа и с применением PBS, pH 7,2, в качестве буфера. Характеристики конъюгатов определяли с помощью микрометода с бичинхониновой кислотой (micro BCA) (Smith,

P.K., et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85) для определения общего содержания белка и анализа MALDI для определения общего содержания сахара.

Иммунизация мышей и анализ методом ELISA:

Все мыши содержались в специфических непатогенных условиях. Составы антигенов готовили в стерильных условиях. Группы из 10 мышей BALB/c иммунизировали в дни 1, 14 и 28; отбор крови проводили в день 0 (до иммунизации), день 27 (после 2) и день 42 (после 3). Вакцины вводили в расчете на дозу сахара в дозе 2 мкг/мышь на каждое введение в расчете на сахарид. Адъювант $AlPO_4$ применяли в дозе 0,12 мг Al^{3+} . Ответ в виде выработки антител, индуцируемый гликоконъюгатами, определяли с помощью ELISA. Собранную до иммунизации сыворотку использовали в качестве отрицательного контроля в этом анализе. На планшеты наносили HSA-deOAc или CPS MenA путем добавления 100 мкл/лунку 5 мкг $мл^{-1}$ раствора полисахарида в буфере PBS при pH 8,2 с последующим инкубированием в течение ночи при 4° C⁴⁶. Конъюгаты HSA-deOAc CPS MenA, CRM₁₉₇, а также CRM₁₉₇ наносили при концентрации белка 2 мкг $мл^{-1}$ в буфере PBS, pH 7,2. Растворы для нанесения удаляли из планшетов путем трехкратной промывки буфером PBS с добавлением 0,05% Tween 20 (Sigma) (TPBS). Затем выполняли стадию блокирования путем добавления 100 мкл/лунку 3% раствора BSA в TPBS и инкубирования планшетов в течение 1 ч при 37°С. Блокирующий раствор удаляли из планшетов путем трехкратной промывки TPBS. В первую лунку каждого ряда планшета добавляли 200 мкл/лунку предварительно разведенной сыворотки (1:25 для отрицательного контроля до иммунизации, 1:200/1:500 для эталонной сыворотки и 1:25/1:200 для исследуемой сыворотки), тогда как в другие лунки вносили по 100 мкл TPBS. Затем выполняли восемь двукратных серийных разведений для каждого ряда путем переноса из лунки в лунку 100 мкл растворов сывороток. После разведения первичных антител планшеты инкубировали в течение 2 ч при 37°С. После трех промывок TPBS добавляли 100 мкл/лунку растворов конъюгатов вторичных антител со щелочной фосфатазой (антитела к IgG мыши 1:10000, Sigma-Aldrich) в TPBS, и планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°С. После еще трех промывок TPBS добавляли 100 мкл/лунку 1 мг $мл^{-1}$ p-NPP (Sigma) в 0,5 М диэтаноламиновом буфере, pH 9,6. Затем планшеты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре и регистрировали поглощение при 405 нм с помощью устройства для считывания планшетов Spectramax 190. Титры сывороток выражали в

виде величины, обратной разведению сыворотки, соответствующему пороговому значению $OD = 1$.

Каждая группа иммунизации была представлена в виде среднего геометрического (GMT) с 95% ДИ титров отдельных мышей. Статистический и графический анализ выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7.

Бактерицидный тест *in vitro*

Функциональные антитела, индуцированные иммунизацией с применением вакцины, анализировали путем определения комплемент-опосредованного лизиса *N.meningitidis* с помощью бактерицидного теста *in vitro* (Jackson, L. A et al., *Clin. Infect. Dis.*, 2009, **49**, e1-10). Коммерческую партию комплемента крольчат (Peel Freeze Biological, cod. 31061) использовали в качестве источника активного комплемента для rSBA, тогда как плазму использовали в качестве источника комплемента для hSBA.

Штамм *N. meningitidis* выращивали в течение ночи на чашках с шоколадным агаром при 37°C в 5% CO₂. Колонии инокулировали в среду Мюллера-Хинтона, содержащую 0,25% глюкозы, до достижения значения OD₆₀₀ 0,05-0,08 и инкубировали при 37°C при встряхивании. Когда бактериальные суспензии достигали значений OD₆₀₀ 0,25-0,27, бактерии разводили в буфере для анализа (DPBS с 1% BSA и 0,1% глюкозы) в рабочем разведении (примерно 10⁴ КОЕ мл⁻¹). Общий объем в каждой лунке составлял 50 мкл и включал 25 мкл серийных двукратных разведений исследуемой сыворотки, 12,5 мкл бактерий в рабочем разведении и 12,5 мкл источника комплемента. Исследуемые сыворотки объединяли и инактивировали нагреванием в течение 30 минут при 56°C. Отрицательные контроли включали бактерии, инкубированные отдельно с содержащей комплемент сывороткой без исследуемой сыворотки, а также с исследуемыми сыворотками и инактивированным нагреванием комплементом. Сразу после добавления комплемента крольчат отрицательные контроли высевали на чашки с агаром Мюллера-Хинтона с использованием метода наклона (момент времени 0). Планшет для микротитрования инкубировали в течение 1 часа при 37°C, затем каждый образец точно наносили в двух повторностях на чашки с агаром Мюллера-Хинтона, в то время как контрольные образцы высевали методом наклона (момент времени 1). Чашки с агаром инкубировали в течение ночи при 37°C и подсчитывали колонии, соответствующие моменту времени 0 и моменту времени 1 (выжившие бактерии). Бактерицидный титр сыворотки определяли как разведение сыворотки, приводящее к снижению количества колониеобразующих единиц (КОЕ) на мл на 50 % после 60 минут

инкубирования бактерий в реакционной смеси, по сравнению с контрольным количеством КОЕ на мл в момент времени 0. Как правило, бактерии, инкубированные без исследуемой мышиной сыворотки, как объединенной, так и отдельной, в присутствии комплемента (отрицательный контроль) демонстрировали увеличение количества КОЕ мл⁻¹ на 150–200 % в течение 60-минутного периода инкубирования. Эталонным штаммом менингококка серотипа А являлся F8238 (Mak, P. A., Santos, G. F., Masterman, K. A., Janes, J., Wacknov, B., Vienken, K., Giuliani, M., Herman, A. E., Cooke, M., Mbow, M. L., Donnelly, J., *Clin. Vacc. Immunol.*, 2011, **18**, 1252-1260.).

Статистические методы

Оценку с помощью непараметрического t-критерия выполняли на данных, полученных с помощью ELISA, оценку с помощью критерия Манна-Уитни проводили с помощью программного обеспечения GraphPad, выполняя сравнение рангов между двумя исследуемыми группами (то есть CRM₁₉₇-MenA avDP15 и CRM₁₉₇-MenA DP6OAc или DP8OAc). Данные ELISA представляли как среднее геометрическое с ДИ 95%. Кроме того, подбирали модель дисперсионного анализа (ANOVA) для log₁₀ титров антител, включающую группу (все группы, за исключением 4 и 5), время и взаимодействие «группа-время» в качестве фиксированных эффектов. Использовали модель гетерогенной дисперсии, поскольку между группами не предполагалось одинаковой дисперсии. В случае каждой конечной точки эту модель использовали для оценки средних геометрических группы и их 95% ДИ, а также отношений средних геометрических (О-ацетилированные составы по сравнению с эталоном) и 95% ДИ. В отличие от этого, для данных SBA, поскольку для каждой группы в каждый момент времени имеется одно наблюдение (объединенные сыворотки), был проведен только графический анализ.

Протокол количественного определения гидролизованного олигомера MenA и carbaMenA в конечных конъюгатах

Для определения количества мономера, высвобождаемого с течением времени из конъюгатов MenA и carbaMenA согласно настоящему изобретению, применяли НРАЕС-RAD. Представленные титры были получены путем гидролиза образцов под действием HCl в конечной концентрации 6М при 110°C в течение 2 часов в сушильном шкафу. После инкубирования образцы сушили в системе Speedvac, и затем повторно растворяли в воде и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Количественную оценку проводили с использованием стандартной кривой, построенной в диапазоне 0,5-5,0

мкг/мл с применением CarbaMenA DP7, количественно определенного с помощью ЯМР и подвергнутого той же обработке, что и образцы. Анализ проводили на системе ICS5000 (Dionex-Thermo Fisher), оснащенной колонкой CarboPac PA1 с защитной колонкой. Элюирование проводили с применением градиента ацетата натрия в присутствии 100 мМ гидроксида натрия со скоростью 1,0 мл/мин, и пик определяли путем интегрированного импульсного амперометрического обнаружения с использованием квадрупольной формы сигнала для углеводов. Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Chromeleon™ 7.2 Chromatography Data System (CDS).

Пример 9: Сравнение комбинированной вакцины ABCWY и комбинированной вакцины carbaMenA-BCWY

Для исследования ответа на MenACarba (произвольное OAc) в комбинации с антигенами MenBCWY четыре группы мышей Balb/C иммунизировали составами вакцин, указанными в таблице 7 ниже. Мышей иммунизировали тремя вводимыми подкожно (п/к) дозами (2 мкг в расчете на сахарид; 200 мкл состава на мышь) с интервалом в две недели (дни 1, 14 и 28) при сборе крови в дни 0, 27 и 42.

Состав вакцины, применяемый в случае конъюгатов carba MenA, был таким же, как описано выше для первого иммунологического исследования.

*B_{NG} означает, что антигенный компонент композиции Men B состоял из антигенов вакцины Бексеро совместно с дополнительным слитым белком fHbp, соответствующим слитому белку 231.13, определенному выше как SEQ ID NO: 35.

Группа	Антиген	Адьювант
1 (8 мышей)	MenAB_{NG}*CWY	AlumOH
2 (8 мышей)	MenA (эталон)	AlumOH
3 (4 мыши)	MenAcarba(произвольное OAc)+ MenB_{NG}*CWY	AlumOH
4 (4 мыши)	MenAcarba (произвольное OAc)	AlumOH

Таблица 7

Группам 1 и 2 вводили вакцинные составы, содержащие твердые (лиофилизированные) компоненты MenA. Группам 3 и 4 вводили полностью жидкие составы. Для ясности, MenAcarba соответствует carbaMenA.

Общий IgG определяли с помощью HT-ELISA для отдельных и объединенных сывороток после 3 введений, а также для объединенных сывороток после 2 введений.

Как показано на ФИГ. 11, титры IgG, индуцированные carbaMenA, сопоставимы с таковыми для MenA в комбинации с антигенами BCWY.

Важно отметить, что данные, представленные в первом столбце на ФИГ. 11 (MenAB_{NG}CWY), относятся к лиофилизированному компоненту Men A, смешанному с жидкими компонентами BCWY, тогда как данные для MenAcarba (произвольное OAc) + MenB_{NG}CWY относятся к полностью жидкому составу (без лиофилизированного компонента MenA).

Ответы в виде выработки функциональных антител определяли как с помощью rSBA, так и с помощью hSBA, и, как показано на ФИГ. 12, функциональная активность антител, индуцированных carbaMenA в комбинации с B_{NG}CWY, сопоставима с таковой для эталонной комбинации AB_{NG}CWY.

Следовательно, иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению имеют преимущество, заключающееся в том, что они эффективны в виде полностью жидкого состава с сохранением иммунологической эффективности эталонной пентавалентной композиции, которая включает лиофилизированные компоненты MenA, требующие разведения совместно с компонентами BCWY перед введением.

Пример 10: Сравнение комбинированной вакцины ABCWY и комбинированной вакцины carbaMenA-BCWY у крыс

СПОСОБЫ

Получение неогликоконъюгатов

Чтобы ввести сложноэфирные ацетильные группы в carbaMenA DP8 и DP10, авторы настоящего изобретения сначала ввели временную защитную группу Boc в аминокгруппу линкера. Затем полученное соединение осторожно ацетилировали путем обработки Ac₂O/имидазолом до достижения уровня ацетилирования 75%, подобно природному CPS. Последующее удаление защитной группы Boc обеспечивало готовые к конъюгированию Ac-carbaMenA DP10 и Ac-carbaMenA DP10.

Аминоолигосахариды сушили в вакууме, сольбилизировали в растворе H₂O: DMSO 1:9 с получением конечной концентрации аминокгрупп 40 ммоль мл⁻¹ и приводили во взаимодействие с 12-кратным молярным избытком линкера ди-N-гидроксисукцинимидиладипата (SIDEA) в присутствии 5-кратного молярного избытка триэтиламина относительно аминокгрупп. Реакционную смесь выдерживали при осторожном перемешивании при комнатной температуре в течение 3 ч. Активированные олигосахариды очищали путем осаждения 4 объемами этилацетата с последующим

десятикратным промыванием осадка 1 мл того же растворителя. Затем осадок сушили в вакууме и определяли содержание введенных групп сложного эфира N-гидроксисукцинимид.

Конъюгаты получали в 100 мМ NaH₂PO₄, pH 7, при молярном отношении активный сложный эфир (АЕ):белок, указанном в таблице ниже (таблица 8):

<i>Гликоконъюгат</i>	<i>моль NHS/ моль белка</i>
CRM₁₉₇-Carba DP8 low	13:1
CRM₁₉₇-Carba DP8 high	30:1
CRM₁₉₇-Carba DP10 low	12:1
CRM₁₉₇-Carba DP10 high	28:1

Таблица 8

Реакции проводили в течение ночи при комнатной температуре при осторожном перемешивании. Полученные конъюгаты очищали с помощью тангенциальной поточной фильтрации (Vivaspin) с порогом отсечения 30 кДа и с применением 10 мМ NaH₂PO₄, pH 7,2, в качестве буфера. Характеристики конъюгатов определяли с помощью микрометода с бицинхониновой кислотой (micro BCA) (Smith, P.K., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150:76-85) для определения общего содержания белка, анализа HPAEC-PAD для определения общего содержания сахара (таблица 9), электрофореза SDS-Page и вестерн-блоттинга (ФИГ. 13).

<i>Гликоконъюгат</i>	<i>Содержание сахара (мкг/мл)</i>	<i>Содержание белка (мг/мл)</i>	<i>Отношение сахарид/белок (масс./масс.)</i>	<i>Отношение сахарид/белок (моль/моль)</i>
CRM₁₉₇-Carba DP8 low	167,1	0,741	0,23	4,4
CRM₁₉₇-Carba DP8 high	241,6	0,470	0,51	9,9
CRM₁₉₇-Carba DP10 low	153,1	0,502	0,30	4,7
CRM₁₉₇-Carba DP10 high	78,3	0,175	0,45	7,0

Таблица 9

Иммунизация крыс:

Все крысы содержались в особых непатогенных условиях. Составы антигенов готовили в стерильных условиях. Группы из 10 крыс CD(SD) Sprague-Dawley иммунизировали в дни 1, 22 и 36; отбор крови проводили в день 0 (до иммунизации) и

день 49 (после 3). Вакцины вводили внутримышечно (в/м) в дозе 1/5, то есть разведение 1:5 (разв. 1:5) дозы ACWY-7B для человека (1/5 HD). Адъювант AlOH применяли в дозе 3 мг/мл.

<i>Группы</i>	<i>Антиген</i>	<i>Дозы</i>	<i>Адъювант</i>	<i>Путь введения</i>	<i>Объем дозы</i>
1	Men ACWY_7B fHbp1X разв. 1:5	2 мкг (сахарид)	Гидроксид алюминия 3 мг/мл	В/М	200 мкл
2	MenCWY_7B CarbaMenA разв. 1:5	2 мкг (сахарид)	Гидроксид алюминия 3 мг/мл	В/М	200 мкл
3	CarbaMenA DP10- CRM разв. 1:5	2 мкг (сахарид)	Гидроксид алюминия 3 мг/мл	В/М	200 мкл
4	MenA-CRM разв. 1:5	2 мкг (сахарид)	Гидроксид алюминия 3 мг/мл	В/М	200 мкл

Таблица 10

ELISA при применении MenACWY у крыс (традиционный HT-ELISA):

На планшет наносили раствор каждого полисахарида (A, C, W135, Y) с концентрацией 5 мкг/мл в 1х PBS, pH 8,2, и инкубировали в течение ночи при +2-8°C. После промывки (1хPBS Tween20) планшет блокировали добавлением 200 мкл Smartblock (Candor Bioscience) и инкубировали 2 часа при к.т. После промывки планшеты обрабатывали стабилизатором Liquid Plate Sealer (Candor Bioscience) и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем содержимое удаляли аспирацией и хранили планшеты в холодильнике при 2-8°C.

