

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044044**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.19

(21) Номер заявки
201991559

(22) Дата подачи заявки
2017.12.29

(51) Int. Cl. *A61K 39/09* (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(54) ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ КОНЬЮГАТЫ ПОЛИПЕПТИД-АНТИГЕН С НЕПРИРОДНЫМИ АМИНОКИСЛОТАМИ

(31) 62/441,115; 62/530,803; 62/568,201;
62/591,160

(32) 2016.12.30; 2017.07.10; 2017.10.04;
2017.11.27

(33) US

(43) 2020.01.30

(86) PCT/US2017/069129

(87) WO 2018/126229 2018.07.05

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ВАКСАЙТ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Фэирмен Джеффри, Хайнрихс Йон,
Чань Вэй (US)**

(74) Представитель:
**Христофоров А.А., Джермакян Р.В.,
Парамонова К.В., Гизатуллина Е.М.,
Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова
М.Ю., Лебедев В.В., Угрюмов В.М.
(RU)**

(56) US-A1-2013189300
WANG Q. ET AL.: "Expanding the Genetic Code for Biological Studies", CHEMISTRY AND BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 16, no. 3, 27 March 2009 (2009-03-27), pages 323-336, XP026093959, ISSN: 1074-5521, DOI: 10.1016/J.CHEMBIOL.2009.03.001 [retrieved on 2009-03-26] page 329; figure 3
US-A1-2016257946
EP-A1-2716661

(57) В изобретении раскрыты иммуногенные композиции, содержащие конъюгаты белок-носитель антиген, при этом компонент белка-носителя содержит одну или более не природных аминокислот, включенных в него. Биортогональные химические структуры для прикрепления, включенные в не природные аминокислоты, обеспечивают более эффективную и активную презентацию антигена иммунной системе, упрощенную очистку и более строго определенную структуру этих полусинтетических иммуногенов.

B1

044044

044044

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США 62/441115 (поданной 30 декабря 2016 г.), предварительной заявке на патент США 62/530803 (поданной 10 июля 2017 г.), предварительной заявке на патент США 62/568201 (поданной 4 октября 2017 г.) и предварительной заявке на патент США 62/591160 (поданной 27 ноября 2017 г.), содержание каждой из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

Вакцины на основе выделенных антигенных макромолекул (например, вакцины первого поколения на основе полисахаридов менингококка, пневмококка и Haemophilus) значительно лучше, чем более ранние вакцинные составы, основанные на вакцинах из живых ослабленных или инактивированных организмов.

Очищенные макромолекулы значительно проще в изготовлении, имеют улучшенный профиль безопасности и могут вызывать более продуктивный специфический иммунный ответ (например, они могут быть направлены против антигена, который является более консервативным или важным для патогена). Кроме того, они обеспечивают упрощенную матрицу для получения вакцины, когда иммунный ответ может быть направлен против конкретного сайта или конкретного организма только за счет обеспечения надлежащего иммуногена. Однако одним из недостатков данной стратегии является то, что не каждая макромолекула вызывает сильный иммунный ответ. Многие липиды, полисахариды и определенные белковые антигены (и большинство небольших молекул) вызывают иммунные ответы, которые по своей природе являются слабыми, кратковременными и/или имеют недостатки в определенных популяциях пациентов (примеры которых включают детей или пожилых людей). Полагают, что эти слабые иммунные ответы возникают из-за антигенных структур, которые в первую очередь активируют В-клетки или неспособны в других отношениях активировать пути, зависящие от Т-клеток, которые участвуют в иммунологической памяти и созревании антител.

Краткое описание изобретения

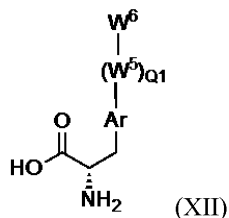
Настоящее изобретение относится к способам, композициям и методикам получения иммуногенных композиций, содержащих неприродную аминокислоту. Биортогональные химические структуры для прикрепления, включенные (встроенные) в неприродные аминокислоты, обеспечивают более эффективную и активную презентацию антигена иммунной системе, упрощенную очистку и более строго определенную структуру этих полусинтетических иммуногенов.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен конъюгат, содержащий полипептид и антиген, причем указанный полипептид представляет собой белок-носитель, содержащий по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки, и по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, или "нпАК", при этом указанный антиген конъюгирован с нпАК. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения белок-носитель содержит по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки, из белка, выбранного из группы, состоящей из токсина *Corynebacterium diphtheriae*, тетаноспазмина *Clostridium tetani* (также известного как столбнячный токсин), белка *D Haemophilus influenzae* (PD, HiD), комплекса белков наружной мембраны менингококка серогруппы В (ОМРС) и CRM197. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения белок-носитель содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 нпАК. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна нпАК заменяет лизин в нативном белке-носителе. Например, белок-носитель содержит CRM197, в котором по меньшей мере 2 (например, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6) из 39 остатков лизина в нативном CRM197 были заменены нпАК. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна нпАК заменяет фенилаланин в нативном белке-носителе. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 нпАК заменяют лизин в нативном белке-носителе. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 нпАК заменяют фенилаланин в нативном белке-носителе. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 нпАК заменяют лизин, фенилаланин или как лизин, так и фенилаланин в природном белке-носителе. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нпАК выбрана из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-3-(4-азидометил)фенилпропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты и 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты или любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность белка-носителя по меньшей мере на 80% идентична белку, выбранному из группы, состоящей из дифтерийного токсина (DT), столбнячного токсина (TT),

белка D Haemophilus influenzae (PD) и CRM197. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность белка-носителя по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки, получен из CRM197 в соответствии с SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна нпАК заменяет К25, К34, К38, К40, К213, К215, К228, К245, К265, К386, К523 или К527 из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна нпАК заменяет F13, F54, F124, F128, F141, F168, F251, F390, F531 или F532 из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере две нпАК заменяют К25, К34, К38, К40, К213, К215, К228, К245, К265, К386, К523, К527, F13, F54, F124, F128, F141, F168, F251, F390, F531 или F532 из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна нпАК заменяет К265 из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна нпАК заменяет К386 из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна нпАК заменяет К265 и К386 из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нпАК выбрана из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты и 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты или любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген конъюгирован с нпАК за счет триазольного соединяющего фрагмента. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой полисахарид.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae (в частности, типа b, т.е. Hib), Streptococcus pyogenes или Streptococcus agalactiae. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид серотипа Streptococcus pneumoniae, выбранного из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F, а также любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид, происходящий из одного из шести серотипов Porphyromonas gingivalis (например, K1, K2, K3, K4, K5 и/или K6).

Согласно связанному варианту реализации настоящего изобретения конъюгат содержит полипептид и антиген, причем указанный полипептид представляет собой белок-носитель, содержащий по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки, и по меньшей мере одну, и предпочтительно по меньшей мере две, нпАК, при этом указанный антиген конъюгирован с по меньшей мере одной нпАК и при этом также по меньшей мере одна нпАК представляет собой 2,3-дизамещенную пропановую кислоту, содержащую amino-заместитель в положении 2 и азидосодержащий заместитель, 1,2,4,5-тетразинилсодержащий заместитель или этинилсодержащий заместитель в положении 3. Согласно другому связанному варианту реализации настоящего изобретения конъюгат содержит полипептид и антиген, причем указанный полипептид представляет собой белок-носитель, содержащий по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки, и по меньшей мере один, и предпочтительно по меньшей мере два, остаток нпАК, при этом указанный антиген конъюгирован с нпАК и при этом также остаток нпАК соответствует аминокислоте, имеющей структуру формулы XII



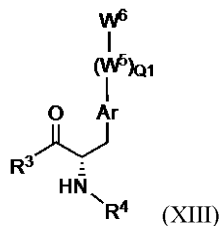
где Ag содержит 5-членное или 6-членное ароматическое кольцо, необязательно содержащее по меньшей мере один гетероатом;

W^5 выбран из C_1 - C_{10} -алкилена, -NH-, -O- и -S-;

$Q1$ равен нулю или 1 и

W^6 выбран из азидо, 1,2,4,5-тетразинила, необязательно C-замещенного низшей алкильной группой, и этинила,

так что остаток нпАК в полипептиде имеет структуру формулы XIII

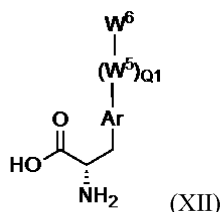


где R^3 представляет собой OH или остаток аминокислоты белка-носителя, и R^4 представляет собой H или остаток аминокислоты белка-носителя.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен полипептид, содержащий по меньшей мере одну нпАК, заменяющую природную аминокислоту в нативном полипептиде в соответствии с SEQ ID NO: 1, при этом по меньшей мере одна нпАК заменяет K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523 или K527 из SEQ ID NO: 1, при этом нпАК содержит соединяющий фрагмент. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен полипептид, содержащий по меньшей мере одну нпАК, заменяющую природную аминокислоту в нативном полипептиде в соответствии с SEQ ID NO: 1, при этом по меньшей мере одна нпАК заменяет F13, F54, F124, F128, F141, F168, F251, F390, F531 или F532 из SEQ ID NO: 1, причем нпАК содержит соединяющий фрагмент. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен полипептид, содержащий по меньшей мере две нпАК, заменяющие природную аминокислоту в нативном полипептиде в соответствии с SEQ ID NO: 1, при этом по меньшей мере одна нпАК заменяет K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523, K527, F13, F54, F124, F128, F141, F168, F251, F390, F531 или F532 из SEQ ID NO: 1, причем нпАК содержит соединяющий фрагмент. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нпАК выбрана из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты и 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты или любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения заменен K265 из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения заменены K265 и K386 из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 нпАК. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нпАК выбрана из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты и 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты или любой их комбинации.

Согласно связанному варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна, и предпочтительно по меньшей мере две, нпАК в полипептиде представляет собой 2,3-дизамещенную пропановую кислоту, содержащую аминокислотный заместитель в положении 2 и азидосодержащий заместитель, 1,2,4,5-тетразинилсодержащий заместитель или этинилсодержащий заместитель в положении 3.

Согласно другому связанному варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна, и предпочтительно по меньшей мере две, нпАК в полипептиде имеет структуру формулы XII



где Ar содержит 5-членное или 6-членное ароматическое кольцо, необязательно содержащее по меньшей мере один гетероатом;

W^5 выбран из C_1 - C_{10} -алкилена, -NH-, -O- и -S-;

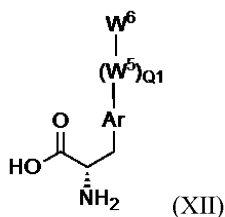
Q1 равен нулю или 1 и

W^6 выбран из азидо, 1,2,4,5-тетразинила, необязательно C-замещенного низшей алкильной группой, и этинила.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложена композиция, содержащая конъюгаты полипептид-антиген, причем указанный полипептид представляет собой белок-носитель, содержащий по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки, и по меньшей мере одну нпАК, и

при этом указанный антиген конъюгирован с нпАК. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения конъюгаты полипептид-антиген поперечно сшиты за счет связей белок-антиген-белок. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения композиция содержит несколько конъюгатов белок-носитель-антиген, причем каждый конъюгат содержит отличающийся антиген (например, капсульные полисахариды из разных серотипов пневмококков). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антигены происходят из разных серотипов (например, для пневмококка) или серогрупп (например, для менингококка) одного и того же организма. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой полисахарид. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* (например, Hib), *Streptococcus pyogenes* или *Streptococcus agalactiae*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид, происходящий из одного из шести серотипов *Porphyromonas gingivalis* (например, K1, K2, K3, K4, K5 и/или K6). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид серотипа *Streptococcus pneumoniae*, выбранного из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F, а также любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения композиция содержит конъюгат белок-носитель-антиген, описанный в настоящем документе, причем она содержит по меньшей мере 14, 20, 21, 24 или 25 различных конъюгатов белок-носитель-капсульный полисахарид, где каждый конъюгат содержит отличающийся капсульный полисахарид серотипа *Streptococcus pneumoniae*, выбранного из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения соотношение полисахарида и белка-носителя (мас./мас.) превышает 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения белок-носитель содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 нпАК. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нпАК выбрана из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты и 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты или любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность белка-носителя по меньшей мере на 80% идентична белку, выбранному из дифтерийного токсина (DT), столбнячного токсина (TT), белка D *Haemophilus* (PD), комплекса белков наружной мембраны менингококка серогруппы B (OMPС) и CRM197. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность белка-носителя по меньшей мере на 80% идентична CRM197. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность белка-носителя по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность белка-носителя по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1, при этом также по меньшей мере одна нпАК заменяет природную аминокислоту, присутствующую в нем. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна нпАК заменяет аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523 или K527 из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна, и предпочтительно по меньшей мере две, нпАК заменяет аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F13, F54, F124, F128, F141, F168, F251, F390, F531 или F532 из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна, и предпочтительно по меньшей мере две, нпАК заменяет аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523, K527, F13, F54, F124, F128, F141, F168, F251, F390, F531 или F532 из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген конъюгирован с нпАК за счет соединяющего фрагмента. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген конъюгирован с нпАК за счет триазольного соединяющего фрагмента.

Согласно связанному варианту реализации настоящего изобретения конъюгаты полипептид-антиген в композиции содержат, в качестве полипептида, белок-носитель, содержащий по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки, и по меньшей мере одну, и предпочтительно по меньшей мере две, нпАК, причем указанный антиген конъюгирован с нпАК и при этом также по меньшей мере одна нпАК представляет собой 2,3-дизамещенную пропановую кислоту, содержащую amino-заместитель в положении 2 и азидосодержащий заместитель, 1,2,4,5-тетразинилсодержащий заместитель или этинилсодержащий заместитель в положении 3. Согласно другому связанному варианту реализации настоящего изобретения конъюгаты полипептид-антиген в композиции содержат, в качестве полипептида, белок-носитель, содержащий по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки, и по меньшей мере одну, и предпочтительно по меньшей мере две, нпАК, причем указанный антиген конъюгирован с нпАК и при этом также по меньшей мере одна нпАК в полипептиде имеет структуру формулы XII



где Ag содержит 5-членное или 6-членное ароматическое кольцо, необязательно содержащее по меньшей мере один гетероатом;

W^5 выбран из C_1 - C_{10} -алкилена, -NH-, -O- и -S-;

Q1 равен нулю или 1 и

W^6 выбран из азида, 1,2,4,5-тетразинила, необязательно C-замещенного низшей алкильной группой, и этинила.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ получения конъюгата, включающий: (а) обеспечение активированного антигена, содержащего множество функциональных групп, содержащих первую химическую "ручку", способную конъюгироваться со второй химической "рукояткой" нпАК; (б) комбинирование активированного антигена с полипептидом, содержащим по меньшей мере одну из нпАК, в условиях, при которых первая и вторая химические "рукоятки" реагируют с образованием конъюгата антиген-полипептид, причем полипептид содержит по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки; и (с) выделение композиции, содержащей конъюгат. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой полисахарид. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* (например, Hib), *Streptococcus pyogenes* или *Streptococcus agalactiae*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид серотипа *Streptococcus pneumoniae*, выбранного из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 9N, 10А, 11А, 12F, 13, 14, 15В, 16, 17F, 18С, 19А, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F, а также любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид, происходящий из одного из шести серотипов *Porphyromonas gingivalis* (например, K1, K2, K3, K4, K5 и/или K6). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген подвергали взаимодействию с первым реагентом, выбранным из группы, состоящей из CDAP, CDI или периодата, при получении активированного антигена. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения первый реагент представляет собой периодат, концентрация которого ниже 1 М. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения множество функциональных групп содержит гидроксильные группы. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения множество функциональных групп содержит альдегидную группу. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген подвергали взаимодействию со вторым реагентом, содержащим функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из пропаргила, DIFO, DBCO и DBCO(PEG) $_n$ -NH $_2$. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген подвергали взаимодействию со вторым реагентом, содержащим DBCO-NH $_2$. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения первая химическая "рукоятка" содержит алкиновую группу. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вторая химическая "рукоятка" содержит азидогруппу. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения соотношение антигена и полипептида конъюгата в композиции (мас./мас.) превышает 1. Согласно связанному варианту реализации настоящего изобретения способ получения конъюгата включает: (а) активацию антигена для включения (с включением) в него по меньшей мере одной первой химической "рукоятки", причем первая химическая "рукоятка" способна конъюгироваться со второй химической "рукояткой" нпАК в полипептиде; (б) комбинирование активированного антигена с полипептидом, содержащим по меньшей мере одну из нпАК, в условиях, при которых первая и вторая химические "рукоятки" реагируют с образованием конъюгата антиген-полипептид, при этом полипептид содержит по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки; и (с) выделение композиции, содержащей конъюгат. Согласно одному аспекту этого варианта реализации активация антигена предусматривает включение (встраивание) в антиген по меньшей мере одной алкинильной группы в качестве первой химической "рукоятки". Согласно другому связанному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ получения конъюгата полипептид-антиген, включающий активацию антигена с помощью включения в него по меньшей мере одной алкинильной группы в качестве первой химической "рукоятки" и взаимодействие антигена с полипептидом, содержащим по меньшей мере одну нпАК, и предпочтительно по меньшей мере две нпАК, несущую азидогруппу в качестве второй химической "рукоятки", что позволяет осуществить некаталитическую реакцию ковалентной биоконъюгации полипептида и антигена. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения алкинильная группа ограничена для повышения реакционной способности, например, в кольцевой структуре, такой как диарил-напряженный циклооктин.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ обеспечения (индукции) иммунозащитного антительного ответа на антиген у субъекта, включающий введение указанному субъекту конъюгата, описанного в настоящем документе, во вспомогательном веществе, подходящем для парентерального введения.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ обеспечения иммунозащитного антительного ответа на антиген у субъекта, включающий введение указанному субъекту композиции, описанной в настоящем документе, во вспомогательном веществе, подходящем для парентерального введения. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ синтеза полипептида, содержащего по меньшей мере 2 неприродные аминокислоты (нпАК), в смеси для бесклеточной экспрессии, поддерживаемой при температуре от примерно 10 до примерно 30°C, причем полученный полипептид содержит как растворимую, так и нерастворимую фракции, и при этом соотношение растворимой фракции и нерастворимой фракции составляет по меньшей мере 30% (мас./мас.). Например, в 100 г общего полипептида нерастворимая фракция будет составлять 70 г или менее, и растворимая фракция будет составлять 30 г или более. Согласно другому варианту реализации температура превышает приблизительно 20°C. Согласно другому варианту реализации температура ниже приблизительно 20°C. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения температура составляет от приблизительно 14 до приблизительно 18°C. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей подавляющий кодон. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения смесь для бесклеточной экспрессии содержит ортогональную пару тРНК/аминоацил-тРНК-синтетаза, специфичную для нпАК. Согласно другому варианту реализации концентрация тРНК составляет по меньшей мере 20 мкМ (т.е. концентрация ортогональной тРНК). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения концентрация нпАК составляет менее приблизительно 2 мМ, и концентрация аминокислот-тРНК-синтетазы составляет менее приблизительно 5 мкМ (т.е. концентрация ортогональной синтетазы). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способ включает конъюгирование полипептида с активным фрагментом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения активный фрагмент выбран из группы, состоящей из гаптена, бактериального антигена, вирусного антигена, пептидного токсина, макролида, простого полиэфира и любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения смесь для экспрессии содержит клеточный экстракт *E. coli*, зародышей пшеницы или ретикулоцитов кролика. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения смесь для экспрессии содержит по меньшей мере 30% клеточного экстракта. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 нпАК. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нпАК выбрана из группы, состоящей из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты и любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полученный полипептид содержит как растворимую, так и нерастворимую фракции, и при этом соотношение растворимой фракции и нерастворимой фракции составляет по меньшей мере 60% (мас./мас.). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полученный полипептид содержит как растворимую, так и нерастворимую фракции, и при этом соотношение растворимой фракции и нерастворимой фракции составляет по меньшей мере 80% (мас./мас.). Например, в 100 г общего полипептида нерастворимая фракция будет составлять 20 г или менее, и растворимая фракция будет составлять 80 г или более. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен улучшенный способ получения белковой конъюгированной вакцины, в которой антиген конъюгирован с белком-носителем, который обеспечивает иммунный ответ, зависимый от Т-клеток, улучшение заключается в применении в качестве белка-носителя полипептида, содержащего по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, при этом неприродная аминокислота содержит биоортогональный реакционноспособный фрагмент, за счет которого антиген конъюгирован с полипептидом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой бактериальный полисахарид. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит по меньшей мере две неприродные аминокислоты, содержащие биоортогональный реакционноспособный фрагмент, за счет которого антиген конъюгирован с полипептидом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки, который не содержит неприродную аминокислоту, содержащую биоортогональный реакционноспособный фрагмент, за счет которого антиген конъюгирован с полипептидом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения эпитоп, активирующий Т-клетки, получен из белка, выбранного из группы, состоящей из токсина *Corynebacterium diphtheriae*, тетаноспазмина *Clostridium tetani*, белка D *Haemophilus influenzae* (PD, HiD), комплекса белков наружной мембраны менингококка серогруппы B (OMP) и

CRM197. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой бактериальный полисахарид, и бактерия выбрана из группы, состоящей из *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* (например, Hib), *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus agalactiae*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна из неприродных аминокислот выбрана из группы, состоящей из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты и 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ получения белка-носителя, содержащего множество неприродных аминокислот в своей структуре, включающий: (a) обеспечение нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-носитель, причем нуклеиновая кислота содержит множество подавляющих кодонов; (b) создание реакционной смеси путем комбинирования нуклеиновой кислоты с бесклеточным бактериальным экстрактом, содержащим неприродные аминокислоты, тРНК, комплементарную подавляющим кодоном, и аминоацил-тРНК-синтетазу; и (c) инкубацию реакционной смеси согласно (b) в условиях, достаточных для селективного встраивания неприродной аминокислоты в сайт, соответствующий каждому подавляющему кодону, в белке-носителе. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения неприродная аминокислота представляет собой 4-азидометилфенилаланин (pAMF). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения этап (c) включает инкубацию реакционной смеси при температуре ниже 20°C. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает очистку белка-носителя непосредственно после (c). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения подавляющий кодон селективно заменен в кодоне 25, 34, 38, 40, 213, 215, 228, 245, 265, 386, 523 или 527 из SEQ ID NO: 2. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения реакционная смесь в (b) дополнительно содержит биологические компоненты, необходимые для синтеза белка. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения тРНК в (b) способна нагружаться pAMF. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминоацил-тРНК-синтетаза в (b) предпочтительно аминоацилирует тРНК с pAMF по сравнению с 20 природными аминокислотами.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена композиция, содержащая по меньшей мере 14, 20, 21, 24 или 25 различающихся конъюгатов белок-носитель-антиген, причем антиген представляет собой капсульный полисахарид, и: (a) капсульный полисахарид в каждом различающемся конъюгате белок-носитель-антиген получен из разного серотипа *Streptococcus pneumoniae*; (b) белок-носитель из конъюгатов белок-носитель-антиген содержит полипептид, содержащий по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки, и по меньшей мере две неприродные аминокислоты (нпАК); и (c) капсульные полисахариды конъюгированы с нпАК. В предпочтительных модификациях этого варианта реализации по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки, получен из CRM197 в соответствии с SEQ ID NO: 1; последовательность полипептида по меньшей мере на 80% или 95% идентична SEQ ID NO: 1; и: (i) полипептид содержит 2-9 нпАК; (ii) полипептид содержит 4-6 нпАК; и/или (iii) по меньшей мере одна нпАК заменяет аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из (a) K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523, K527 из CRM197, (b) F13, F54, F124, F128, F141, F168, F251, F390, F531 или F532 из SEQ ID NO: 1, или (c) K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523, K527, F13, F54, F124, F128, F141, F168, F251, F390, F531 или F532 из SEQ ID NO: 1. Предпочтительные модификации предыдущих вариантов реализации включают композиции, содержащие по меньшей мере 14, 20, 21, 24 или 25 различающихся конъюгатов белок-носитель-антиген, причем каждый различающийся конъюгат белок-носитель-антиген содержит антиген, выбранный индивидуально из капсульных полисахаридов серотипа *Streptococcus pneumoniae*, выбранного из группы, состоящей из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F; композиции из по меньшей мере 24 различающихся конъюгатов белок-носитель-антиген, в которых капсульный полисахарид из 24 различающихся конъюгатов белок-носитель-антиген получен из серотипов *Streptococcus pneumoniae* 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F и 33F; композиции, содержащие по меньшей мере 25 различающихся конъюгатов белок-носитель-антиген, в которых капсульный полисахарид по меньшей мере одного из различающихся конъюгатов белок-носитель-антиген получен из серотипа *Streptococcus pneumoniae*, выбранного из группы, состоящей из 6C, 7C, 13, 15A, 15C, 16, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 34, 35B, 33F, 35F, 37 и 38; и композиции, содержащие по меньшей мере 25 различающихся конъюгатов белок-носитель-антиген, в которых капсульный полисахарид по меньшей мере одного из различающихся конъюгатов белок-носитель-антиген получен из серотипа *Streptococcus pneumoniae*, выбранного из группы, состоящей из 15A и 35B, или в другом варианте из группы, состоящей из 20A, 20B и 24B.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложена композиция, содержащая по меньшей мере 14, 20, 21, 24 или 25 различающихся конъюгатов белок-носитель-антиген, в которых антиген представляет собой капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae*, причем (a) капсульный полисахарид в каждом различающемся конъюгате белок-носитель-антиген получен из разного серо-

типа *Streptococcus pneumoniae*; (b) белок-носитель из конъюгатов белок-носитель-антиген представляет собой полипептид, содержащий по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки, и по меньшей мере две неприродные аминокислоты (нпАК), и капсульные полисахариды конъюгированы с нпАК, (c) присутствует различающийся конъюгат белок-носитель-антиген, содержащий капсульный полисахарид для каждого из серотипов *Streptococcus pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F и 23F, и (d) присутствует по меньшей мере один дополнительный различающийся конъюгат белок-носитель-антиген, содержащий капсульный полисахарид из серотипов *Streptococcus pneumoniae*, выбранных из группы, состоящей из серотипов 2, 6С, 8, 9N, 10А, 12F, 15А, 15В, 15С, 16F, 17F, 20, 20А, 20В, 22F, 23А, 23В, 24F, 24В, 31, 33F, 34, 35В, 35F и 38. Например, композиция может содержать (i) по меньшей мере 20 или 21 различающийся конъюгат белок-носитель-антиген, включая конъюгат для каждого из серотипов *Streptococcus pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F, или (ii) по меньшей мере 24 различающихся конъюгата белок-носитель-антиген, причем присутствует различающийся конъюгат белок-носитель-антиген, содержащий капсульный полисахарид для каждого из серотипов *Streptococcus pneumoniae* 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 9N, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 17F, 18С, 19А, 19F, 20, 22F, 23F и 33F.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен конъюгат полипептид-антиген, в котором полипептид содержит 3 или более остатков нпАК, и конъюгат имеет молекулярную массу по меньшей мере 500 кДа. Полипептид может представлять собой CRM197 (например, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 1, как обсуждается в разделе 5 а ниже), содержащий 3 или более остатков нпАК (например, 3-9 или 3-8, или 3-7, или 3-6 остатков нпАК). Антиген может представлять собой бактериальный полисахарид, такой как пневмококковый капсульный полисахарид. Конъюгат может иметь молекулярную массу по меньшей мере 600 кДа, по меньшей мере 800 кДа, по меньшей мере 900 кДа или по меньшей мере 1 МДа, например, 1-5 МДа. Как обсуждается далее в настоящем документе, несколько препаратов таких конъюгатов, где все препараты получены с пневмококковым капсульным полисахаридом из разных серотипов *Streptococcus pneumoniae*, можно комбинировать в композиции согласно настоящему изобретению, которые можно применять в качестве поливалентных вакцин. Предпочтительные группы серотипов *Streptococcus pneumoniae*, представленных в таких конъюгатах, также обсуждаются в настоящем документе ниже.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен конъюгат полипептид-антиген, в котором полипептид содержит 4 или более остатков нпАК. Полипептид может представлять собой CRM197 (например, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 1, как описано в разделе 5а ниже), содержащий 4 или более остатков нпАК (например, 4-9 или 4-8, или 4-7, или 4-6 остатков нпАК). Антиген может представлять собой бактериальный полисахарид, такой как пневмококковый капсульный полисахарид. Конъюгат может иметь молекулярную массу по меньшей мере 500 кДа, (например, по меньшей мере 600 кДа, по меньшей мере 800 кДа, по меньшей мере 900 кДа или по меньшей мере 1 МДа, например, 1 -5 МДа). Как обсуждается далее в настоящем документе, несколько препаратов таких конъюгатов, где все препараты получены с пневмококковым капсульным полисахаридом из разных серотипов *Streptococcus pneumoniae*, можно комбинировать в композиции согласно настоящему изобретению, которые можно применять в качестве поливалентных вакцин. Предпочтительные группы серотипов *Streptococcus pneumoniae*, представленных в таких конъюгатах, также обсуждаются в настоящем документе далее.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен белок, подходящий для получения иммуногенного конъюгата полисахарид-белок, в котором указанный белок (i) содержит по меньшей мере одну нпАК и (ii) имеет растворимость по меньшей мере 50 мг/л при 20°C в трис-буфере с pH 7,4. Полипептид содержит по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки (как обсуждается выше); например, это может быть CRM197 (например, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 1, как обсуждается в разделе 5а ниже), содержащий 2 или более остатков нпАК, например, 3-9 или 4-9, или 3-8, или 4-8, или 3-7, или 4-7, или 3-6, или 4-6 остатков нпАК. Белок может быть конъюгирован с бактериальным полисахаридом, таким как пневмококковый капсульный полисахарид, для получения конъюгата. Растворимость может составлять по меньшей мере 100 мг/л, по меньшей мере 200 мг/л или даже по меньшей мере 250 мг/л. Как обсуждается далее в настоящем документе, несколько препаратов таких конъюгатов, где все препараты получены с пневмококковым капсульным полисахаридом из разных серотипов *Streptococcus pneumoniae*, можно комбинировать в композиции согласно настоящему изобретению, которые можно применять в качестве поливалентных вакцин. Предпочтительные группы серотипов *Streptococcus pneumoniae*, представленных в таких конъюгатах, также обсуждаются далее в настоящем документе.