Образцы разводили в растворе 1х PBS 1% BSA, pH 7,4, начиная с разведения 1:100 (MenA и MenY), 1:500 (MenC) и 1:200 MenW135, далее с получением следующих пяти двукратных серийных разведений.

Затем планшеты инкубировали в течение 90 мин при 30°C, затем промывали, как описано выше, и добавляли 100 мкл раствора вторичного антитела (конъюгат антитела к общему IgG крысы с щелочной фосфатазой). Затем планшеты инкубировали в течение 60 мин при 30°C.

После промывки планшетов добавляли 100 мкл субстрата (*пара*-нитрофенилфосфата) и после 30' инкубирования при 30°C регистрировали поглощение при 405 нм.

ELISA при применении Бексеро+NG у крыс (традиционный HT-ELISA):

На планшеты наносили раствор рекомбинантных белков (287-953, 936-741, 961с, 741-231.16) с концентрацией 0,15 мкМ в 1х PBS и 2 мкг/мл в 100 mM Трис, pH 9,0, в

случае OMV-NZ, и инкубировали в течение ночи при +2-8°C. После промывки (1xPBS Tween20) планшеты блокировали добавлением 200 мкл Smartblock (Candor Bioscience) и инкубировали 2 часа при к.т. После промывки планшеты обрабатывали стабилизатором Liquid Plate Sealer (Candor Bioscience) и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем содержимое удаляли аспирацией и хранили планшеты в холодильнике при 2-8°C.

Образцы разводили в растворе 1x PBS 1% BSA, pH 7,4, начиная с разведения 1:1000 (936-741), 1:500 (287-953, 961с и OMV-NZ) и 1:1000 (741-231.13), далее с получением следующих пяти двукратных серийных разведений.

Затем планшеты инкубировали в течение 90 мин при 37°C, затем промывали, как описано выше, и добавляли 100 мкл раствора вторичного антитела (конъюгат антитела к общему IgG крысы с щелочной фосфатазой). Затем планшеты инкубировали в течение 60 мин при 37°C.

После промывки планшетов добавляли 100 мкл субстрата (пара-нитрофенилфосфата) и после 25-30' инкубирования при 37°C регистрировали поглощение при 405 нм.

Общий IgG определяли с помощью HT-ELISA для отдельной сыворотки после 3 введений. Как показано на ФИГ. 14А, титры IgG к PS Men A сопоставимы в сыворотке крыс, иммунизированных ABNGCWY или carbaMenA в комбинации с BNGCWY, и более высоки у крыс, иммунизированных CarbaMenA, чем у крыс, иммунизированных MenA-CRM.

На ФИГ. 14В показано, что были получены сопоставимые титры IgG к PS Men CWY при определении в сыворотке крыс, иммунизированных ABNGCWY или carbaMenA в комбинации с BNGCWY.

На ФИГ. 14В показано, что были получены сопоставимые титры IgG к антигену Бексеро и слитому белку 231.13_NB при определении в сыворотке крыс, иммунизированных ABNGCWY или carbaMenA в комбинации с BNGCWY.

Состав Carba-MenA индуцировал более высокие титры IgG к PS MenA, чем в группе MenA-CRM. Не было отмечено значимых результатов для сравнения MenCWY_7B-Carba MenA со стандартным пентавалентным составом.

Бактерицидный тест *in vitro*

В день 1 менингококковые бактерии высевали штрихом для выделения из исходной культуры на чашки с шоколадным агаром с добавкой поливитекс

(BIOMERIEUX 43101) и инкубировали 16 (± 2) часов при 37°C с 5% CO₂. В день 2 бактерии собирали с чашек с агаром и ресуспендировали в среде Мюллера-Хинтона до оптической плотности (OD₆₀₀) 0,05 и выращивали при 37°C с 5% CO₂ при встряхивании при 135 об./мин до OD 0,25 (что соответствует 10⁹ КОЕ/мл), после чего использовали в анализе.

Затем бактерии разбавляли до 10⁵ КОЕ/мл в рабочем буферном растворе (фосфатно-солевой буфер Дульбекко, 0,1% глюкозы и 1% бычьего сывороточного альбумина), содержащем 5 ЕД/мл гепарина, 10 мМ MgCl₂ и 1,5 мМ CaCl₂.

SBA проводили в 96-луночных микропланшетах в конечном объеме 40 мкл на лунку путем смешивания 2-кратных серийных разведений исследуемых сывороток в 20 мкл рабочего буфера, 10 мкл бактерий (3/5 x 10⁴ КОЕ/мл) и 10 мкл активного компонента плазмы (плазма хранится при -80°C и размораживается непосредственно перед применением). Плазму человека, полученную от доноров-добровольцев при информированном согласии, выбирали для применения в качестве источника компонента для конкретного менингококкового штамма только в том случае, если она не приводила к значительному снижению количества колониеобразующих единиц этого штамма при добавлении в среду для анализа в концентрации 50%.

Бактерицидный тест содержит два внутренних контроля:

1) Комплементзависимый контроль для оценки уничтожения бактерий компонентом отдельно в отсутствие антител; эти реакционные смеси содержат только бактерии и активный компонент.

2) Комплементнезависимый контроль для оценки уничтожения сывороткой отдельно в присутствии инактивированного нагреванием компонента; эти реакционные смеси содержат бактерии, образец сыворотки и инактивированный нагреванием компонент.

Реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 60 минут (T60) с 5% CO₂.

При T60 в каждую лунку добавляли 100 мкл расплавленной среды TSB/0,7% агара и оставляли для затвердевания на 10 минут. В каждую лунку добавляли второй слой из 50 мкл расплавленной агаризованной среды и оставляли для затвердевания еще на 10 минут. Затем планшеты инкубировали под крышкой в течение ночи при 37°C. После выдерживания в течение ночи при 37°C с 5% CO₂ микропланшеты помещали в систему AxioLab (MicroTechniX BVBA), и изображения каждой лунки были получены и автоматически сохранены в общей папке необработанных и проанализированных

изображений. Анализ изображений был выполнен с помощью программного обеспечения AxioVision Rel. 4.8 4.8.2, и подсчет колоний производился автоматически. Бактерицидный титр (титр hSBA) определяли как величину, обратную разведению сыворотки, которое приводило к снижению количества колониеобразующих единиц (КОЕ) по меньшей мере на 50% по сравнению с количеством КОЕ, присутствующих в контрольной реакции без сыворотки. Для статистического анализа использовали интерполированные титры SBA.

Ответы в виде выработки функциональных антител определяли с помощью hSBA и, как показано на ФИГ. 15А, ФИГ. 15В, ФИГ. 15С, функциональная активность антител, индуцированных carbaMenA в комбинации с BNGCWY, сопоставима с таковой для эталонной комбинации ABNGCWY, кроме того, сопоставимые титры hSBA также были индуцированы другими антигенами и белками CWY Бексера (фиг. 15В и ФИГ. 15С).

Составы Carba-MenA продемонстрировали более низкие титры hSBA против штамма MenA 3125 по сравнению с MenA-CRM. Не было обнаружено различий между составами MenACWY_7B fHbp 1X и MenCWY_7B-CarbaMenA.

Состав MenACWY-7B fHbp 1X продемонстрировал более высокие титры hSBA против штамма MenA F8238 по сравнению с составом MenCWY_7B-CarbaMenA. Не было отмечено различий между MenA-CRM и составом Carba MenA.

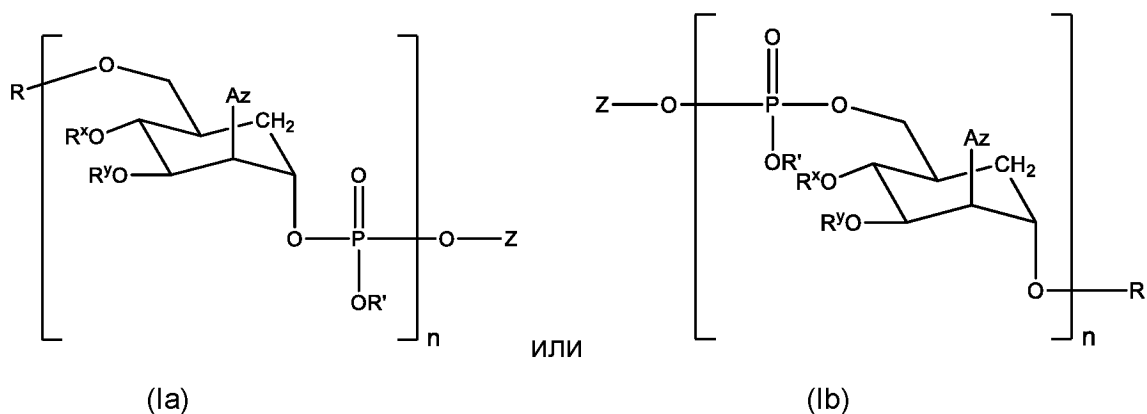
Воплощения настоящего изобретения дополнительно описаны в следующих пронумерованных пунктах:

1. Водная иммуногенная композиция, которая после введения субъекту способна индуцировать иммунный ответ, который является бактерицидным в отношении серогрупп А, В, С, W135 и Y *Neisseria meningitidis*, где указанная композиция содержит:

- i. конъюгированный антиген серогруппы А;
- ii. конъюгированный антиген серогруппы С;
- iii. конъюгированный антиген серогруппы W135;
- iv. конъюгированный антиген серогруппы Y; и
- v. один или более чем один полипептидный антиген из серогруппы В,

где (ii), (iii) и (iv) представляют собой капсульные сахаридные антигены, и где (i) представляет собой синтетический аналог капсульного сахара серогруппы А.

2. Композиция по пункту 1, где конъюгированный антиген серогруппы А представляет собой конъюгат олигомера и содержит олигомер формулы (Ia) или (Ib):



где

n больше или равно 6;

R представляет собой H или $-P(O)(OR'')_2$, где R'' представляет собой H или фармацевтически приемлемый противоион для фосфатной группы;

R' представляет собой H или фармацевтически приемлемый противоион для фосфатной группы;

R^x представляет собой H или $-C(O)CH_3$ и может быть одинаковым или различным в каждом повторяющемся звене;

R^y представляет собой H или $-C(O)CH_3$ и может быть одинаковым или различным в каждом повторяющемся звене;

где по меньшей мере один из R^x или R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном повторяющемся звене;

Az представляет собой азаместитель, выбранный из группы, состоящей из $-NH(CO)R^1$, $-N(R^1)_2$ и $-N_3$, где R^1 независимо выбран из группы, состоящей из H , линейного или разветвленного C_1 - C_6 -алкила и линейного или разветвленного C_1 - C_6 -галогеналкила;

Z представляет собой (i) защитную группу,

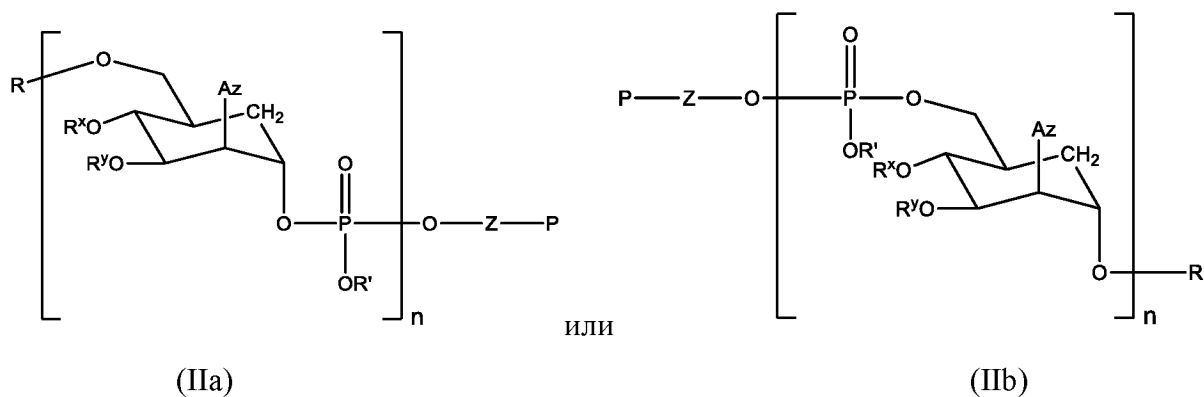
(ii) функциональный линкер для конъюгирования с белком

или (iii) линейный или разветвленный C_1 - C_6 алкил, возможно замещенный фенил, $-C(O)Y$ либо линейный или разветвленный C_1 - C_6 -алкил- X ,

где Y представляет собой H , линейный или разветвленный C_1 - C_6 -алкил либо защитную группу, и

где X представляет собой $-NH_2$, $-N_3$, $-C\equiv CH$, $-CH=CH_2$, $-SH$ или $-S-C\equiv N$.

3. Композиция по пункту 1 или пункту 2, где конъюгированный антиген серогруппы А представляет собой конъюгат формулы (IIa) или (IIb), предпочтительно формулы (IIa):



где в указанном олигомере

n больше или равно 6;

R представляет собой H или $-P(O)(OR'')_2$, где R'' представляет собой H или фармацевтически приемлемый противоион для фосфатной группы;

R' представляет собой H или фармацевтически приемлемый противоион для фосфатной группы;

R^x представляет собой H или $-C(O)CH_3$ и может быть одинаковым или различным в каждом повторяющемся звене;

R^y представляет собой H или $-C(O)CH_3$ и может быть одинаковым или различным в каждом повторяющемся звене;

где по меньшей мере один из R^x или R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном повторяющемся звене;

Az представляет собой азаместитель, выбранный из группы, состоящей из $-NH(CO)R^1$, $-N(R^1)_2$ и $-N_3$, где R^1 независимо выбран из группы, состоящей из H , линейного или разветвленного C_1 - C_6 -алкила и линейного или разветвленного C_1 - C_6 -галогеналкила;

Z представляет собой (i) функциональный линкер или связь; и

P представляет собой белок.

4. Композиция по пункту 2 или пункту 3, где в указанном олигомере R^x представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном повторяющемся звене;

5. Композиция по любому из пунктов 2-4, где в указанном олигомере n составляет от 6 до 30.

6. Композиция по любому из пунктов 2-4, где в указанном олигомере n составляет от 8 до 20.

7. Композиция по любому из пунктов 2-4, где в указанном олигомере n составляет от 8 до 15.

8. Композиция по любому из пунктов 2-4, где в указанном олигомере n представляет собой 8 или 10.

9. Композиция по любому из пунктов 2-8, где в указанном олигомере Az представляет собой $-NHC(O)CH_3$.

10. Композиция по любому из пунктов 2-9, где в указанном олигомере R^x и R^y оба представляют собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене.

11. Композиция по любому из пунктов 2-10, где в указанном олигомере R^x представляет собой H и R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене.

12. Композиция по любому из пунктов 2-11, где в указанном олигомере R^x представляет собой $-C(O)CH_3$, и R^y представляет собой H по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене.

13. Композиция по любому из пунктов 2-12, где в указанном олигомере R^x и R^y оба представляют собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене.

14. Композиция по любому из пунктов 2-13, где в указанном олигомере R^x представляет собой H и R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене, и R^x представляет собой $-C(O)CH_3$ и R^y представляет собой H по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене.

15. Композиция по любому из пунктов 2-14, где в указанном олигомере R^x представляет собой H и R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене, R^x представляет собой $-C(O)CH_3$ и R^y представляет собой H по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене, и R^x и R^y оба представляют собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене.

16. Композиция по любому из пунктов 2-15, где R^x и R^y оба представляют собой $-C(O)CH_3$ в 40-50% повторяющихся звеньев указанного олигомера.

17. Композиция по пункту 16, где в 10-20% оставшихся повторяющихся звеньев олигомера один из R^x или R^y представляет собой $-C(O)CH_3$, при этом остальные повторяющиеся звенья в олигомере содержат $R^x = R^y = H$.

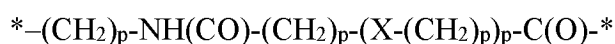
18. Композиция по любому из пунктов 2-17, где примерно от 50 до 90% R^x и R^y в указанном олигомере представляют собой $-C(O)CH_3$.

19. Композиция по любому из пунктов 2-18, где R^x в каждом повторяющемся звене представляет собой Н и по меньшей мере 80% R^y в указанном олигомере представляет собой $-C(O)CH_3$.

20. Композиция по любому из пунктов 2-19, где Р представляет собой инактивированный бактериальный токсин, выбранный из дифтерийного анатоксина (DT), столбнячного анатоксина (TT), CRM₁₉₇, ST *E. coli* и экзотоксина *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA), или Р представляет собой полиаминокислоту, такую как поли(лизин:глутаминовая кислота), или Р представляет собой коровый белок вируса гепатита В или SPR96-2021.