Краткое описание чертежей

Признаки и преимущества вариантов реализации, описанных в настоящем документе, дополнительно поясняются со ссылкой на следующее подробное описание и прилагаемые чертежи, на которых изложены иллюстративные варианты реализации.

На фиг. 1 показан выход eCRM, содержащего 6 нпАК, полученного при 30, 25 или 20°C в реакциях CFPS, необязательно дополненных повышающимися количествами тРНК (О-тРНК) или нпАК/aaRS-

синтетазы (нпАК). В каждом столбике показаны два столбца, представляющие выход общей и растворимой фракций.

На фиг. 2 показано изображение геля после окрашивания Кумасси (2А) и флуоресцентное изображение геля (2В), демонстрирующие относительный выход синтезированного белка (2А) и способность рАМФ, включенной в eCRM, вступать в реакцию с DBCO-флуоресцеином (2В) для односайтного eCRM, полученного в реакциях бесклеточного белкового синтеза (CFPS). На фиг. 2А маркеры молекулярной массы показывают, сверху вниз, 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 и 250 кДа. На фиг. 2В флуоресцентные маркеры находятся на уровне 25 и 75 кДа. Дорожки соответствуют следующим: L = маркеры молекулярной массы; W = дикий тип; C = C-концевой TAG; затем в дорожках 1-12 TAG заменяет Lys в положениях 11, 25, 34, 38, 40, 52, 60, 77, 83, 91, 96 и 103, соответственно.

На фиг. 3 показана опсонофагоцитарная (ОРА) активность (GMT) у мышей после введения моновалентных конъюгатов пневмококковый полисахарид-eCRM. Серотипы показаны на оси X. Белые столбцы представляют добавленные в качестве адьюванта полисахариды, тогда как черные столбцы представляют добавленные в качестве адьюванта конъюгаты.

На фиг. 4 показаны ответы IgG (GMT) у мышей после введения моновалентных конъюгатов пневмококковый полисахарид-eCRM. Серотипы показаны на оси X. Белые столбцы представляют добавленные в качестве адьюванта, но неконъюгированные полисахариды; черные столбцы представляют добавленные в качестве адьюванта конъюгаты.

На фиг. 5 показаны ответы IgG (GMT) у кроликов после введения поливалентных пневмококковых вакцин. Каждый серотип (ось X) имеет данные для 24-валентной конъюгированной вакцины согласно настоящему изобретению (слева), Prevnar-13™ (в центре) и 24-валентной неконъюгированной вакцины (справа). Данные представляют среднее значение \pm 95% доверительный интервал.

Фиг. 6 сходна с фиг. 5, но на ней показаны ответы ОРА (GMT).

Подробное описание изобретения

В белковых конъюгированных вакцинах иммунный ответ на "слабый" антиген усиливается за счет прикрепления к известному "сильному" белковому антигену. В этих полусинтетических биомолекулах белки, которые вызывают сильные, длительные иммунные ответы, зависящие от Т-клеток ("зависящие от Т-клеток антигены"), обычно прикреплены к "слабому" антигену с помощью неспецифических химических реакций окисления/восстановления. Конструктивные особенности на этих иммуногенных белках, активирующие Т-клетки, привлекают хелперные Т-клетки к В-клеткам, которые распознают прикрепленный слабый антиген, что обеспечивает сильный, длительный иммунный ответ на слабоиммуногенную в других отношениях молекулу.

Современные способы и структурные элементы, применяемые для получения белковых конъюгированных вакцин, препятствуют более широкому применению конъюгированных вакцин для лечения и предотвращения заболеваний. Во-первых, относительно небольшое количество сильных белковых антигенов являются химически устойчивыми, нетоксичными и достаточно масштабируемыми для применения в качестве носителей в конъюгированных вакцинах. Во-вторых, химические реакции окисления/восстановления, обычно применяемые для получения конъюгированной вакцины, затрудняют сохранение эпитопов на носителе и антигене, необходимых для максимальной иммуногенности. В-третьих, относительно низкая эффективность этих реакций окисления/восстановления усложняет контроль качества и очистку, в частности, в промышленном масштабе.

Получение рекомбинантного белка позволяет оптимизировать антигенность и нетоксичность белков-носителей, но существующие белки-носители трудно получать в рекомбинантных клетках, и полностью модифицированные белки трудно получать с высокими выходами. Реакции конъюгации Гентлера позволяют свести к минимуму денатурацию/обструкцию эпитопов носителя и антигена, но более низкая эффективность этих реакций приводит к меньшей нагрузке антигена на белок-носитель и более сложным схемам очистки. Важно отметить, что относительно более низкое количество антигена по отношению к носителю приводит к более высокой вероятности иммунных "помех" в результате гуморального ответа на сам белок-носитель или к установленному явлению индуцированного носителем подавления эпитопа.

Соответственно, было установлено, что существует потребность в стратегиях и реагентах, которые позволяют комбинировать эти технологии для получения конъюгированных вакцин с более высокой иммуногенностью и более легким изготовлением. Соответственно, в настоящем документе описаны, помимо прочего, (1) полипептиды, включая улучшенные белки-носители, содержащие неприродные аминокислоты; (2) антигены, которые подходят для конъюгирования с полипептидами, включая улучшенные белки-носители, содержащие неприродные аминокислоты; (3) конъюгаты полипептид-антиген по п. (1) и п. (2), включая антигены, конъюгированные с улучшенными белками-носителями, содержащими неприродные аминокислоты; (4) вакцинные композиции, содержащие указанное выше; и (5) способы получения и применения указанного выше.

1. Определения.

Термин "подавляющий кодон" относится к нуклеотидному триплету, который введен в полинуклеотид в заранее определенном положении и распознается специфической тРНК, которая может распо-

знавать стоп-кодон (например, стоп-кодон амбер, охра или опал) и обеспечивает трансляцию с прочтением кодона для получения белка, подавляя тем самым стоп-кодон.

"Неприродная аминокислота" (нпАК) относится к аминокислоте, которая не является ни одной из 20 распространенных аминокислот, ни пирролизином, ни селеноцистеином; другие термины, которые используются как синонимы термина "неприродная аминокислота", включают "не кодируемая в природе аминокислота", "ненатуральная аминокислота", "не встречающаяся в природе аминокислота" и различные их варианты, разделенные дефисом или не разделенные. Неприродные аминокислоты с биоортгональными химически реакционноспособными боковыми цепями можно применять в качестве химической "рукоятки" для конъюгации различных полезных грузов с дискретными сайтами в белке.

Термин "идентичность последовательности" или "процент идентичности", применительно к двум или более последовательностям нуклеиновых кислот или полипептидов, относится к двум или более последовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения, согласно результатам измерения с использованием алгоритма сравнения последовательностей (например, BLASTP для аминокислотных последовательностей). Для целей настоящего документа процент идентичности определяется по всей длине последовательности, такой как эталонная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 1. Способ вычисления идентичности последовательности, представленный в настоящем документе, представляет собой программу BLASTP, имеющую значения по умолчанию, установленные как длина слова (W) 3, ожидание (E) 10 и оценочная матрица BLOSUM62 (см., например, Henikoff & Henikoff, 1989, Proc Natl Acad Sci USA 89:10915). Например, инструмент для выравнивания BLAST доступен на веб-сайте blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi или в другом месте.

Термин "антиген" относится к любой молекуле или линейному молекулярному фрагменту, который может распознаваться очень вариабельными антигенными рецепторами (В-клеточные рецепторы, Т-клеточные рецепторы или оба типа рецепторов) адаптивной иммунной системы. Неограничивающие примеры антигенов включают полисахариды или гликаны (например, бактериальные капсульные полисахариды), полинуклеотиды, полиаминокислоты, липиды и небольшие молекулы (например, гаптены, лекарственные препараты, вызывающие лекарственную зависимость).

Термин "эпитоп, активирующий Т-клетки" относится к структурной единице молекулярной структуры, которая способна индуцировать Т-клеточный иммунитет. Функция белков-носителей, которые содержат эпитопы, активирующие Т-клетки, хорошо известна и документально подтверждена для конъюгатов. Безотносительно к какой-либо теории, эпитоп, активирующий Т-клетки, в белке-носителе обеспечивает процессинг ковалентно прикрепленного антигена антигенпрезентирующими клетками и презентирование CD4⁺ve Т-клеткам для индукции иммунологической памяти против антигена.

Термин "В-клеточный эпитоп" относится обычно к тем признакам макромолекулярной структуры, которые способны индуцировать В-клеточный ответ. В отличие от Т-клеточного эпитопа В-клеточный эпитоп не обязательно должен содержать пептид, поскольку для активации В-клеток не требуется процессинг антигенпрезентирующими клетками и загрузка на связывающую пептид щель ГКГС.

В настоящем документе термин "белок-носитель" относится к нетоксичному или детоксифицированному полипептиду, содержащему эпитоп, активирующий Т-клетки, который может быть прикреплен к антигену (например, полисахариду) для усиления у субъекта гуморального ответа на конъюгированный антиген. Термин включает любой из бактериальных белков, применяемых в качестве носителей эпитопа в вакцинах, одобренных Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения белок-носитель представляет собой токсин *Corynebacterium diphtheriae*, тетаноспазмин *Clostridium tetani*, белок D *Haemophilus influenzae* (PD, HiD), комплекс белков наружной мембраны менингококка серогруппы В (OMP), CRM197 или специфический поверхностный белок оокинета малярийного плазмодия Pfs25. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения белок-носитель представляет собой ВВ, происходящий из белка G штамма *Streptococcus* G148. "Нативный белок-носитель" содержит только природные аминокислоты. "Улучшенный белок-носитель" содержит по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, заменяющую природную аминокислоту в белке-носителе.

В настоящем документе термин "иммуногенный полипептид" относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки, причем Т-клеточный эпитоп происходит из белка, способного индуцировать иммунологическую память у животных.

Термины "еCRM" или "улучшенный CRM", используемые взаимозаменяемо в настоящем документе, относятся к модифицированной версии варианта кодона G52E дифтерийного токсина, причем по меньшей мере один из остатков природных аминокислот заменен неприродной аминокислотой и полипептид сохраняет по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки.

В настоящем документе термины "модифицированный", "замененный", "улучшенный" и "замещенный" считаются синонимами при применении для описания остатков полипептида, и во всех случаях относятся к замене природной аминокислоты неприродной аминокислотой в полипептидной цепи.

В настоящей заявке термин "Т-независимый антиген" относится к антигену, который индуцирует признаки иммунитета, опосредуемого В-клетками, или который не индуцирует процессы, связанные с

иммунитетом, опосредуемым хелперными Т-клетками, такие как переключение изотипа или иммунологическая память.

В настоящем документе термин "полисахарид" используется в его обычном смысле, включая, но не ограничиваясь ими, сахараиды, содержащие множество повторяющихся звеньев, включая, но не ограничиваясь ими, полисахариды, имеющие 50 или более повторяющихся звеньев, и олигосахариды, имеющие 50 или менее повторяющихся звеньев. Как правило, полисахариды имеют от приблизительно 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 повторяющихся звеньев до приблизительно 2000 или более повторяющихся звеньев и необязательно от приблизительно 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 повторяющихся звеньев до приблизительно 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800 или 1900 повторяющихся звеньев. Олигосахариды, как правило, имеют от приблизительно 6, 7, 8, 9 или 10 повторяющихся звеньев до приблизительно 15, 20, 25, 30 или от 35 до приблизительно 40 или 45 повторяющихся звеньев.

В настоящем документе термин "гликан" относится к любому линейному или разветвленному полимеру, состоящему из моносахаридных (например, глюкозных) остатков, связанных друг с другом гликозидными связями. Примеры гликанов включают гликоген, крахмал, гиалуроновую кислоту и целлюлозу. Другие примеры "гликанов" включают бактериальные капсульные полисахариды.

В настоящем документе термин "молекулярная масса" полисахарида или конъюгата белок-носитель-полисахарид относится к молекулярной массе, рассчитанной с помощью гель-проникающей хроматографии (SEC) в комбинации с многоугловым рассеянием лазерного излучения (MALS).

В настоящем документе термин "низший алкил", и если не указано иное, относится к насыщенному линейному или разветвленному углеводороду, содержащему от одного до шести атомов углерода, т.е. C₁-C₆-алкилу. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения низшая алкильная группа представляет собой первичный, вторичный или третичный углеводород. Термин включает как замещенные, так и незамещенные фрагменты; см. также US-2014/0066598. Термин "низший алкилен" относится к алкиленовому радикалу низшего алкила.

Соединения согласно различным вариантам реализации, раскрытым в настоящем документе, или их фармацевтически приемлемые соли, которые содержат один или более асимметричных центров и дают энантиомеры, диастереомеры и другие стереоизомерные формы, которые определены, касательно абсолютной стереохимии, как (R) или (S) либо как (D) или (L) для аминокислот. Предполагается, что настоящее изобретение охватывает все такие изомеры, а также их рацемические и оптически чистые формы. нпАК, применяемые в настоящем документе, обычно представляют собой α-аминокислоты с хиральным центром у альфа-углерода, и они предпочтительно являются (L) изомерами.

Протокол номенклатуры химических веществ и структурные схемы, применяемые в настоящем документе, представляют собой модифицированную форму системы номенклатуры IUPAC с использованием программного обеспечения ACD/Name, версия 9.07, и/или программы присвоения имен ChemDraw Ultra, версия 11.0.1 (CambridgeSoft). За исключением случаев, описанных ниже, в настоящем документе указаны все химические связи на диаграммах химических структур, за исключением всех химических связей на некоторых атомах углерода, которые, как предполагают, связаны с достаточным количеством атомов водорода для заполнения валентности.

2. Общие способы.

Если не указано иное, значение всех технических и научных терминов, используемых в настоящем документе, соответствует общепринятому. В частности, практические специалисты могут найти определения и термины в Green & Sambrook (eds.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4 изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012), и Ausubel, F.M., et al, *Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 99)*, John Wiley & Sons, New York (2012), и Plotkin, S.A., Orenstein, W.A., & Offit, P.A., *Vaccines*, 6 изд., Elsevier, London (2013), которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Стандартные способы также описаны в Bindereif, Schon, & Westhof (2005) *Handbook of RNA Biochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, где описаны подробные способы манипуляции и анализа РНК и который включен в настоящий документ посредством ссылки. Примеры молекулярных методик, подходящих для получения рекомбинантных нуклеиновых кислот, и инструкции для многих процедур клонирования можно найти в Green & Sambrook (Id); Ausubel, F. M., et al., (Id.); Berger & Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology (Volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. 1987)*; и *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, San Diego, Calif. 1990)*, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Примеры биоорганических методик, подходящих для активации и дериватизации биомолекул с помощью химических "ручек", и инструкции по разработке таких синтезов можно найти в Hermanson, G.T, *Bioconjugate Techniques*, 2 изд., Elsevier, London (2008). Практикующие специалисты могут найти примеры методик и компонентов, необходимых для парентерального введения биомолекул, описанных в настоящем документе, в Remington, *Essentials of Pharmaceutics*, Pharmaceutical Press, London (2012). Способы очистки белка, хроматографии, электрофореза, центрифугирования и кристаллизации описаны в Coligan et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York. Способы бесклеточного синтеза описаны в Spirin & Swartz (2008) *Cell-free Protein Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany. Способы включения неприрод-

ных аминокислот в белки с применением бесклеточного синтеза описаны в Shimizu et al. (2006) FEBS Journal, 273, 4133-4140 и также в Chong (2014) Curr Protoc Mol Biol. 108:16.30.1-11.

Способы амплификации ПЦР описаны, например, в Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press Inc. San Diego, Calif., 1990 и Domingues (ed.) PCR: Methods and Protocols ISBN 1493970593 (2017). Реакция амплификации, как правило, включает ДНК, которая должна быть амплифицирована, термостабильную ДНК-полимеразу, два олигонуклеотидных праймера, дезоксинуклеотидтрифосфаты (дНТФ), реакционный буфер и магний. Как правило, желательное количество тепловых циклов составляет от 1 до 25. Способы конструирования праймеров и оптимизации условий ПЦР можно найти в учебниках по молекулярной биологии, таких как Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, 5 изд., Wiley, 2002 и Innis et al., PCR Protocols, Academic Press, 1990. Компьютерные программы полезны при разработке праймеров с требуемой специфичностью и оптимальными свойствами амплификации (например, Oligo, версия 5.0 (National Biosciences)). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения праймеры для ПЦР дополнительно содержат сайты распознавания рестриционных эндонуклеаз для облегчения вставки амплифицированного фрагмента ДНК в специфические сайты рестриционных ферментов в векторе. Если сайты рестрикции должны быть добавлены к 5'-концу праймеров для ПЦР, предпочтительно включать несколько (например, два или три) дополнительных 5'-оснований, чтобы обеспечить более эффективное расщепление ферментом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения праймеры для ПЦР также содержат сайт промотора РНК-полимеразы, такой как T7 или SP6, чтобы обеспечить последующую транскрипцию в условиях *in vitro*. Способы транскрипции в условиях *in vitro* можно найти в таких источниках, как Van Gelder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1663-1667, 1990; Eberwine et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:3010-3014, 1992.

Молекулярную массу полисахарида или конъюгата белок-носитель-полисахарид измеряют с помощью гель-проникающей хроматографии (SEC) в комбинации с многоугловым рассеянием лазерного излучения (MALS). Установка SEC MALS-UV-RI состоит из Agilent HPLC 1100 (включая дегазатор, насос для нагнетания четырехкомпонентных смесей, автоматический пробоотборник с регулируемой температурой, отсек колонки с регулируемой температурой и детектор с диодной матрицей UV-VIS) в комбинации с детектором многоугольного рассеяния лазерного излучения DAWN-HELEOS и дифференциальным рефракционным интерферометром Optilab T-rEX (Wyatt Technology, Санта-Барбара, Калифорния, США) для детектирования элюируемых частиц. С этой системой совместимы следующие серии колонок: TSKgel Guard PWXL, внутренний диаметр 6,0 мм × длина 4,0 см, частицы 12 мкм; TSKgel 6000 PWXL, внутренний диаметр 7,8 мм × длина 30 см, частицы 13 мкм; и TSKgel 3000 PWXL, внутренний диаметр 7,8 мм × длина 30 см, частицы 7 мкм. Температура в отсеке колонок установлена на 25°C, и температура в отсеке для образцов установлена на 4°C. Подвижная фаза, состоящая из 1 × ФСБ, профильтрованного через фильтр с размером пор 0,2 мкм, и 5% об./об. ацетонитрила, применяется при скорости потока 0,5 мл/мин. Образцы впрыскивают в диапазоне концентраций 0,2-1,5 мг/мл полисахарида, и впрыскиваемый объем корректируют так, чтобы получить общую впрыснутую массу 30-40 мкг. Программное обеспечение Agilent Open Lab используется для контроля ВЭЖХ, и программное обеспечение Wyatt Astra 7 используется для сбора и анализа данных. Методика позволяет выявить распределение абсолютных молекулярных масс для конъюгатов в образце, и результаты для популяции выражают как среднее значение.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенные капсульные полисахариды *S. pneumoniae* получают непосредственно из бактерий с применением процедуры выделения, известной обычному специалисту в данной области техники (см, например, способы, описанные в публикациях заявок на патенты США 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, а также 2008/0102498 и WO 2008/118752). Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения выделенные капсульные полисахариды *S. pneumoniae* получают из коммерческого источника (например, ATCC).

3. Полипептиды.

В настоящем документе описаны полипептиды, содержащие по меньшей мере один остаток нпАК. Подходящие полипептиды включают любой биологически активный полипептид. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид представляет собой иммуногенный полипептид. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения остаток нпАК заменяет нативные остатки указанного полипептида. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения остаток нпАК добавлен до, добавлен после или вставлен в пределах последовательности указанного полипептида. Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения полипептид содержит по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 остатков нпАК. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 остатков нпАК. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит 2-9 остатков нпАК и предпочтительно 4-6 остатков нпАК. Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения полипептид содержит 2 или более остатков нпАК, которые отличаются химически.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен иммуногенный полипептид, содержащий остаток нпАК. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 остатков нпАК. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере два остатка неприродных аминокислот содержат по меньшей мере две разные неприродные аминокислоты. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере две разные неприродные аминокислоты выбраны из группы, состоящей из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (рАФ), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (рАМФ), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты или 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты и любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит эпитоп, активирующий Т-клетки, белка-носителя. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид представляет собой белок-носитель. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нпАК не находится в эпитопе, активирующем Т-клетки, белка-носителя. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нпАК заменяет остаток лизина. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид конъюгирован с антигеном. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген конъюгирован с нпАК. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген содержит независимый от Т-клеток антиген, выбранный из группы, состоящей из гаптена, бактериального капсульного полисахарида, бактериального липополисахарида или гликана опухолевого происхождения. Согласно другому варианту реализации антиген содержит бактериальный некапсульный полисахарид, такой как экзополисахарид, например экзополисахарид *S.aureus*.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен белок-носитель, содержащий остаток нпАК. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения белок-носитель содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 остатков нпАК. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения неприродная аминокислота выбрана из группы, состоящей из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (рАФ), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (рАМФ), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты или 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты и любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нпАК заменяет остаток лизина. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения остаток нпАК находится в положении, которое не находится в эпитопе, активирующем Т-клетки, белка-носителя. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения замена выбрана из группы, состоящей из K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K265, K386, K523 и K527, а также любой их комбинации из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения замена содержит комбинацию K25, K213, K245, K265, K386 и K523 из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения белок-носитель содержит антиген. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген содержит независимый от Т-клеток антиген, выбранный из группы, состоящей из гаптена, бактериального капсульного полисахарида, бактериального липополисахарида или гликана опухолевого происхождения. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой полисахарид. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид представляет собой капсульный полисахарид серотипа *Streptococcus pneumoniae*, выбранного из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 9N, 10А, 11А, 12F, 13, 14, 15В, 16, 17F, 18С, 19А, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F, а также любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид способен вызывать иммунный ответ, зависящий от Т-клеток.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен белок, содержащий антиген, конъюгированный с остатком аминокислоты белка-носителя, причем ни один антиген не конъюгирован с остатком природной аминокислоты белка-носителя. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения ни один антиген не конъюгирован с остатком лизина белка-носителя. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминокислота не находится в эпитопе, активирующем Т-клетки, белка-носителя. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген содержит независимый от Т-клеток антиген, выбранный из группы, состоящей из гаптена, бактериального капсульного полисахарида, бактериального липополисахарида или гликана опухолевого происхождения. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой полисахарид. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид представляет собой капсульный полисахарид из серотипа *Streptococcus pneumoniae*, выбранного из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 9N, 10А, 11А, 12F, 13, 14, 15В, 16, 17F, 18С, 19А, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F, а также любой их комбинации.

В оптимальном случае белок-носитель должен иметь растворимость по меньшей мере 50 мг/л (например, по меньшей мере 100 мг/л, по меньшей мере 150 мг/л, по меньшей мере 200 мг/л или по меньшей мере 250 мг/л) при экспрессии в системе бесклеточного синтеза белка.

В случае если носитель содержит более одного остатка нпАК, предпочтительно включать только один вид нпАК (например, единственной нпАК в носителе является рАМФ). Это позволяет использовать одну и ту же химическую реакцию конъюгации одновременно на каждой нпАК. Если желательно прикрепить два разных антигена к одной молекуле носителя, это может быть достигнуто путем применения разных видов нпАК в одном носителе и конъюгирования каждого антигена с разной нпАК, но предпочтительным является конъюгирование с одним видом нпАК в носителе. Более того, если композиция содержит несколько различных конъюгатов (например, различные серотипы пневмококка), каждый конъюгат предпочтительно содержит один идентичный вид нпАК. Кроме того, если композиция содержит несколько разных конъюгатов (например, различные серотипы пневмококка), каждый конъюгат предпочтительно содержит один и тот же белок-носитель.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий полипептид, описанный в настоящем документе. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид, описанный в настоящем документе. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии.

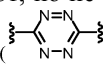
4. Неприродные аминокислоты.

Остаток нпАК необязательно содержит любую из неприродных аминокислот, описанных в настоящей заявке, или другие, которые были идентифицированы как совместимые с клеточным или бесклеточным синтезом белка (см., например, Schultz et al. *Annu Rev Biochem.* 2010; 79:413-44, в частности, pp. 418-420; и Chin et al. *Annu Rev Biochem.* 2014;83:5.1-5.30, которые включены в настоящий документ посредством ссылки).

Примеры неприродных аминокислот, которые можно применять в способах вариантов реализации, включают неприродный аналог аминокислоты тирозин; неприродный аналог глутаминовой аминокислоты; неприродный аналог аминокислоты фенилаланин; неприродный аналог аминокислоты серин; неприродный аналог аминокислоты треонин; алкил, арил, ацил, азидо, циано, галоген, гидразин, гидразид, гидроксил, алкенил, алкинил, простой эфир, тиол, сульфонил, селено, сложный эфир, тиокислоту, борат, боронат, фосфо, фосфоно, фосфин, гетероцикло, енон, имин, альдегид, гидроксилламин, кето или аминокислоту или любую их комбинацию; аминокислоту с фотоактивируемым поперечно сшивающим агентом; спин-меченую аминокислоту; флуоресцентную аминокислоту; аминокислоту с новой функциональной группой; аминокислоту, которая ковалентно или нековалентно взаимодействует с другой молекулой; связывающую металл аминокислоту; содержащую металл аминокислоту; радиоактивную аминокислоту; фотозапертую и/или фотоизомеризуемую аминокислоту; аминокислоту, содержащую биотин или аналог биотина; гликозилированную или модифицированную углеводом аминокислоту; кетосодержащую аминокислоту; аминокислоты, содержащие полиэтиленгликоль или простой полиэфир; аминокислоту, замещенную атомом тяжелого элемента; химически расщепляемую или фоторасщепляемую аминокислоту; аминокислоту с удлиненной боковой цепью; аминокислоту, содержащую токсичную группу; замещенную сахаром аминокислоту, например, замещенный сахаром серин или тому подобное; соединенную за счет углерода сахаросодержащую аминокислоту; активную в окислительно-восстановительных реакциях аминокислоту; α -гидроксисодержащую кислоту; аминокислоту, содержащую аминокислоту; α , α -дизамещенную аминокислоту; β -аминокислоту; циклическую аминокислоту, отличную от пролина, и т.д.

Особенно предпочтительными нпАК для применения с настоящим изобретением являются те, которые могут быть включены во время трансляции (в клеточную или бесклеточную систему) и которые обеспечивают функциональную группу, которая не встречается ни в одной из 20 природных аминокислот. Известны различные методики включения таких аминокислот в полипептиды, например, см. Young & Schultz (2010) *J Biol Chem* 285:11039-44, Maza et al. (2015) *Bioconjugate Chem.* 26:1884-9 и Zimmerman et al. (2014) *Bioconjugate Chem.* 25:351-61.

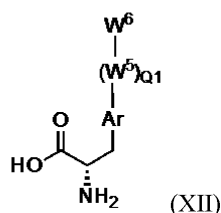
В частности, остаток нпАК необязательно содержит химическую группу, подходящую для реакции "клик-химии" с соответствующей группой на отдельной молекуле антигена или гаптена. Химические группы, подходящие для "клик-химии" включают, но не ограничиваются ими, азидную (N₃), алкиновую

(C=C), алкеновую (C=C) и 1,2,4,5-тетразиновую () группы.

Конъюгат содержит полипептид и антиген, причем указанный полипептид представляет собой белок-носитель, содержащий по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки, и по меньшей мере одну нпАК, предпочтительно по меньшей мере две нпАК, при этом указанный антиген конъюгирован с по меньшей мере одной нпАК. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна нпАК представляет собой 2,3-дизамещенную пропановую кислоту, содержащую аминокислоту-заместитель в положении 2 и азидосодержащий заместитель, 1,2,4,5-тетразинилсодержащий заместитель или этинилсодержащий заместитель в положении 3.

Согласно другому связанному варианту реализации настоящего изобретения конъюгат содержит полипептид и антиген, причем указанный полипептид представляет собой белок-носитель, содержащий

по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки, и по меньшей мере один остаток нпАК, при этом указанный антиген конъюгирован с нпАК и при этом также остаток нпАК соответствует аминокислоте, имеющей структуру формулы XII



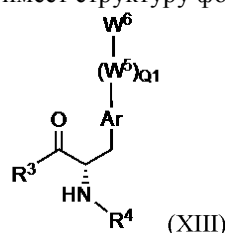
где Ar содержит 5-членное или 6-членное ароматическое кольцо, необязательно содержащее по меньшей мере один гетероатом;

W^5 выбран из C_1 - C_{10} - алкилена, -NH-, -O- и -S-;

Q_1 равен нулю или 1 и

W^6 выбран из азидо, 1,2,4,5-тетразинила, необязательно C-замещенного низшей алкильной группой, и этинила,

так что остаток нпАК в полипептиде имеет структуру формулы XIII

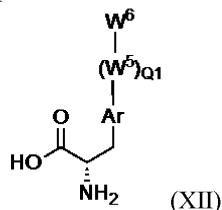


где R^3 представляет собой OH или остаток аминокислоты белка-носителя, и R^4 представляет собой H или остаток аминокислоты белка-носителя.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен полипептид, содержащий по меньшей мере одну нпАК, которая заменяет природную аминокислоту в нативном полипептиде в соответствии с SEQ ID NO: 1, причем по меньшей мере одна нпАК заменяет K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523 или K527 из SEQ ID NO: 1, при этом нпАК содержит соединяющий фрагмент. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нпАК выбрана из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты и 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты или любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения заменен K265 из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения заменен K386 из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения заменены K265 и K386 из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 нпАК. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нпАК выбрана из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты и 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты или любой их комбинации.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нпАК в полипептиде представляет собой 2,3-дизамещенную пропановую кислоту, содержащую amino-заместитель в положении 2 и азидо-содержащий заместитель, 1,2,4,5-тетразинилсодержащий заместитель или этинилсодержащий заместитель в положении 3. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения заместитель в положении 3 представляет собой азидосодержащий заместитель, и в более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения азидосодержащий заместитель содержит концевую азидогруппу, связанную с атомом углерода в положении 3 за счет соединяющей группы. Например, соединяющая группа может содержать ариленовый фрагмент, который необязательно замещен и необязательно содержит гетероатом. Например, соединяющая (линкерная) группа может содержать 5- или 6-членный ариленовый фрагмент, содержащий от 0 до 4 гетероатомов и от 0 до 4 неводородных кольцевых заместителей.

В более предпочтительном варианте реализации нпАК имеет структуру формулы XII



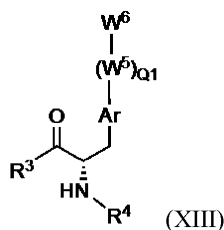
где Ar содержит 5-членное или 6-членное ароматическое кольцо, необязательно содержащее по меньшей мере один гетероатом;

W⁵ выбран из C₁-C₁₀- алкилена, -NH-, -O- и -S-;

Q1 равен нулю или 1 и

W⁶ выбран из азидо, 1,2,4,5-тетразинила, необязательно C-замещенного низшей алкильной группой, и этинила.

Следует понимать, что в этом случае соответствующий остаток нпАК в полипептиде имеет структуру формулы XIII

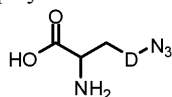


где R³ представляет собой OH или остаток аминокислоты белка-носителя, и R⁴ представляет собой H или остаток аминокислоты белка-носителя.

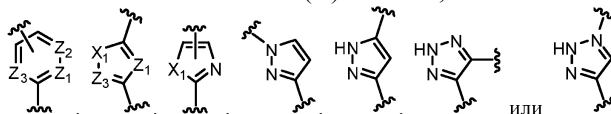
Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Ar не содержит какие-либо гетероатомы, причем в этом случае предпочтительный линкер представляет собой незамещенную фениленовую группу (т.е. Ar представляет собой -C₆H₄-). Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения Ar содержит гетероатом азота и по меньшей мере один дополнительный гетероатом, выбранный из N, O и S. Примерные азотсодержащие гетероциклы описаны ниже, и Ar может представлять собой, например, пиридин или пиридазин. Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения Q1 равен 1, W представляет собой низший алкилен, и W⁶ представляет собой азидо.

Азидосодержащие аминокислоты.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения остаток нпАК содержит азидосодержащую нпАК. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения остаток нпАК содержит азидосодержащую нпАК формулы I



где D представляет собой -Ar-W3- или -W1-Y1-C(O)-Y2-W2-;



Ar представляет собой

каждый из W1, W2 и W3 независимо представляет собой одинарную химическую связь или низший алкилен;

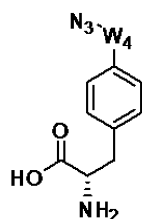
каждый X1 независимо представляет собой -NH-, -O- или -S-;

каждый Y1 независимо представляет собой одинарную химическую связь, -NH- или -O-;

каждый Y2 независимо представляет собой одинарную химическую связь, -NH-, -O- или N-соединенный или C-соединенный пирролидинилен и

один из Z₁, Z₂ и Z₃ представляет собой -N- и другие из Z₁, Z₂ и Z₃ независимо представляют собой -CH-

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения остаток нпАК содержит азидосодержащую аминокислоту формулы II



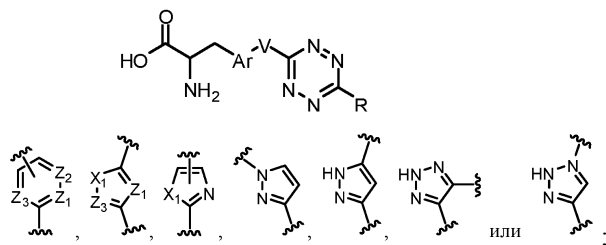
где W4 представляет собой C₁-C₁₀-алкилен.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения остаток нпАК содержит азидосодержащую аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты или 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты и любой их комбинации. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения остаток нпАК содержит 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановую кислоту (pAMF). pAMF обеспечивает очень благоприятную кинетику реакции для получения конъюгатов (например, намного более быструю, чем при применении pAF в реакции с алкинсодержащим углеводным антигеном в методе СПААС).

Получение азидосодержащих аминокислот в соответствии с формулами I и II может быть найдено, например, в Stafford et al. US2014-0066598A1, в частности абзацы [0331]-[0333], которые включены посредством ссылки. Способ включает замену хлоридом гидроксильных групп на производных соответствующих ариламинокислот с применением тионилхлорида с последующим нуклеофильным замещением хлорида азидом. Подходящие аминокислоты, содержащие арильную боковую цепь, также могут быть приобретены коммерчески.

1,2,4,5-Тетразинилсодержащие аминокислоты.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения неприродный остаток аминокислоты содержит нпАК, содержащую 1,2,4,5-тетразин. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения неприродная аминокислота содержит нпАК, содержащую 1,2,4,5-тетразин, формулы III



где Ar представляет собой

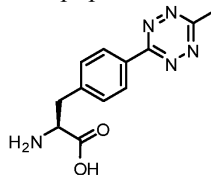
V представляет собой простую химическую связь, низший алкилен или -W1-W2-; один из W1 и W2 отсутствует или представляет собой низший алкилен, и другой представляет собой -NH-, -O- или -S-;

каждый из Z₁, Z₂ и Z₃ представляет собой -CH- или -N-, и каждый из других Z₁, Z₂ и Z₃ независимо представляет собой -CH-; и X₁ независимо представляет собой -NH-, -O- или -S-;

R представляет собой низший алкил;



и необязательно если Ar представляет собой  и V представляет собой -NH-, то один из Z₁, Z₂ и Z₃ представляет собой -N-, при условии, что неприродная аминокислота не является:



Получение 1,2,4,5-тетразинсодержащих аминокислот в соответствии с формулой III можно найти, например, в Yang et al. US2016-0251336A1, в частности, абзацы [0341]-[0377], который включен посредством ссылки. Способ включает реакцию Негизи для связывания amino/карбоксил-защищенного производного (R)-2-амино-3-йодпропановой кислоты с аминопиридилбромидом для введения Ar с последующей реакцией с метилтио-производным 1,2,4,5-тетразина для введения тетразинового фрагмента в аминокислоту.

Алкинсодержащие аминокислоты.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения остаток нпАК содержит алкинсодержащую нпАК. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения это пропаргильная группа. Различные пропаргилсодержащие аминокислоты, включая их синтез, можно найти в Beatty et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 7364-7; Beatty et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2005(127): 14150-1; Nguyen et al. *J Am Chem Soc.* 2009(131):8720-1. Такие пропаргилсодержащие аминокислоты пригодны для включения в качестве нпАК в белки с применением систем на основе клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения остаток нпАК содержит пропаргилсодержащую нпАК, выбранную из группы, состоящей из гомопротаргилглицина, этинилфенилаланина и N6-[(2-пропинилокси)карбонил]-L-лизина.

5. Модифицированные белки-носители.

Согласно одному аспекту полипептид, содержащий по меньшей мере один остаток нпАК, представляет собой модифицированный вариант нативного белка-носителя (например, eCRM) или полипептид, содержащий один или множество эпитопов, активирующих Т-клетки, нативного белка-носителя. Белки-носители, пригодные для такой модификации, включают, но не ограничиваются ими, белки, применяемые в конъюгированных вакцинах, такие как токсин *Corynebacterium diphtheriae*, тетаноспазмин *Clostridium tetani*, белок D *Haemophilus influenzae* (PD, HiD), комплекс белков наружной мембраны менингококка серогруппы В (ОМРС) или CRM197.

Аминокислотные или нуклеиновые последовательности многих нативных белков-носителей общедоступны. Однако, как отмечено, такие немодифицированные (или нативные) белки-носители имеют ограничения, включая недискриминационное конъюгирование антигена с любой аминокислотой, экспонируемой на поверхности. В результате этого активирующие Т-клетки эпитопы часто являются сайтами, в которых происходит конъюгация антигена. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения иммуногенный полипептид представляет собой белок-носитель, модифицированный за счет включения по меньшей мере одного остатка нпАК для применения в качестве сайта конъюгации. Как обсуждалось выше, нпАК может заменять нативный остаток или может быть добавлена к полипептиду за счет добавления перед, добавления после или вставки в пределах последовательности полипептида. Применение неприродных аминокислот, как описано в настоящем документе, позволяет селективно размещать неприродные аминокислоты для конъюгации, в результате этого можно избежать вовлечения эпитопов, активирующих Т-клетки, улучшенного белка-носителя при конъюгации антигена.

В табл. 1 показаны аминокислотные и нуклеиновые последовательности (SEQ ID NO: 1 и 2) примерного нативного белка-носителя: CRM197. Специалисты в данной области техники распознают добавление N-концевого метионина к аминокислотной последовательности обычного CRM197, полученного с помощью ферментации *S. diphtheriae*, и как следствие добавление 1 к обычной нумерации положений остатков аминокислот. Метионин присутствует из-за включения стартового кодона в способе бесклеточного синтеза белка, который применяли для получения этих носителей согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым аспектам последовательность улучшенного белка-носителя, содержащего остаток нпАК, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична последовательности гомологичного нативного или нетоксичного белка-носителя, применяемого в конъюгированной вакцине.

Белки-носители, последовательности которых идентичны SEQ ID NO: 1 (CRM197), включают другие мутантные белки дифтерийного токсина, такие как нетоксичный двойной мутант K51E/E148K, который также применяется в качестве белка-носителя в конъюгатах (Pecetta et al. 2016 *Vaccine* 34:1405-11). Во всех этих вариантах SEQ ID NO: 1 отсутствует природная токсичность дифтерийного токсина дикого типа (за счет мутации G52E в CRM197, или мутаций K51E/E148K согласно Pecetta et al.).

В табл. 1 также показана аминокислотная последовательность белка D (SEQ ID NO: 8) из *H. influenzae*. Последовательность улучшенного белка-носителя, содержащего остатки нпАК, может быть по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 8. По меньшей мере один остаток Lys в SEQ ID NO: 8 может быть заменен нпАК. В SEQ ID NO: 8 содержится 36 остатков Lys, поэтому некоторые из них могут быть заменены нпАК и затем могут применяться для конъюгации.

В случае если идентичность последовательности определяется относительно дифтерийного или столбнячного токсина, ее следует определять относительно подвергнутой процессингу последовательности тяжелой цепи, например, относительно аминокислот 226-567 из P00588-1 или аминокислот 458-1315 из P04958-1 (последовательности UniProt).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения улучшенный белок-носитель, содержащий остатки нпАК, содержит неполную нативную последовательность белка-носителя и вместо этого содержит по меньшей мере один или множество эпитопов, активирующих Т-клетки, из токсина *Corynebacterium diphtheriae*, тетаноспазмина *Clostridium tetani*, белка D *Haemophilus influenzae* (PD, HiD), комплекса белков наружной мембраны менингококка серогруппы В (ОМРС), CRM197, Pfs25 или другого пригодного нативного или нетоксичного белка-носителя. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения токсичность улучшенного белка-носителя ограничивается обработкой параформальдегидом (или обработкой формальдегидом или глутаровым альдегидом) и затем нейтрализующим

агентом. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения улучшенный белок-носитель, содержащий остатки нпАК, представляет собой полипептид, содержащий множество эпитопов, активирующих Т-клетки, нативного CRM197.

Таблица 1

**Нативные аминокислотные и нуклеиновые
последовательности CRM197 и NTHi-D**

| | |
|----------------|--|
| Аминокислотная | <p align="center">>4AE1_B</p> <p>MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYDDWKEF YSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVYTPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTE PLMEQVGTBEFIRKFDGASRVVLSLPAEFGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETR KRGQDAMYEQACAGNRVRRSVGSSLSCLNLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNM SESPNKTVSEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVI DSETADNLEKTTAALSILPFGISVMGIADGAVHNTEETVAQSIALSSLMVAQAIPLVG ELVDIGFAAYNFVESIINLQVHVNSYNRPAYSPGHKTQPFLLHDGYAVSWNTVEDSII R TGFQGESGHDIKITAENTFLPIAGVLLPFI PGKLDVNSKSTHISVNGRKRIMRCRAIDG DVTFCRPFKSPVYVGVNQHANLHVAFHRSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNS KLSLFFETKS (SEQ ID NO: 1)</p> |
| Нуклеиновая | <p align="center">>KU521393.1 Клон синтетической конструкции pUC57- CRM197, ген токсина CRM197 (CRM197), полная кодирующая последовательность</p> <p>ATGGGCGCAGACGATGTTGTGACTCAAGTAAATCATTTGTTCATGGAAAACCTTC TCCTCATATACCGCACGAAACCGGGCTACGTTGATAGCATTAGAAAAGGTATCCAAAA ACCGAAATCTGGCAGCAGGGTAACTACGATGACGATTGGAAAAGATTCTACAGCACCG ACAACAAATATGATCGCGCCGGTACTCAGTCGACAACGAAATCCCGTGTCCGGGCAA GCCCGCGGTGGTAAAGTACGATATCCGGGCTGACCAAAGTCTGGCCCTGAAAGT GGATAATGCAGAAACCATCAAAAAGAACTGGGTCTGAGCCTGACGGAACCGCTGATGG AACAGGTTGGCACCGAAGAAATTTATCAACCGCTTCGGCGATGGTCCAGTCGTCTCGT CTGTCCCTGCCGTTCCGAGAAGTAGCTCTAGTGTGGAATATATTAACAATGGGAACA AGCGAAAGCCCTGTCCGTTGAACTGGAAATCAACTTTGAAACCCCGGCAACGTTGCT AGGATGCGATGATGAATACATGGCACAAGCTTGC CGGGTAAATCGCGTTCGTCCGAGC GTCCGCTCCTCACTGTCTGTATCAACCTGGACTGGGATGTTATCCGTGATAAACCAA AACGAAATCGAAAGTCTGAAAGAACATGGCCGATCAAAAACAAATGACGGAATCTC</p> |
| | <p>CGAATAAAACCGGTGTCGAAAGAAAAGCTAAACAGTATCTGGAAAGAAATTCACCAAAAC GCATGGACATCCGGAACCTGCAGAACTGAAAACCGTGACGGGTACCAACCCGGTTTT TGCCGGCGCAAATACGCAGCTGGGCTGTGAACCTGCGCAAGTGATTGACTCGGAAA CGGCCGATAAATCTGAAAAAACACCGCGCCCTGAGTATTTGCCGGGCATCGGTTCC GTATGGGTATGCGCACGCGCAGTCCATCACAACCGAAGAAATTTGGCCAGTC TATCGCACTGTGAGCCTGATGGTTGCTCAAGCGATTCCCGTGGTTGGCGAACTGGTTG ATATCGGCTTTCAGCTTACAACTTCGTGGAAAGTATATCAACCTGTTTCAGGTTGTC CACAACCTATATAATCGCCCGGCTACTCGCCGGTCAAAAACCAACCGTTCTCGCA TGACGGCTACGCGGTAGCTGGAATACGGTCAAGATCTATATCCGTACCGGCTTTC AGGGTGAATCTGGCCACGACATTAATAACACGGCTGAAAACACCCCGCTGCCGATGCA GGTGTCTGCTGCCGACGATCCCGGTAACCTGGATGTTAACAATCAAAAACCCATAT CTCGGTCAACGGTCCGAAATTCGTATGCGTGCCTGCGATCGACGGGATGTGACCT TCTGTCTCCGAAAAGCCCGTCTATGTGGCAACGGTGCCTATGCTAATCTGCAGCTG CGGTTTCATCGCTTAGTCCGAAAAATCCATAGTAACGAAATCTCATCGGATTCAT TGGTGTCTGGGCTACCAGAAAACCGTGGACCATACCAAGTGAATAGCAAACTGAGCC TGTTCTCGAAATCAATCGTAA (SEQ ID NO:2)</p> |
| Аминокислотная | <p align="center">>AAA24998.1 белок D <i>Haemophilus influenzae</i></p> <p>CSSHSSNMANTQMSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYLEQDLAM TKDGRLLVVIHDFLDGLTDVAKKFPHRHRKDRYVIDFTLKEIQSLEMTENFETKDKG QAQVYPNRFFLWKSHFRHTFEDEIEFIQGLEKSTGKKVGIYPEIKAPWFHHQNGKDIA AETLKVLYKGYDKKTDVMVYLQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLIAITDWBKQ EKDPKGYVWVNYNDWFMFKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIYVTFVVKEL AQYVNEVHPYTRKDALPEFFTFDVMQYDALLNKSATGVFTDFPDTGVFELKGIK (SEQ ID NO:8)</p> |

5а. нпАК-содержащий CRM197.

Как указано выше, в табл. 1 показана аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 1) CRM197. CRM197 ("перекрестно реагирующий материал 197"; также известный как CRM197) является нетоксичным мутантом дифтерийного токсина, который применяется во многих одобренных гликоконъюгированных вакцинах (например, см. Broker et al. (2011) *Biologicals* 39:195-204). Предпочтительные белки-носители для применения с настоящим изобретением содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 1. Например, белок-носитель может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, за исключением присутствия одной или более нпАК (которые могут быть вставлены в SEQ ID NO: 1 или могут заменять один или более остатков аминокислот в SEQ ID NO: 1, например, заменять Lys и/или Phe).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере один остаток Lys и/или по меньшей мере один остаток Phe в SEQ ID NO: 1 заменен остатком нпАК. Предпочтительно более одного остатка в SEQ ID NO: 1 заменены нпАК, и в наилучшем случае только один вид остатка в SEQ ID NO: 1 заменен нпАК, например, заменены только остатки Lys. Если в SEQ ID NO: 1 более одного остатка заменено нпАК, предпочтительно в каждом положении применяют одну и ту же нпАК, например, рАМФ в каждом заменяемом положении.

Белки-носители с 2-9 остатками нпАК в SEQ ID NO: 1 являются предпочтительными и в наилучшем случае с 4-9, 4-8 или 4-6 остатками нпАК, например, 4, 5 или 6 остатками нпАК. Это обеспечивает более значительное прикрепление антигенов к носителю, чем при применении одной нпАК, что увеличивает соотношение антиген:носитель и при этом позволяет избежать чрезмерного нарушения нативной последовательности и структуры, что может привести к нерастворимости.

Исследования CRM197 выявили Т-клеточные эпитопы в остатках P272-D291, V322-G384 и Q412-I458. Соответственно, предпочтительно избегать введения нпАК в эти области SEQ ID NO: 1. Эти области включают F274, F356, F361, F369, K420, K441, K446, K448 и K457, т.е. это остатки Phe и Lys, которые менее предпочтительны для замены нпАК в CRM197. Предпочтительными остатками Lys для замены нпАК в SEQ ID NO: 1 являются K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523 или K527. Другими подходящими остатками Lys для замены нпАК являются K11, K38, K83, K104, K105, K126, K158, K173, K222, K237, K243, K475 и K499. Предпочтительными остатками Phe для замены нпАК являются F13, F54, F124, F128, F141, F168, F251, F390, F531 или F532.

Структурные исследования CRM197 выявили две общие трехмерные области: первая область распространяется от N-конца до Asn-374; и вторая область распространяется от Ser-375 до C-конца. В наилучшем случае носитель, применяемый в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере одну нпАК в первой области и по меньшей мере одну нпАК во второй области, например, по меньшей мере 2 нпАК в каждой области или по меньшей мере 3 нпАК в каждой области. Это позволяет пространственно разделить конъюгированные антигены при прикреплении к носителю. Можно применять носитель с 3 нпАК в первой области и 3 нпАК во второй области.

Первая область содержит 27 остатков Lys, и вторая область содержит 12 остатков Lys. Соответственно, один или более (например, 3) остатков Lys в пределах N-концевой последовательности из 374 аминокислот и один или более (например, 3) остатков Lys в C-концевой последовательности из 162 аминокислот из SEQ ID NO: 1 могут быть заменены нпАК, например, рАМФ.

Предпочтительные варианты реализации нпАК-содержащих носителей на основе CRM197 имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, в которой один или более из остатков K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523 и/или K527 заменены нпАК. Одна из таких последовательностей представляет собой SEQ ID NO: 9, в которой каждый X представляет собой нпАК (предпочтительно одинаковые нпАК, такие как рАМФ)

```
MGADVVVDSKSFVMENFSSYHGTRKPGYVDSIQXGIQKPKSGTQGNVDDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDN
ENPLSGKAGGVVQVTPGLTKVLKLVDAETIKKELGSLTEPLMEQVGTTEEFIKRFGDASRVVLSLP
FAEGSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRKQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCLNLDWDVI
RDXTTKTIESLKEHGPIKKNMSESPNKTVSEKAXQYLEEFHQTALEHPSELXTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMTADGAVHNTTEEIIVAQSIALLSSLMVAQAIPLVGE
LVDIGFAAYNFVESIINLQVQVHNSYNRPAYSPGHXTQPFPHDGYAVSWNTVEDSIRTFQGESGHDIK
ITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNSKSTHISVNGRKIRMRCAIDGVDVTFRCRPKSPVYVNGVHANLHV
AFHRSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDTKVNSSLSEFFEIKS (SEQ ID NO: 9)
```

Было обнаружено, что этот белок-носитель очень хорошо экспрессируется в системе бесклеточного синтеза белка, сохраняя при этом хорошую растворимость и обеспечивая хорошие иммуногенные ответы при конъюгации с пневмококковыми капсульными полисахаридами.

Согласно настоящему изобретению также предложены композиции, содержащие несколько различных конъюгатов (например, разные серотипы пневмококка), в которых каждый конъюгат содержит белок-носитель, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 (в которой в наилучшем случае каждый остаток X представляет собой одну и ту же нпАК, предпочтительно рАМФ).

SEQ ID NO: 1 содержит N-концевой метионин (который, как правило, будет формилирован), который не присутствует в CRM197 дикого типа, но включен для инициации трансляции без необходимости в полной нативной лидерной последовательности. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения белок-носитель, применяемый в настоящем изобретении, не содержит N-концевой метионин, например, N-концевой метионин SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 может отсутствовать. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения белок-носитель на основе CRM197 не содержит природные аминокислоты (и более предпочтительно вообще не содержит аминокислоты) перед N-концом SEQ ID NO: 1 или после C-конца SEQ ID NO: 1.

Эти нпАК-содержащие белки-носители CRM197 являются особенно подходящими для конъюгирования с пневмококковыми капсульными полисахаридами. Эти конъюгаты можно комбинировать для образования поливалентных композиций, как обсуждается в другом месте данного документа.

Согласно настоящему изобретению также предложен белок для получения иммуногенного конъюгата полисахарид-белок, причем указанный белок имеет аминокислотную последовательность, которая

по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 1 (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%) и содержит по меньшей мере одну нпАК, при этом белок имеет N-концевой метионин. Согласно настоящему изобретению также предложен иммуногенный конъюгат полисахарид-белок, полученный с помощью конъюгирования полисахарида с по меньшей мере одной нпАК в белке.

Согласно настоящему изобретению также предложен белок для получения иммуногенного конъюгата полисахарид-белок, причем указанный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, за исключением того, что по меньшей мере один (например, 2-9) остаток лизина представляет собой нпАК. В наилучшем случае нпАК представляет собой азидосодержащую нпАК (например, предпочтительно рАМФ), 1,2,4,5-тетразинилсодержащую нпАК или алкенилсодержащую нпАК. Согласно настоящему изобретению также предложен конъюгат, содержащий такой белок, конъюгированный с полисахаридным антигеном за счет по меньшей мере одной из его нпАК.

Согласно настоящему изобретению также предложен иммуногенный конъюгат полисахарид-белок, причем указанный белок представляет собой CRM197, имеющий N-концевой метионин.

Содержащие нпАК носители CRM197, как правило, присутствуют в мономерной форме при применении для получения конъюгатов, а не связаны с другими субъединицами CRM197 с образованием мультимеров CRM197.

6. Способы получения белков-носителей.

Общие способы получения полипептидов.

Улучшенный белок-носитель получают любым способом, описанным для получения полипептидов. Способы, подходящие для получения полипептидов, включают, но не ограничиваются ими, твердофазный химический синтез пептидов, экспрессию рекомбинантного белка в клетках (в *E. coli* или нативном хозяине) и бесклеточную экспрессию белка и любую их комбинацию (например, лигирование экспрессируемого белка с использованием комбинации синтетических и рекомбинантных пептидных компонентов).

Согласно одному варианту реализации способа получения улучшенного белка-носителя несущий нпАК улучшенный белок-носитель получают способом, который включает "переназначение кодонов". В одной модификации этого варианта реализации применяют нпАК, которые являются близкими структурными аналогами 20 канонических аминокислот (например, гомоаллилглицин, фторированный лейцин, азидогомоаланин). нпАК загружают на соответствующую им тРНК с использованием аминоацил-тРНК-синтетазы дикого типа, и нпАК полностью заменяет одну из 20 канонических аминокислот, указанных в последовательности ДНК-матрицы. Чтобы предотвратить вмешательство нативной аминокислоты обычно требуется применение бактериального экспрессирующего штамма, который является аутокотрофным по отношению к заменяемой нативной аминокислоте. Эта стратегия является специфичной скорее в отношении аминокислоты, а не остатка, поскольку все остатки аминокислот определенного типа заменены нпАК.

Согласно другому варианту реализации способа получения улучшенного белка-носителя несущий нпАК улучшенный белок-носитель получают с помощью стратегии, которая включает "нонсенс-подавление". В этом подходе неприродная аминокислота указывается в последовательности ДНК-матрицы с помощью редкого или "нонсенс" кодона, который обычно не определяет аминокислоту в природе. Один из вариантов подхода нонсенс-подавления был впервые предложен Schultz (Noren et al. *Science*. 1989(244): 182-188.) и Chamberlin (Bain et al. *J Am Chem Soc*. 1989(111):8013-8014.) и включает применение редкого стоп-кодона TAG ("амбер" кодон; UAG в коде РНК) вместе с его тРНК и соответствующей аминоацил-тРНК-синтетазой (aaRS) для включения нпАК в полипептид сайт-специфическим способом.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения подход "нонсенс-подавления" включает выделение пары тРНК/aaRS, модификацию антикодоновой петли тРНК для распознавания ортогонального кодона (например, амбер-кодона TAG, опал-кодона TGA или другого кодона или последовательности оснований, обычно не используемой для определения аминокислот при трансляции) и модификацию aaRS для сдвига предпочтения в сторону нпАК в сравнении с аминоацил-тРНК нативных аминокислот. Согласно некоторым модификациям этого варианта реализации пара тРНК/аминоацил-тРНК-синтетаза получена из того же организма, как и механизм трансляции, применяемый для синтеза полипептидов. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения пара тРНК/аминоацил-тРНК-синтетаза получена из вида, отличного от вида, к которому относится механизм трансляции, применяемый для синтеза полипептида. Описаны способы модификации антикодоновой петли тРНК и активного сайта aaRS, а также примеры модифицированных ортогональных пар тРНК/aaRS.

Согласно другому варианту реализации подхода "нонсенс-подавления" получение улучшенного белка-носителя не включает применение модифицированной аминоацил-тРНК-синтетазы. В этом варианте реализации выделяют только ортогональную тРНК и модифицируют в антикодоновой петле для распознавания ортогонального кодона (например, амбер-кодона TAG или другого кодона или последовательности оснований, обычно не используемой для определения аминокислот при трансляции). Затем ортогональную модифицированную тРНК ацилируют в условиях *in vitro* с помощью подходящего хими-

ческого способа (например, с помощью способа Heckler et al. *Biochemistry*. 1984 Mar 27; 23(7): 1468-73, который включает применение T4 РНК-лигазы и мутантной тРНК-Phe), и добавляют в экстракт для бесклеточного синтеза белка. Поскольку в этом варианте реализации применяют химически ацилированные тРНК, он совместим только с бесклеточными способами синтеза белка.

Бесклеточный синтез белка.