21. Композиция по любому из пунктов 2-20, где Р представляет собой CRM₁₉₇.

22. Композиция по любому из пунктов 2-21, где Z представляет собой линкер, имеющий следующую формулу:

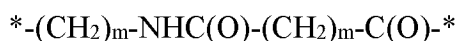


где * обозначает точку присоединения, и где

p независимо выбран из целых чисел от 1 до 10; и

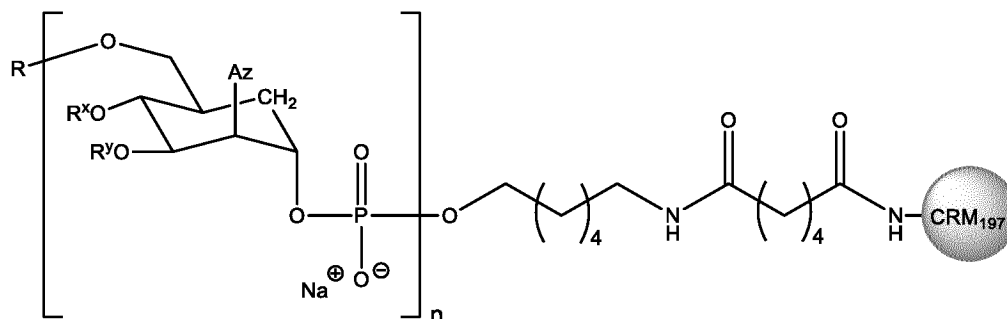
X выбран из -O-, -S- и -NH-.

23. Композиция по любому из пунктов 2-21, где Z представляет собой линкер, имеющий следующую формулу:



где m независимо выбран из целых чисел от 1 до 10.

24. Композиция по любому из пунктов 2-23, где конъюгат олигомера имеет следующую структуру:



где n, Az, R, R^x и R^y являются такими, как определено в любом из пунктов 2-19.

25. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где конъюгированные антигены серогруппы С, W135 и Y конъюгированы с белком-носителем, выбранным из дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, белка D *H. influenzae* и CRM₁₉₇.

26. Композиция по пункту 25, где антигены серогруппы С, W135 и Y конъюгированы с CRM₁₉₇.

27. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где один или более чем один полипептидный антиген из серогруппы В включает одно или более чем одно из менингококкового антигена NHBA, менингококкового антигена NadA, менингококкового антигена fHbp и везикул наружной мембраны (OMV) менингококка.

28. Композиция по пункту 27, содержащая мутантный менингококковый полипептид fHbp v1.13, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, где указанная аминокислотная последовательность содержит мутацию по типу замены в одном или более чем одном из остатков S216, E211 или E232 SEQ ID NO: 2.

29. Композиция по пункту 28, где аминокислотная последовательность отличается от SEQ ID NO: 2 по меньшей мере одной или более чем одной из замен S216R, E211A и E232A.

30. Композиция по пункту 29, где аминокислотная последовательность содержит замены в нескольких остатках, выбранные из следующих:

- (i) E211A и S216R, и
- (ii) E211A и E232A.

31. Композиция по любому из пунктов 28-30, где менингококковый полипептид fHbp v1.13 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

32. Композиция по пункту 27, содержащая слитый полипептид, содержащий менингококковые полипептиды fHbp v1, v2 и v3 в порядке v2-v3-v1 от N-конца к С-концу, и при этом полипептид fHbp v1 представляет собой мутантный полипептид fHbp v1.13, как определено в любом из пунктов 28-31.

33. Композиция по пункту 32, где:

- (a) полипептид fHbp v2 представляет собой мутантный полипептид fHbp v2, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12, где аминокислотная последовательность fHbp v2 содержит мутацию по типу замены в остатках S32 и

L123 SEQ ID NO:12, и где указанные замены представляют собой S32V и L123R;
и

(b) полипептид fHbp v3 представляет собой мутантный полипептид fHbp v3, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15, где аминокислотная последовательность fHbp v3 содержит мутацию по типу замены в остатках S32 и L126 SEQ ID NO: 15, и где указанные замены представляют собой S32V и L126R.

34. Композиция по пункту 33, где:

(a) полипептид fHbp v2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или состоит из нее; и/или

(b) полипептид fHbp v3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или состоит из нее.

35. Композиция по любому из пунктов 32-34, где аминокислотные последовательности fHbp v2 и v3 и аминокислотные последовательности fHbp v3 и v1 соединены глицин-сериновым линкером, и предпочтительно при этом последовательность v2 имеет N-концевую лидерную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 18.

36. Композиция по любому из пунктов 32-35, где слитый полипептид fHbp содержит аминокислотную последовательность, соответствующую любой из SEQ ID NO: 19-23.

37. Композиция по пункту 36, где слитый полипептид fHbp дополнительно содержит необязательную N-концевую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

38. Композиция по пункту 36, где слитый полипептид fHbp имеет последовательность SEQ ID NO. 35.

39. Композиция по любому из пунктов 28-36, дополнительно содержащая менингококковый антиген NHBA, менингококковый антиген NadA, менингококковый антиген fHbp и везикулы наружной мембраны (OMV) менингококка.

40. Композиция по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая адъювант.

41. Композиция по пункту 40, где адъювант представляет собой гидроксид алюминия.

42. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где указанная композиция содержит Бексеро (BEXSERO).

43. Композиция по любому из предшествующих пунктов, упакованная в одну герметично укупоренную емкость, предпочтительно флакон или шприц.

44. Способ индуцирования иммунного ответа у млекопитающего, включающий введение иммуногенной композиции по любому из пунктов 1-43, при этом млекопитающее возможно представляет собой человека.

45. Способ лечения или предупреждения инфекции и/или заболевания, вызванного *N. meningitidis*, у нуждающегося в этом млекопитающего, включающий введение указанному млекопитающему иммунологически эффективного количества композиции по любому из пунктов 1-43, возможно где млекопитающее представляет собой человека.

46. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-43 для применения в медицине.

47. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-43 для применения в качестве вакцины.

48. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 1-43 для применения в способе индуцирования иммунного ответа у млекопитающего, возможно где млекопитающее представляет собой человека.

49. Композиция по любому из пунктов 1-43 для применения для иммунизации млекопитающего против инфекции *N. meningitidis*, возможно где млекопитающее представляет собой человека.

50. Применение композиции по любому из пунктов 1-43 в изготовлении лекарственного средства для применения для лечения или предупреждения инфекции и/или заболевания, вызванного *N. meningitidis*.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

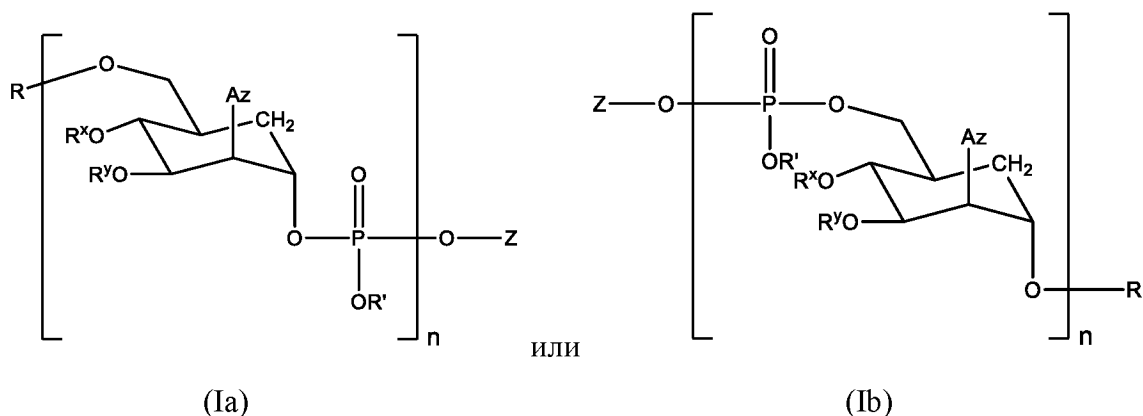
1. Водная иммуногенная композиция, которая после введения субъекту способна индуцировать иммунный ответ, который является бактерицидным в отношении серогрупп A, B, C, W135 и Y *Neisseria meningitidis*, где указанная композиция содержит:

- vi. конъюгированный антиген серогруппы A;
- vii. конъюгированный антиген серогруппы C;
- viii. конъюгированный антиген серогруппы W135;
- ix. конъюгированный антиген серогруппы Y и

x. один или более чем один полипептидный антиген из серогруппы B,

где (ii), (iii) и (iv) представляют собой капсульные сахаридные антигены, и где (i) представляет собой синтетический аналог капсульного сахара серогруппы A.

2. Композиция по п. 1, где конъюгированный антиген серогруппы A представляет собой конъюгат олигомера и содержит олигомер формулы (Ia) или (Ib):



где

n больше или равно 6;

R представляет собой H или -P(O)(OR'')₂, где R'' представляет собой H или фармацевтически приемлемый противоион для фосфатной группы;

R' представляет собой H или фармацевтически приемлемый противоион для фосфатной группы;

R^x представляет собой H или -C(O)CH₃ и может быть одинаковым или различным в каждом повторяющемся звене;

R^y представляет собой H или -C(O)CH₃ и может быть одинаковым или различным в каждом повторяющемся звене;

где по меньшей мере один из R^x или R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном повторяющемся звене;

Az представляет собой азаместитель, выбранный из группы, состоящей из $-NH(CO)R^1$, $-N(R^1)_2$ и $-N_3$, где R^1 независимо выбран из группы, состоящей из H, линейного или разветвленного C_1 - C_6 -алкила и линейного или разветвленного C_1 - C_6 -галогеналкила;

Z представляет собой (i) защитную группу,

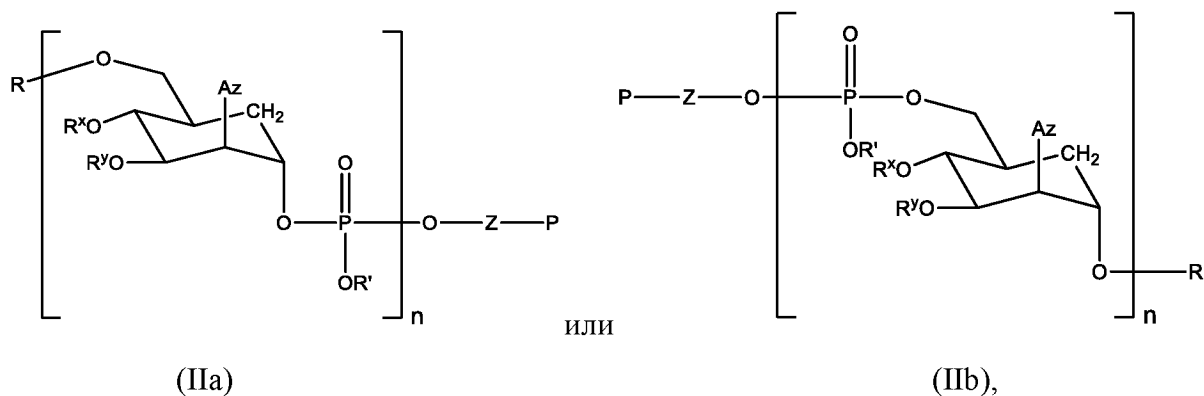
(ii) функциональный линкер для конъюгирования с белком

или (iii) линейный или разветвленный C_1 - C_6 алкил, возможно замещенный фенил, $-C(O)Y$ либо линейный или разветвленный C_1 - C_6 -алкил-X,

где Y представляет собой H, линейный или разветвленный C_1 - C_6 -алкил либо защитную группу, и

где X представляет собой $-NH_2$, $-N_3$, $-C\equiv CH$, $-CH=CH_2$, $-SH$ или $-S-C\equiv N$.

3. Композиция по п. 1 или п. 2, где конъюгированный антиген серогруппы A представляет собой конъюгат формулы (IIa) или (IIb), предпочтительно формулы (IIa):



где в указанном олигомере

n больше или равно 6;

R представляет собой H или $-P(O)(OR'')_2$, где R'' представляет собой H или фармацевтически приемлемый противоион для фосфатной группы;

R' представляет собой H или фармацевтически приемлемый противоион для фосфатной группы;

R^x представляет собой H или $-C(O)CH_3$ и может быть одинаковым или различным в каждом повторяющемся звене;

R^y представляет собой H или $-C(O)CH_3$ и может быть одинаковым или различным в каждом повторяющемся звене;

где по меньшей мере один из R^x или R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном повторяющемся звене;

Az представляет собой азаместитель, выбранный из группы, состоящей из $-NH(CO)R^1$, $-N(R^1)_2$ и $-N_3$, где R^1 независимо выбран из группы, состоящей из H, линейного или разветвленного C_1 - C_6 -алкила и линейного или разветвленного C_1 - C_6 -галогеналкила;

Z представляет собой (i) функциональный линкер или связь; и

P представляет собой белок.

4. Композиция по п. 2 или п. 3, где в указанном олигомере R^x представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном повторяющемся звене.

5. Композиция по любому из пп. 2-4, где в указанном олигомере n составляет от 6 до 30.

6. Композиция по любому из пп. 2-4, где в указанном олигомере n составляет от 8 до 20.

7. Композиция по любому из пп. 2-4, где в указанном олигомере n составляет от 8 до 15.

8. Композиция по любому из пп. 2-4, где в указанном олигомере n представляет собой 8 или 10.

9. Композиция по любому из пп. 2-8, где в указанном олигомере Az представляет собой $-NHC(O)CH_3$.

10. Композиция по любому из пп. 2-9, где в указанном олигомере R^x и R^y оба представляют собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене.

11. Композиция по любому из пп. 2-10, где в указанном олигомере R^x представляет собой H и R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене.

12. Композиция по любому из пп. 2-11, где в указанном олигомере R^x представляет собой $-C(O)CH_3$ и R^y представляет собой H по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене.

13. Композиция по любому из пп. 2-12, где в указанном олигомере R^x и R^y оба представляют собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене.

14. Композиция по любому из пп. 2-13, где в указанном олигомере R^x представляет собой H и R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене.

же повторяющемся звене, и R^x представляет собой $-C(O)CH_3$ и R^y представляет собой H по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене.

15. Композиция по любому из пп. 2-14, где в указанном олигомере R^x представляет собой H и R^y представляет собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене, R^x представляет собой $-C(O)CH_3$ и R^y представляет собой H по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене, и R^x и R^y оба представляют собой $-C(O)CH_3$ по меньшей мере в одном и том же повторяющемся звене.

16. Композиция по любому из пп. 2-15, где R^x и R^y оба представляют собой $-C(O)CH_3$ в 40-50% повторяющихся звеньев указанного олигомера.

17. Композиция по п. 16, где в 10-20% оставшихся повторяющихся звеньев олигомера один из R^x или R^y представляет собой $-C(O)CH_3$, при этом остальные повторяющиеся звенья в олигомере содержат $R^x = R^y = H$.

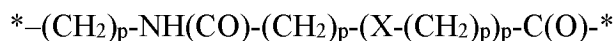
18. Композиция по любому из пп. 2-17, где примерно от 50 до 90% R^x и R^y в указанном олигомере представляют собой $-C(O)CH_3$.

19. Композиция по любому из пп. 2-18, где R^x в каждом повторяющемся звене представляет собой H и по меньшей мере 80% R^y в указанном олигомере представляет собой $-C(O)CH_3$.

20. Композиция по любому из пп. 2-19, где P представляет собой инактивированный бактериальный токсин, выбранный из дифтерийного анатоксина (DT), столбнячного анатоксина (TT), CRM₁₉₇, ST *E. coli* и экзотоксина *Pseudomonas aeruginosa* (гЕРА), или P представляет собой полиаминокислоту, такую как поли(лизин:глутаминовая кислота), или P представляет собой коровый белок вируса гепатита В или SPR96-2021.

21. Композиция по любому из пп. 2-20, где P представляет собой CRM₁₉₇.