В особенно подходящем способе получения белков-носителей, содержащих нпАК, применяют бесклеточный синтез белка. В данной области техники известно несколько методик бесклеточной экспрессии белков, с помощью которых могут быть включены различные нпАК (например, см. табл. 1 в Quast et al. (2015) *FEBS Letters* 589:1703-12), избегая при этом потенциальных цитотоксических эффектов нпАК. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения улучшенный белок-носитель получают с помощью синтеза белка на основе бесклеточных экстрактов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения бесклеточный экстракт содержит экстракт ретикулоцитов кролика, зародышей пшеницы или *E. coli*. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения бесклеточный экстракт дополнен аминокислотами, источниками энергии, системами регенерации энергии или катионными кофакторами и любой их комбинацией. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения экстракт содержит экзогенно дополненную мутантную тРНК или мутантную aaRS (аминоацил-тРНК-синтазу) и любую их комбинацию. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения экстракт содержит лизаты из штаммов *E. coli*, генетически кодирующих мутантную тРНК или мутантную aaRS и любую их комбинацию. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения штаммы *E. coli*, применяемые для лизатов, представляют собой ослабленные по RF-1 штаммы. Совместимые системы бесклеточного синтеза белка были описаны для вставки формул I, II и III в рекомбинантные полипептиды (например, US8715958B2, US20160257946A1 и US20160257945A1).

В одном примере US8715958B2 продемонстрирована регенерирующая бесклеточная система на основе *E. coli*, посредством которой пара тРНК^{Tyr}/тирозинсинтаза из *Methanococcus jannaschii* (Wang et al. (2001) *Science* 292(5516):498-500) применяется для введения неприродной аминокислоты п-азидо-L-фенилаланин (pAF) в рекомбинантную хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), ГМ-КСФ и TetA. С помощью этой системы пару тРНК/синтаза либо добавляют в экстракт, либо трансформируют в бактерии, применяемые для получения экстракта.

В другом примере в US20160257946A1 продемонстрировано: (а) как вышеуказанную тирозинсинтазу *Methanococcus jannaschii* адаптируют с применением мутагенеза так, что она преимущественно загружает п-азидометил-L-фенилаланин (pAMF) на тРНК, распознающую амбер-кодон, и (б) как система бесклеточного синтеза, содержащая модифицированные пары синтаза/тРНК применяется для селективного встраивания pAMF в антитела, например, трастузумаб.

В дополнительном примере в US20160257945A1 продемонстрировано: (а) как вышеуказанная тирозинсинтаза *Methanococcus jannaschii* адаптирована с применением мутагенеза так, что она преимущественно загружает (S)-2-амино-3-(5-((6-метил-1,2,4,5-тетразин-3-иламино)метил)пиридин-2-ил)пропановую кислоту (пиридилтетразиновое производное аминокислоты) на распознающую амбер-кодон тРНК, и (б) как система бесклеточного синтеза, содержащая модифицированную пару синтаза/тРНК применяется для селективного встраивания (S)-2-амино-3-(5-((6-метил-1,2,4,5-тетразин-3-иламино)метил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты в рекомбинантный GFP.

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложены способы получения полипептидов в бесклеточном экстракте, содержащем 2 или более неприродных аминокислот. В этом варианте реализации полипептиды также обладают биологической активностью, сравнимой с нативным белком. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения полипептиды имеют улучшенную или повышенную биологическую активность, сравнимую с нативным белком.

Необязательно удельная активность белка в композиции может быть определена на основании уровня активности в функциональном количественном исследовании, путем определения количества присутствующего белка в нефункциональном количественном исследовании (например, иммуном окрашивании, ИФА, количественном определении в геле, окрашенном Кумасси или серебром, и т.д.) и путем определения соотношения биологически активного белка или неагрегированного белка и общего белка. Обычно удельная активность, определенная таким способом, будет составлять по меньшей мере приблизительно 5% от активности нативного белка, обычно по меньшей мере приблизительно 10% от активности нативного белка и необязательно составляет приблизительно 20%, приблизительно 40%, приблизительно 60% или более.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способы получения полипептидов, содержащих нпАК, включают изменение концентраций нпАК-специфической тРНК, нпАК-специфической синтазы, самой нпАК или температуры трансляции и любой их комбинации. Такие условия необязательно обеспечивают меньшее количество трансляционных ошибок, улучшенную скорость включения нпАК, улучшенную активность шаперонов, необходимых для сворачивания белка при включении нпАК, сниженную активность клеточных факторов, которые препятствуют включению нпАК, или любую комбинацию вышеупомянутых механизмов. Согласно некоторым вариантам реализа-

ции способов получения улучшенного полипептида концентрация тРНК, специфичной для нпАК, увеличивается до концентрации выше приблизительно 20 мкМ, что приводит к увеличению доли растворимого или активного полипептида. В других модификациях этого варианта реализации концентрация тРНК увеличивается, в то время как концентрация нпАК поддерживается ниже приблизительно 2 мМ и концентрация нпАК-синтетазы поддерживается ниже приблизительно 5 мкМ.

Согласно некоторым вариантам реализации способов получения улучшенных полипептидов температура инкубации трансляционной смеси составляет от 20 до 30°C, приблизительно 20 или ниже 20°C. В некоторых вариантах эти модификации температуры независимо комбинируют с модификациями концентраций тРНК, специфичных для нпАК, концентраций нпАК или концентраций нпАК-синтетазы, описанных в предыдущем абзаце.

7. Варианты последовательности.

Улучшенные белки-носители согласно настоящему изобретению содержат одну или более нпАК, замененных в любом положении в полипептиде, при условии, что сохраняется иммуногенная функция одного или более Т-клеточных эпитопов полипептида. Если улучшенный белок-носитель основан на известном носителе, обычно предпочтительно заменить существующие природные аминокислоты в известном носителе некоторыми или всеми нпАК, чтобы свести к минимуму вероятность нежелательного влияния на свойства носителя. Однако следует понимать, что нпАК могут быть вставлены внутри исходной последовательности носителя или на ее конце в качестве дополнений. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна нпАК в улучшенном белке-носителе (например, eCRM) не присутствует в пределах одной или более из областей белка, которые содержат Т-клеточный эпитоп. Согласно другому варианту ни одна из нпАК в улучшенном иммуногенном полипептиде не присутствует в пределах одной или более областей белка, которые содержат Т-клеточный эпитоп.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения остаток нпАК заменяет одну или более из двадцати кодируемых в природе аминокислот, включая аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, цистеин, глутамин, глутаминовую кислоту, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин. Согласно некоторым другим вариантам реализации настоящего изобретения остаток нпАК заменяет один или более из конкретных классов остатков природных аминокислот, таких как алифатический, ароматический, кислый, основной, гидроксильный, сульфидсодержащий или амидный (содержащий амидную группу). В некоторых случаях только одна конкретная аминокислота (например, лизин) заменена нпАК в полипептиде в одном или более положениях. В других случаях две или более разных аминокислот (например, лизин, фенилаланин и т.д.) заменены нпАК в пределах полипептида в двух или более положениях. Лизин и фенилаланин являются предпочтительными для замены нпАК, поскольку (i) лизин часто применялся для конъюгации с существующими белками-носителями, поэтому нпАК-содержащий носитель может сохранять те же сайты связывания, и (ii) многие подходящие нпАК основаны на фенилаланине, поэтому носитель с нпАК может иметь минимальную структурную модификацию по сравнению с нативной последовательностью. Полипептиды, в которых нпАК заменяет только один вид аминокислоты, являются предпочтительными, например, в которых заменены только остатки Lys.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения остаток нпАК заменяет по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14 или по меньшей мере 15 остатков природных аминокислот белка-носителя. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения остаток нпАК заменяет по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14 или по меньшей мере 15 остатков природных аминокислот белка-носителя. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения остаток нпАК заменяет по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14 или по меньшей мере 15 остатков природных аминокислот из SEQ ID NO: 1.

В дополнительных аспектах нпАК заменяет один или более остатков аминокислот в белке-носителе. Конкретный остаток аминокислоты, который выбран для создания вариантов с одной или более заменами нпАК, описанных в настоящем документе, необязательно определяют путем разделения белка на субдомены и выбора для замены отдельной аминокислоты или группы аминокислотных остатков, которые не препятствуют стерически друг другу (например, так, чтобы между сайтами замены было расстояние в несколько ангстрем). Разделение CRM197 на две структурные области обсуждается ниже.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нпАК заменяет остаток заряженной аминокислоты. Соответственно, нпАК может заменять остаток аминокислоты аспарат, глутамат, лизин, аргинин или гистидин. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения

нпАК заменяет остаток отрицательно заряженной аминокислоты, например, остаток аспартата или глутамата. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нпАК заменяет остаток положительно заряженной аминокислоты, например, остаток лизина, аргинина или гистидина.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нпАК заменяет один или более остатков лизина в иммуногенном полипептиде. Например, расширенную версию SEQ ID NO: 1 получают путем замены лизина нпАК следующим образом: 1) один остаток, выбранный из группы, состоящей из K25, K34, K38 и K40; 2) один остаток, выбранный из группы, состоящей из K213 и K215; и 3) от 2 до 4 остатков, выбранных из группы, состоящей из K228, K245, K265, K386, K523 и K527. Согласно другому дополнительному варианту реализации один или более из конкретного класса замененных остатков природных аминокислотных выбраны из группы, состоящей из K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K265, K386, K523 и K527, а также любой их комбинации из SEQ ID NO: 1. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения замена нпАК в SEQ ID NO: 1 выбрана из одного или более из K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523 и K527. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения замена нпАК содержит шесть остатков, состоящих из K25, K215, K228, K265, K386 и K523 из SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения замена нпАК в SEQ ID NO: 1 содержит K265. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения замена нпАК в SEQ ID NO: 1 содержит K386. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения замены нпАК в SEQ ID NO: 1 содержат K265 и K386. Согласно дополнительному варианту реализации нпАК заменяет фенилаланин. Предпочтительные остатки фенилаланина для замены включают F13, F54, F124, F128, F141, F168, F251, F390, F531 или F532 из SEQ ID NO: 1. Как правило, предпочтительно не заменяют F531 и F532 вследствие их близости.

Связывающие эпитопы для человеческих CD4⁺ клеток на дифтерийном токсине, которые распознаются большинством исследованных субъектов, охватывают остатки 271-290, 321-340, 331-350, 351-370, 411-430 или 431-450 (см., Raju et al., Eur J Immunol. 1995 Dec; 25(12):3207-14). Следовательно, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более замен нпАК не расположены в пределах остатков 271-290, 321-340, 331-350, 351-370, 411-430 и/или 431-450 из SEQ ID NO: 1. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения одна или более замен нпАК не расположены в пределах остатков 331-350 из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения одна или более замен нпАК не расположены в пределах остатков 321-340 из SEQ ID NO: 1. Согласно другому дополнительному варианту реализации настоящего изобретения одна или более замен нпАК не расположены в пределах остатков 431-450 из SEQ ID NO: 1.

Связывающие эпитопы для человеческих CD4⁺ клеток на столбнячном токсине, которые распознаются всеми испытанными субъектами, включают остатки тяжелых цепей H176-195, IDKISDVSTIVPY-IGPALNI [SEQ ID NO:3] и H491-510, NNFTVSVFWRVPKVSASHLE [SEQ ID NO:4] (см. Diethelm-Okita et al., J Infect Dis. 1997 Feb; 175(2):382-91). Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более замен нпАК не расположены в пределах остатков 176-195 и/или 491-510 пептидного компонента тяжелой цепи белка-предшественника столбнячного токсина. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения одна или более замен нпАК не расположены в пределах остатков 176-195 пептидного компонента тяжелой цепи белка-предшественника столбнячного токсина. Согласно другому дополнительному варианту реализации настоящего изобретения одна или более замен нпАК не расположены в остатках 491-510 пептидного компонента тяжелой цепи белка-предшественника столбнячного токсина.

Связывающие эпитопы для человеческих CD4⁺ клеток на белке наружной мембраны *Neisseria meningitidis* (OMP или PorA), которые распознаются большинством испытанных субъектов, охватывают иммунодоминантные Т-клеточные эпитопы, которые в основном расположены вне переменных областей и являются консервативными среди различных штаммов менингококков (и гонококков), например, соответствующие консервативным предполагаемым трансмембранным областям OMP (Wiertz et al. J Exp Med. 1992; 176(1): 79-88). Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более замен нпАК не расположены в пределах консервативной области OMP.

Связывающие эпитопы для человеческих CD4⁺ клеток на BB, белке-носителе, происходящем из белка G штамма *Streptococcus G148*, которые распознаются большинством испытанных субъектов, охватывают аминокислоты 25-40 (VSDYYKNLINAKTVE [SEQ ID NO:5]), 63-78 (DGLSDFLKSPAQTEDT [SEQ ID NO:6]) и 74-89 (AEDTVKSIELAEAKVL [SEQ ID NO:7]) в последовательности BB (Goetsch et al., Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jan; 10(1): 125-32). Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более замен нпАК не расположены в пределах остатков 25-40, 63-78 и/или 74-89 последовательности BB.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммуногенный полипептид, содержащий по меньшей мере один остаток неприродной аминокислоты, дополнительно содержит по меньшей мере один антиген. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммуногенный полипептид, содержащий по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, представляет собой улучшенный белок-носитель и дополнительно содержит по меньшей мере один антиген. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммуногенный полипептид, содержащий по

меньшей мере одну природную аминокислоту, представляет собой улучшенный белок-носитель и дополнительно содержит по меньшей мере один антиген.

8. Т-клеточные эпитопы.

Т-клеточные эпитопы белка-носителя необязательно определяют любым из известных способов. Чтобы облегчить разработку улучшенных белков-носителей согласно настоящему изобретению, связывающие Т-клетки эпитопы в белках предсказывают с использованием алгоритмов, которые учитывают различные факторы, такие как профили амфипатичности белков, мотивы последовательностей, количественные матрицы (QM), искусственные нейронные сети (ANN), метод опорных векторов (SVM), количественные соотношения между структурой и активностью (QSAR) и моделирование молекулярной стыковки и т.д. (см. Desai et al. *Methods Mol Biol.* 2014; 1184:333-64). Например, связывающие Т-клетки эпитопы дифтерийного токсина/CRM были предсказаны с использованием алгоритма DeLisi & Berzofsky (см., Bixler et al. WO89/06974 и PNAS 82:7848, 1985). Предсказанные Т-клеточные эпитопы могут быть подтверждены экспериментально. Например, Т-клеточные эпитопы иммуногенного полипептида, представляющего интерес, могут быть экспериментально определены путем синтеза частично перекрывающихся пептидных фрагментов, соответствующих полной последовательности иммуногенного полипептида (или предсказанным областям) и проведения количественных исследований пролиферации линий клеток CD4⁺ (например, мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК)) в присутствии каждого фрагмента. Этот общий подход применяли для картирования Т-клеточных эпитопов в дифтерийном токсине (Raju et al., *Eur J Immunol.* 1995 Dec; 25(12):3207-14), столбнячном токсине (Diethelm-Okita et al., *J Infect Dis.* 1997 Feb; 175(2):382-91), белке наружной мембраны *Neisseria meningitidis* (OMP) (*J Exp Med.* 1992 Jul 1; 176(1): 79-88) и ВВ, белке-носителе, происходящем из белка G штамма *Streptococcus G148* (Goetsch et al., *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jan; 10(1): 125-32). Также можно проводить непосредственный скрининг улучшенных белков-носителей согласно настоящему изобретению для оценки пролиферации CD4⁺ клеток и/или цитокинового ответа, чтобы установить присутствие Т-клеточного эпитопа, который не был инактивирован в присутствии одной или более нпАК.

9. Способы получения конъюгатов.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ синтеза полипептида, содержащего нпАК, в смеси для бесклеточной экспрессии, поддерживаемой при температуре от приблизительно 10 до приблизительно 30°C. Согласно другому варианту реализации температура выше приблизительно 20°C. Согласно другому варианту реализации температура ниже приблизительно 20°C. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения температура составляет от приблизительно 14 до приблизительно 18°C. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей подавляющий кодон. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения смесь для бесклеточной экспрессии содержит ортогональную пару тРНК/аминоацил-тРНК-синтетаза, специфичную для нпАК. Согласно другому варианту реализации концентрация тРНК составляет по меньшей мере 20 мкМ. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения концентрация нпАК составляет менее приблизительно 2 мМ, и концентрация аминокислот-тРНК-синтетазы составляет менее приблизительно 5 мкМ. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способ включает конъюгирование полипептида с активным фрагментом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения активный фрагмент выбран из группы, состоящей из гаптена, бактериального антигена, вирусного антигена, гликана опухолевого происхождения, пептидного токсина, макролида, простого полиэфир и любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид выбран из группы, состоящей из гормона роста, фактора свертывания крови, белка плазмы, интерлейкина, внеклеточного домена Т-клеточного рецептора, внеклеточного домена фактора роста, бактериального антигена, вирусного антигена и любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения смесь для экспрессии содержит клеточный экстракт *E. coli*, зародышей пшеницы или ретикулоцитов кролика. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения смесь для экспрессии содержит по меньшей мере 30% клеточного экстракта. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 нпАК. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нпАК выбрана из группы, состоящей из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (pAF), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты и любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полученный полипептид содержит как растворимую, так и нерастворимую фракции, причем соотношение растворимой фракции и нерастворимой фракции составляет по меньшей мере 40% (мас./мас.). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полученный полипептид содержит как растворимую, так и нерастворимую фракции, причем соотношение растворимой фракции и нерастворимой фракции составляет по меньшей

мере 60% (мас./мас.). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, полученный с помощью бесклеточной экспрессии, содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 нпАК, и соотношение растворимой фракции и нерастворимой фракции составляет по меньшей мере 20% (мас./мас.), по меньшей мере 30% (мас./мас.), по меньшей мере 40% (мас./мас.), по меньшей мере 50% (мас./мас.), по меньшей мере 60% (мас./мас.), по меньшей мере 70% (мас./мас.), по меньшей мере 80% (мас./мас.), по меньшей мере 90% (мас./мас.).

Антигены.

В настоящем документе описаны иммуногенные антигены, которые необязательно дополнительно дериватизированы химической "рукояткой", чтобы облегчить прикрепление к улучшенному белку-носителю. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антигенами являются любые очищенные природные, синтетические или полученные рекомбинантным способом макромолекулы или их фрагменты. Примеры включают, но не ограничиваются ими, липиды, полисахариды, нуклеиновые кислоты или полипептиды и любую их комбинацию (например, гликопротеины, гликолипопротеины, гликолипиды). Например, гликолипид необязательно представляет собой гликофосфатидилинозитол. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой независимый от Т-клеток или активирующий Т-клетки антиген (обычно слабый активирующий Т-клетки антиген), выбранный из группы, состоящей из бактериального полисахарида, бактериального липополисахарида, гликана опухолевого происхождения или гаптена.

Полисахариды бактериального происхождения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген, содержащий полисахарид, содержит полисахарид бактериального происхождения, такой как капсульный полисахарид. Такие капсульные полисахариды представляют собой высокомолекулярные полимеры грамположительных или грамотрицательных бактерий, функция которых заключается в защите микроорганизмов от иммунных ответов, и как таковые представляют собой перспективные вакцинные мишени, когда целью является выработка нейтрализующих антител. Такие капсульные полисахариды обычно получают из лизатов целых клеток или культурального супернатанта соответствующей бактерии с помощью способов, которые включают диафильтрацию, удаление белка, осаждение этанолом, удаление нуклеиновой кислоты и лиофильную сушку. Примеры включают, но не ограничиваются ими, протокол Merieux (Institut Merieux (1980) Brevet Beige 80:26320) и протокол Yavordios (Yavordios et al. EP0071515A1(1983)).

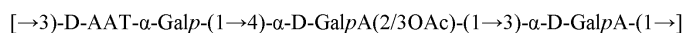
Капсульные полисахариды *S. pneumoniae*. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения капсульный полисахарид содержит капсульный полисахарид, происходящий из *Streptococcus pneumoniae*. *Streptococcus pneumoniae* представляет собой инкапсулированную грамположительную бактерию, которая может вызывать пневмонию, бактериемию и менингит. Существует 90 различных документально подтвержденных серотипов *S. pneumoniae* (описанных, например, в Kalin, M. Thorax 1998;53:159-162), которые несут капсульные полисахариды со специфическими для серотипа структурами из повторяющихся звеньев. Соответственно, в некоторых случаях антиген представляет собой капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae*, выбранный из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 7A, 7B, 7C, 8, 9A, 9L, 9N, 9V, 10F, 10A, 10B, 10C, 11F, 11A, 11B, 11C, 11D, 12F, 12A, 12B, 13, 14, 15F, 15A, 15B, 15C, 16F, 16A, 17F, 17A, 18F, 18A, 18B, 18C, 19F, 19A, 19B, 19C, 20, 21, 22F, 22A, 23F, 23A, 23B, 24F, 24A, 24B, 25F, 25A, 27, 28F, 28A, 29, 31, 32F, 32A, 33F, 33A, 33B, 33C, 33D, 34, 35F, 35A, 35B, 35C, 36, 37, 38, 39, 40, 41F, 41A, 42, 43, 44, 45, 46, 47F, 47A и 48 (Henrichsen J Clin Microbiol 1995; 33:2759-2762). Однако бактериальную инфекцию обычно вызывает только подгруппа этих серотипов, которая включает серотипы 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F. Серотипы 6C, 1C, 15A, 15C, 16F, 23A, 23B, 31, 34, 35B, 35F, 37 и 38 также стали представлять клиническую проблему, как и серотипы 20A, 20B и 24B. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae*, выбранный из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae*, выбранный из серотипов 6C, 7C, 15A, 15C, 16F, 23A, 23B, 31, 34, 35B, 35F, 37 и 38. Варианты реализации, описанные в настоящем документе, также могут дополнительно включать один или более капсульных полисахаридов *Streptococcus pneumoniae*, выбранных из серотипов 20A, 20B и 24B.

Как упомянуто выше, композиции согласно настоящему изобретению могут включать конъюгаты капсульного полисахарида из по меньшей мере 14, 15, 20, 21, 24 или 25 различных серотипов пневмококка. Если композиция включает 14 или более серотипов, они предпочтительно включают 13 серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F. В дополнение к этим 13 серотипам композиция предпочтительно содержит один или более из серотипов 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20, 22F, и/или 33F. В другом варианте в дополнение к вышеуказанным 13 серотипам композиция предпочтительно содержит один или более серотипов 2, 6C, 8, 9N, 10A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 20, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 24B, 31, 33F, 34, 35B, 35F и 38. Подходящая комбинация из 15 или более (например, 16 или более) серотипов содержит каждый из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, а

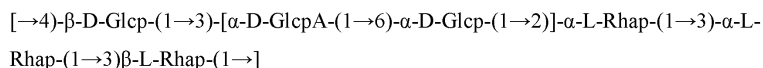
также может содержать серотип 8. Подходящая комбинация из 20 или более (например, 21 или более) серотипов содержит каждый из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F. Подходящая комбинация из 24 или более серотипов содержит каждый из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 9N, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 17F, 18С, 19А, 19F, 20, 22F, 23F и 33F.

Структуры распространенных повторяющихся звеньев капсульных полисахаридов из серотипов *S. pneumoniae* описаны в Jones et al. (Jones C et al. *An Acad Bras Ciênc.* 2005 Jun; 77(2):293-324)

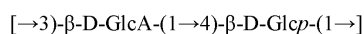
Тип 1



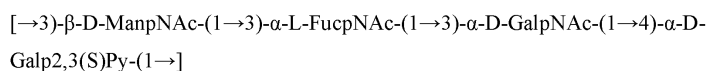
Тип 2



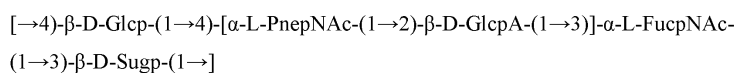
Тип 3



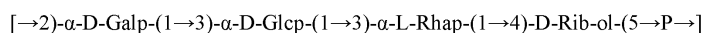
Тип 4



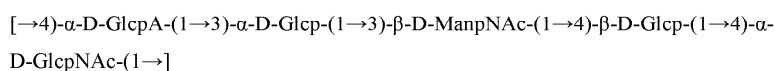
Тип 5



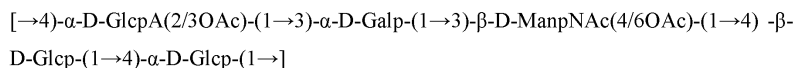
Тип 6В



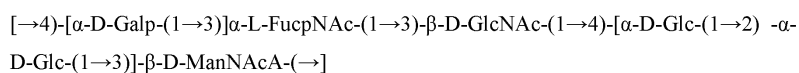
Тип 9N



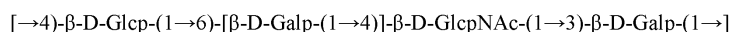
Тип 9V



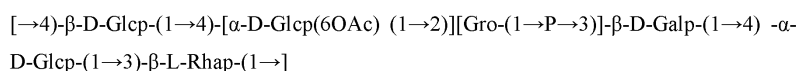
Тип 12F



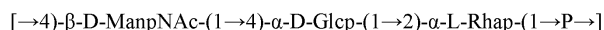
Тип 14



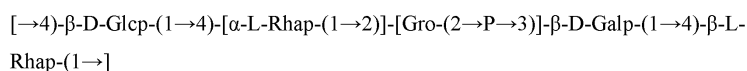
Тип 18С



Тип 19F



Тип 23F



Более подробное обсуждение полисахаридов можно найти в Geno et al. (2015) *Clin. Microbiol. Rev.* 28:871-99, где в табл. 1 показаны структуры для 97 известных серотипов. В этой таблице также показана доля сахаридных остатков, которые ацетилированы, если ацетилирование неполное.

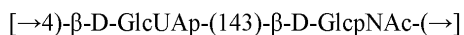
Капсульный полисахарид необязательно О-ацетилирован. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения капсульный полисахарид из серотипа 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 9N, 10А, 11А, 12F, 13, 14, 15В, 16, 17F, 18С, 19А, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F содержит сахарид, степень О-ацетилирования которого составляет 10-100%, 20-100%, 30-100%, 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 75-100%, 80-100%, 90-100%, 50-90%, 60-90%, 70-90% или 80-90%. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения степень О-ацетилирования составляет более 10%, более 20%, более 30%, более 40%, более 50%, более 60%, более 70%, более 80%, более 90% или приблизительно 100%. Степень

О-ацетилирования полисахарида необязательно определяют, например, с помощью протонного ЯМР (см., например, Lemercinier & Jones (1996) Carbohydrate Research 296:83-96; Jones et al. (2002) J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30:1233-1247). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения присутствие О-ацетильных групп определяют с помощью ионной ВЭЖХ. Обычно полисахарид в конъюгате будет сохранять уровни О-ацетилирования, наблюдаемые в исходном полисахариде, очищенном от бактерии.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения капсульный полисахарид из серотипа 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 9N, 10А, 11А, 12F, 13, 14, 15В, 16, 17F, 18С, 19А, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F имеет молекулярную массу от 10 кДа до 4000 кДа. В других таких вариантах реализации полисахарид имеет молекулярную массу от 50 кДа до 4000 кДа. В других таких вариантах реализации полисахарид имеет молекулярную массу от 50 кДа до 1400 кДа. В других таких вариантах реализации полисахарид имеет молекулярную массу от 50 кДа до 3500 кДа; от 50 кДа до 3000 кДа; от 50 кДа до 2500 кДа; от 50 кДа до 2000 кДа; от 50 кДа до 1750 кДа; от 50 кДа до 1500 кДа; от 50 кДа до 1250 кДа; от 50 кДа до 1000 кДа; от 50 кДа до 750 кДа; от 50 кДа до 500 кДа; от 100 кДа до 4000 кДа; от 100 кДа до 3500 кДа; от 100 кДа до 3000 кДа; от 100 кДа до 2500 кДа; от 100 кДа до 2000 кДа; от 100 кДа до 1750 кДа; от 100 кДа до 1500 кДа; от 100 кДа до 1250 кДа; от 100 кДа до 1000 кДа; от 100 кДа до 750 кДа; от 100 кДа до 500 кДа; от 200 кДа до 4000 кДа; от 200 кДа до 3500 кДа; от 200 кДа до 3000 кДа; от 200 кДа до 2500 кДа; от 200 кДа до 2000 кДа; от 200 кДа до 1750 кДа; от 200 кДа до 1500 кДа; от 200 кДа до 1250 кДа; от 200 кДа до 1000 кДа; от 200 кДа до 750 кДа; или от 200 кДа до 500 кДа. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается как вариант реализации настоящего изобретения.

Капсульный полисахарид необязательно химически модифицирован в сравнении с природным капсульным полисахаридом. Например, полисахарид необязательно де-О-ацетилирован (частично или полностью), де-N-ацетилирован (частично или полностью), N-пропионирован (частично или полностью) и т.д. Деацетилирование необязательно происходит до, во время или после конъюгации с химической "рукояткой" или полипептидом, но обычно происходит до конъюгации.