22. Композиция по любому из пп. 2-21, где Z представляет собой линкер, имеющий следующую формулу:

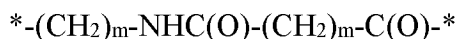


где * обозначает точку присоединения, и где

p независимо выбран из целых чисел от 1 до 10; и

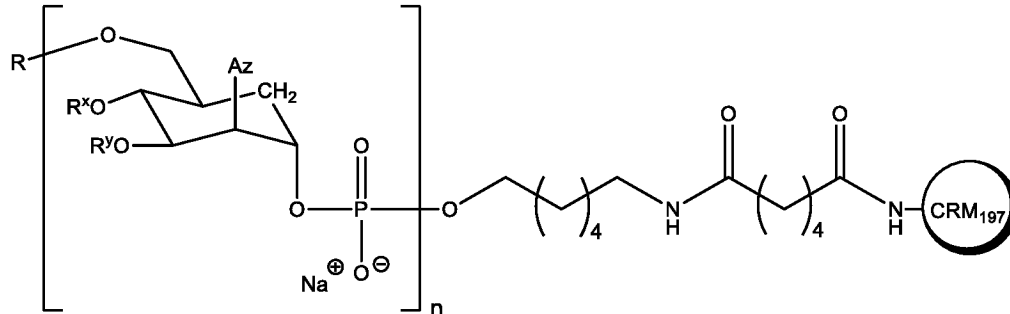
X выбран из -O-, -S- и -NH-.

23. Композиция по любому из пп. 2-21, где Z представляет собой линкер, имеющий следующую формулу:



где m независимо выбран из целых чисел от 1 до 10.

24. Композиция по любому из пп. 2-23, где указанный конъюгат олигомера имеет следующую структуру:



где n , Az, R, R^x и R^y являются такими, как определено в любом из пп. 2-19.

25. Композиция по любому из пп. 1-24, где указанные конъюгированные антигены серогруппы C, W135 и Y конъюгированы с белком-носителем, выбранным из дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, белка *D H. influenzae* и CRM₁₉₇.

26. Композиция по п. 25, где антигены серогруппы C, W135 и Y конъюгированы с CRM₁₉₇.

27. Композиция по любому из пп. 1-26, где указанный один или более чем один полипептидный антиген из серогруппы B включает одно или более чем одно из менингококкового антигена NHBA, менингококкового антигена NadA, менингококкового антигена fHbp и везикул наружной мембраны (OMV) менингококка.

28. Композиция по п. 27, содержащая мутантный менингококковый полипептид fHbp v1.13, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, где указанная аминокислотная последовательность содержит мутацию по типу замены в одном или более чем одном из остатков S216, E211 или E232 SEQ ID NO: 2.

29. Композиция по п. 28, где аминокислотная последовательность отличается от SEQ ID NO: 2 по меньшей мере одной или более чем одной из замен S216R, E211A и E232A.

30. Композиция по п. 29, где аминокислотная последовательность содержит замены в нескольких остатках, выбранные из следующих:

- (iii) E211A и S216R, и
- (iv) E211A и E232A.

31. Композиция по любому из пп. 28-30, где менингококковый полипептид fHbp v1.13 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

32. Композиция по п. 27, содержащая слитый полипептид, содержащий менингококковые полипептиды fHbp v1, v2 и v3 в порядке v2-v3-v1 от N-конца к С-концу, и при этом полипептид fHbp v1 представляет собой мутантный полипептид fHbp v1.13, как определено в любом из пп. 28-31.

33. Композиция по п. 32, где:

(с) полипептид fHbp v2 представляет собой мутантный полипептид fHbp v2, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12, где аминокислотная последовательность fHbp v2 содержит мутацию по типу замены в остатках S32 и L123 в SEQ ID NO:12, и где указанные замены представляют собой S32V и L123R; и

(d) полипептид fHbp v3 представляет собой мутантный полипептид fHbp v3, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15, где аминокислотная последовательность fHbp v3 содержит мутацию по типу замены в остатках S32 и L126 в SEQ ID NO: 15, и где указанные замены представляют собой S32V и L126R.

34. Композиция по п. 33, где:

(с) полипептид fHbp v2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или состоит из нее; и/или

(d) полипептид fHbp v3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или состоит из нее.

35. Композиция по любому из пп. 32-34, где аминокислотные последовательности fHbp v2 и v3 и аминокислотные последовательности fHbp v3 и v1 соединены глицин-сериновым линкером, и предпочтительно при этом последовательность v2 имеет N-концевую лидерную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 18.

36. Композиция по любому из пп. 32-35, где слитый полипептид fHbp содержит аминокислотную последовательность, соответствующую любой из SEQ ID NO: 19-23.

37. Композиция по п. 36, где слитый полипептид fHbp дополнительно содержит необязательную N-концевую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

38. Композиция по п. 36, где слитый полипептид fHbp имеет последовательность SEQ ID NO. 35.

39. Композиция по любому из пп. 28-36, дополнительно содержащая менингококковый антиген NHBA, менингококковый антиген NadA, менингококковый антиген fHbr и везикулы наружной мембраны (OMV) менингококка.

40. Композиция по любому из пп. 1-39, дополнительно содержащая адъювант.

41. Композиция по п. 40, где адъювант представляет собой гидроксид алюминия.

42. Композиция по любому из пп. 1-41, где указанная композиция содержит Бексеро (BEXSERO).

43. Композиция по любому из пп. 1-42, упакованная в одну герметично закупоренную емкость, предпочтительно флакон или шприц.

44. Способ индуцирования иммунного ответа у млекопитающего, включающий введение иммуногенной композиции по любому из пп. 1-43, возможно где млекопитающее представляет собой человека.

45. Способ лечения или предупреждения инфекции и/или заболевания, вызванного *N. meningitidis*, у нуждающегося в этом млекопитающего, включающий введение указанному млекопитающему иммунологически эффективного количества композиции по любому из пп. 1-43, возможно где млекопитающее представляет собой человека.

46. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-43 для применения в медицине.

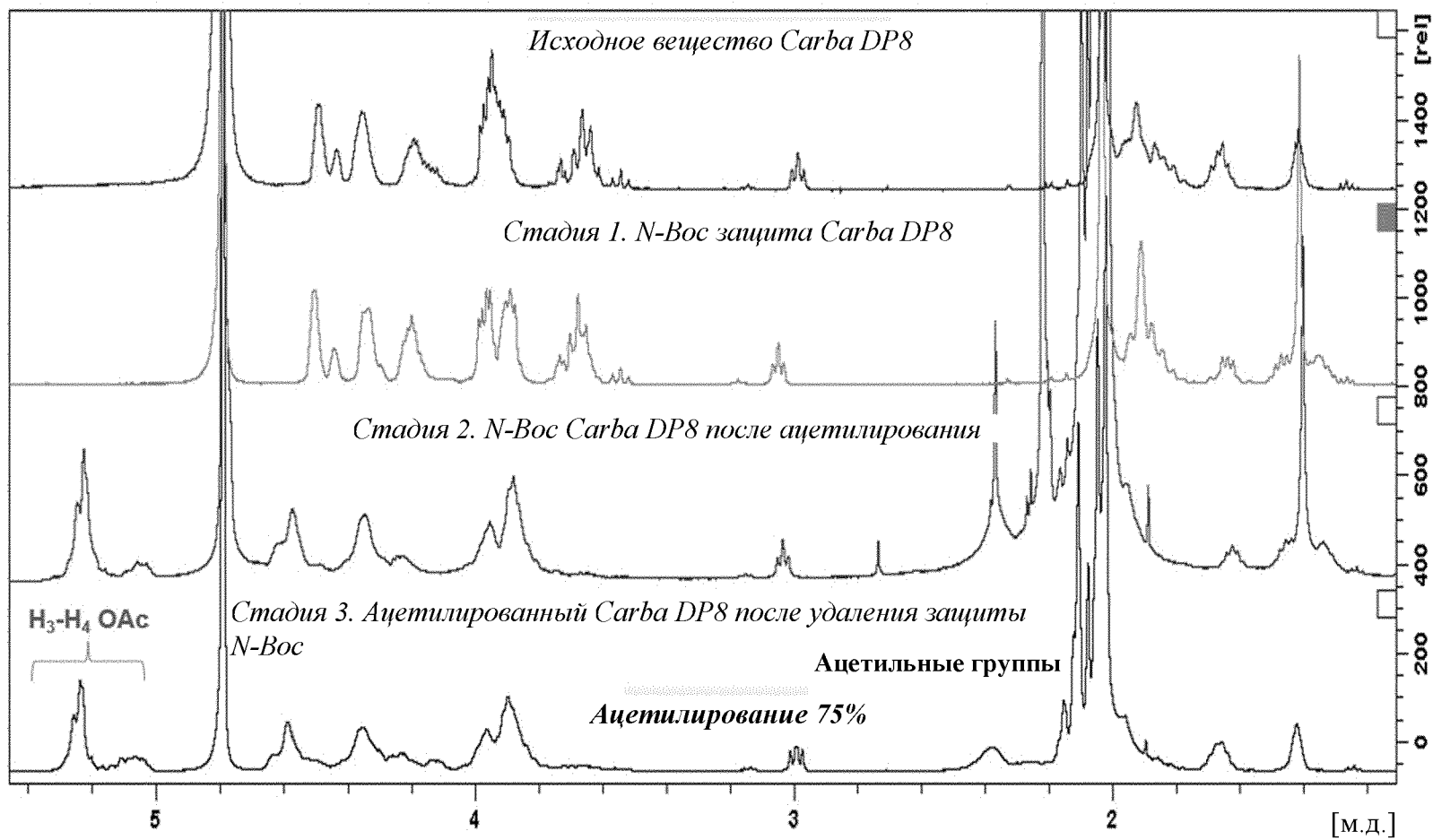
47. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-43 для применения в качестве вакцины.

48. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-43 для применения в способе индуцирования иммунного ответа у млекопитающего, возможно где млекопитающее представляет собой человека.

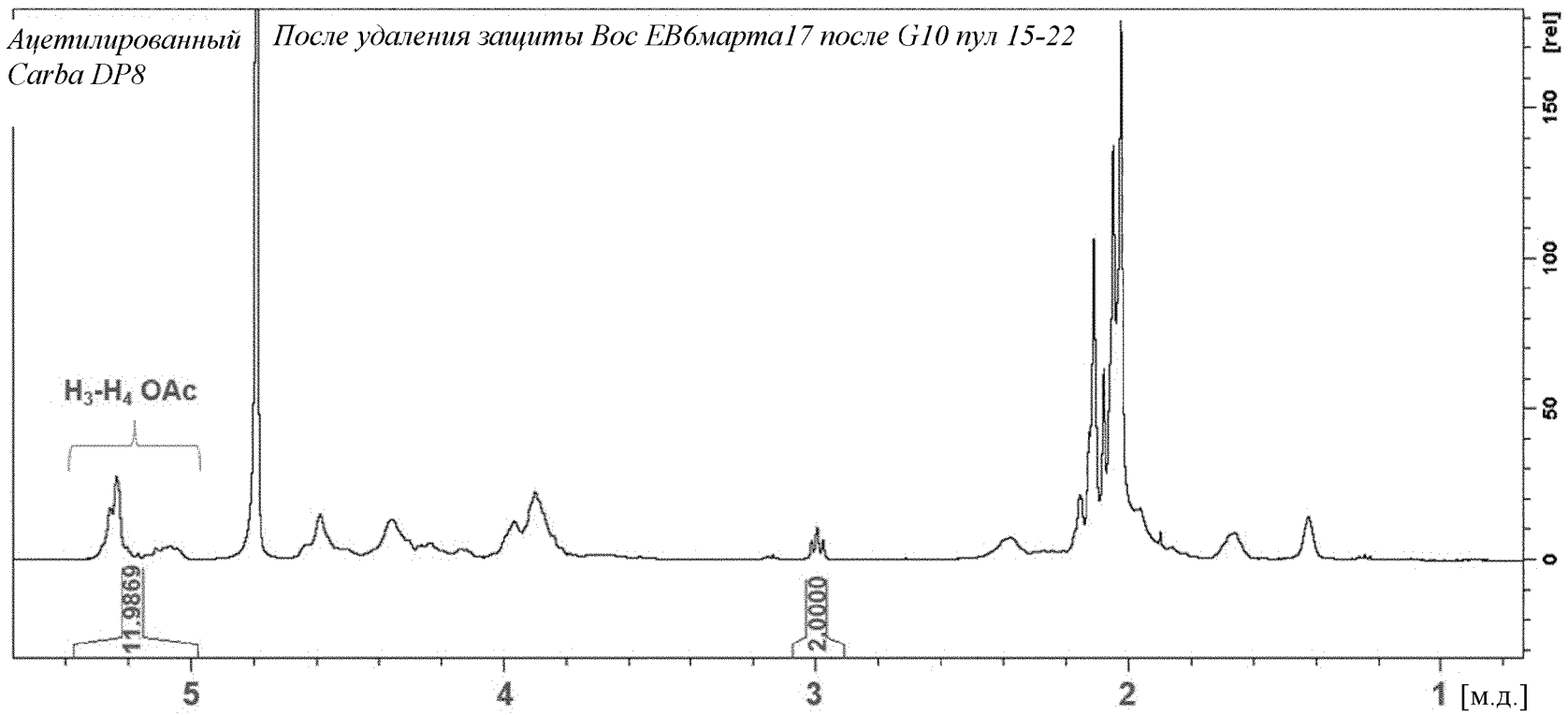
49. Композиция по любому из пп. 1-43 для применения для иммунизации млекопитающего против инфекции *N. meningitidis*, возможно где млекопитающее представляет собой человека.

50. Применение композиции по любому из пп. 1-43 в изготовлении лекарственного средства для применения для лечения или предупреждения инфекции и/или заболевания, вызванного *N. meningitidis*.

Фиг. 1

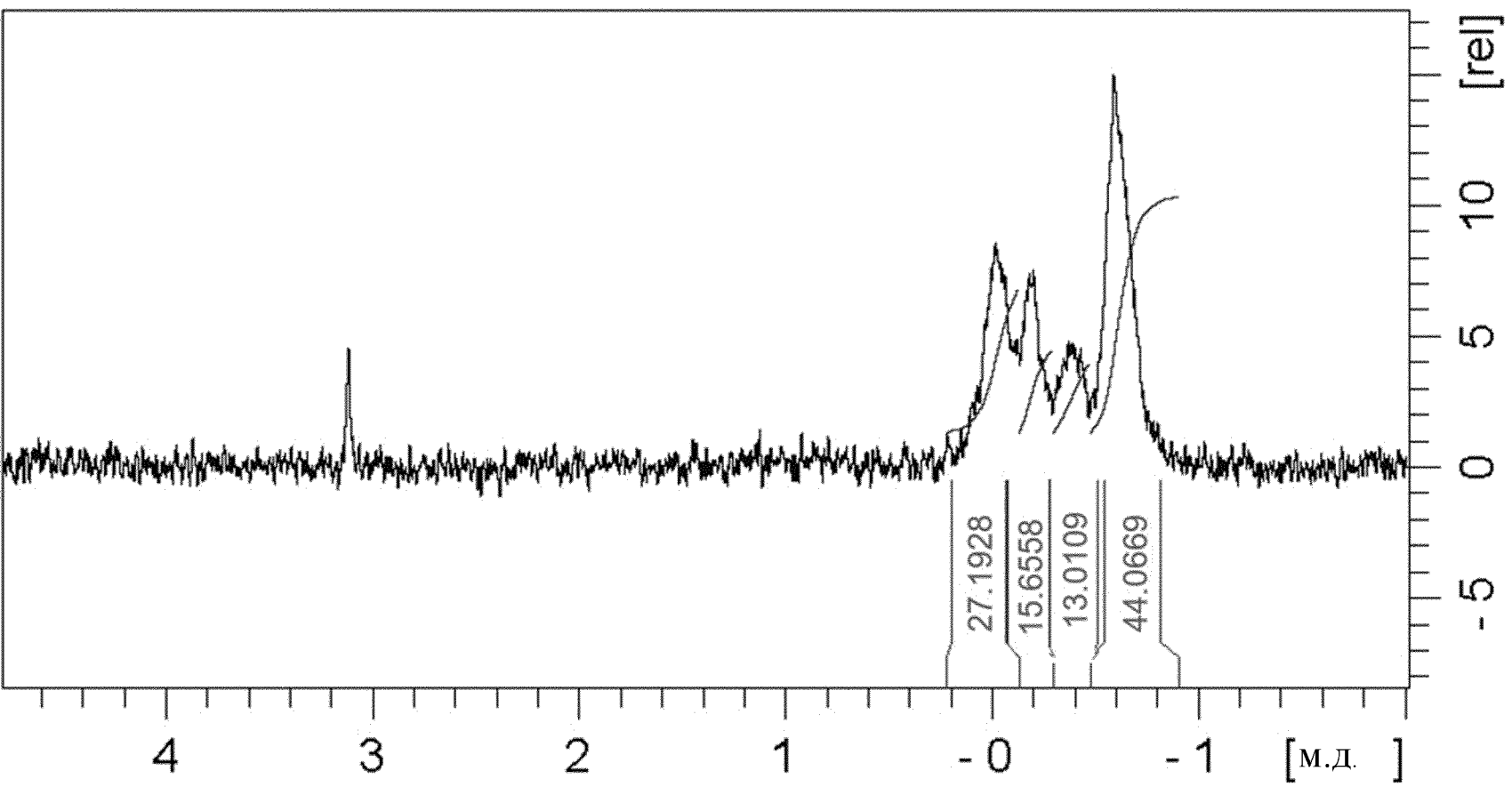


Фиг. 2



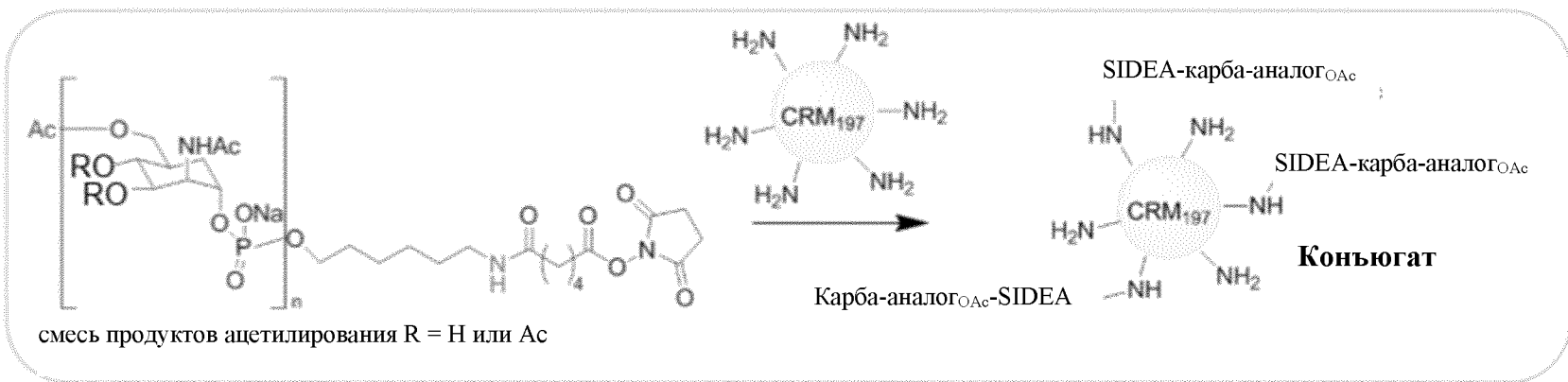
3/23

Фиг. 3



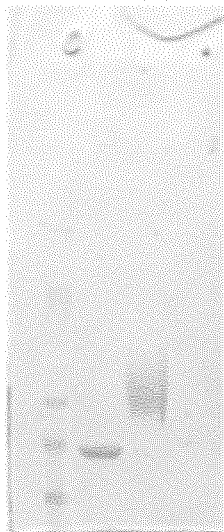
4/23

Фиг. 4



Электрофорез в 3-8% полиакриламидном геле с добавлением SDS, Т.А.