Полисахариды *S. ruogenes*. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген, содержащий полисахарид, содержит полисахарид, полученный из *S. ruogenes*. *S. ruogenes* представляет собой грамположительную бактерию (также известную как стрептококк группы А или "GAS"), ответственную за широкий спектр инфекций у людей, включая фарингит, тонзиллит, скарлатину, целлюлит, рожистое воспаление, ревматическую лихорадку, постстрептококковый гломерулонефрит, некротический фасциит, мионекроз и лимфангит. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полисахарид представляет собой капсульный полисахарид *S. ruogenes*. Капсульный полисахарид *S. ruogenes* состоит из гиалуроновой кислоты, высокомолекулярного полимера, в котором повторяющееся звено имеет структуру



которая, по-видимому, является инвариантной среди серотипов *S. ruogenes*.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения капсульный полисахарид из *S. ruogenes* имеет молекулярную массу от 10 кДа до 4000 кДа. В других таких вариантах реализации полисахарид имеет молекулярную массу от 50 кДа до 4000 кДа. В других таких вариантах реализации полисахарид имеет молекулярную массу от 50 кДа до 3500 кДа; от 50 кДа до 3000 кДа; от 50 кДа до 2500 кДа; от 50 кДа до 2000 кДа; от 50 кДа до 1750 кДа; от 50 кДа до 1500 кДа; от 50 кДа до 1250 кДа; от 50 кДа до 1000 кДа; от 50 кДа до 750 кДа; от 50 кДа до 500 кДа; от 100 кДа до 4000 кДа; от 100 кДа до 3500 кДа; от 100 кДа до 3000 кДа; от 100 кДа до 2500 кДа; от 100 кДа до 2000 кДа; от 100 кДа до 1750 кДа; от 100 кДа до 1500 кДа; от 100 кДа до 1250 кДа; от 100 кДа до 1000 кДа; от 100 кДа до 750 кДа; от 100 кДа до 500 кДа; от 200 кДа до 4000 кДа; от 200 кДа до 3500 кДа; от 200 кДа до 3000 кДа; от 200 кДа до 2500 кДа; от 200 кДа до 2000 кДа; от 200 кДа до 1750 кДа; от 200 кДа до 1500 кДа; от 200 кДа до 1250 кДа; от 200 кДа до 1000 кДа; от 200 кДа до 750 кДа; или от 200 кДа до 500 кДа. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается как вариант реализации настоящего изобретения.

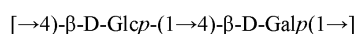
Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид представляет собой некапсульный полисахарид из *S. ruogenes*. Некапсульные полисахариды включают полисахарид клеточной стенки стрептококка группы А, который содержит остов из поли-L-рамнопиранозильных звеньев, соединенных чередующимися связями $\alpha\text{-L-(1}\rightarrow 3)$ и $\alpha\text{-L-(1}\rightarrow 2)$, к которым присоединены остатки N-ацетил- $\beta\text{-D-}$ глюкозамина в положении 3 рамнозного остова.

Согласно одному варианту реализации полисахарид клеточной стенки стрептококков группы А из *S. ruogenes* имеет молекулярную массу от 10 кДа до 4000 кДа. В других таких вариантах реализации полисахарид имеет молекулярную массу от 50 кДа до 4000 кДа. В других таких вариантах реализации полисахарид имеет молекулярную массу от 50 кДа до 3500 кДа; от 50 кДа до 3000 кДа; от 50 кДа до 2500 кДа; от 50 кДа до 2000 кДа; от 50 кДа до 1750 кДа; от 50 кДа до 1500 кДа; от 50 кДа до 1250 кДа; от 50 кДа до 1000 кДа; от 50 кДа до 750 кДа; от 50 кДа до 500 кДа; от 100 кДа до 4000 кДа; от 100 кДа до 3500

кДа; от 100 кДа до 3000 кДа; от 100 кДа до 2500 кДа; от 100 кДа до 2000 кДа; от 100 кДа до 2000 кДа; от 100 кДа до 1750 кДа; от 100 кДа до 1500 кДа; от 100 кДа до 1250 кДа; от 100 кДа до 1000 кДа; от 100 кДа до 750 кДа; от 100 кДа до 500 кДа; от 200 кДа до 4000 кДа; от 200 кДа до 3500 кДа; от 200 кДа до 3000 кДа; от 200 кДа до 2500 кДа; от 200 кДа до 2000 кДа; от 200 кДа до 2000 кДа; от 200 кДа до 1750 кДа; от 200 кДа до 1500 кДа; от 200 кДа до 1250 кДа; от 200 кДа до 1000 кДа; от 200 кДа до 750 кДа; или от 200 кДа до 500 кДа. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается как вариант реализации настоящего изобретения.

Капсульные полисахариды *Streptococcus agalactiae*. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген, содержащий полисахарид, содержит капсульный полисахарид, происходящий из *S. agalactiae*. *S. agalactiae* (также называемый стрептококк группы В или GBS) является грамположительной бактерией, обычно условно-патогенной у млекопитающих, которая вызывает сепсис, пневмонию и менингит у иммунологически уязвимых людей и мастит крупного рогатого скота у молочных коров. Существует по меньшей мере 10 серотипов *S. agalactiae* с различными повторяющимися звеньями капсульных полисахаридов (Ia, Ib, II-IX); однако заболевание обычно вызывает только подгруппа серотипов. К ним относятся серотипы Ia, Ib, II, III и V, и могут быть получены конъюгаты капсульных полисахаридов из этих серотипов. Структуры повторяющихся звеньев капсульных полисахаридов обычных серотипов *S. agalactiae* определены и представляют собой

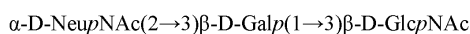
Тип Ia



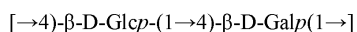
3

↑

1



Тип Ib



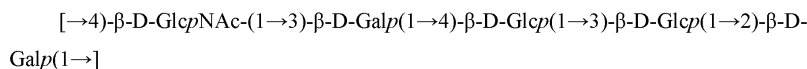
3

↑

1



Тип II



6

3

↑

↑

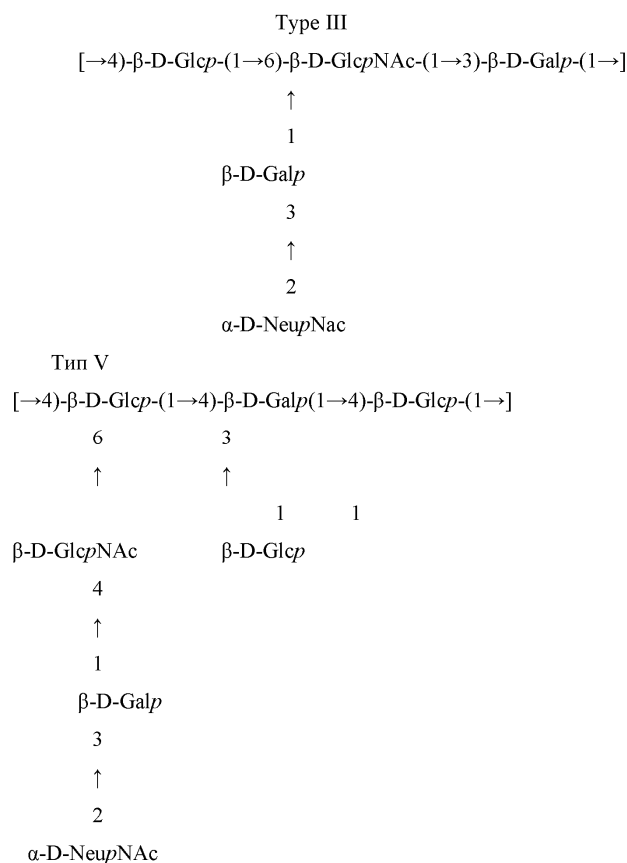
1

2

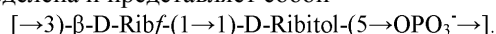
$\beta\text{-D-Galp}$

$\alpha\text{-D-}$

NeupNAc

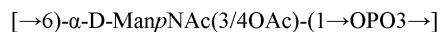


Капсульные полисахариды *Haemophilus influenzae*. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген, содержащий полисахарид, содержит капсульный полисахарид, происходящий из *H. influenzae*. *H. influenzae* представляет собой грамотрицательную, анаэробную патогенную бактерию, ответственную за широкий спектр локализованных и инвазивных инфекций, включая пневмонию, бактериемию, менингит, эпиглоттит, целлюлит и инфекционный артрит. Существует по меньшей мере 6 серотипов *H. influenzae* с различными химическими структурами капсульных полисахаридов (типы a-f). Однако только типы a и b считаются штаммами *H. influenzae* с высокой вирулентностью, и большая часть детских инфекций, как полагают, вызвана типом b (Jin et al. *Infect. Immun.* June 2007, vol. 75, no. 6, 2650-2654), который, соответственно, является предпочтительным типом полисахарида *H. influenzae* для применения в настоящем изобретении. Структура повторяющегося звена капсульного полисахарида типа b была определена и представляет собой

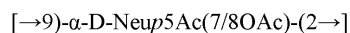


Капсульные полисахариды *Neisseria meningitidis*: Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген, содержащий полисахарид, содержит капсульный полисахарид, происходящий из *N. meningitidis*. *N. meningitidis* представляет собой грамотрицательную бактерию, которая является основным возбудителем менингита и менингококковой септической инфекции. Существуют по меньшей мере 13 серогрупп *N. meningitidis* с различными химическими структурами капсульного полисахарида (серогруппы A, B, C, E-29, H, I, K, L, W-135, X, Y, Z и Z' (29E)). Однако считается, что только шесть серогрупп (A, B, C, W-135, X, Y) вызывают опасное для жизни заболевание. Структуры повторяющегося звена капсульного полисахарида для пяти основных опасных для жизни серогрупп, представляющих интерес для получения конъюгата, определены и представляют собой

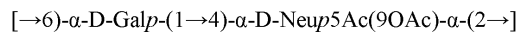
Тип А



Тип С



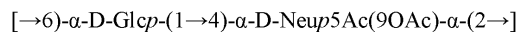
Тип W-135



Тип Х



Тип Y



Капсульные полисахариды *Porphyromonas gingivalis*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид, происходящий из одного из шести серотипов *Porphyromonas gingivalis* (например, K1, K2, K3, K4, K5 и/или K6); см. Van Winkelhoff et al. (1993) *Oral Microbiol. Immunol.* 8:259-265; и Laine et al. (1996) *J. Periodontal Res.* 31: 278-84.

Капсульные полисахариды *Salmonella typhi*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой полисахарид Vi. Vi представляет собой капсульный полисахарид *Salmonella typhi* (ранее классифицированной как отдельный вид, но теперь упоминаемой как серовар *typhi* *S. enteric*d). Vi также может быть обнаружен в других сероварах *Salmonella* (таких как серовар *paratyphi* С *S. enterica* или серовар *dublin*), а также у других бактерий, таких как *Citrobacter* (например, *C. freundii* и *C. youngae*). Полисахарид Vi представляет собой линейный гомополимер гексозаминоуроновой кислоты, α -1,4-N-ацетилгалактозаминуроновой кислоты, которая ацетилирована на 60-90% в положении С-3. Замена О-ацетил на Vi является одним из факторов, лежащих в основе его способности вызывать защитный иммунный ответ. Иммуногенность Vi тесно связана со степенью его О-ацетилирования. Частичное де-О-ацетилирование может незначительно повысить иммуногенность; полное де-О-ацетилирование устраняет иммуногенность Vi. Полисахарид Vi, применяемый в настоящем изобретении, может быть химически модифицирован по сравнению с природным капсульным полисахаридом. Например, полисахарид Vi может быть частично де-О-ацетилирован, де-N-ацетилирован (частично или полностью), N-пропионирован (частично или полностью) и т.д. Деацетилирование может происходить до, во время или после конъюгации, но предпочтительно происходит до конъюгации. Эффект деацетилирования и т.д. можно оценить с помощью рутинных количественных исследований.

Сахариды *Staphylococcus aureus*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой полисахарид из *S. aureus*. Полисахарид может представлять собой экзополисахарид *S. aureus*, который представляет собой поли-N-ацетилглюкозамин (PNAG) или капсульный полисахарид *S. aureus*, который может относиться, например, к типу 5, типу 8 или типу 336.

Поверхностный полисахарид *Clostridium difficile*: Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой поверхностный гликан из *C. difficile*, такой как PS-I или PS-II.

Глюканы.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой глюкан, содержащий β -1,3-связи и/или β -1,6-связи. Эти конъюгированные глюканы можно применять для стимуляции противогрибкового иммунного ответа, например, против *Candida albicans*. Глюканы представляют собой содержащие глюкозу полисахариды, обнаруженные, помимо прочего, в клеточных стенках грибов. β -глюканы содержат одну или более β -связей между субзвеньями глюкозы. Глюкан, применяемый в соответствии с настоящим изобретением, содержит β -связи и может содержать только β -связи (т.е. α -связи отсутствуют). Глюкан может содержать одну или более β -1,3-связей и/или одну или более β -1,6-связей. Он может также содержать одну или более β -1,2-связей и/или β -1,4-связей, но обычно единственными β -связями будут β -1,3-связи и/или β -1,6-связи. Глюкан может быть разветвленным или линейным. Глюкан может представлять собой грибковый глюкан. "Грибковый глюкан" обычно будет получен из грибка, но, если конкретная структура глюкана обнаруживается как в грибах, так и в организмах, отличных от грибов (например, в бактериях, низших растениях или водорослях), тогда организм, отличный от грибка, может применяться в качестве альтернативного источника. Соответственно, глюкан может происходить из клеточной стенки *Candida*, например, *C. albicans*, или из *Coccidioides immitis*, *Trichophyton verrucosum*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Paracoccidioides brasiliensis* или *Pythium insidiosum*. Существуют различные источники грибковых β -глюканов. Например, чистые β -глюканы являются коммерчески доступными, например, пустилан (Calbiochem) представляет собой β -1,6-глюкан, очищенный из *Umbilicaria papulosa*. β -глюканы могут быть очищены из клеточных стенок грибов различными способами. Согласно некото-

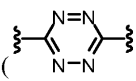
рым вариантам реализации настоящего изобретения глюкан представляет собой β -1,3-глюкан с некоторым разветвлением β -1,6, которое наблюдают, например, в ламинаринах. Ламинарины встречаются в бурых водорослях и морских водорослях. Соотношения $\beta(1-3):\beta(1-6)$ ламинаринов различаются среди различных источников, например, оно составляет всего лишь 3:2 в ламинарине *Eisenia bicyclis* и вплоть до 7:1 в ламинарине *Laminaria digitata*. Соответственно, глюкан, применяемый в настоящем изобретении, может иметь соотношение $\beta(1-3):\beta(1-6)$ от 1,5:1 до 7,5:1, например, приблизительно 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 или 7:1. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения глюкан имеет исключительно или преимущественно β -1,3-связи, как наблюдается в курдлане. Соответственно, глюкан может состоять исключительно из β -1,3-соединенных остатков глюкозы (например, линейные β -D-глюкопиранозы исключительно с 1,3-связями). Однако необязательно глюкан может содержать моносахаридные остатки, которые не являются β -1,3-соединенными остатками глюкозы, например, он может содержать β -1,6-соединенные остатки глюкозы. Соотношение β -1,3-соединенных остатков глюкозы и указанных других остатков должно быть по меньшей мере 8:1 (например, $\geq 9:1$, $\geq 10:1$, $\geq 11:1$, $\geq 12:1$, $\geq 13:1$, $\geq 14:1$, $\geq 15:1$, $\geq 16:1$, $\geq 17:1$, $\geq 18:1$, $\geq 19:1$, $\geq 20:1$, $\geq 25:1$, $\geq 30:1$, $\geq 35:1$, $\geq 40:1$, $\geq 45:1$, $\geq 50:1$, $\geq 75:1$, $\geq 100:1$ и т.д.).

Гликаны опухолевого происхождения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген, содержащий полисахарид, содержит не соответствующий стадии развития поверхностный гликан, характерный для опухолевых клеток. Danishefsky (см. обзор в Zhu et al. *Expert Rev Vaccines*. 2009(10): 1399-1413), наряду с другими, открыл, что определенные олигосахаридные мотивы (специфичные для стадии развития эмбриональные антигены, SSEA) первоначально экспрессируются на клеточных поверхностях во время эмбриогенеза и "повторно активируются" в опухолях у взрослых. Поскольку они представляют собой короткие полисахариды, в основном они доступны за счет химического синтеза (см. обзор Zhu, выше). Среди этих олигосахаридов с канцерогенезом (например, раком предстательной железы и раком молочной железы) наиболее четко связаны Globo-H, Le^x, STn, TF и Tn.

Гаптены: Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген содержит гаптен: неполимерный синтетический фрагмент с молекулярной массой менее 1000 Да. Применение гаптен в терапевтических белковых конъюгатах относится к гаптенам, которые имитируют лекарственные препараты, вызывающие зависимость, например, никотин или кокаин (см., например, Berkowitz & Spector. *Science*. 1972(178): 1290-1292 для морфина; Kosten et al. *Vaccine*. 2002(20): 1196-1204 для кокаина; и Hatsukami et al. *Clin Pharmacol Ther*. 2005(78):456-467). Конъюгирование слабоиммуногенных в других отношениях малых молекул с иммуногенными полипептидами позволяет стимулировать выработку специфических для лекарственного препарата антител, которые изолируют лекарственные препараты, вызывающие зависимость, от центральной нервной системы.

Способы дериватизации и получения антигенов и полученные в результате композиции.

В настоящем изобретении описаны антигены, содержащие химическую "рукоятку", которая способна вступать в реакцию с соответствующей группой, введенной в неприродную аминокислоту полипептида, как описано ранее в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химическая "рукоятка" содержит группу, подходящую для реакции "клик-химии" с соответствующей группой на полипептиде. Химические группы, подходящие для "клик-химии", включают, но не ограничиваются ими, азидную ($-N_3$), алкиновую ($C=C$), фосфиновую (например, $-P(Ph)_2$),

алкеновую ($C=C$) и 1,2,4,5-тетразиновую () группы.

Химическую "рукоятку" вводят с помощью общего способа, включающего 3 этапа: (а) активацию антигена; (b) необязательно взаимодействие антигена с линкером или нуклеофильной группой для придания реакционной способности, обычно не присутствующей в антигене; и (с) конъюгирование антигена с химической "рукояткой". Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения два или более этапов (а)-(с) являются одновременными, например, в том случае, когда химическая "рукоятка" модифицирована с помощью добавления реакционноспособного фрагмента, такого как N-гидроксисукцинимид. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения два или более этапов (а)-(с) являются дискретными с необязательной очисткой антигена между этапами. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения этап (а) дополнительно включает этап для удаления блокирующей группы на антигене так, что определенные функциональные группы (например, гидроксилы, амины, тиолы) становятся более доступными для активации.

Химическую "рукоятку" необязательно вводят в разных местоположениях по отношению к антигену. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химическую "рукоятку" вводят на конце (например, восстанавливающие и невосстанавливающие концы полисахарида, N- и C-концы полипептида или конец ацильной цепи глицерида). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химическую "рукоятку" вводят во внутреннее местоположение (например, внутреннюю аминокислоту полипептида или внутренний гидроксил, амин или активированный гидроксил полисахарида). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химическую "рукоятку"

вводят на одном или более концах в дополнение к внутреннему местоположению. Конкретный способ активации, применяемый для антигена, будет влиять на местоположения, активированные для конъюгации, и, следовательно, на конечное местоположение конъюгированной химической "рукоятки" на антигене. Предпочтительным является введение нескольких химических "ручек" в антиген так, чтобы он мог образовать несколько связей с носителями.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения способ конъюгирования полипептида с антигеном за счет химических "ручек" заключается в следующем. Антиген активируют для включения в него по меньшей мере одной первой химической "рукоятки", причем первая химическая "рукоятка" способна к конъюгации со второй химической "рукояткой" нпАК в полипептиде. Активированный антиген комбинируют с полипептидом, содержащим по меньшей мере одну нпАК, содержащую вторую "рукоятку", в условиях, при которых первая и вторая химические "рукоятки" реагируют с образованием конъюгата антиген-полипептид. Осуществленная таким способом реакция представляет собой некаталитическую реакцию ковалентной биоконъюгации. Реактивные сайты на антигене, которые служат "первой химической рукояткой", предпочтительно представляют собой алкинильные группы, причем алкинильные группы могут быть включены в молекулярное окружение, которое увеличивает реакционную способность. Например, алкинильные группы могут быть включены в кольцо, например, циклооктенильное кольцо, такое как диарил-напряженный циклоктин. Предпочтительные реакционно-способные сайты в полипептиде, т.е. "вторая химическая рукоятка", которые обеспечены остатками нпАК, представляют собой азидогруппы. Как известно специалистам в данной области техники, в данном случае реакция представляет собой [3+2] циклоприсоединение, называемое в данной области техники "облегченное напряжением азид-алкиновое циклоприсоединение" (SPAAC), которое обсуждается более подробно ниже.

Активация антигенов.

Антиген необязательно активируют с применением любого химического способа, описанного для получения биоконъюгатов. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, окисление периодатом, снятие маскировки собственного альдегида (например, восстанавливающий конец полисахарида), активацию тетрафторборатом 1-циано-4-диметиламинопиридина (CDAP) или активацию гидроксила с применением 1,Г-карбонилдиимидазола (CDI) с последующим нуклеофильным добавлением. Другие химические стратегии дериватизации сахаридов описаны в Hermanson (Hermanson, Greg. Bioconjugate Techniques (2008)). Для активации можно применять цианилирующие реагенты (такие как п-нитрофенилцианат, CDAP или тетрафторборат N-цианотриэтиламмония), активные сложные эфиры, карбодиимиды, гидразиды, норборан, п-нитробензойную кислоту, N-гидроксисукцинимид, S-NHS, EDC, TSTU и т.д.

Согласно настоящему изобретению предложен антиген (в частности, полисахаридный антиген, описанный в настоящем документе, такой как пневмококковый капсульный полисахаридный антиген), который активирован в соответствии с любой из обсуждаемых ниже химических реакций, например, продукт реакции антигена с одной или более группами DBCO и DIFO, обсуждаемый ниже.

Активация периодатом.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген активируют с помощью окисления периодатом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения окисление периодатом применяют для введения альдегидных групп в антиген, и его можно применять для добавления альдегидов к: 1) полисахаридам; и 2) N-концевым остаткам полипептидов для получения активированного антигена. Периодат расщепляет углерод-углеродные химические связи, которые имеют первичный или вторичный гидроксил или амин на любом конце, и активирует тем самым остатки углеводного сахара, несущие соседние гидроксилы, или аминокислоты, содержащие 2-амино спиртовой фрагмент (N-концевые остатки треонина или серина). Поскольку альдегидный фрагмент имеет длительный период полужизни, активированные этим способом антигены необязательно хроматографически очищают и/или лиофилизируют после активации.

Для периодатного окисления антигенов: (а) антигены растворяют в растворе; (b) источник периодата добавляют к антигену из концентрированного исходного раствора с образованием окислительной смеси; (в) реакционную смесь инкубируют; и (d) (необязательно) удаляют избыток периодата.

Для реакции окисления необязательно применяют деионизированную воду или подходящий буферный раствор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения раствор на этапе (а) представляет собой деионизированную воду. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения раствор на этапе (а) содержит эффективное количество буфера с рКа, приблизительно соответствующей физиологическому значению рН. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения раствор на этапе (а) содержит эффективное количество буфера с рКа, приблизительно соответствующей физиологическому значению рН, причем указанный буфер не содержит аминогруппу. Примеры не содержащих аминогруппу буферов включают, но не ограничиваются ими, ацетат, формиат и фосфат.

Источник периодата на этапе (b) необязательно выбирают из любого источника периодата с соответствующей стабильностью в водном растворе. Примеры источников периодата включают, но не ограничиваются ими, периодат натрия, периодат калия, (мета) периодат тетрабутиламмония, периодат бария,

тригидроортопериодат натрия, (пара) периодат натрия и (мета) периодат тетраэтиламмония.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения уровень добавления периодата и условия реакции корректируют для превращения в альдегиды всех доступных диолов на полисахариде. Например, большие избыточные количества периодата натрия (>1000-кратный избыток по отношению к молярной концентрации полисахарида или 10 мМ раствор периодата натрия) в комбинации с инкубацией при комнатной температуре способствуют полному превращению диолов в альдегиды.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения уровень добавления периодата и условия реакции корректируют для введения низкого уровня окисления/образования альдегидов в полисахаридную цепь. Количество периодата натрия, которое ниже стехиометрического (например, <1,0 экв.), в реакции окисления способствует низкой степени окисления полисахаридной цепи. Например, бактериальный сахарид активируют с применением 0,001-0,7, 0,005-0,5, 0,01-0,5, 0,1-1,2, 0,1-0,5, 0,1-0,2, 0,5-0,8, 0,1-0,8, 0,3-1,0 или 0,4-0,9 молярных эквивалентов периодата (см. WO2011/110531). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения 0,4 молярного эквивалента периодата добавляют в раствор с pH 6,0, содержащий пневмококковый капсульный полисахарид, и инкубируют в течение 17 ч при 25°C (см. WO2011/110531).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения менее 0,001%, 0,01%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 30% или 50% vicinaльных диолов бактериального сахара окисляются во время активации периодатом (см. WO2011/110531), например, 5-10%. Низкие значения температуры реакции также способствуют снижению степени окисления полисахаридной цепи. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения низкие концентрации периодата (<0,1 экв.) комбинируют с реакциями в течение ночи при 4°C, чтобы свести к минимуму окисление полисахаридной цепи конкретных капсульных полисахаридов, таких как 19F S. pneumoniae.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения уровень добавления периодата и условия реакции корректируют для непосредственного расщепления полисахаридной цепи до выборочных сахаров. Например, 1 мМ NaIO₄ при 4°C применяют, согласно литературным данным, для селективного окисления остатков сиаловой кислоты при 7, 8 или 9 атомах углерода, в то время как 10 мМ NaIO₄ при комнатной температуре применяют для окисления широкого спектра остатков сахаров, включая остатки сиаловой кислоты, галактозы и маннозы.

Для окисления N-концевых остатков серина или метионина в белковых антигенах обычно применяют более мягкие условия окисления (низкие концентрации периодата и меньшее время реакции), чтобы избежать окислительного повреждения внутренних боковых цепей антигенов. В одном варианте реализации этап (b) включает добавление периодата натрия до конечной концентрации 2,5 мМ, и этап (c) включает инкубацию реакционной смеси при 25°C в течение 3 мин.

Поскольку избыточный не вступивший в реакцию периодат может вызывать более высокие, чем желательно, уровни окисления или повреждение иммуногенных фрагментов в антигене, избыточный периодат необязательно удаляют на этапе (d). Для больших антигенов (≥ 10 кДа) избыток периодата, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, удаляют с помощью гель-фильтрации, диализа или диафильтрации против воды или буферного раствора с применением среды с подходящим пределом отсечения молекулярной массы или пределом исключения. Для небольших антигенов, для которых очистка на основе размера является неудобной (короткие пептиды или олигосахариды) удаление периодата на этапе (d) включает добавление нейтрализующего агента. Избыток периодата необязательно нейтрализуют добавлением глицерина (10% (об./об.)), добавлением молярного избытка сульфата натрия или добавлением молярного избытка N-ацетилметионина.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения с полисахаридного или белкового антигена снимают защиту, чтобы увеличить доступность гидроксильных или аминных групп для активации периодатом. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения O-ацетильные или N-ацетильные группы на полисахаридах удаляют, чтобы повысить способность соседних гидроксильных групп реагировать с периодатом. В случае полисахаридных антигенов де-O-ацетилирование или де-N-ацетилирование необязательно осуществляют путем инкубации в растворе слабой кислоты (например, с низкой концентрацией HCl) или щелочи (например, бикарбоната натрия) с последующим необязательным нагреванием и корректировкой pH для возвращения к физиологическому значению. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обработку слабой кислотой (<0,1 М HCl или <0,2 М AcOH) с последующим нагреванием и нейтрализацией применяют для частичного гидролиза ("доведение до требуемого размера") полисахаридов с высокой молекулярной массой. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обработку слабой кислотой (например, <0,1 М HCl или <0,2 М AcOH) с последующим нагреванием (45-95°C) и нейтрализацией (до pH 5,5-6,0) применяют для одновременного частичного гидролиза ("доведение до требуемого размера") полисахаридов с высокой молекулярной массой и снятия защиты с полисахарида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения серотипы 3, 4, 18C и 11A обрабатывают с помощью такого способа кислота/нагревание/нейтрализация для снятия защиты с полисахарида, доведения до требуемого размера полисахарида или и того, и другого. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полиса-

харид серотипа 3 *S. pneumoniae* обрабатывают 0,18 М уксусной кислотой с последующим нагреванием при 85°C в течение 1 ч. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полисахарид серотипа 4 *S. pneumoniae* обрабатывают 0,01 М HCl с последующим нагреванием при 45°C в течение 1 ч. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полисахарид 18С *S. pneumoniae* обрабатывают 0,18 М уксусной кислотой с последующим нагреванием при 95°C в течение 40 мин. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полисахарид серотипа 11А *S. pneumoniae* обрабатывают 0,18 М уксусной кислотой с последующим нагреванием при 80°C в течение 1 ч.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения N-формильные группы на очищенных белках удаляют/аминные группы деформируют путем обработки формил-L-метионил-пептидамидогидролазой в деионизированной воде или физиологическом рН-забуферном растворе. Согласно другому дополнительному варианту реализации настоящего изобретения N-формильные группы на очищенных белках удаляют путем обработки лиофилизированного белка безводными парами гидразина при -5°C (Miyataki et al. *Em. J. Biochem.* 212, 785-789 (1993)).

Активация CDAP.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген активируют путем образования временного аддукта с тетрафторборатом циано-4-диметиламинопиридина (CDAP) (см., например, WO2011/110531 и US20120321658). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гидроксильные группы на белковом или полисахаридном антигене активируют с помощью реакции с CDAP с образованием временного цианата (-OCN) аддукта, который затем подвергают реакции с подходящим нуклеофилом на химической "рукоятке" или линкере с образованием карбамимидатной связи. В этом варианте реализации химические связи С-С на антигене не расщепляются (в отличие от активации периодатом). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конкретные капсульные полисахариды предпочтительно активируют с применением CDAP. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения капсульные полисахариды серотипа 3, 7F или 10А *S. pneumoniae* активируют с применением CDAP.

Для активации антигенов CDAP: (а) антиген растворяют в подходящем растворителе; (b) CDAP добавляют к антигену из концентрированного раствора; (с) добавляют буферный агент.

Активацию с применением CDAP необязательно выполняют в любом подходящем растворителе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения растворитель в (а) содержит дистиллированную воду. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения растворитель в (а) дополнительно содержит органический растворитель, такой как ДМСО или ацетонитрил. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения капсульные полисахариды серотипа 3, 7F или 10А *S. pneumoniae* активируют в воде.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения для активации применяют су-пра- или субстехиометрические (по отношению к полисахариду) количества CDAP. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения для активации полисахарида применяют от приблизительно 0,1 до приблизительно 3 экв. CDAP. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения для активации полисахарида применяют приблизительно 0,2-0,8 экв. CDAP. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения капсульный полисахарид серотипа 3 *S. pneumoniae* активируют с применением 2,0 экв. CDAP. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения капсульный полисахарид серотипа 10А *S. pneumoniae* активируют с применением 0,8 экв. CDAP.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения добавление буферного агента в (с) применяют для значительного повышения эффективности активации CDAP (Lees et al. *Vaccine.* 1996 (14): 190-198). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения буферный агент в (с) представляет собой триэтанолламин (ТЕА). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в качестве буферного агента применяют от 1 до 4 экв. ТЕА (относительно полисахарида). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения для реакции активации CDAP с участием полисахарида серотипа 7F *S. pneumoniae* в качестве буферного агента применяют от приблизительно 1 до приблизительно 4 экв. ТЕА. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в качестве буферного агента применяют 2,5 экв. ТЕА. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения для реакции активации CDAP с участием полисахарида серотипа 7F *S. pneumoniae* в качестве буферного агента применяют 2,5 экв. ТЕА. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения буферный агент представляет собой борат натрия, карбонат натрия или гидроксид натрия и любую их комбинацию. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения буферный агент имеет рКа от приблизительно 8,0 до приблизительно 11,0, или буферный агент применяют для доведения рН реакционного раствора до значения от приблизительно 8,0 до приблизительно 11,0. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения буферный агент имеет рКа от приблизительно 9,0 до приблизительно 9,5, или буферный агент применяют для доведения рН реакционного раствора до значения от приблизительно 9,0 до приблизительно 9,5. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения для реакции активации CDAP с участием полисахарида серотипа 3 *S. pneumoniae* значение рН доводят до 9,5 с помощью гидроксида натрия. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения для реакции активации CDAP с участием полисахарида серотипа 10А *S. pneumoniae* значение рН доводят до 9,5 с помощью гидроксида натрия.

Активация карбонилдимидазолом (CDI)/карбонилдитриазолом (CDT).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген активируют карбонилдимидазолом (CDI) или карбонилдитриазолом (CDT). CDI и CDT, подобно CDAP, способны активировать гидроксильные группы на антигене с образованием временного реакционноспособного фраг-



мента; в данном случае он представляет собой нестабильный карбамат (для CDI и для CDT), который затем необязательно подвергают взаимодействию с амином или тиолом на химической "рукоятке" или линкере с образованием карбаматной или карботиоатной связи. Активация должна проводиться в сухом органическом растворителе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активацию CDI/CDT проводят в безводном диметилсульфоксиде (ДМСО). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения активацию CDI/CDT проводят путем добавления молярного избытка CDI/CDT по отношению к антигену. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения активацию CDI/CDT проводят путем добавления молярного количества CDI/CDT, приблизительно равного молярному количеству антигена.

Нехимическая активация.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эндогенные амины или другие нуклеофильные фрагменты (например, первичный амин), которые либо присутствуют в природе, либо являются результатом этапа снятия защиты (например, как обсуждалось выше), применяют для конъюгации конкретного полисахарида с химической "рукояткой" или белком-носителем. Такие нуклеофильные фрагменты можно удобно подвергать взаимодействию с различными обычными электрофильными реагентами для конъюгации, такими как производные сукцината (например, N-гидроксисукцинимид (NHS) или сложные эфиры сульфо-NHS). В таких вариантах реализации иногда предпочтительно проводить обработку с применением протокола для периодата, как в (i), чтобы стимулировать разрушение антигенных загрязнителей, таких как С-полисахарид *S. pneumoniae*. В этом варианте реализации после обработки периодатом применяют очень большой избыток борогидрида натрия для нейтрализации любых химически введенных альдегидных групп. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полисахарид серотипа 1 *S. pneumoniae* обрабатывают от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,25 экв. периодата натрия при комнатной температуре в течение от приблизительно 12 до приблизительно 14 ч, после чего проводят обработку от приблизительно 5 экв. до приблизительно 15 экв. борогидрида натрия. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полисахарид серотипа 1 *S. pneumoniae* обрабатывают 0,15 экв. периодата натрия при комнатной температуре в течение 18 ч с последующей обработкой 10 экв. борогидрида натрия.

Конъюгация с химической "рукояткой".

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген конъюгируют с химической "рукояткой" с применением любого химического способа, совместимого со способами активации, описанными выше ("Активация антигенов"). Такие способы включают, но не ограничиваются ими, образование основания Шиффа с синтетическими антигенными альдегидами с последующим восстановительным аминированием, образованием гидразона, образованием оксима, прямым нуклеофильным присоединением и образованием основания Шиффа с нативными альдегидами антигена с последующим восстановительным аминированием. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения абсолютная концентрация полисахарида в реакции конъюгации с химической "рукояткой" важна для уменьшения до минимума агрегации или перекрестной реактивности полисахарида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения абсолютная концентрация полисахарида/антигена в реакции конъюгации с DBCO (добензоциклооктином) или производным DBCO важна для полисахаридов, активированных периодатом или CDAP. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения концентрация полисахарида в реакции конъюгации DBCO/производное DBCO составляет менее 2, менее 5, менее 7, менее 10, менее 15, менее 17,5 или менее 20 мкмоль/мл. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения концентрация полисахарида в реакции конъюгации DBCO/производное DBCO составляет от приблизительно 1,5 до приблизительно 17,5 мкмоль/мл.

Реакции с антигенами, активированными периодатом.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химическая "рукоятка" конъюгирована с полипептидным или полисахаридным антигеном, активированным, как описано выше ("Активация антигенов"), с применением периодата. В этих вариантах реализации химическую "рукоятку", содержащую функциональную группу, которая образует стабильный или полустабильный аддукт с альдегидами, комбинируют с антигеном, активированным периодатом, с последующим необязательным восстановлением для превращения полустабильных аддуктов в стабильные аддукты (см., например, WO2014/111344; Wu et al. Vaccine 31(2013): 5623-2626; Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, Second Edition, 2008). Согласно некоторым модификациям этих вариантов реализации химическую "рукоятку" добавляют в большом молярном избытке по отношению к альдегидным группам на активированном антигене так, что в реакции конъюгации химическая "рукоятка"/антиген расходуются все альдегиды. В других модификациях этих вариантов реализации химическую "рукоятку" добавляют в более низком

молярном соотношении по отношению к альдегидным группам на активированном антигене, и избыток не вступивших в реакцию альдегидов на активированном антигене расходуется в последующей реакции с избытком недорогого альдегидреактивного нуклеофила (например, этаноламина) или при обработке восстановителем, достаточно сильным для восстановления альдегидов до гидроксильных групп (например, NaBH_4).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения химическая "рукоятка" конъюгирована с антигеном за счет образования основания Шиффа с синтетическими антигенными альдегидами с последующим восстановительным аминированием. Этот вариант реализации позволяет получить конечный продукт, который имеет вторичную аминную связь между химической "рукояткой" и антигеном: непосредственную химическую связь N-C между амином химической "рукоятки" и атомом углерода на антигене. В этом варианте реализации химическая "рукоятка" содержит амин. В этом варианте реализации способ конъюгации включает: комбинирование аминсодержащей "рукоятки" с антигеном, активированным периодатом, в деионизированной воде или забуференном растворе, содержащем ДМСО; инкубацию с образованием основания Шиффа; восстановление основания Шиффа до вторичного амина с применением цианоборогидрида натрия (NaBH_3CN); и необязательно нейтрализацию не вступивших в реакцию альдегидов с помощью NaBH_4 . Согласно некоторым вариантам реализации этого способа химическую "рукоятку" и антиген комбинируют в стехиометрическом соотношении 1:1 или примерно равном ему. Согласно некоторым вариантам реализации этого способа химическую "рукоятку" и антиген комбинируют с молярным избытком химической "рукоятки". Согласно некоторым вариантам реализации этого способа химическую "рукоятку" и антиген комбинируют с молярным избытком антигена. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения цианоборогидрид натрия заменяет другой восстановитель с аналогичной селективностью для восстановления химических связей C=N, такой как триацетоксиборогидрид натрия.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения химическая "рукоятка" конъюгирована с антигеном за счет образования гидрозона. В этом варианте реализации химическая "рукоятка" содержит гидразидную ($-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{NH}_2$) группу. Этот вариант реализации позволяет получить конечный продукт, который имеет гидрозоновую ($-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-$) или N'-алкилгидразидную ($-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}-$) связь между химической "рукояткой" и углеродом антигена. В этом варианте реализации способ конъюгации включает: комбинирование молярного избытка гидразидсодержащей химической "рукоятки" с антигеном в растворе с pH 6,0-8,5 и инкубацию с образованием гидрозона ($-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{N}=\text{C}-$). Согласно некоторым другим вариантам реализации этого способа цианоборогидрид натрия или триацетоксиборогидрид натрия включают в реакционную смесь для восстановления химической связи N=C с получением N'-алкилгидразида ($-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{NH}-\text{C}-$).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения химическая "рукоятка" конъюгирована с антигеном за счет образования оксима. В этом варианте реализации химическая "рукоятка" содержит аминокси ($-\text{O}-\text{NH}_2$) группу. Этот вариант реализации позволяет получить конечный продукт, который имеет оксимную ($-\text{O}-\text{N}=\text{C}-$) связь между химической "рукояткой" и углеродом антигена. В этом варианте реализации способ конъюгации включает: комбинирование молярного избытка аминоксисодержащей химической "рукоятки" с антигеном в растворе с pH 6,0-8,5 и инкубацию с образованием оксимной связи ($-\text{O}-\text{N}=\text{C}-$). В некоторых других вариантах этого способа цианоборогидрид натрия или триацетоксиборогидрид натрия включают в реакционную смесь для восстановления химической связи N=C и улучшения стабильности; это приводит к образованию N'-алкилгидроксиламинной связи ($-\text{O}-\text{N}-\text{C}-$).

Реакции с CDAP-активированными антигенами.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химическая "рукоятка" конъюгирована с полипептидным или полисахаридным антигеном, активированным с применением CDAP, как описано выше ("активация CDAP"). В этих вариантах реализации временная цианато ($-\text{OCN}$) группа, полученная за счет активации CDAP, затем взаимодействует с аминоксисодержащей химической "рукояткой" с получением карбамимидатной связи ($-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{O}-$) между химической "рукояткой" и углеродом антигена.

Для конъюгации химических "ручек" с CDAP гидроксильные группы на антигене активируют, как описано выше ("активация CDAP"), и в активационную смесь дополнительно добавляют химическую "рукоятку", содержащую амин. Поскольку цианатогруппа лабильна, химическую "рукоятку" обычно добавляют вскоре (в течение нескольких минут) после активации антигена. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген добавляют через 2,5 мин после введения CDAP. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения добавляют большой молярный избыток аминсодержащей химической "рукоятки" по отношению к активированным гидроксильным группам на антигене. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения химическую "рукоятку" добавляют в концентрации, близкой к молярному соотношению 1:1 по отношению к активированным гидроксильным группам на антигене, и избыток не вступивших в реакцию цианатных групп истощают путем добавления избытка недорогого амина (например, этаноламина или гександиамина).

Реакции с CDI/CDT-активированными антигенами.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химическая "рукоятка" конъюгирована с полипептидным или полисахаридным антигеном, активированным с применением CDI/CDT,

как описано выше ("активация карбонилдиимдазолом (CDI)/карбонилдитриазолом (CDT)"). В этих вариантах нестабильный карбамат, полученный в результате активации антигенных гидроксильных групп с



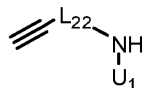
применением CDI/CDT (для CDI и для CDT), затем взаимодействует с первичным амином с получением стабильной карбаматной (-NH-C(=O)-O-) связи или с первичным тиолом с получением стабильной карботиоатной (-S-C(=O)-O-) связи между химической "рукояткой" и углеродом антигена. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения добавляют большой молярный избыток амин/тиолсодержащей химической "рукоятки" по отношению к активированным гидроксильным группам на антигене. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения химическую "рукоятку" добавляют в концентрации, близкой к молярному соотношению 1:1 по отношению к активированным гидроксильным группам на антигене. В других вариантах реализации остаточный CDI/CDT в реакции затем инактивируют путем обработки тетраборатом натрия.

Реакции с неактивированными антигенами.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химическая "рукоятка" конъюгирована с эндогенным амином или другим нуклеофильным фрагментом (например, первичным амином), который либо присутствует в природе, либо является результатом этапа снятия защиты с полипептидного или полисахаридного антигена, как описано выше. Согласно одному варианту реализации вышеописанного электрофильную группу (например, NHS или сложный эфир сульфо-NHS) на химической "рукоятке" подвергают взаимодействию с первичной аминогруппой на антигене с получением амидной связи (-C(=O)-NH-) между химической "рукояткой" и амином антигена. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения карбоксильную группу на химической "рукоятке" подвергают взаимодействию с первичной аминогруппой на антигене в присутствии стандартных реагентов для связывания пептидов и условий для получения амидной связи между химической "рукояткой" и амином антигена.

Алкинсодержащие "рукоятки".

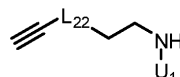
Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химическая "рукоятка" содержит фрагмент, который обеспечивает реакцию "клик-химии" с соответствующей группой на остатке нпАК полипептида. Один из таких фрагментов представляет собой алкиновую группу, которая способна вступать в реакцию с остатком нпАК, содержащим азидогруппу. В простейшем варианте реализации такой фрагмент представляет собой пропаргильную группу так, что алкиновая группа на антигене содержит структуру формулы IV



где L₂₂ представляет собой C₁-C₁₀-алкил и

U₁ представляет собой по меньшей мере один фрагмент антигена.

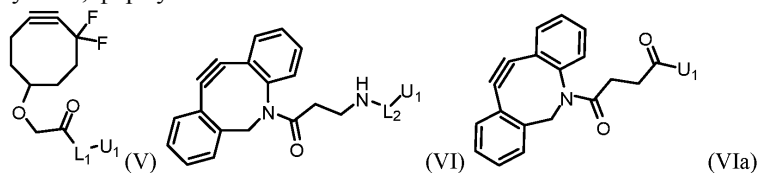
Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения алкиновая группа на антигене содержит структуру формулы IVa



где L₂₂ представляет собой -(CH₂CH₂O)₁₋₁₀- и

U₁ представляет собой по меньшей мере один фрагмент антигена.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения алкиновая группа дополнительно содержит дополнительные признаки, которые ускоряют или облегчают реакцию алкина с азидогруппой. Примером одного такого признака является 8-членная кольцевая структура (например, циклооктин), так, что алкиновая группа на антигене дополнительно содержит группу DIFO или DBCO. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения алкиновая группа на антигене содержит структуру формулы V, формулы VI или VIa



в которых L₁ независимо представляет собой химическую связь, -NH-, -O-, -S-, -NH(L₁₂)-, -O(L₁₂)-, или -S(L₁₂)-;

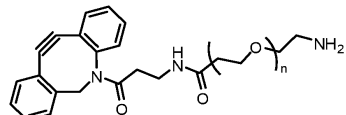
L₂ независимо представляет собой химическую связь, -C(=O)-, -S(=O)₂-, -C(=O)L₁₂-, -S(=O)₂L₁₂;

L₁₂ независимо представляет собой L₂₂ или L₂₂NH-;

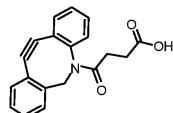
L₂₂ независимо представляет собой C₁₋₁₀алкил или -(CH₂CH₂O)₁₋₁₀- и

U_1 независимо представляет собой по меньшей мере один фрагмент антигена.

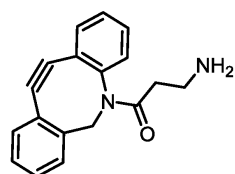
Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения структуры формул V и VIa легко образуются из антигена, содержащего нуклеофильную группу (например, первичный амин), и NHS или сложный эфир сульфо-NHS соответствующих DIFO- или DBCO-карбоновых кислот из структур V и VIa. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения структуры формулы VI легко образуются из активированного антигена и производного DBCO, такого как DBCO-NH₂ или DBCO-PEG_n-NH₂. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения DBCO-PEG_n-NH₂ представляет собой DBCO-PEG₄-NH₂.



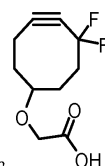
DBCO-PEG_n-NH₂



DBCO-карбоновая кислота



DBCO-NH₂

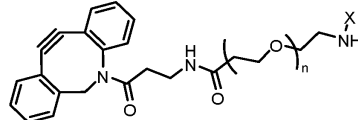


DIFO-карбоновая кислота

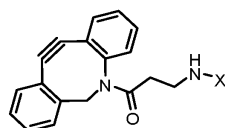
Значение "n" в "PEG_n" представляет собой количество повторяющихся звеньев оксиэтилена, например, в структуре, показанной выше, или в формуле VII, формуле VIIb, формуле XI или фрагменте "A", или в полиалкилокси L₂₂. Значение n находится в пределах диапазона 1-20, например, в пределах 2-18, 3-16 или 4-14. Таким образом, n может принимать любое значение, например, 4, 5, 11, 12 или 13.

Согласно некоторым вариантам реализации формул IV, V или VI фрагмент U_1 представляет собой по меньшей мере один полиол полисахарида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фрагмент U_1 представляет собой по меньшей мере один полиол липополисахарида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фрагмент U_1 представляет собой по меньшей мере одну аминокислоту антигенного полипептида.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения антиген, содержащий алкин, содержит структуру формулы VII или VIIa



(формула VII)

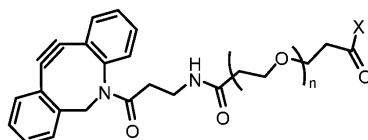


(формула VIIa)

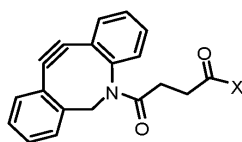
в которых X независимо представляет собой по меньшей мере один полиол полисахарида и n составляет по меньшей мере 1.

Если группа (например, X, Y или U_1) описана как полиол, это может относиться к химическому прикреплению к полиолу в полисахариде (например, к моносахариду в полисахариде, причем указанный моносахарид представляет собой полиол). Прикрепление как таковое может происходить к любой подходящей функциональной группе (например, к альдегиду, который может возникнуть в результате окисления vicинального диола).

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения алкинсодержащий антиген содержит структуру формулы VIIb или VIIc



(формула VIIb)

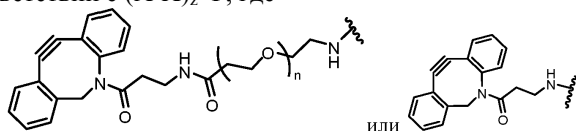


(формула VIIc)

в которых X независимо представляет собой амин по меньшей мере одного аминсахара полисахарида и

n составляет по меньшей мере 1.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения алкинсодержащий антиген содержит полисахарид в соответствии с $(A-X)_z-Y$, где



A представляет собой

X независимо представляет собой по меньшей мере один полиол;

Y независимо представляет собой по меньшей мере один полиол полисахарида;

n составляет по меньшей мере 1 и

z больше 1.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген содержит полисахарид, который дополнительно содержит группу DBCO и содержит по меньшей мере 1,5%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 11%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 13%, по меньшей мере 14%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 16%, по меньшей мере 17%, по меньшей мере 18%, по меньшей мере 19% или по меньшей мере 20% (мас./мас.) ковалентно прикрепленного DBCO. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген содержит более приблизительно 1,5% (мас./мас.) DBCO. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген содержит более 3% (мас./мас.) DBCO. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген содержит не более 20%, не более 19%, не более 18%, не более 17%, не более 16%, не более 15%, не более 14%, не более 13%, не более 12%, не более 11%, не более 10%, не более 9%, не более 8%, не более 7%, не более 6%, не более 5%, не более 4%, не более 3,5%, не более 3,0%, не более 2,5%, не более 2,0% или не более приблизительно 1,7% (мас./мас.) ковалентно прикрепленного DBCO. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген содержит менее 20% (мас./мас.) ковалентно прикрепленного DBCO. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения антиген содержит менее 10% (мас./мас.) ковалентно прикрепленного DBCO. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген содержит приблизительно от 1,5 до 20%, от 3% до 20%, от 3% до 18%, от 3% до 16%, от 3% до 14%, от 3% до 12%, от 3% до 10%, от 3% до 8%, от 3% до 6% или от 3% до 4%, или от 1,5 до 9% (мас./мас.) ковалентно прикрепленного DBCO.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген содержит полисахарид, который дополнительно содержит группу DBCO и содержит по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 11%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 13%, по меньшей мере 14%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 16%, по меньшей мере 17%, по меньшей мере 18%, по меньшей мере 19% или по меньшей мере 20% молекул DBCO на 100 повторяющихся звеньев полисахарида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген содержит более 3% молекул DBCO на 100 повторяющихся звеньев полисахарида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген содержит не более 20%, не более 19%, не более 18%, не более 17%, не более 16%, не более 15%, не более 14%, не более 13%, не более 12%, не более 11%, не более 10%, не более 9%, не более 8%, не более 7%, не более 6%, не более 5%, не более 4% или не более 3,5% ковалентно прикрепленных молекул DBCO на 100 повторяющихся звеньев полисахарида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген содержит менее 20% ковалентно прикрепленного DBCO на повторяющееся звено полисахарида. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения антиген содержит менее 10% ковалентно прикрепленных молекул DBCO на 100 повторяющихся звеньев полисахарида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген содержит от приблизительно 3% до 20%, от 3% до 18%, от 3% до 16%, от 3% до 14%, от 3% до 12%, от 3% до 10%, от 3% до 8%, от 3% до 6% или от 3% до 4% ковалентно прикрепленных молекул DBCO на 100 повторяющихся звеньев полисахарида.

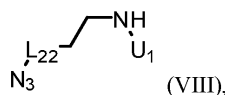
Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антиген, содержащий полисахарид, необязательно представляет собой олигосахарид. Олигосахариды имеют низкое количество повторяющихся звеньев (обычно 5-15 повторяющихся звеньев), и их обычно получают синтетическим путем или путем гидролиза полисахаридов с более высокой молекулярной массой.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антиген, содержащий полисахарид, имеет молекулярную массу от приблизительно 10 кДа до приблизительно 10000 кДа. В других таких вариантах реализации полисахарид имеет молекулярную массу от 50 кДа до 10000 кДа. В других таких вариантах реализации полисахарид имеет молекулярную массу от 50 кДа до 10000 кДа; от 50 кДа до 9500 кДа; от 50 кДа до 9000 кДа; от 50 кДа до 8500 кДа; от 50 кДа до 8000 кДа; от 50 кДа до 7500 кДа; от 50 кДа до 7000 кДа; от 50 кДа до 6500 кДа; от 50 кДа до 6000 кДа; от 50 кДа до 5500 кДа; от 50 кДа до 5000 кДа; от 50 кДа до 4500 кДа; от 50 кДа до 4000 кДа; от 50 кДа до 3500 кДа; от 50 кДа до 3000 кДа; от 50 кДа до 2500 кДа; от 50 кДа до 2000 кДа; от 50 кДа до 1750 кДа; от 50 кДа до 1500 кДа; от 50 кДа до 1250 кДа; от 50 кДа до 1000 кДа; от 50 кДа до 750 кДа; от 50 кДа до 500 кДа; от 100 кДа до 10000 кДа; от 100 кДа до 9500 кДа; от 100 кДа до 9000 кДа; от 100 кДа до 8500 кДа; от 100 кДа до 8000 кДа; от 100 кДа до 7500 кДа; от 100 кДа до 7000 кДа; от 100 кДа до 6500 кДа; от 100 кДа до 6000 кДа; от 100 кДа до 5500 кДа; от 100 кДа до 5000 кДа; от 100 кДа до 4500 кДа; от 100 кДа до 4000 кДа; от 100 кДа до 3500 кДа; от 100 кДа до 3000 кДа; от 100 кДа до 2500 кДа; от 100 кДа до 2000 кДа; от 100 кДа до 1750 кДа; от 100 кДа до 1500 кДа; от 100 кДа до 1250 кДа; от 100 кДа до 1000 кДа; от 100 кДа до 750 кДа; от 100 кДа до 500 кДа; от 200 кДа до 10000 кДа; от 200 кДа до 9500 кДа; от 200 кДа до 9000 кДа; от 200 кДа до 8500 кДа; от 200 кДа до 8000 кДа; от 200 кДа до 7500 кДа; от 200 кДа до 7000 кДа; от 200 кДа до 6500 кДа; от 200 кДа до 6000 кДа; от 200 кДа до 5500 кДа; от 200 кДа до 5000 кДа; от 200 кДа до 4500 кДа; от 200 кДа до 4000 кДа; от 200 кДа до 3500 кДа; от 200 кДа до 3000 кДа; от 200 кДа до 2500 кДа; от 200 кДа до 2000 кДа; от 200 кДа до 2000 кДа; от 200 кДа до 1750 кДа; от 200 кДа до 1500 кДа; от 200 кДа до 1250 кДа; от 200 кДа до 1000 кДа; от 200 кДа до 750 кДа; или от 200 кДа до 500 кДа. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов предусмотрено как вариант реализации настоящего изобретения.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антиген, содержащий полисахарид, имеет молекулярную массу от приблизительно 50 кДа до приблизительно 1400 кДа. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антиген, содержащий полисахарид, имеет молекулярную массу от приблизительно 500 кДа до приблизительно 3000 кДа.

Азидосодержащие "рукоятки".

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химическая "рукоятка" содержит фрагмент, который обеспечивает реакцию "клик-химии" с соответствующей группой на остатке нпАК полипептида. Один из таких фрагментов представляет собой азидогруппу, которая способна вступать в реакцию с остатком нпАК, содержащим алкиновую группу или фосфин, на полипептиде. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения азидогруппа на антигене содержит структуру формулы VIII

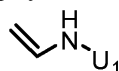


L_{22} представляет собой связь, алкил или полиалкилокси и

U_1 независимо представляет собой по меньшей мере один фрагмент антигена.

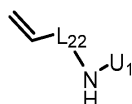
Алкенсодержащие "рукоятки".

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химическая "рукоятка" содержит фрагмент, который обеспечивает реакцию "клик-химии" с соответствующей группой на остатке нпАК полипептида. Один из таких фрагментов представляет собой алкеновую группу, которая способна вступать в реакцию с остатком нпАК, содержащим 1,2,4,5-тетразиновую группу. В простейших вариантах такой фрагмент представляет собой винильную группу. В одном таком варианте реализации алкеновая группа на антигене содержит структуру формулы IX



где U_1 независимо представляет собой по меньшей мере один фрагмент антигена.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения алкеновая группа на антигене содержит структуру формулы IXa



где L_{22} представляет собой C_{1-10} алкил или $-(CH_2CH_2O)_{1-10}-$ и

U_1 независимо представляет собой по меньшей мере один фрагмент антигена.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ получения гликоконъюгата, включающий: (a) обеспечение нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-носитель, причем указанная нуклеиновая кислота содержит подавляющий кодон; (b) создание реакционной смеси путем комбинирования нуклеиновой кислоты с бесклеточным бактериальным экстрактом, содержащим 4-азидометилфенилаланин (pAMF), тРНК, комплементарную подавляющему кодону, и аминоксил-тРНК-

синтетазу; (с) инкубацию реакционной смеси (b) в условиях, достаточных для селективного встраивания рАМФ в сайт, соответствующий подавляющему кодону, в белке-носителе; и (d) конъюгирование рАМФ с полисахаридом с помощью [2+3] циклоприсоединения. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения [2+3] циклоприсоединение включает реакцию между азидной и алкиновой группами. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения этап (с) включает инкубацию реакционной смеси при температуре ниже 20°C. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает очистку белка-носителя сразу после (с). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения подавляющий кодон селективно заменен в кодоне 25, 34, 38, 40, 213, 215, 228, 245, 265, 386, 523 или 527 из SEQ ID NO: 2. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения реакционная смесь в (b) дополнительно содержит биологические компоненты, необходимые для синтеза белка. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения тРНК в (b) способна нагружаться рАМФ. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминоксил-тРНК-синтетаза в (b) предпочтительно аминокислотилирует тРНК с рАМФ по сравнению с 20 природными аминокислотами. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения алкиновая группа содержит фрагмент DBCO, конъюгированный с полисахаридом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид представляет собой капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* или *Streptococcus agalactiae*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид представляет собой капсульный полисахарид серотипа *Streptococcus pneumoniae*, выбранного из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F или любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид, происходящий из одного из шести серотипов *Porphyromonas gingivalis* (например, K1, K2, K3, K4, K5 и/или K6). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен гликоконъюгат, полученным способом, включающим этапы (a)-(d). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения рАМФ конъюгируют с полисахаридом с получением конъюгата формулы X, Xa, XI или XIa. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложена вакцина, содержащая гликоконъюгат, полученный на этапах (a)-(d).