Carba DP6_{OAc}-CRM



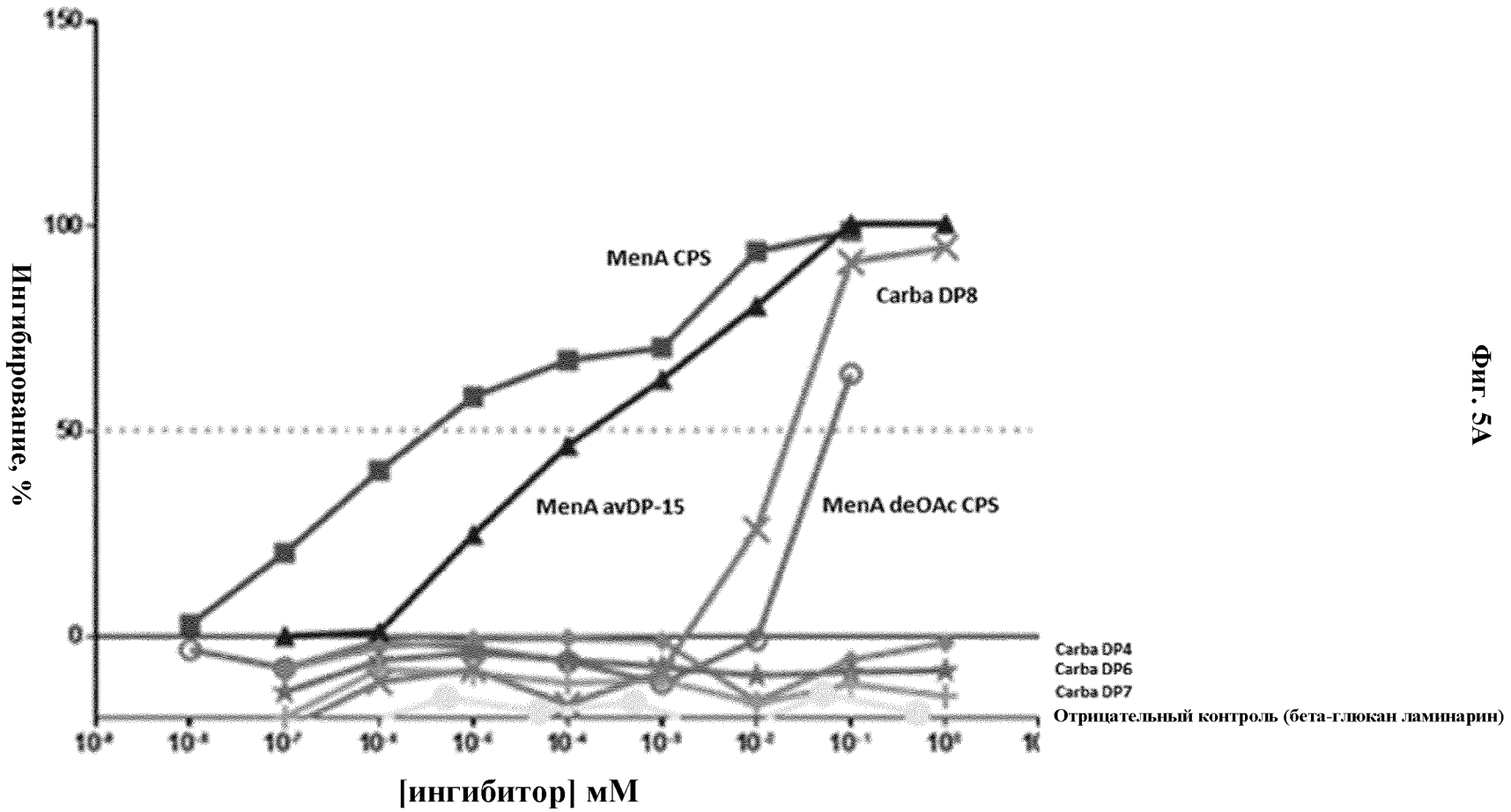
Carba DP7_{OAc}-CRM



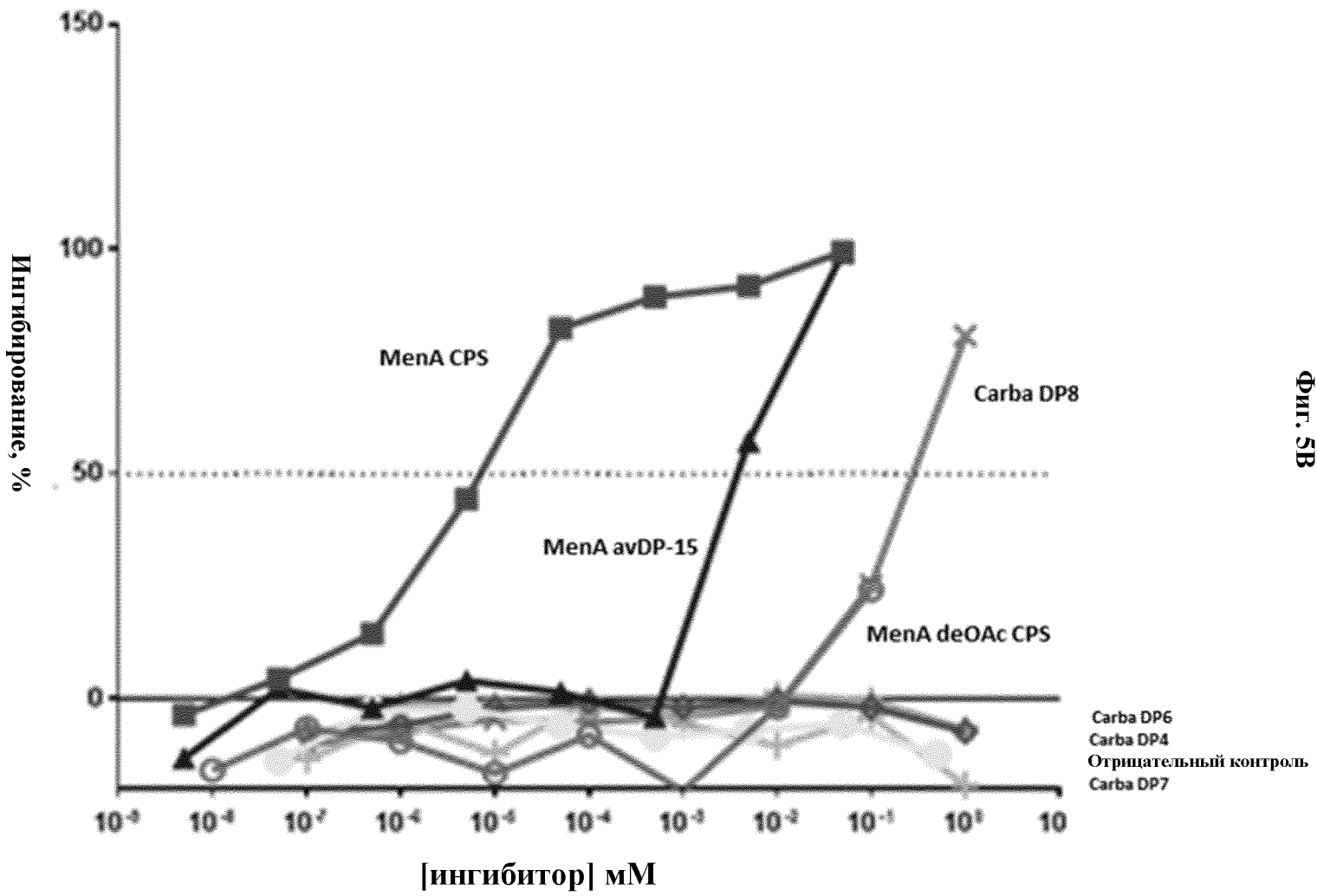
Carba DP8_{OAc}-CRM



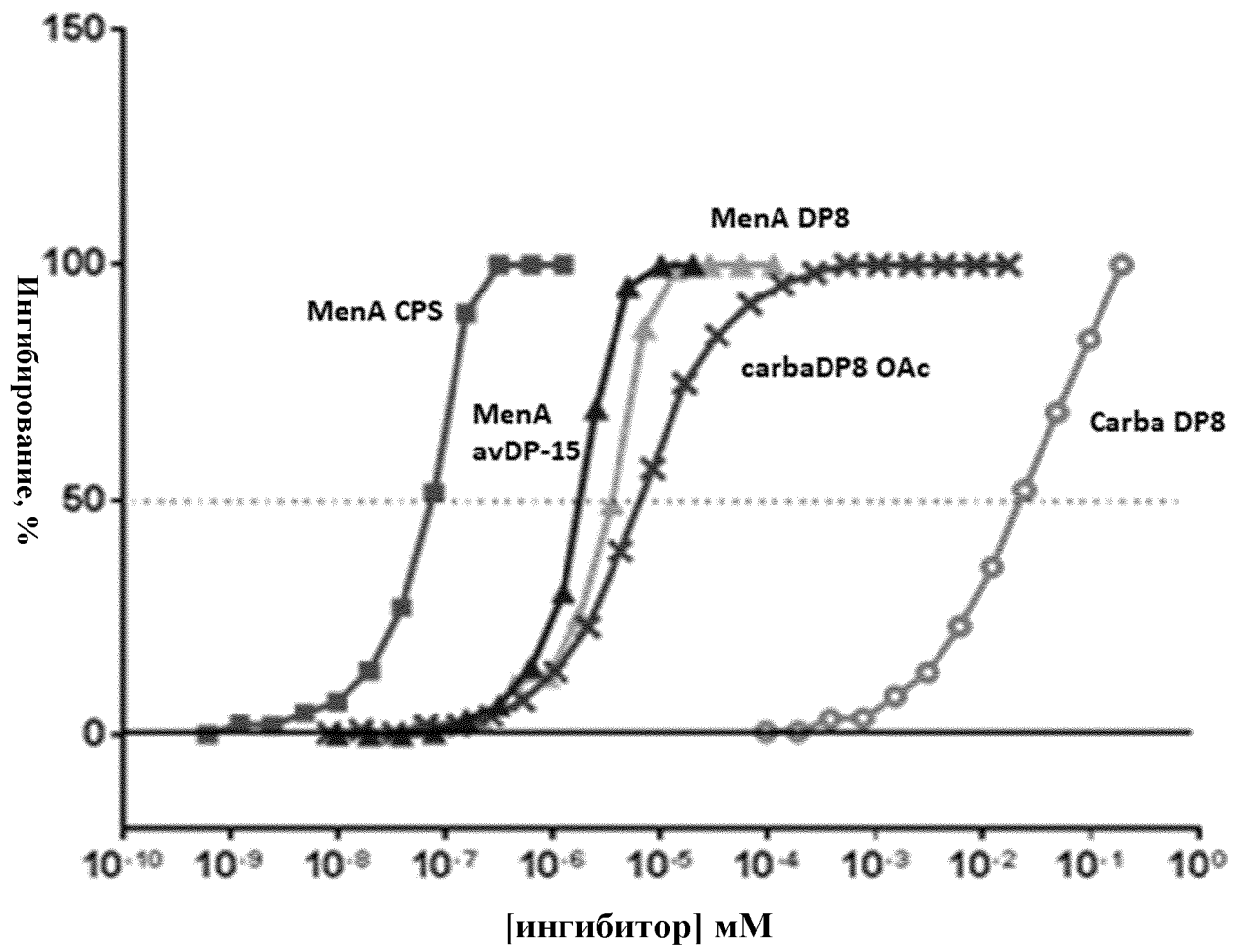
Фиг. 5A



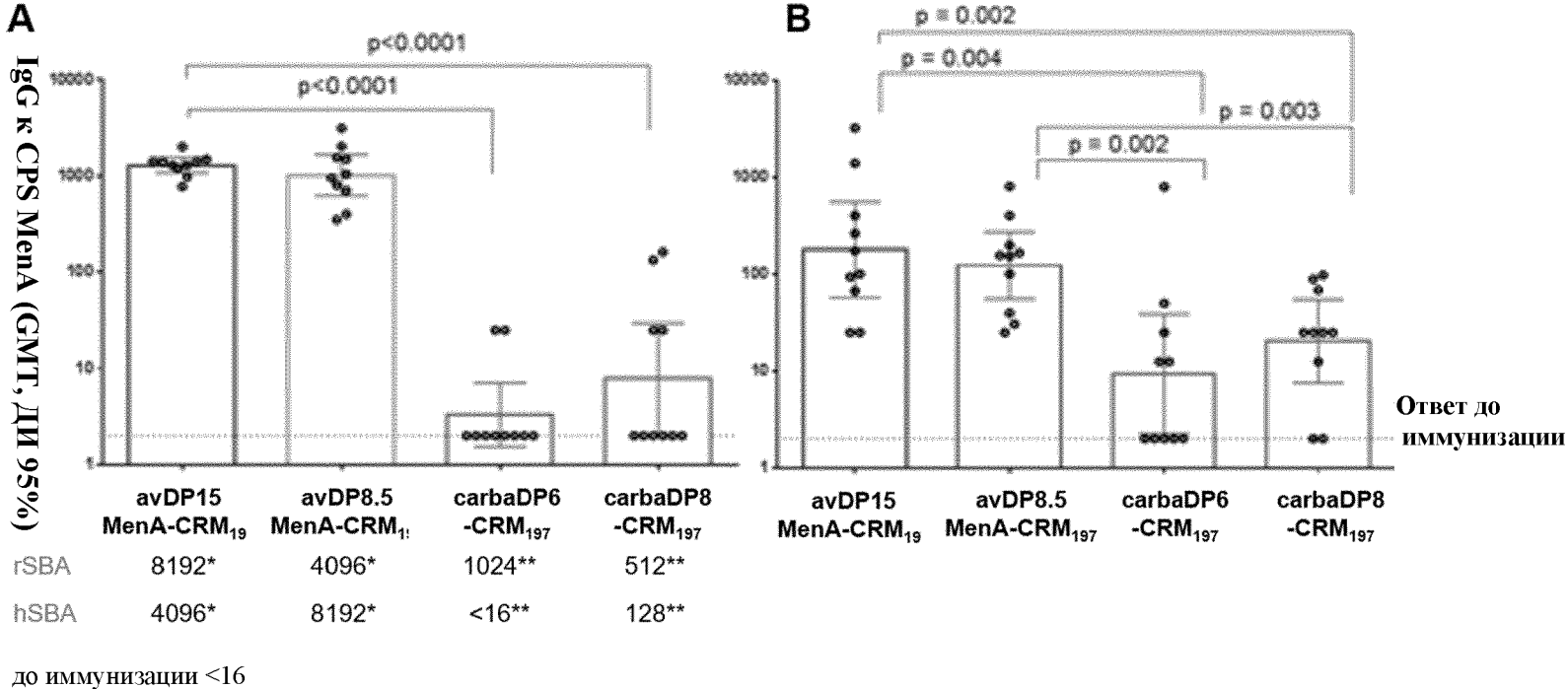
Фиг. 5В



Фиг. 5С

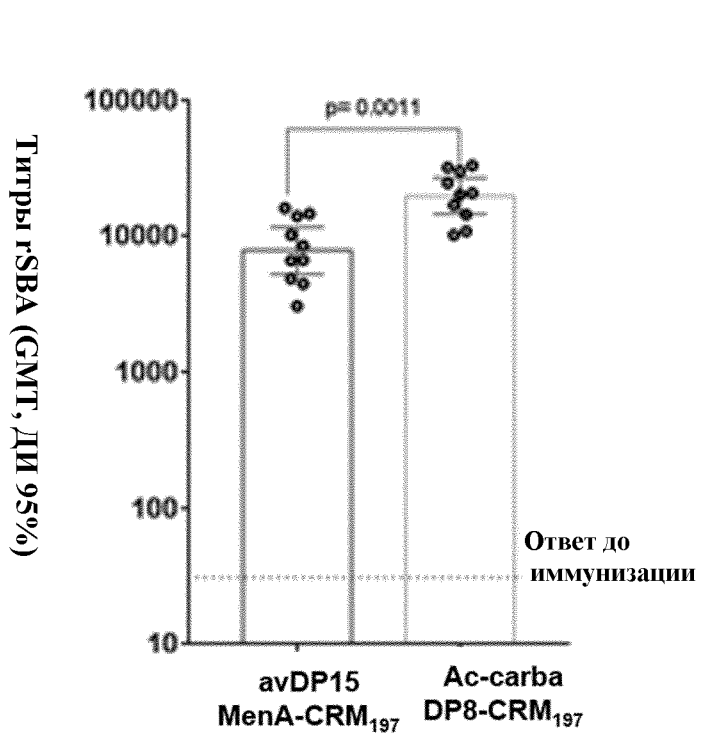
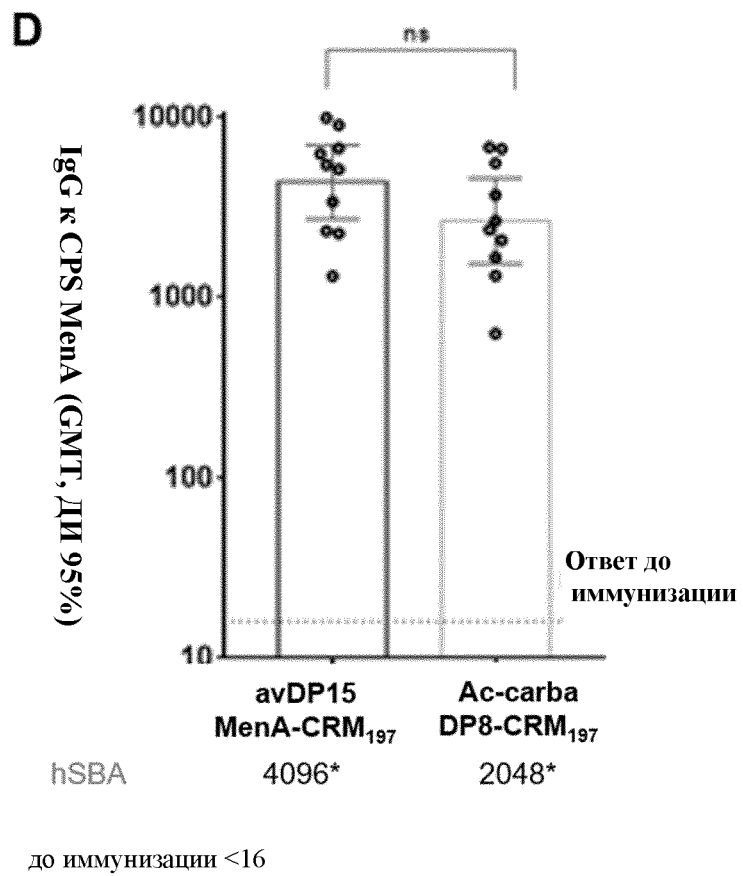


Фиг. 6А и Фиг. 6В



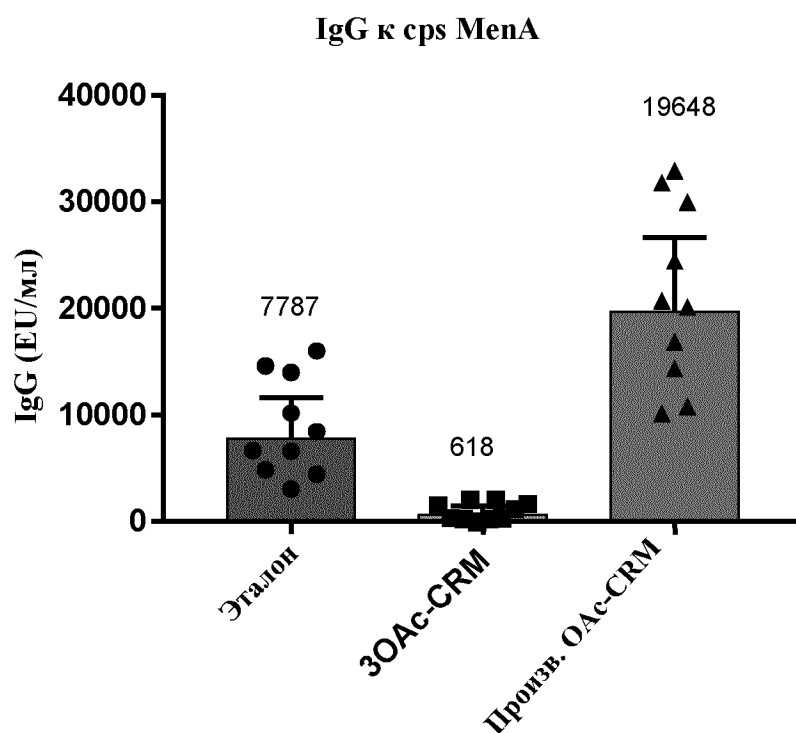
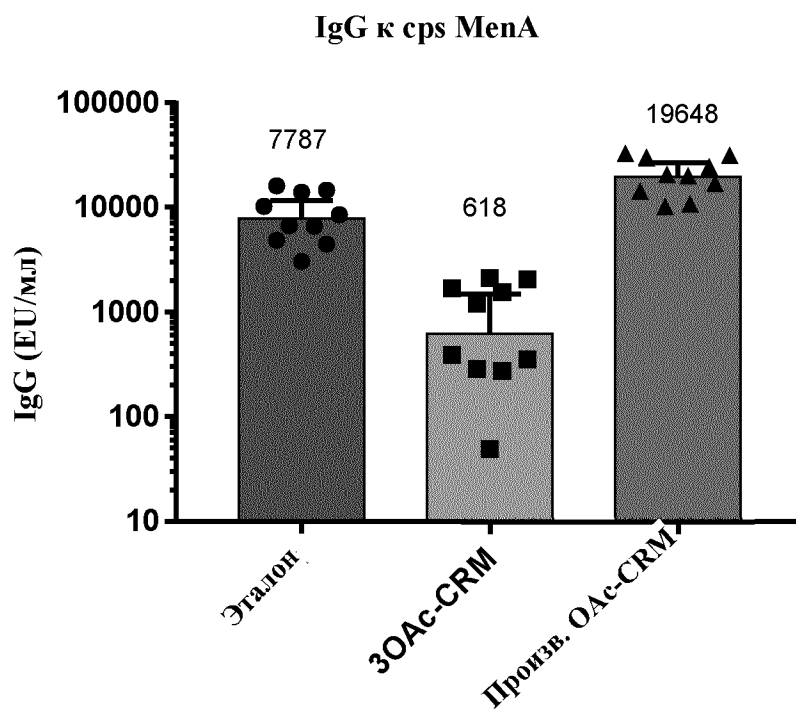
9/23

Фиг. 6С и 6D

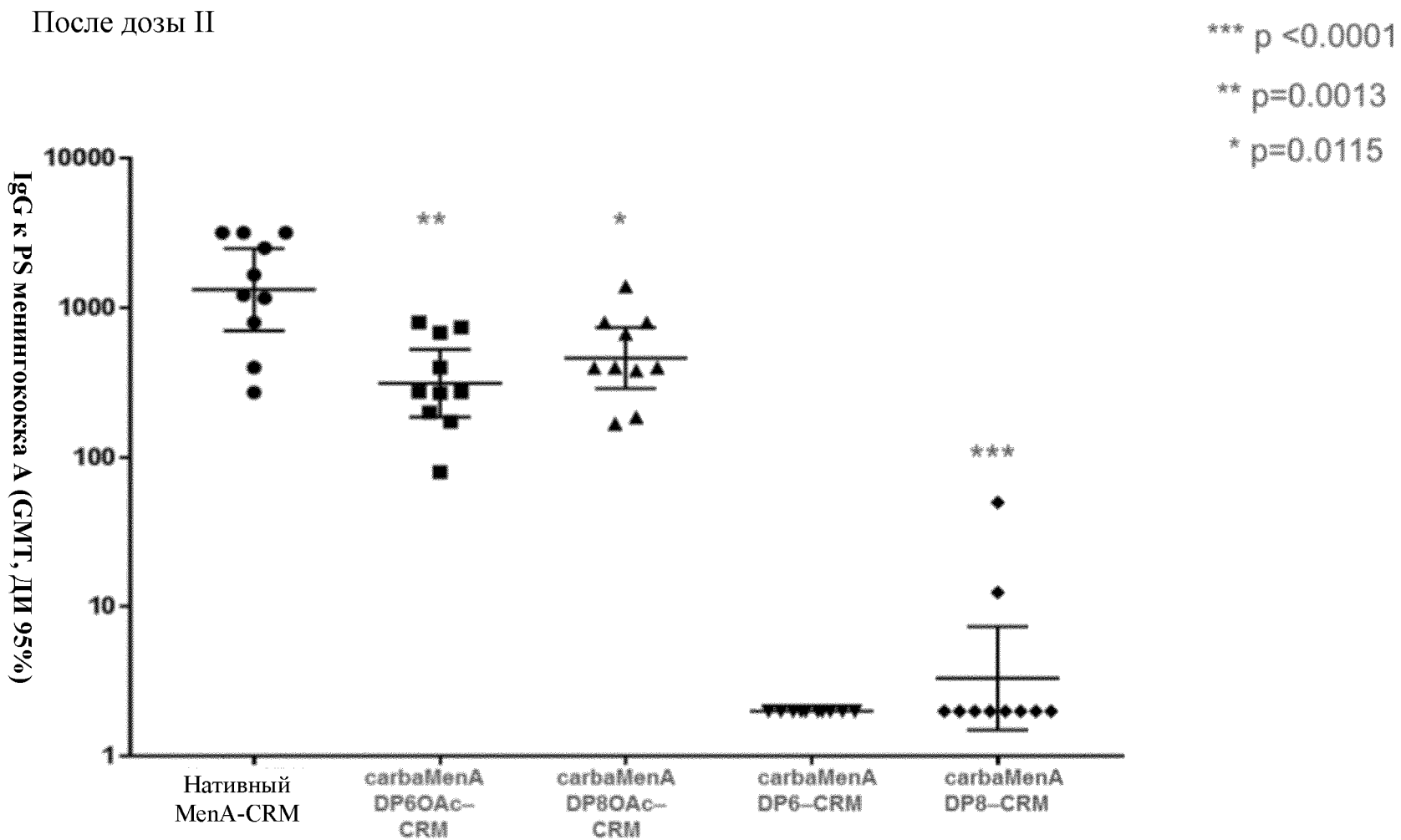


10/23

Фиг. 7



Фиг. 8А



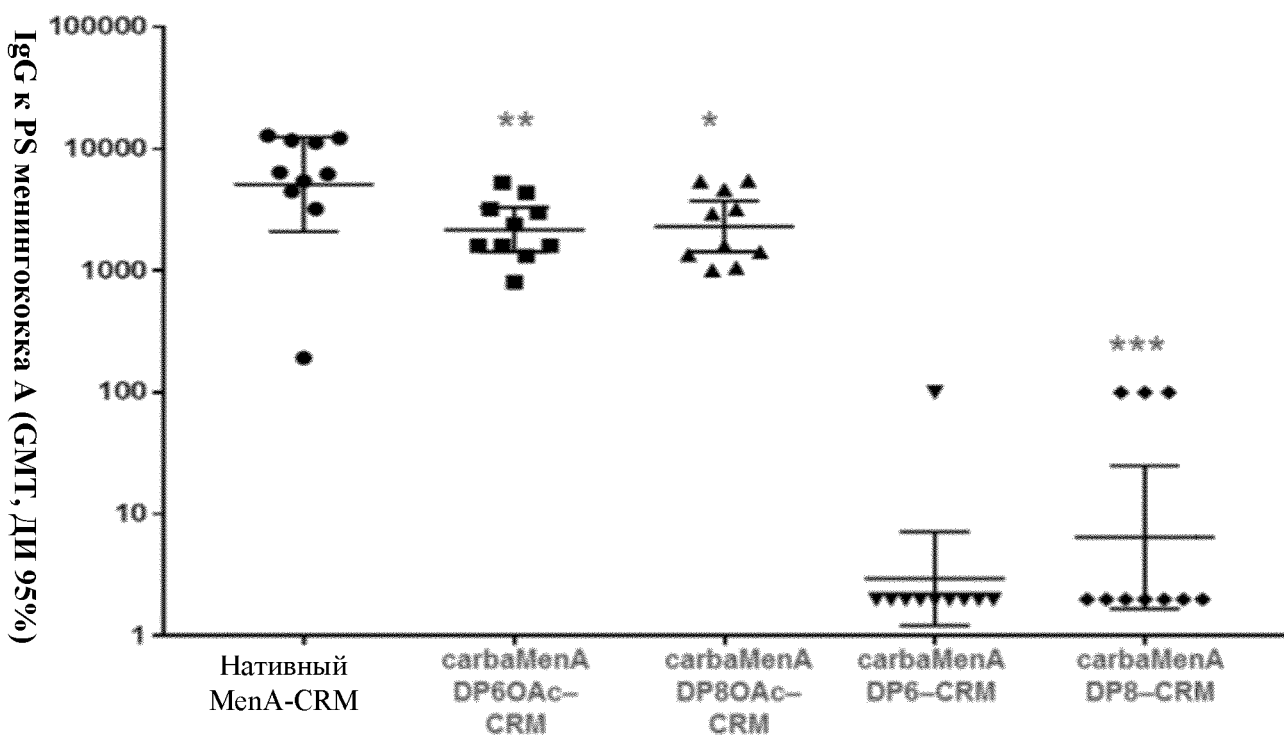
12/23

Фиг. 8B

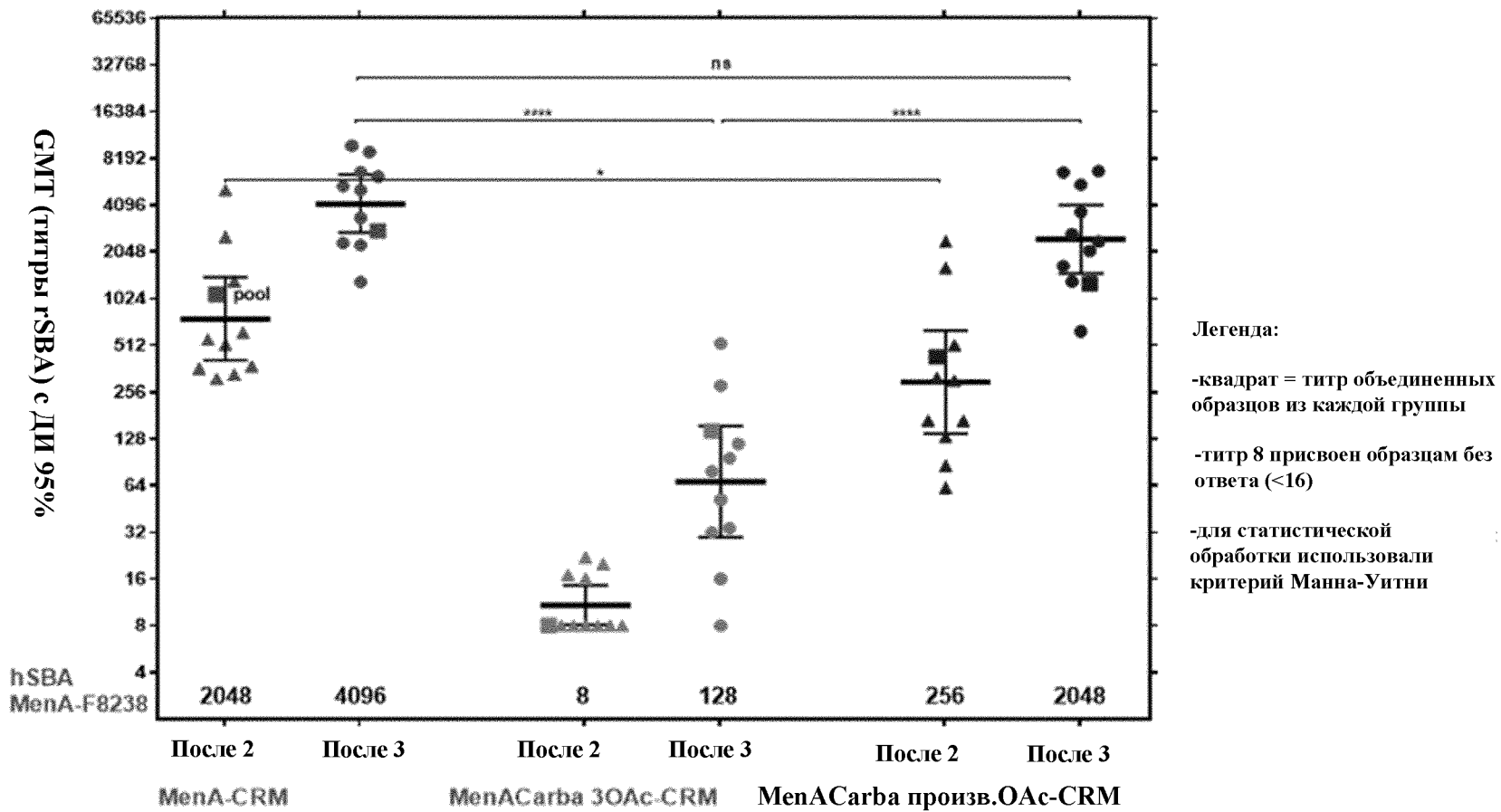
*** $p < 0.0001$
** $p = 0.0041$
* $p = 0.0122$

После дозы III

Pc

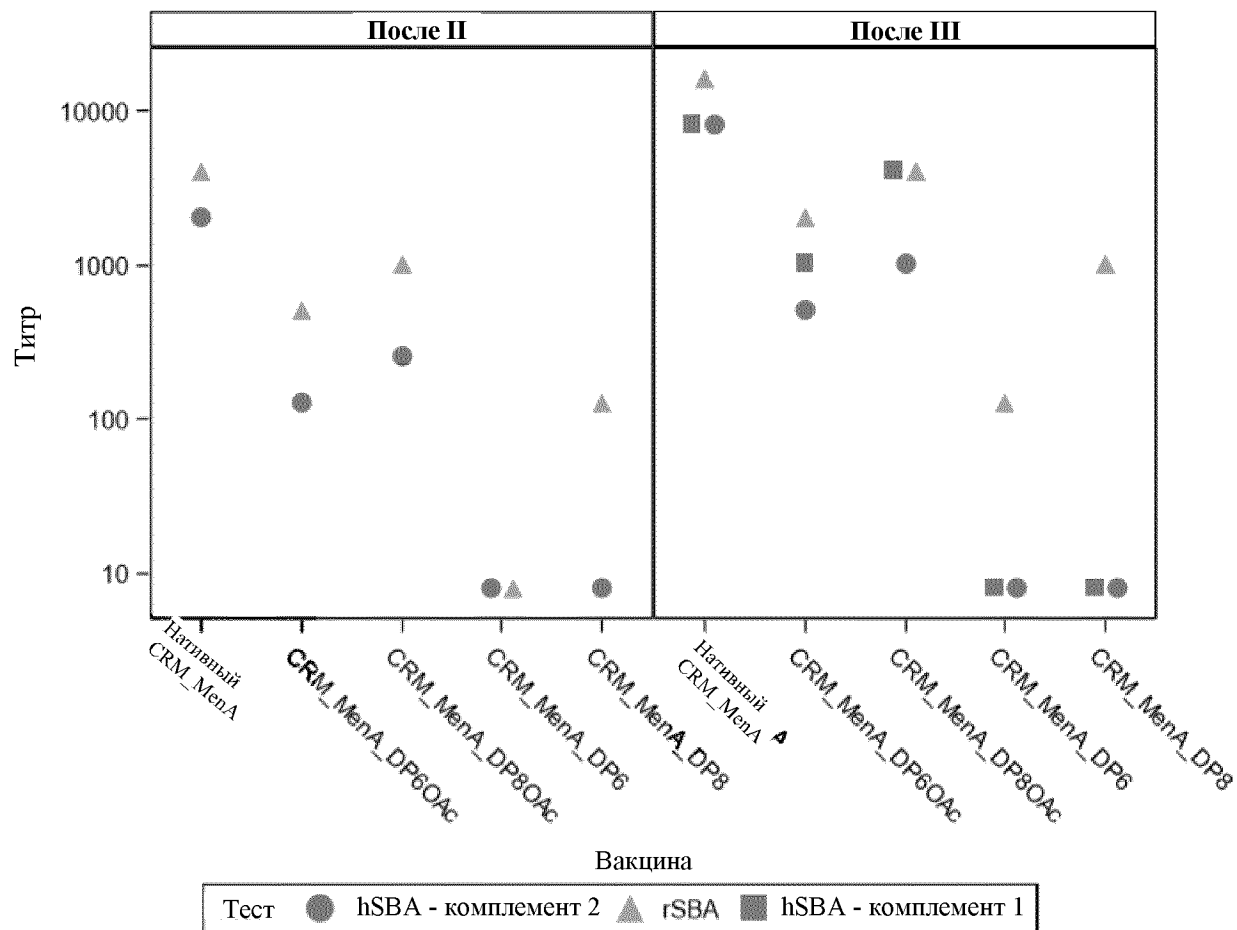


Фиг. 9



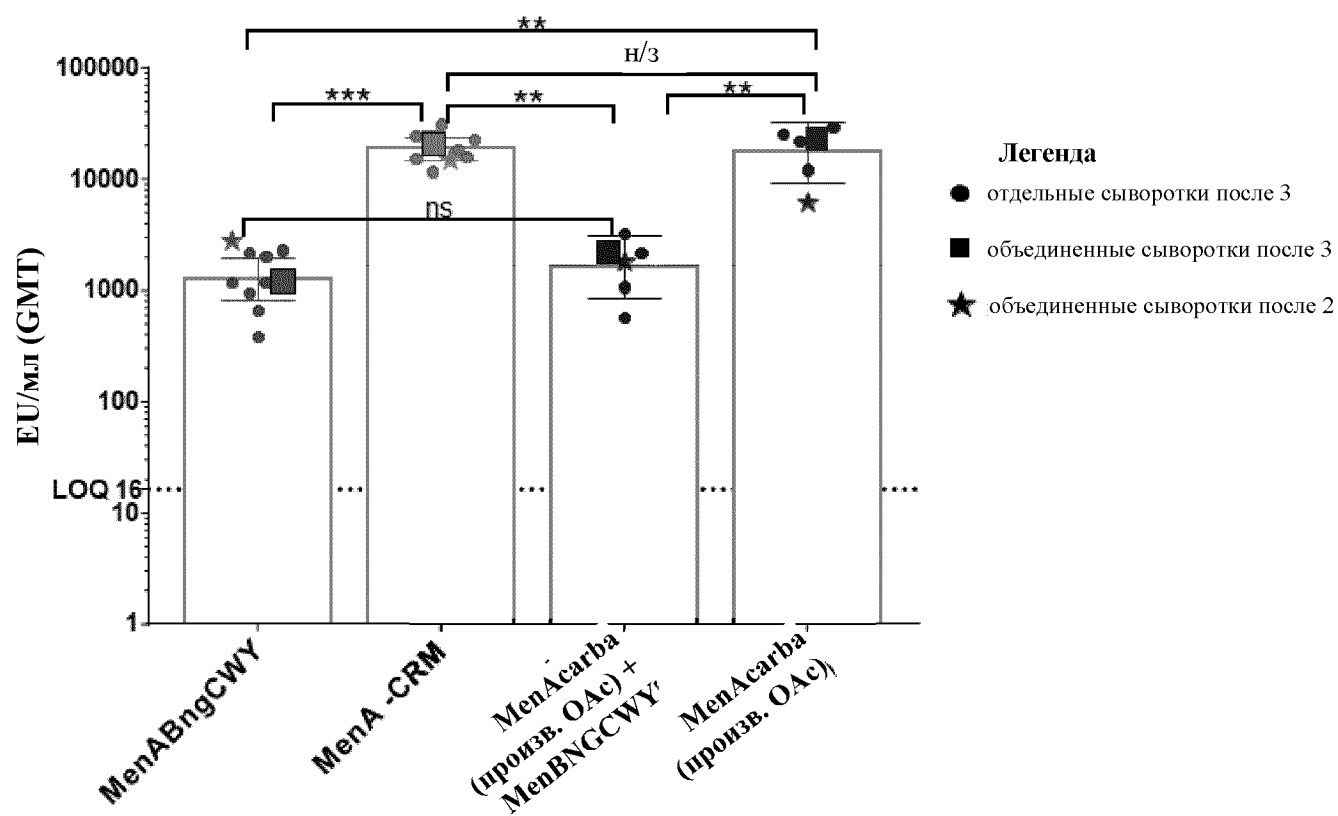
14/23

Фиг. 10



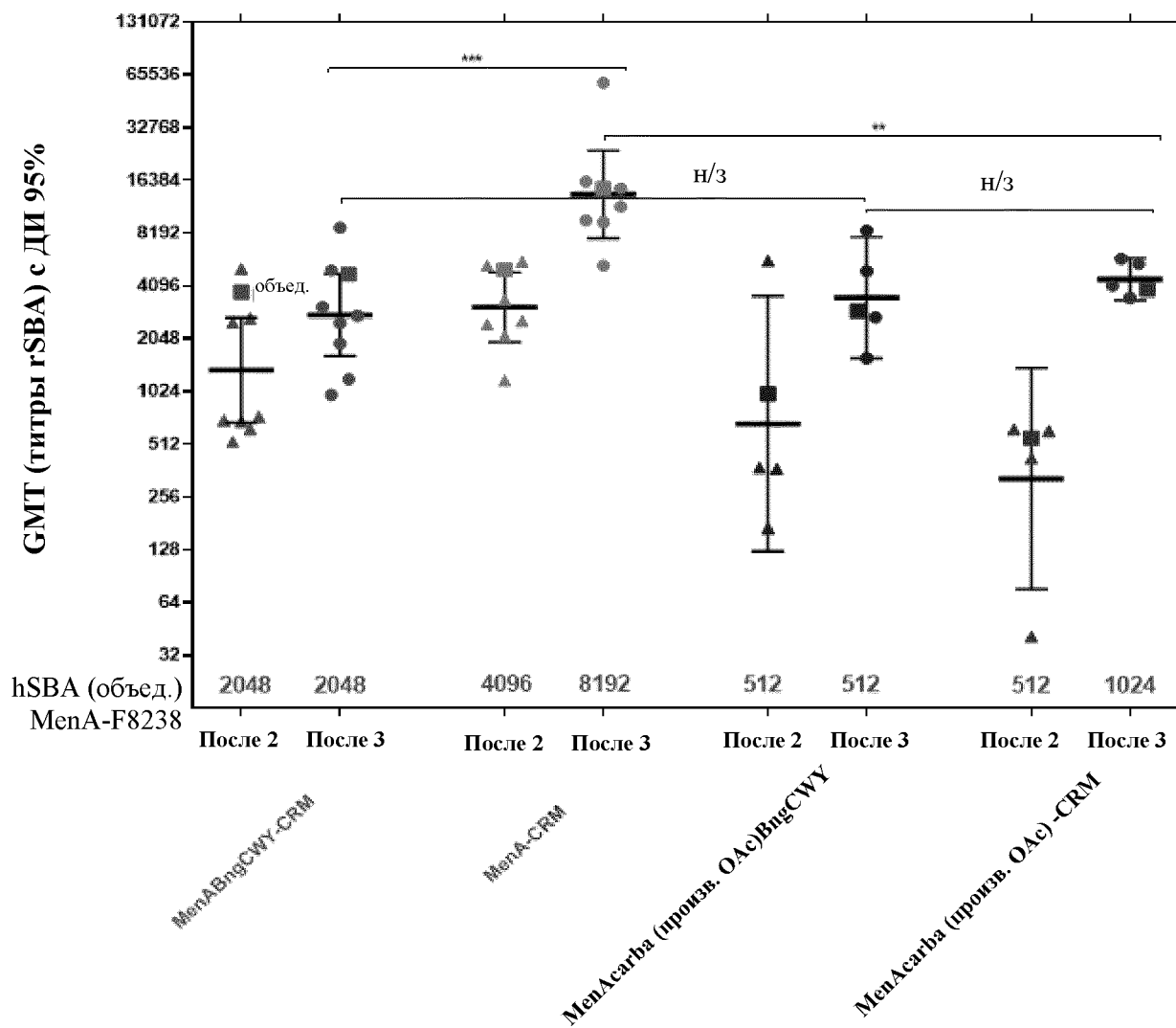
15/23

Фиг. 11



16/23

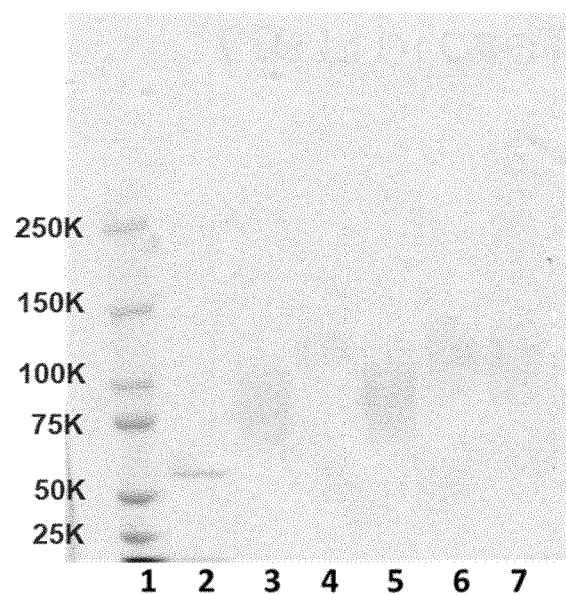
Фиг. 12



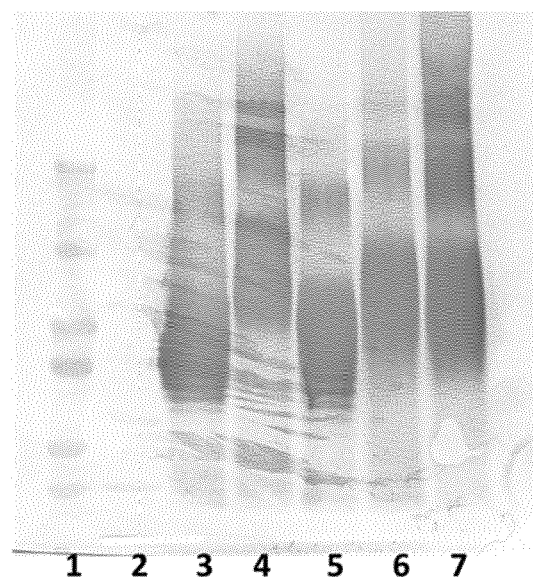
17/23

Фиг. 13

ЭФ в 3-8% геле с SDS, Трис-ацетат
Олигосахариды CRM197-Carba MenA



Вестерн блоттинг (первичное mAb к
MenA mIgG2a GSS2



- 1: маркер
- 2: CRM197
- 3: CRM-Carba MenA DP8 low
- 4: CRM-Carba MenA DP8 high
- 5: CRM-Carba MenA DP10 low
- 6: CRM-Carba MenA DP10 high
- 7: CRM-MenA