Конъюгаты полипептид-антиген.

В настоящем документе описаны конъюгаты полипептид-антиген, которые могут образовываться между иммуногенным полипептидом, описанным выше, и антигеном, описанным выше. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгаты полипептид-антиген содержат улучшенный белок-носитель и антиген, причем указанный антиген соединен с нпАК в улучшенном белке-носителе. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антиген не соединен с природной аминокислотой иммуногенного полипептида. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген не соединен с лизином в иммуногенном полипептиде. Например, антиген не соединен с лизином в SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген соединен только с одной или более нпАК иммуногенного полипептида. Одна или более нпАК необязательно расположены на N-конце, C-конце или в любом местоположении между N- и C-концевыми частями иммуногенного полипептида. В некоторых случаях антиген соединен только с одной или более рАМФ в иммуногенном полипептиде. Например, антиген соединен только с одной или более рАМФ в SEQ ID NO: 1.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере один антиген соединен с аминокислотой, расположенной вне Т-клеточного эпитопа иммуногенного полипептида. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения ни один антиген не соединен с аминокислотой, расположенной в Т-клеточном эпитопе иммуногенного полипептида.

Аминокислоты, отобранные для конъюгации в иммуногенном полипептиде, необязательно содержат один или более поверхностно-доступных остатков на основании кристаллической структуры (или другой трехмерной структуры, такой как структура по данным ЯМР) полипептида. Дополнительно или альтернативно, для иммуногенного полипептида проводят комплексную замену природных аминокислот нпАК с последующей конъюгацией, чтобы оценить полезность конкретных сайтов на полипептиде для конъюгации.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антиген опосредовано конъюгирован с улучшенным белком-носителем (например, улучшенный белок-носитель или антиген сначала комбинируют с реакционноспособным линкером, и затем комбинируют аддукт улучшенный белок-носитель-линкер или антиген-линкер с антигеном или улучшенным белком-носителем, соответственно). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген непосредственно конъюгирован с улучшенным белком-носителем (например, путем комбинирования двух компонентов, содержащих улучшенный белок-носитель и антиген, вместе в одной реакции). Если конъюгат содержит линкер, можно применять любую подходящую группу. Например, конъюгат может содержать линкер, выбранный из адипиновой кислоты, дигидразида адипиновой кислоты (ADH), β-пропионамида, нитрофенилэтиламина, галоацил галидов, гликозидных связей, 6-аминокапроновой кислоты, N-сукцинимидил-3-(2-

пиридилдитио)пропионата (SPDP), фрагментов C₄-C₁₂ и т.д. Также можно применять линкеры, полученные из групп DBCO и DIFO, обсуждавшихся выше, например, включая остаток диарилциклооктинового фрагмента, такой как диарилциклооктен. Линкер обычно будет прикреплен к антигену для конъюгации, а не прикреплен к носителю.

Поскольку конъюгаты антиген-полипептид могут образовывать большие поперечно сшитые комплексы, непосредственное измерение или точное определение местоположения некоторых или всех конъюгаций и других физических признаков может быть невозможным при использовании имеющихся аналитических способов. Однако следует понимать, что такие местоположения или физические признаки могут быть надежно выведены из дизайна синтетической схемы, ее ожидаемого продукта и аналитических результатов, соответствующих этому ожиданию.

Реакция конъюгации антиген-полипептид.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген конъюгирован с улучшенным белком-носителем с применением любого химического способа, подходящего для конъюгирования природных аминокислот и химических "ручек", описанных в настоящем документе. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, катализируемое медью (I) алкин-азидное циклоприсоединение (CuAAC), облегчаемое напряжением азид-алкиновое циклоприсоединение (SPAAC) и тетразин-алкеновое лигирование. Поскольку все эти реакции относятся к "клик-химии", они могут быть проведены в водном растворе. Также можно применять лигирование по Штаудингеру между фосфином и азидом.

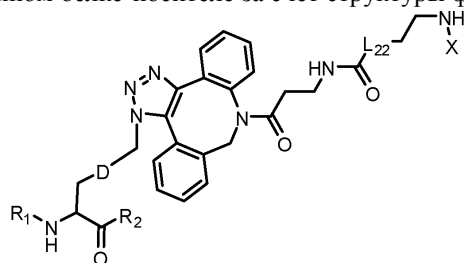
CuAAC.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген конъюгирован с улучшенным белком-носителем с помощью катализируемого медью (I) алкин-азидного циклоприсоединения (CuAAC). В одной модификации этого варианта реализации улучшенный белок-носитель содержит пропаргилсодержащую нпАК, и антиген содержит азидогруппу. Согласно другой модификации этого варианта реализации улучшенный белок-носитель содержит азидосодержащую нпАК, и антиген содержит пропаргильную группу. Подходящие условия для CuAAC-конъюгации биомолекул могут быть найдены, например, в Presolski et al. *Curr Protoc Chem Biol.* 2011; 3(4): 153-162, все из которых включают добавление Cu²⁺. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения реакцию ускоряют путем добавления Cu-координирующего лиганда, такого как THPTA. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения реакцию ускоряют путем добавления восстанавливающего агента для поддержания окисленного состояния Cu²⁺. Подходящие восстанавливающие агенты включают аскорбат натрия, DTT или TCEP.

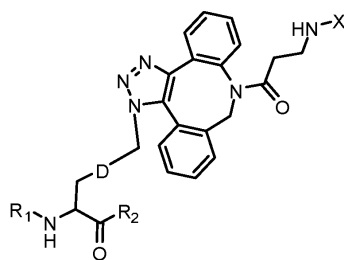
SPAAC.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген конъюгирован с улучшенным белком-носителем за счет облегчаемого напряжением азид-алкинового циклоприсоединения (SPAAC). В одной модификации этих вариантов реализации улучшенный белок-носитель содержит азидосодержащую нпАК, и антиген содержит циклооктиновую группу. Согласно другой модификации этих вариантов реализации улучшенный белок-носитель содержит циклооктинсодержащую нпАК, и антиген содержит азидогруппу. Поскольку SPAAC не требует дополнительных катализаторов или кофакторов, эту реакцию можно проводить в дистиллированной воде, 0,9% солевом растворе, ФСБ или физиологическом забуференном растворе. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения улучшенный белок-носитель и антиген комбинируют в массовом соотношении 1,20:1 (мас./мас.).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген соединен с азидосодержащей нпАК в улучшенном белке-носителе за счет структуры формулы X или Xa



(формула X)

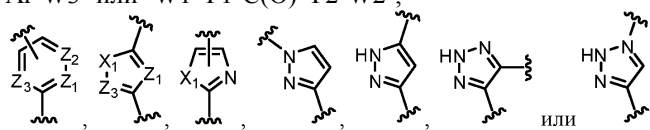


(формула Xa)

где R_1 независимо представляет собой H, формил или по меньшей мере одну аминокислоту улучшенного белка-носителя;

R_2 независимо представляет собой OH или по меньшей мере одну аминокислоту улучшенного белка-носителя;

D представляет собой $-Ag-W3-$ или $-W1-Y1-C(O)-Y2-W2-$;



Ag представляет собой

каждый из $W1$, $W2$ и $W3$ независимо представляет собой одинарную химическую связь или низший алкилен;

каждый $X1$ независимо представляет собой $-NH-$, $-O-$ или $-S-$;

каждый $Y1$ независимо представляет собой одинарную химическую связь, $-NH-$ или $-O-$;

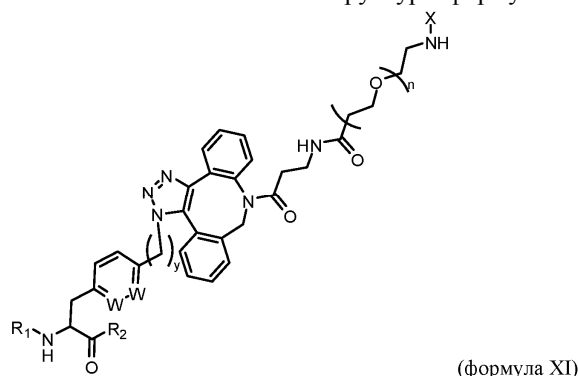
каждый $Y2$ независимо представляет собой одинарную химическую связь, $-NH-$, $-O-$ или N-соединенный или C-соединенный пирролидинилен;

один из $Z1$, $Z2$ и $Z3$ представляет собой $-N-$, и другие из $Z1$, $Z2$ и $Z3$ независимо представляют собой $-CH-$;

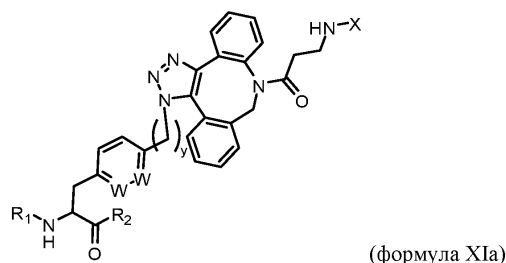
$L22$ независимо представляет собой связь, алкил или полиалкилокси и

X представляет собой по меньшей мере один полиол полисахарида.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген соединен с азидосодержащей нпАК в улучшенном белке-носителе за счет структуры формулы XI или XIa



(формула XI)



(формула XIa)

где R_1 независимо представляет собой H, формил или по меньшей мере одну аминокислоту улучшенного белка-носителя;

R_2 независимо представляет собой OH или по меньшей мере одну аминокислоту улучшенного белка-носителя;

W представляет собой C или N;

u составляет по меньшей мере 1;

n составляет по меньшей мере 1 и

X независимо представляет собой по меньшей мере один полиол капсульного полисахарида.

Значение "n" обсуждалось выше в отношении "PEGn". Значение "u" находится в пределах диапазона 1-10, в соответствии с формулой XII, и предпочтительно представляет собой низший алкилен, например, C_1 - C_4 -алкилен.

Тетразин-алкиновое лигирование.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антиген конъюгирован с улучшенным белком-носителем с помощью тетразин-алкинового лигирования. В одной модификации этих вариантов реализации улучшенный белок-носитель содержит 1,2,4,5-тетразинсодержащую нпАК, и антиген содержит алкеновую группу. Сходно с реакциями SPAAC, тетразин-алкиновое лигирование происходит без добавления кофакторов, и эту реакцию можно проводить в дистиллированной воде, 0,9% солевом растворе, ФСБ или физиологическом забуференном растворе.

Характеристика конъюгации.

Способы (гель-фильтрация, диафильтрация, диализ).

После реакции конъюгации представляющие интерес конъюгаты антиген-улучшенный белок-носитель необязательно очищают в соответствии со способами, которые включают, но не ограничиваются ими, хроматографию (например, ионообменную, аффинную, гидрофобного взаимодействия и гелепроникающую хроматографию), исключение по размеру молекулы (диализ, диафильтрацию, фильтрацию в тангенциальном потоке, глубинную фильтрацию), электрофоретические методики (например, препаративное изоэлектрическое фокусирование), дифференциальную растворимость (например, осаждение сульфатом аммония) или электрофорез в ДСН-ПААГ (см., например, *Protein Purification*, J.C. Janson & Lars Ryden, редакторы, VCH Publishers, New York, 1989) для получения по существу чистых конъюгатов.

Конъюгированные белки, представляющие интерес, необязательно количественно определяют в соответствии со способами, которые включают, но не ограничиваются ими, микроструйный электрофорез, гель-электрофорез, Вестерн-блоттинг, иммуноанализы (например, ИФА) и другие количественные способы исследований, чтобы оценить активность конъюгированного белка.

Примерные физические параметры.

Одним важным параметром для конъюгатов антиген-улучшенный белок-носитель является молекулярная масса конъюгата. Поскольку конъюгаты необязательно содержат переменные количества молекул антигена, конъюгированных с каждой молекулой белка, а также переменные поперечные сшивки высшего порядка (например, связи белок-антиген-белок), конечная молекулярная масса конъюгата необязательно может быть предсказана на основании входных молекулярных масс улучшенных белков-носителей и антигенов. Во многих литературных источниках (например, Howard et al. *Immunology*. 1971(21): 535-545 и Kabat & Bezer. *Arch Biochem Biophys*. 1958(78) 306-18) указано, что размер антигенных частиц оказывает существенное влияние на иммуногенность. В Wessels et al. (1998) *Infect Immun* 66:2186-92 сообщается, что размер конъюгата и поперечное сшивание могут влиять на иммуногенность и защитную эффективность конъюгатов GBS типа III.

В целом конъюгаты могут быть получены путем соединения белка-носителя с антигеном, который имеет одну или более "ручек" на антиген. Если антиген содержит несколько "ручек", то может образовываться поперечно сшитый конъюгат, содержащий связи белок-антиген-белок. Если антиген содержит одну "рукоятку" (например, концевую группу в полисахариде), то такая решетка конъюгата не образуется, поскольку один антиген не может связываться с несколькими молекулами белка-носителя. Поперечно сшитые конъюгаты являются предпочтительными согласно настоящему изобретению (в частности, для пневмококка), когда желательны более высокие молекулярные массы, и, соответственно, предпочтительными являются антигены с несколькими "рукоятками".

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат антиген-улучшенный белок-носитель имеет молекулярную массу приблизительно 750 кДа, приблизительно 1000 кДа, приблизительно 1500 кДа, приблизительно 2000 кДа, приблизительно 2500 кДа, приблизительно 3000 кДа, приблизительно 3500 кДа, приблизительно 4000 кДа, приблизительно 4500 кДа, приблизительно 5000 кДа, приблизительно 5500 кДа, приблизительно 6000 кДа, приблизительно 6500 кДа, приблизительно 7000 кДа, приблизительно 7500 кДа или приблизительно 8000 кДа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат антиген-улучшенный белок-носитель имеет молекулярную массу по меньшей мере приблизительно 750 кДа, по меньшей мере приблизительно 1000 кДа или по меньшей мере приблизительно 1500 кДа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат антиген-улучшенный белок-носитель имеет молекулярную массу от приблизительно 750 кДа до приблизительно 2800 кДа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат антиген-улучшенный белок-носитель имеет молекулярную массу от приблизительно 800 кДа до приблизительно 2800 кДа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат антиген-улучшенный белок-носитель имеет молекулярную массу от приблизительно 850 до приблизительно 2800 кДа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат антиген-улучшенный белок-носитель имеет молекулярную массу от приблизительно 900 кДа до приблизительно 2800 кДа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат антиген-улучшенный белок-носитель имеет молекулярную массу от приблизительно 950 кДа до приблизительно 2800 кДа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат антиген-улучшенный белок-носитель имеет молекулярную массу от приблизительно 1000 кДа до приблизительно 2800 кДа.

Другим важным параметром для конъюгированных вакцин согласно настоящему изобретению является соотношение антигена (например, полисахарида) и иммуногенного полипептидного носителя (например, белков-носителей согласно настоящему изобретению). Если использовать конъюгат полисахарид-белок-носитель в качестве иллюстрации общего принципа, то соотношение полисахарида и белка (PS:PC) очищенного конъюгата обычно выражено как соотношение масса-масса (мас./мас.). Такие соотношения обычно выражают как включающие любой свободный полисахарид, который очищен вместе с отдельными гликоконъюгатами. Более высокие соотношения PS:PC конъюгатов полисахарид-белок-носитель позволяют доставлять больше полисахаридного антигена с меньшим количеством улучшенного

белка-носителя. Для пневмококковых конъюгированных вакцин это соотношение обычно находится в пределах диапазона 0,3-3,0, но оно может варьироваться в зависимости от серотипа и аспектов химических реакций конъюгации (приложение 2: рекомендации по получению и контролю пневмококковых конъюгированных вакцин; Серия технических докладов ВОЗ, № 927, 2005 г.). Соотношение для коммерческой вакцины "Превнар-13" составляет 0,9 (см. вкладыш в упаковку для "Превнар 13", версия М/2016, pg. 24; www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/vaccines/approvedproducts/ucm201669.pdf), это указывает на то, что предпочтительный диапазон составляет 1,0-3,0. При изготовлении вакцины с более чем 13 серотипами может быть предпочтительным достичь соотношения 1,5-3,0, и особенно предпочтительным является применение соотношения от приблизительно 1,5 до приблизительно 2,0. Это может быть среднее соотношение для всех конъюгатов в композиции, которое может быть достигнуто за счет обеспечения того, что все индивидуальные конъюгаты имеют это соотношение, или за счет обеспечения того, чтобы любые конъюгаты вне этого диапазона с отклонением соотношения в одну сторону сбалансированы конъюгатом вне этого диапазона с отклонением соотношения в другую сторону.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения соотношение (мас./мас.) полисахарида и улучшенного белка-носителя в конъюгате полисахарид-улучшенный белок-носитель составляет от 0,5 до 4,0 (например, приблизительно 0,5, приблизительно 0,6, приблизительно 0,7, приблизительно 0,8, приблизительно 0,9, приблизительно 1,0, приблизительно 1,1, приблизительно 1,2, приблизительно 1,3, приблизительно 1,4, приблизительно 1,5, приблизительно 1,6, приблизительно 1,7, приблизительно 1,8, приблизительно 1,9, приблизительно 2,0, приблизительно 2,1, приблизительно 2,2, приблизительно 2,3, приблизительно 2,4, приблизительно 2,5, приблизительно 2,6, приблизительно 2,7, приблизительно 2,8, приблизительно 2,9, приблизительно 3,0, приблизительно 3,1, приблизительно 3,2, приблизительно 3,3, приблизительно 3,4, приблизительно 3,5, приблизительно 3,6, приблизительно 3,7, приблизительно 3,8, приблизительно 3,9 или приблизительно 4,0). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения соотношение (мас./мас.) PS:PC в конъюгате белка-носителя составляет от 0,7 до 2,8. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения соотношение (мас./мас.) PS:PC в конъюгате белка-носителя составляет от 1,0 до 2,8. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения соотношение (мас./мас.) PS:PC в конъюгате белка-носителя составляет по меньшей мере 0,8, по меньшей мере 0,9, по меньшей мере 1,0, по меньшей мере 1,1, по меньшей мере 1,2, по меньшей мере 1,3, по меньшей мере 1,4 или по меньшей мере 1,5. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения соотношение полисахарида и улучшенного белка-носителя в конъюгате полисахарид-улучшенный белок-носитель составляет более 0,9 (мас./мас.). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения соотношение полисахарида и улучшенного белка-носителя в конъюгате полисахарид-улучшенный белок-носитель составляет от приблизительно 0,9 до приблизительно 3,0 (мас./мас.). В результате смешивания отдельных конъюгатов с такими соотношениями PS:PC может быть получена комбинация, имеющая желаемое общее соотношение PS:PC.

Присутствие загрязнений (свободный полисахарид, С-поли).

Важным параметром для конъюгатов полисахарид-улучшенный белок-носитель является уровень свободного полисахарида, который не конъюгирован ковалентно с улучшенным белком-носителем, но тем не менее присутствует в композиции конъюгата. Например, в некоторых случаях свободный полисахарид не связан ковалентно с конъюгатом полисахарид-улучшенный белок-носитель (т.е. не связан ковалентно, не адсорбирован в него или не захвачен в него, или не захвачен с ним). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгаты полисахарид-улучшенный белок-носитель, описанные в настоящем документе, содержат менее приблизительно 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% или 10% свободного полисахарида по сравнению с общим количеством полисахарида. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения конъюгаты полисахарид-улучшенный белок-носитель, описанные в настоящем документе, содержат менее приблизительно 10% свободного полисахарида по сравнению с общим количеством полисахарида. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения конъюгаты полисахарид-улучшенный белок-носитель, описанные в настоящем документе, содержат менее приблизительно 25% свободного полисахарида по сравнению с общим количеством полисахарида. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения конъюгаты полисахарид-улучшенный белок-носитель, описанные в настоящем документе, содержат менее приблизительно 30% свободного полисахарида по сравнению с общим количеством полисахарида. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения конъюгаты полисахарид-улучшенный белок-носитель, описанные в настоящем документе, содержат менее приблизительно 15% свободного полисахарида по сравнению с общим количеством полисахарида. Свободный полисахарид необязательно измеряют с помощью любого подходящего способа, включая способ в Lei et al. (Dev Biol (Basel). 2000; 103:259-64), в котором для различения пулов полисахарида применяется метод осаждения на основе HCl/дезоксихолата. В предпочтительных композициях количество неконъюгированного бактериального полисахарида составляет менее 5% по массе от общего количества бактериального полисахарида в композиции. В композиции с несколькими пневмококковыми конъюгатами предпочтительно количество неконъюгированного бактериального полисахарида для каждого серотипа составляет менее 5 мас.% от общего количества бактериального полисахарида этого серотипа в композиции.

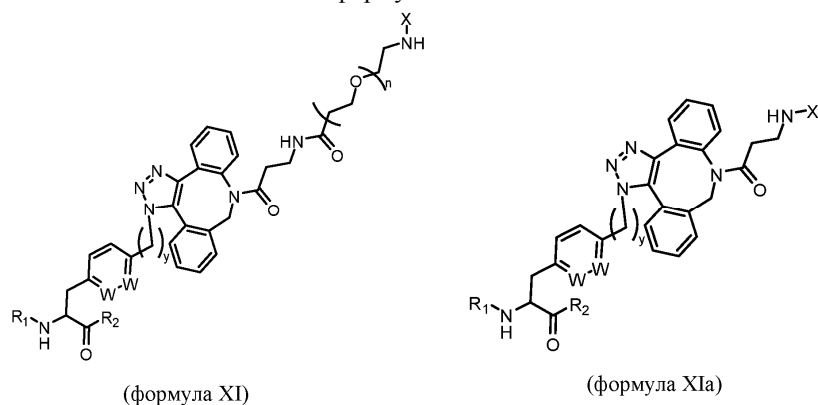
Важным параметром для конъюгатов пневмококкового капсульного полисахарида с улучшенным белком-носителем является уровень загрязнения С-полисахаридом, присутствующим в препаратах

конъюгата. С-полисахарид является иммунологически непродуктивным, но высокоиммуногенным компонентом клеточной стенки *S. pneumoniae*, который "пассивно присутствует" во многих способах получения пневмококкового капсульного полисахарида. Поскольку иммунные ответы на С-полисахарид обычно не приводят к выработке нейтрализующих антител, загрязнение С-полисахаридом может препятствовать точным оценкам эффективности конъюгата антиген-улучшенный белок-носитель при введении животным.

Уровень С-полисахарида необязательно показывают с помощью общего кислотного гидролиза препарата полисахаридного конъюгата, хроматографии гидролизата и кондуктометрического детектирования холина. Согласно другому варианту негидролизованый полисахарид анализируют с помощью ЯМР для определения холина. В методике ЯМР для расчета содержания С-полисахарида используют соотношение сигнала холина и сигнала метила рамнозы (для капсульных полисахаридов, содержащих рамнозу; или другого сигнала для других капсульных полисахаридов). В хроматографическом методе для расчета содержания С-полисахарида используют соотношение сигнала холина и либо содержания полисахарида, определенного с помощью количественного кондуктометрического исследования, либо одного из пиков капсульного полисахаридного компонента. В любом методе стандарты известных концентраций холина позволяют непосредственно рассчитать уровень холина, присутствующего в полисахаридном препарате, после установления концентрации холина концентрацию С-полисахарида в препарате полисахарида определяют, пользуясь теоретической повторяющейся структурой С-полисахарида [Hermans, et al., Reel. Trav. Chim. Pays-Bas, 107, 600 (1988)].

Концентрации полисахаридов в образцах конъюгата полисахарид-улучшенный белок-носитель необязательно измеряют с помощью различных методик, например, общую концентрацию полисахарида необязательно определяют с помощью общего гидролиза полисахарида и измерения концентрации конкретного моносахарида. Степень загрязнения С-полисахаридом (мас./мас.) определяют, сравнивая концентрацию С-полисахарида с общей концентрацией полисахарида. Приемлемыми считаются уровни С-полисахарида ниже 3% (мас./мас.) от общего количества полисахарида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения уровни С-полисахарида ниже 1%.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен конъюгат, содержащий белок-носитель и антиген, причем указанный антиген соединен с нпАК в белке-носителе. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения белок-носитель сохраняет эпитоп связывания Т-клеток анатоксина дифтерии (DT), анатоксина столбняка (TT), белка D (PD) *Haemophilus influenzae*, комплекса белков наружной мембраны менингококка серогруппы В (ОМРС) или CRM197. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нпАК представляет собой 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановую кислоту (pAF), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановую кислоту (pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановую кислоту, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановую кислоту, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановую кислоту, 2-амино-5-азидопентановую кислоту или 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановую кислоту и любую их комбинацию. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нпАК не находится в эпитопе, активирующем Т-клетки, белка-носителя. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нпАК заменяет один или более остатков лизина в белке-носителе. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения кажущаяся молекулярная масса конъюгата составляет от приблизительно 900 кДа до приблизительно 5 МДа. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения один или более замененных остатков лизина выбраны из группы, состоящей из K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K265, K386, K523 и K527, а также любой их комбинации из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нпАК не находится в эпитопе, активирующем Т-клетки, белка-носителя. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген соединен с белком-носителем в соответствии с формулой XI или XIa

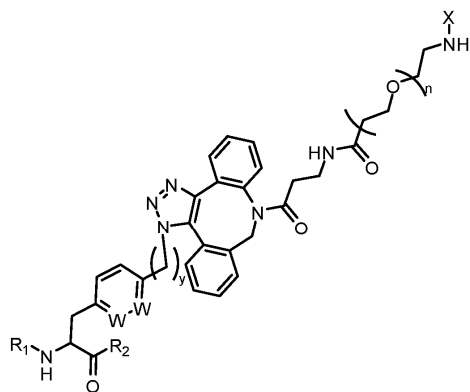


где R₁ независимо представляет собой H, формил или по меньшей мере одну аминокислоту белка-носителя;

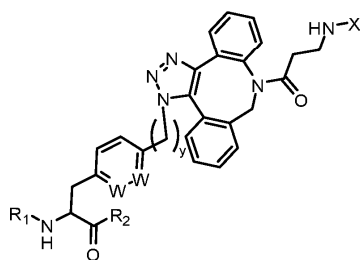
R_2 независимо представляет собой ОН или по меньшей мере одну аминокислоту белка-носителя;
 W представляет собой С или N;
 y составляет по меньшей мере 1;
 n составляет по меньшей мере 1 и
 X независимо представляет собой по меньшей мере один полиол капсульного полисахарида.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой полисахарид. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид представляет собой капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* или *Streptococcus agalactiae*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид представляет собой капсульный полисахарид серотипа *Streptococcus pneumoniae*, выбранного из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F, а также любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид, происходящий из одного из шести серотипов *Porphyromonas gingivalis* (например, K1, K2, K3, K4, K5 и/или K6).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ выявления оптимального размещения антигена на белке-носителе для улучшения иммунного ответа хозяина, включающий: i) введение в белок-носитель замены нпАК; ii) конъюгирование полисахарида с нпАК с образованием гликоконъюгата; и iii) измерение кажущейся молекулярной массы гликоконъюгата. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения замена нпАК не находится в эпитопе, активирующем Т-клетки, белка-носителя. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения белок-носитель сохраняет эпитоп связывания Т-клеток анатоксина дифтерии (DT), анатоксина столбняка (TT), белка D (PD) *Haemophilus influenzae*, комплекса белков наружной мембраны менингококка серогруппы В (OMPC) или CRM197. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой полисахарид. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере один или более полисахаридов конъюгированы с белком-носителем в соответствии с формулой XI или XIa



(формула XI)



(формула XIa)

где R_1 независимо представляет собой H, формил или по меньшей мере одну аминокислоту белка-носителя;

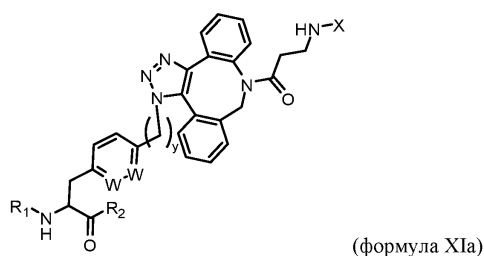
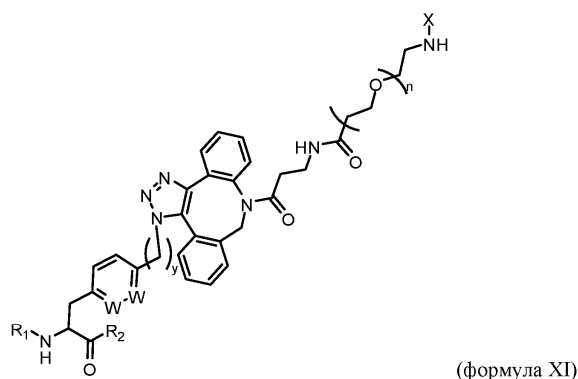
R_2 независимо представляет собой ОН или по меньшей мере одну аминокислоту белка-носителя и
 X независимо представляет собой по меньшей мере один полиол капсульного полисахарида.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна или более замененных неприродных аминокислот представляют собой рАМФ. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен белок-носитель с оптимальным расположением антигена, выявленным с помощью способа согласно i)-iii). Согласно другому варианту реализации замена введена по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 раз. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид представляет собой капсульный полисахарид бактерии. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения бактерия представляет собой *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* или *Streptococcus agalactiae*.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения бактерия представляет собой *Streptococcus pneumoniae*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид представляет собой капсульный полисахарид серотипа *Streptococcus pneumoniae*, выбранного из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F, а также любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид, происходящий из одного из шести серотипов *Porphyromonas gingivalis* (например, K1, K2, K3, K4, K5 и/или K6).