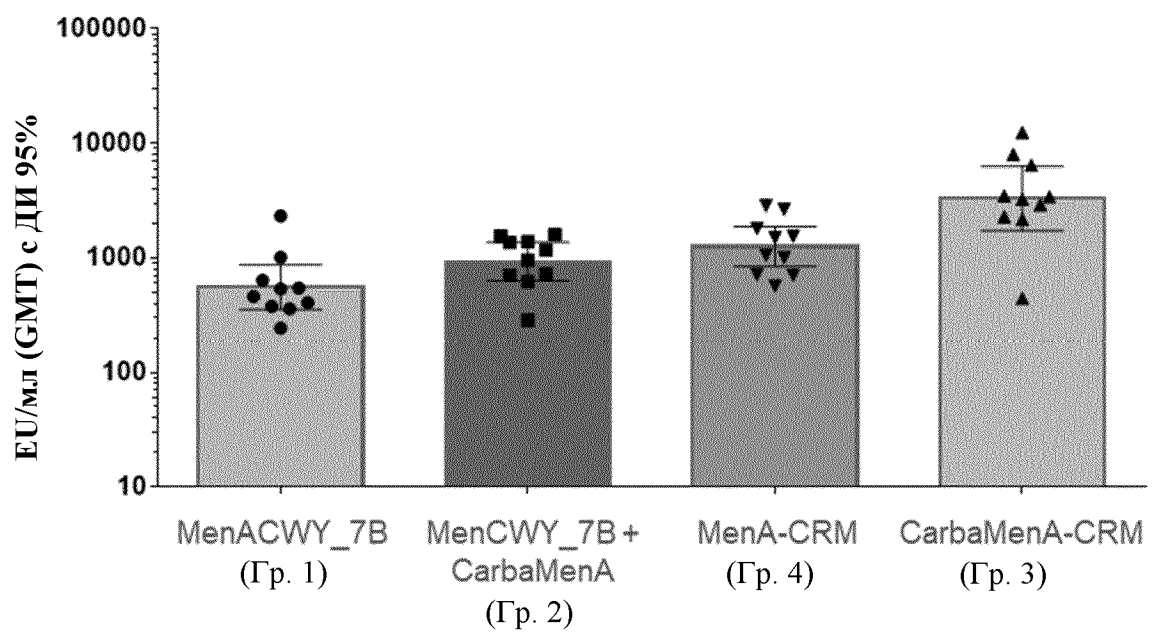
18/23

Фиг. 14А

HT-ELISA

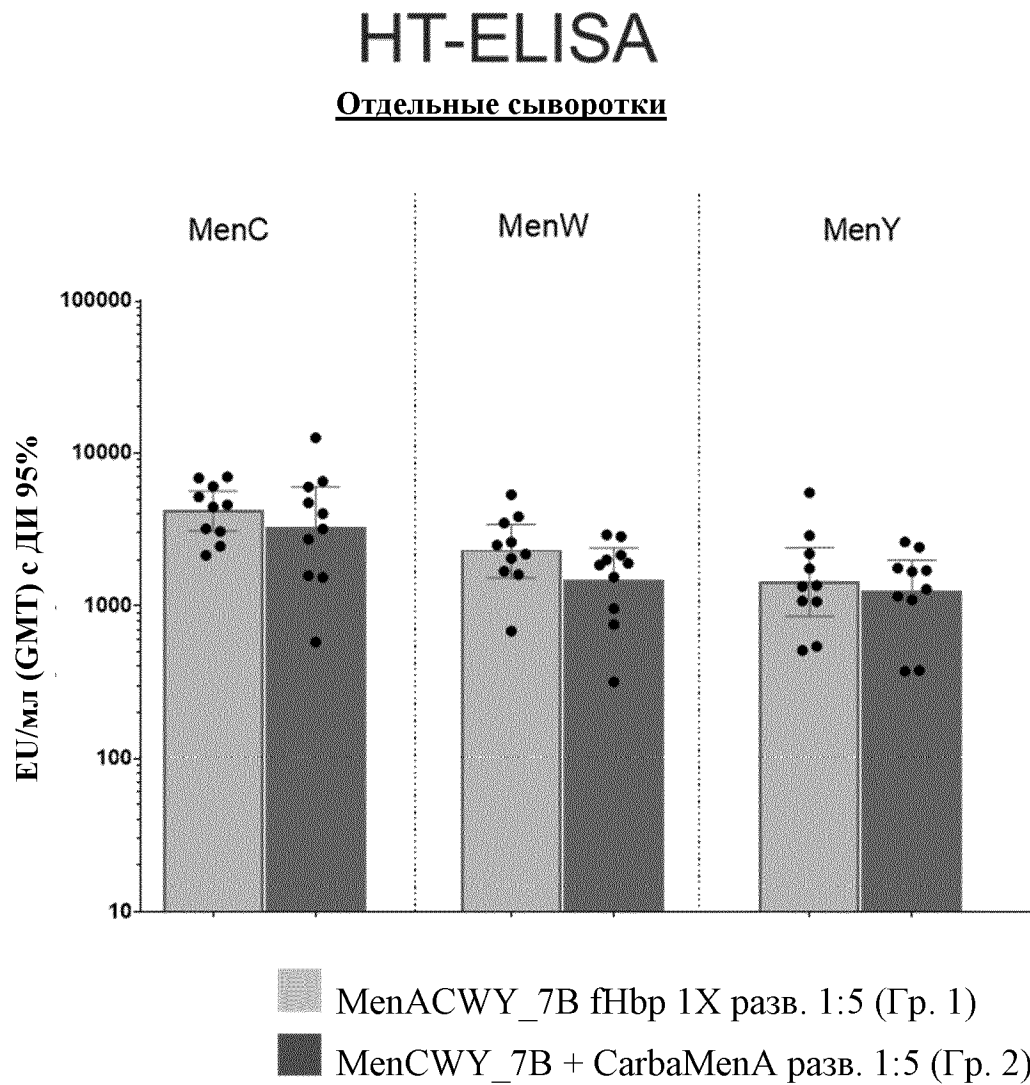
Отдельные сыворотки

Общий IgG к PsMenA в сыворотках после 3 доз



19/23

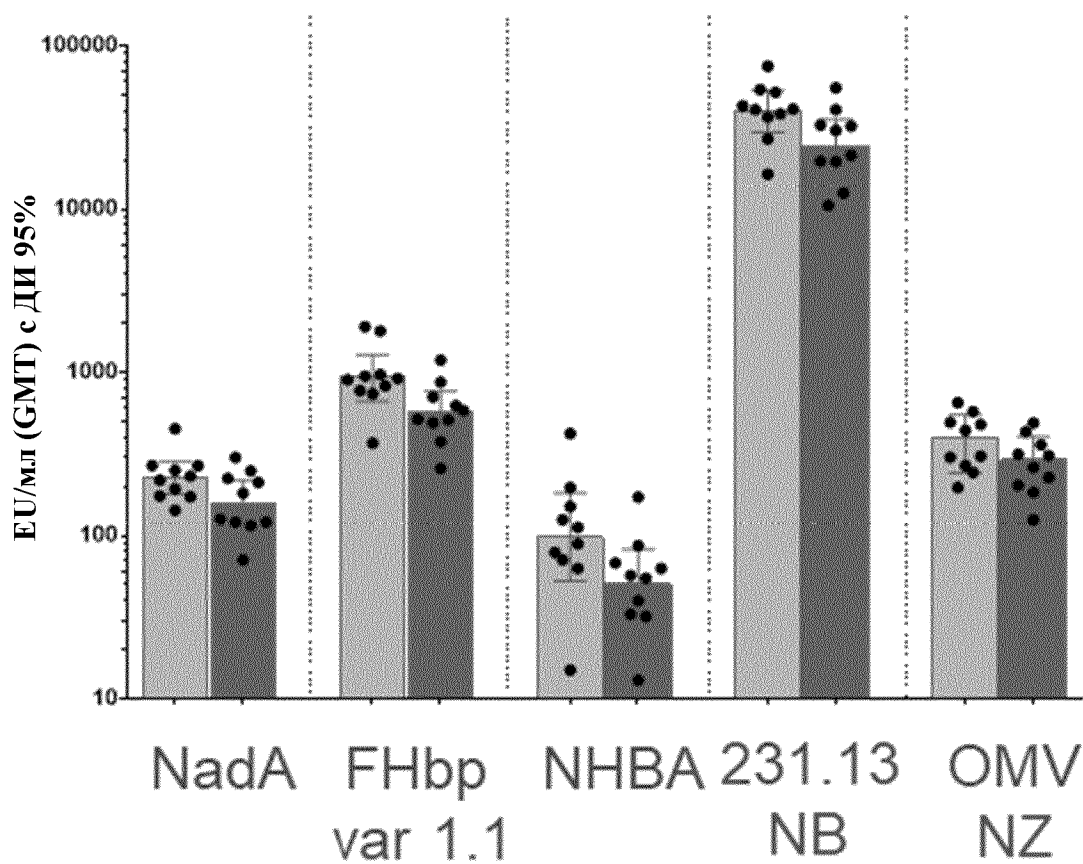
Фиг. 14В



20/23

Фиг. 14С

HT-ELISA Отдельные сыворотки

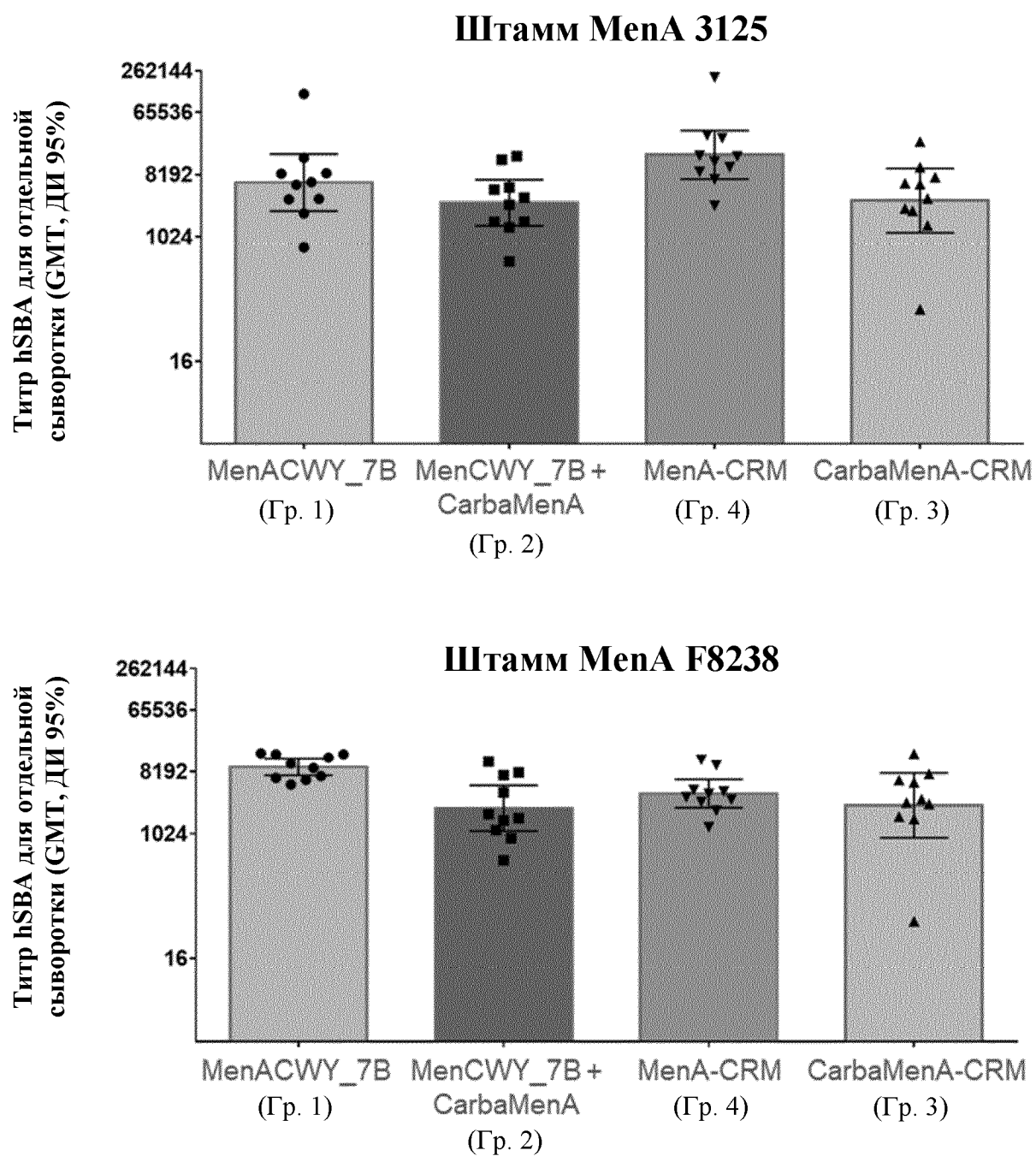


21/23

Фиг. 15А

Тест hSBA на слое агара (Axiolab)

Отдельные сыворотки

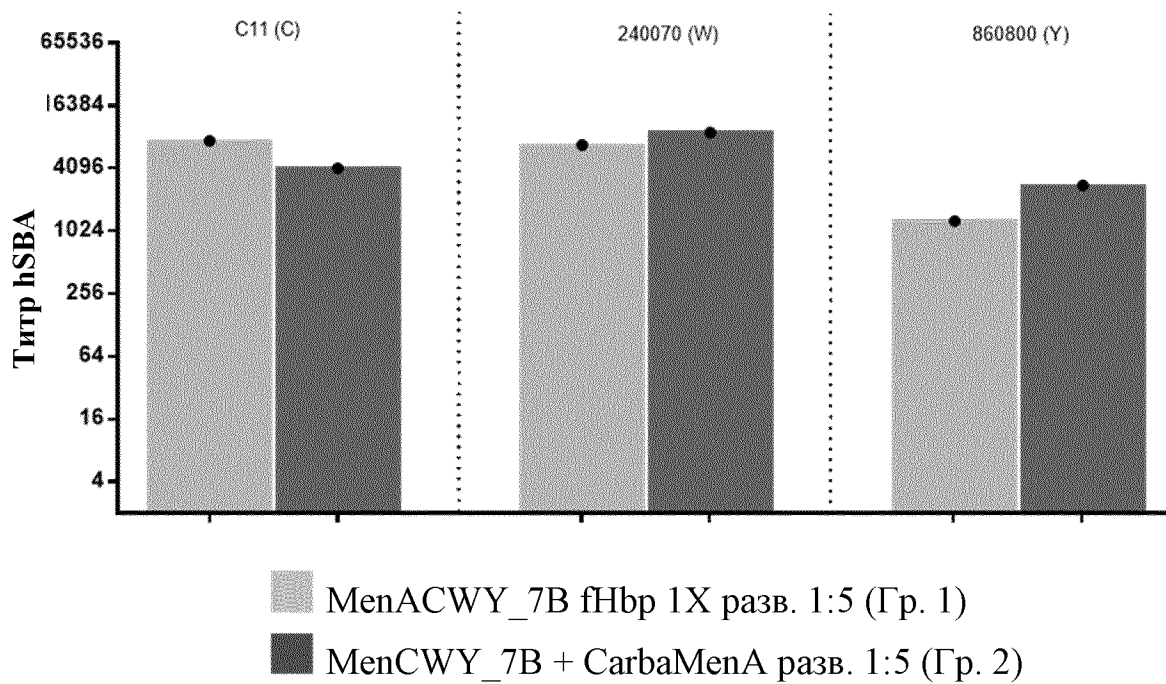


22/23

Фиг. 15В

Тест hSBA, выполненный вручную

Объединенные сыворотки



Фиг. 15С