Модифицированные полипептиды и полисахариды.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен модифицированный полипептид, содержащий по меньшей мере одно соединение, или его соль, содержащее формулу XI или XIa



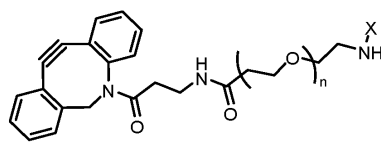
где R_1 независимо представляет собой H, формил или по меньшей мере одну аминокислоту белка-носителя;

R_2 независимо представляет собой OH или по меньшей мере одну аминокислоту белка-носителя и

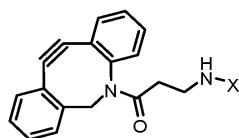
X независимо представляет собой по меньшей мере один полиол полисахарида.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения белок-носитель сохраняет эпитоп связывания Т-клеток анатоксина дифтерии (DT), анатоксина столбняка (TT), белка D (PD) *Haemophilus*, комплекса белков наружной мембраны менингококка серогруппы В (OMPС) или CRM197. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид представляет собой капсульный полисахарид вида бактерий. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вид бактерий представляет собой *Streptococcus pneumoniae*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вид бактерий представляет собой *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* или *Streptococcus agalactiae*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид представляет собой капсульный полисахарид серотипа *Streptococcus pneumoniae*, выбранного из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F, а также любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения R_1 и R_2 не являются аминокислотами, которые встречаются в Т-клеточном эпитопе белка-носителя. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид, происходящий из одного из шести серотипов *Porphyromonas gingivalis* (например, K1, K2, K3, K4, K5 и/или K6).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен модифицированный полисахарид, содержащий по меньшей мере одно соединение, или его соль, содержащее формулу VII или VIIa.



(формула VII)



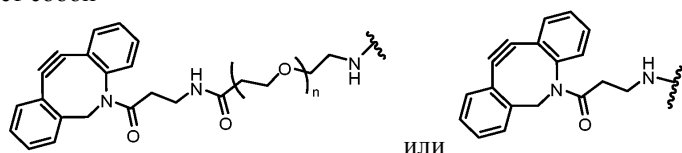
(формула VIIa)

в которых X независимо представляет собой по меньшей мере один полиол капсульного полисахарида и

n составляет по меньшей мере 1.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения модифицированный полисахарид формулы VII дополнительно конъюгирован с белком-носителем, содержащим по меньшей мере одну нпАК. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения модифицированный полисахарид конъюгирован с помощью [2+3] циклоприсоединения. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид происходит из вида бактерий. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вид бактерий представляет собой *Streptococcus pneumoniae*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вид бактерий представляет собой *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* или *Streptococcus agalactiae*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид представляет собой бактериальный капсульный полисахарид. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения молярное соотношение DBCO и повторяющегося звена капсульного полисахарида превышает 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения капсульный полисахарид получен из серотипа *Streptococcus pneumoniae*, включающего 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9B, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F, а также любую их комбинацию. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид, происходящий из одного из шести серотипов *Porphyromonas gingivalis* (например, K1, K2, K3, K4, K5 и/или K6).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен модифицированный полисахарид в соответствии с $(A-X)_z-Y$, где A представляет собой



или

X независимо представляет собой по меньшей мере один полиол;

Y независимо представляет собой по меньшей мере один полиол полисахарида;

n составляет по меньшей мере 1 и

z больше 1.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид происходит из вида бактерий. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вид бактерий представляет собой *Streptococcus pneumoniae*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вид бактерий представляет собой *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* или *Streptococcus agalactiae*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид представляет собой бактериальный капсульный полисахарид. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения капсульный полисахарид представляет собой полисахарид серотипа *Streptococcus pneumoniae*, выбранный из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F, а также любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид, происходящий из одного из шести серотипов *Porphyromonas gingivalis* (например, K1, K2, K3, K4, K5 и/или K6). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид дополнительно конъюгирован с белком-носителем. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид конъюгирован с белком-носителем за счет связи формулы II. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения белок-носитель сохраняет эпитоп связывания Т-клеток CRM197. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид конъюгирован с помощью [2+3] циклоприсоединения. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения белок-носитель содержит одну или более не природных аминокислот. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения белок-носитель сохраняет эпитоп связывания Т-клеток анатоксина дифтерии (DT), анатоксина столбняка (TT), белка D (PD) *Haemophilus influenzae*, ком-

плекса белков наружной мембраны менингококка серогруппы В (ОМРС) или CRM197. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения белок-носитель дополнительно конъюгирован с антигеном. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения белок-носитель конъюгирован с антигеном за счет связи формулы II. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения соотношение (мас./мас.) полисахарида и белка-носителя (PS:PC) составляет от приблизительно 1,5 до приблизительно 4.

Композиции конъюгатов полипептид-антиген.

В настоящем документе описаны иммуногенные композиции, содержащие по меньшей мере один конъюгат улучшенный белок-носитель-антиген вместе с по меньшей мере одним вспомогательным веществом, причем указанный антиген конъюгирован с полипептидом за счет остатка нпАК в улучшенном белке-носителе. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложена вакцинная композиция, содержащая гликоконъюгат, описанный в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция конъюгированной вакцины, содержащая по меньшей мере один конъюгат улучшенный белок-носитель-антиген, описанный в настоящем документе, вызывает более низкое опосредуемое носителем подавление у субъекта по сравнению с композицией конъюгированной вакцины, содержащей нативный белок-носитель. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция конъюгированной вакцины, содержащая по меньшей мере один конъюгат улучшенный белок-носитель-антиген, описанный в настоящем документе, улучшает общий иммунный ответ и/или увеличивает зависимый от Т-клеток ответ у субъекта по сравнению с композицией конъюгированной вакцины, содержащей нативный белок-носитель.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммуногенная композиция содержит индивидуальный конъюгат белок-носитель-антиген (например, один серотип пневмококка). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммуногенная композиция содержит несколько конъюгатов белок-носитель-антиген (например, несколько серотипов пневмококка). Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения несколько конъюгатов белок-носитель-антиген необязательно содержат: (а) несколько антигенов, конъюгированных с общим улучшенным белком-носителем; или (б) несколько антигенов, конъюгированных с различными улучшенными белками-носителями. Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения несколько конъюгатов улучшенный белок-носитель-антиген содержат антигены, происходящие из разных серотипов одного и того же организма (например, *S. pneumoniae*). Если композиция содержит несколько различных антигенов (например, капсульный полисахарид из нескольких серотипов пневмококка или из нескольких серогрупп менингококка), предпочтительно для каждого антигена применяют один и тот же тип белка-носителя, например, каждый антиген индивидуально конъюгирован с одним и тем же нпАК-содержащим вариантом CRM197, и отдельные конъюгаты антиген-белок затем комбинируют для получения полиантигенной композиции.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения общее (мас./мас.) соотношение полисахаридов всех серотипов и белка-носителя (PS:PC) в поливалентной композиции конъюгатов, содержащих серотипические полисахариды, находится в определенном диапазоне. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения соотношение (мас./мас.) полисахарида и улучшенного белка-носителя в конъюгате полисахарид-улучшенный белок-носитель (или в общей поливалентной композиции) составляет от 0,5 до 4,0 (например, приблизительно 0,5, приблизительно 0,6, приблизительно 0,7, приблизительно 0,8, приблизительно 0,9, приблизительно 1,0, приблизительно 1,1, приблизительно 1,2, приблизительно 1,3, приблизительно 1,4, приблизительно 1,5, приблизительно 1,6, приблизительно 1,7, приблизительно 1,8, приблизительно 1,9, приблизительно 2,0, приблизительно 2,1, приблизительно 2,2, приблизительно 2,3, приблизительно 2,4, приблизительно 2,5, приблизительно 2,6, приблизительно 2,7, приблизительно 2,8, приблизительно 2,9, приблизительно 3,0, приблизительно 3,1, приблизительно 3,2, приблизительно 3,3, приблизительно 3,4, приблизительно 3,5, приблизительно 3,6, приблизительно 3,7, приблизительно 3,8, приблизительно 3,9 или приблизительно 4,0). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения соотношение (мас./мас.) PS:PC в конъюгате белка-носителя (или в общей поливалентной композиции) составляет от 0,7 до 2,8. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения соотношение (мас./мас.) PS:PC в конъюгате белка-носителя (или в общей поливалентной композиции) составляет от 1,0 до 2,8. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения соотношение (мас./мас.) PS:PC в конъюгате белка-носителя (или в общей поливалентной композиции) составляет по меньшей мере 0,8, по меньшей мере 0,9, по меньшей мере 1,0, по меньшей мере 1,1, по меньшей мере 1,2, по меньшей мере 1,3, по меньшей мере 1,4 или по меньшей мере 1,5 (мас./мас.). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения соотношение полисахарида и улучшенного белка-носителя в конъюгате полисахарид-улучшенный белок-носитель (или в общей поливалентной композиции) составляет более 0,9 (мас./мас.). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения соотношение полисахарида и улучшенного белка-носителя в конъюгате полисахарид-улучшенный белок-носитель (или в общей поливалентной композиции) составляет от приблизительно 0,9 до приблизительно 3,0 (мас./мас.). Предпочтительная композиция содержит конъюгаты белок-сахарид капсульных полисахаридов из нескольких пневмококковых серотипов с общим массовым из-

бытком полисахарида по отношению к белку, например, соотношение белок:полисахарид составляет от 1:1,1 до 1:2 (мас./мас.), например, от 1:1,5 до 1:1,9.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения общий диапазон молекулярной массы конъюгатов полисахаридов всех серотипов и белка-носителя в поливалентной композиции конъюгатов, содержащих серотипические полисахариды и белок-носитель, находится в пределах конкретного диапазона. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгаты антиген-улучшенный белок-носитель имеют молекулярную массу приблизительно 750 кДа, приблизительно 1000 кДа, приблизительно 1500 кДа, приблизительно 2000 кДа, приблизительно 2500 кДа, приблизительно 3000 кДа, приблизительно 3500 кДа, приблизительно 4000 кДа, приблизительно 4500 кДа, приблизительно 5000 кДа, приблизительно 5500 кДа, приблизительно 6000 кДа, приблизительно 6500 кДа, приблизительно 7000 кДа, приблизительно 7500 кДа или приблизительно 8000 кДа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгаты антиген-улучшенный белок-носитель имеют молекулярную массу по меньшей мере приблизительно 750 кДа, по меньшей мере приблизительно 1000 кДа или по меньшей мере приблизительно 1500 кДа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгаты антиген-улучшенный белок-носитель имеют молекулярную массу от приблизительно 750 кДа до приблизительно 2800 кДа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгаты антиген-улучшенный белок-носитель имеют молекулярную массу от приблизительно 800 кДа до приблизительно 2800 кДа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгаты антиген-улучшенный белок-носитель имеют молекулярную массу от приблизительно 850 кДа до приблизительно 2800 кДа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгаты антиген-улучшенный белок-носитель имеют молекулярную массу от приблизительно 900 кДа до приблизительно 2800 кДа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгаты антиген-улучшенный белок-носитель имеют молекулярную массу от приблизительно 950 кДа до приблизительно 2800 кДа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгаты антиген-улучшенный белок-носитель имеют молекулярную массу от приблизительно 1000 кДа до приблизительно 2800 кДа.

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения иммуногенная композиция содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29 или по меньшей мере 30 различных конъюгатов улучшенный белок-носитель-антиген.

В любой композиции, которая содержит несколько конъюгатов (например, конъюгат для каждого из нескольких пневмококковых серотипов), в некоторых случаях может быть предпочтительным, чтобы белок-носитель в каждом конъюгате был идентичным. Согласно другому варианту реализации таких композиций с несколькими конъюгатами предпочтительным может быть применение более чем одного носителя. Несмотря на возможность конъюгации каждого антигена (например, капсульных полисахаридов из разных пневмококковых серотипов) с различным носителем, как правило, только 2-4 (например, 2 или 3) различных носителя будут представлены среди отдельных конъюгатов в таких композициях. В качестве иллюстрации, но не с целью ограничения, в композиции из 24 различных конъюгатов, каждый из которых содержит капсульные полисахариды из различного пневмококкового серотипа, некоторые, но не все из 24 конъюгатов, содержат первый белок-носитель (например, основанный на CRM197), и оставшиеся из 24 конъюгатов содержат второй белок-носитель (например, основанный на HiD). Соответственно, в качестве примера, но не с целью ограничения, 12, 13, 15 или 20 из 24 конъюгатов могут содержать первый белок-носитель, и 12, 11, 9 или 4, соответственно, остальных конъюгатов могут содержать второй белок-носитель.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере одно вспомогательное вещество содержит компоненты, подходящие для парентерального введения.

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере одно вспомогательное вещество необязательно содержит буфер или агент, корректирующий pH. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения буфер или агент, корректирующий pH, выбраны из группы, состоящей из бората натрия, фосфата натрия, цитрата натрия, сульфата аммония или сукцината и любой их комбинации. Другие примеры подходящих буферов включают кислоты, такие как уксусная, борная, лимонная, молочная, фосфорная и соляная кислоты; основания, такие как гидроксид натрия, ацетат натрия, лактат натрия и трис-гидрокси-метиламинометан; и буферы, такие как цитрат/декстроза, бикарбонат натрия и хлорид аммония. Буферы на основе гистидина также можно применять в иммуногенных композициях.

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере одно вспомогательное вещество необязательно содержит корректирующий тоничность агент для доведения осмоляльности композиции до приемлемого диапазона. Согласно конкретным вариантам реализации

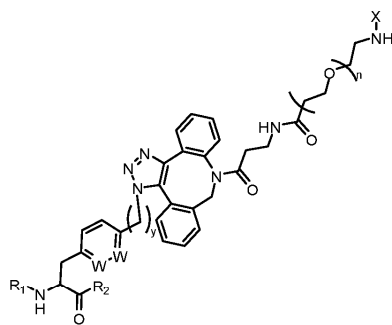
настоящего изобретения корректирующий тоничность агент выбран из группы, состоящей из хлорида натрия, декстрозы и глицерина и любой их комбинации. Другие примеры буферов, подходящих для парентерального введения, включают соли, содержащие катионы натрия, калия или аммония и анионы хлорида, цитрата, аскорбата, бората, фосфата, бикарбоната, сульфата, тиосульфата или бисульфита; подходящие соли включают хлорид калия, тиосульфат натрия, бисульфит натрия и сульфат аммония.

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере одно вспомогательное вещество необязательно содержит поверхностно-активный агент (поверхностно-активное вещество). Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения поверхностно-активный агент представляет собой монолаурат полиоксиэтиленсорбитана (полисорбат 20 или "твин 20"), моноолеат полиоксиэтиленсорбитана (полисорбат 80 или "твин 80"), Brij 35, тритон X-10, плурононовую кислоту F127 или додецилсульфат натрия (ДСН). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения поверхностно-активный агент присутствует в концентрации от 0,0003 до 0,3% (мас./мас.).

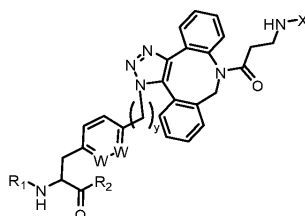
Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере одно вспомогательное вещество необязательно содержит адъювант, агент, который усиливает стимуляцию иммунной системы за счет усиления презентации антигена (депо-состав, системы для доставки) и/или обеспечения костимулирующих сигналов (иммуномодуляторы). Согласно некоторым модификациям этого варианта реализации адъювант основан на соли алюминия. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения адъювант представляет собой фосфат алюминия-калия, гидроксифосфат-сульфат алюминия, гидроксид алюминия или фосфат алюминия и любую их комбинацию. В других вариантах адъювант представляет собой эмульсию типа "масло-в-воде". Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения адъювант представляет собой AS03, MF59 или AF03 и любую их комбинацию. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения адъювант представляет собой агонист TLR4. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения адъювант представляет собой RC529. Предпочтительными адъювантами для применения с настоящим изобретением являются соли алюминия, такие как адъювант на основе фосфата алюминия (например, адъювант на основе гидроксифосфата алюминия). Если композиция содержит адъювант на основе соли алюминия, предпочтительно концентрация Al^{3+} в композиции составляет <1,25 мг на дозу, например, <1,25 мг на 0,5 мл, и в оптимальном варианте <0,85 мг на дозу. Конъюгаты в композиции могут быть адсорбированы в адъювант на основе соли алюминия. В случае смешанной композиции конъюгаты могут быть адсорбированы в соль алюминия по отдельности и затем смешаны или могут быть добавлены к соли алюминия для достижения последовательной адсорбции с получением смешанной композиции конъюгатов.

Предпочтительная композиция содержит (i) один или более конъюгатов, определенных в настоящем документе, например, капсульный полисахарид из нескольких пневмококковых серотипов, конъюгированный с белками-носителями, содержащими нпАК, и (ii) адъювант на основе фосфата алюминия.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ увеличения соотношения полисахарида и белка-носителя (мас./мас.) (PS:PC) иммуногенной композиции, включающий: (a) введение в белок-носитель одной или более замен нпАК; и (b) конъюгирование полисахарида с белком-носителем за счет одной или более замен неприродных аминокислот. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения одна или более замен содержат по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 9 замен. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения замены нпАК не находятся в эпитопе, активирующем Т-клетки, белка-носителя. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нпАК представляет собой рAMF. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения белок-носитель сохраняет эпитоп связывания Т-клеток анатоксина дифтерии (DT), анатоксина столбняка (TT), белка D (PD) Haemophilus, комплекса белков наружной мембраны менингококка серогруппы В (OMPС) или CRM197. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения замены неприродной аминокислотой происходят в остатках лизина. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения эти остатки лизина выбраны из группы, состоящей из K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K265, K386, K523 и K527, а также любой их комбинации из SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид конъюгирован с белком-носителем за счет связи формулы XI или XIa



(формула XI)



(формула XIa)

где R_1 независимо представляет собой H, формил или по меньшей мере одну аминокислоту белка-носителя;

R_2 независимо представляет собой OH или по меньшей мере одну аминокислоту белка-носителя и

X независимо представляет собой по меньшей мере один полиол капсульного полисахарида.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения соотношение PS:PC составляет от приблизительно 1,5 до приблизительно 4. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид представляет собой капсульный полисахарид серотипа *Streptococcus pneumoniae*, выбранного из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F, а также любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой капсульный полисахарид, происходящий из одного из шести серотипов *Porphogomonas gingivalis* (например, K1, K2, K3, K4, K5 и/или K6). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полисахарид представляет собой капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* или *Streptococcus agalactiae*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен гликопротеин, полученный с помощью способа, включающего этапы (a)-(b).

10. Стимуляция иммунных ответов.

Согласно настоящему изобретению предложен способ обеспечения иммунозащитного антительного ответа на антиген у субъекта путем введения указанному субъекту конъюгата или композиции, описанных в настоящем документе. Конъюгат или композиция, как правило, будут комбинированы со вспомогательным веществом, подходящим для парентерального введения.

Согласно настоящему изобретению также предложены конъюгаты и композиции для применения при вызове иммунозащитного антительного ответа на антиген. Согласно настоящему изобретению также предложено применение конъюгатов и композиций для изготовления лекарственного средства для обеспечения иммунозащитного антительного ответа на антиген.

Иммунозащитный антительный ответ означает, что конъюгат и композиции можно применять, например, чтобы обеспечить активную иммунизацию для предотвращения инвазивного заболевания, вызванного *S.pneumoniae*, для предотвращения отита среднего уха, вызванного *S.pneumoniae*, для предотвращения пневмонии, вызванной *S.pneumoniae*, для активной иммунизации субъектов, подверженных риску воздействия *N.meningitidis*, для предотвращения инвазивного заболевания и т.д.

Настоящее изобретение проиллюстрировано следующими примерами. Материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения. Для специалистов в данной области техники будут очевидны многочисленные варианты, изменения и замены, не отступающие от сущности настоящего изобретения. Примеры осуществляют с применением общеизвестных и общепринятых методик, известных специалистам в данной области техники, если иное не описано подробно.

Примеры

Пример 1. Синтез фрагментов односайтного eCRM K11TAG, K25TAG, K34TAG, K38TAG, K40TAG, K52TAG, K60TAG, K77TAG, K83TAG, K91TAG, K96TAG и K103TAG.

eCRM экспрессировали в экстракте для бесклеточного синтеза белка (CFPS), предоставленном Sutro Biopharma, Inc. (Южный Сан-Франциско, Калифорния, США). Особенности и получение такого экстракта описаны в других публикациях; в данном случае экстракт обычно получали, как описано в Zawada et al., 2011, *Biotechnol. Bioeng.*, 108(7), 1570-1578 со следующими модификациями из US2016/0257946: (1) бесклеточный экстракт получали из чувствительного к OmpT штамма, ослабленного по RF-1 и модифицированного для сверхэкспрессии DsbC *E. coli*; (2) бесклеточный экстракт получали из аналогичного

ослабленного по RF-1 штамма *E. coli*, модифицированного для получения ортогональной тРНК, кодирующей CUA, для вставки неприродной аминокислоты в стоп-кодоне амбер; (3) бесклеточные экстракты из (1) и (2) смешивали (в соотношении 85:15) и обрабатывали 50 мкМ йодацетамидом в течение 30 мин при комнатной температуре (20°C); и (4) смешанные экстракты добавляли в предварительную смесь, содержащую все другие компоненты системы для бесклеточного синтеза белка, за исключением ДНК, кодирующей eCRM. Конечная концентрация в реакции для бесклеточного синтеза белка составила 30% (по объему) клеточного экстракта, 2 мМ пара-метилазидо-L-фенилаланина (pAMF) (RSP Amino Acids, Ширли, Массачусетс, США), 5 мкМ pAMF-специфичной тРНК-синтетазы ("RS"), 2 мМ GSSG (окисленного глутатиона), 8 мМ глутамата магния, 10 мМ глутамата аммония, 130 мМ глутамата калия, 35 мМ пирувата натрия, 1,2 мМ АМФ, 0,86 мМ каждого из ГМФ, УМФ и ЦМФ, 2 мМ аминокислот (за исключением 0,5 мМ для тирозина и фенилаланина), 4 мМ оксалата натрия, 1 мМ путресцина, 1,5 мМ спермидина, 15 мМ фосфата калия, 100 нМ T7 РНК-полимеразы и 2,5 мкМ плазмиды eCRM, кодирующей варианты нпАК. Реакции бесклеточного синтеза инициировали путем добавления плазмидной ДНК, кодирующей eCRM.

Реакционные смеси инкубировали в течение 14 ч на шейкере при 650 об./мин в 48-луночных планшетах с лунками в форме цветка (m2p-labs # MTP-48-B). После инкубационного периода реакцию поддерживали при 4°C до дальнейших манипуляций для очистки или анализа. После реакции бесклеточного синтеза белка смесь, содержащую pAMF-eCRM, переносили в 96-луночный планшет (DyNa Block™, 2 мл; Labnet, Эдисон, Нью-Джерси, США) и центрифугировали при 5000×g в течение 15 мин при 40°C.

Сначала проводили эксперимент по оптимизации для оценки наилучшей температуры и добавок для получения eCRM с помощью CFPS. Реакции CFPS проводили при 30, 25 и 20°C с дополнительным добавлением кодирующей CUA тРНК (0, 1, 2, 4, 8, 12% об./об.) и смеси нпАК/синтеза (50, 100, 150, 200 мкг/мл) при каждой из трех температур. Образцы смеси CFPS до и после центрифугирования собирали и анализировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, и полосы количественно оценивали денситометрическим методом для оценки количества растворимого белка (образец после центрифугирования) от общего белка (образец перед центрифугированием), полученного при каждом условии.

На фиг. 1 показан выход нпАК-eCRM, полученного при каждом условии, который количественно оценивали денситометрическим методом. В то время как реакции CFPS при 30° давали относительно небольшую фракцию растворимого белка (не более ~0,33 от общего количества во всех условиях), выход растворимого белка был повышен (>~0,40 растворимого/общего белка во всех условиях) при 25° и далее повышался (>~0,60 растворимого/общего белка во всех условиях) при 20°. При обоих условиях с "низкими" температурами выход растворимого белка дополнительно повышался за счет увеличения концентрации тРНК (1-12× концентрации увеличивали выход), в то время как увеличение концентрации нпАК/синтеза оказывало нежелательное влияние на выход растворимого белка либо не оказывало влияния.

На основании эксперимента согласно фиг. 1 температуры менее 20° и концентрация тРНК по меньшей мере 20 мкМ были выбраны для синтеза вариантов K11TAG, K25TAG, K34TAG, K38TAG, K40TAG, K52TAG, K60TAG, K77TAG, K83TAG, K91TAG, K96TAG и K103TAG.

Реакции CFPS проводили, как указано выше. Для удобства очистки в этих предварительных экспериментах гистидиновую метку (GSGHNNNNN; SEQ ID NO: 10) гибридизовали с С-концом последовательности белка-носителя с помощью вектора экспрессии, и очистку вариантов eCRM из супернатанта после центрифугирования проводили с применением колонки PhyTip® IMAC (Phynexus, Сан-Хосе, Калифорния, США), содержащей 40 мкл смолы. Слой смолы предварительно уравнивали в буфере для уравнивания IMAC (1× ФСБ и 10 мМ имидазола), и очищенный супернатант пипетировали 10 раз вверх и вниз через уравнивающую PhyTip® IMAC при скорости потока 4,2 мкл/мин. Связанный белок промывали буфером для уравнивания IMAC и затем элюировали 125 мкл буфера для элюирования IMAC (1× ФСБ и 0,5 М имидазола). Гистидиновая метка не является существенной, и ею пренебрегали для более крупномасштабной очистки.

Включение нпАК и реакцию способность оценивали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ и флуоресцентного анализа после реакции с DBCO- флуоресцеином (фиг. 2). 2-12 мкМ eCRM инкубировали с 50 мкМ DBCO-флуоресцеина в течение 16 ч, подвергали электрофорезу в ДСН-ПААГ в невосстанавливающих условиях и визуализировали с применением Кумасси синего (видимый свет) и набора фильтров Surgo-guby (флуоресцентный, флуоресцеин). На фиг. 2 показаны соответствующие изображения геля, окрашенного Кумасси (слева), и флуоресцентные изображения (справа) геля, показывающие способность pAMF, включенной в eCRM, вступать в реакцию с DBCO. Амбер-замены K25, K34, K38 и K40 показывают высокую эффективность экспрессии и конъюгации, в отличие от других.

Пример 2. Дизайн нескольких нпАК eCRM.

Несколько вариантов нпАК eCRM выбирали, как описано в подробном описании выше. Варианты синтезировали с помощью CFPS и испытывали в соответствии с примером 1.

Таблица 2

Несколько вариантов нпАК eCRM

| Номер варианта | K25 | K34 | K38 | K40 | K213 | K215 | K228 | K245 | K265 | K386 | K523 | K527 |
|----------------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 | √ | | | | √ | | √ | | √ | √ | √ | |
| 2 | √ | | | | √ | | √ | | √ | √ | | √ |
| 3 | √ | | | | √ | | | √ | √ | √ | √ | |
| 4 | √ | | | | √ | | | √ | √ | √ | | √ |
| 5 | √ | | | | | √ | √ | | √ | √ | √ | |
| 6 | √ | | | | | √ | √ | | √ | √ | | √ |
| 7 | √ | | | | | √ | | √ | √ | √ | √ | |
| 8 | √ | | | | | √ | | √ | √ | √ | | √ |
| 9 | | √ | | | √ | | √ | | √ | √ | √ | |
| 10 | | √ | | | √ | | √ | | √ | √ | | √ |
| 11 | | √ | | | √ | | | √ | √ | √ | √ | |
| 12 | | √ | | | √ | | | √ | √ | √ | | √ |
| 13 | | √ | | | | √ | √ | | √ | √ | √ | |
| 14 | | √ | | | | √ | √ | | √ | √ | | √ |
| 15 | | √ | | | | √ | | √ | √ | √ | √ | |
| 16 | | √ | | | | √ | | √ | √ | √ | | √ |
| 17 | | | √ | | √ | | √ | | √ | √ | √ | |
| 18 | | | √ | | √ | | √ | | √ | √ | | √ |
| 19 | | | √ | | √ | | | √ | √ | √ | √ | |
| 20 | | | √ | | √ | | | √ | √ | √ | | √ |
| 21 | | | √ | | | √ | √ | | √ | √ | √ | |
| 22 | | | √ | | | √ | √ | | √ | √ | | √ |
| 23 | | | √ | | | √ | | √ | √ | √ | √ | |
| 24 | | | √ | | | √ | | √ | √ | √ | | √ |
| 25 | | | | √ | √ | | | | √ | √ | √ | |
| 26 | | | | √ | √ | | √ | | √ | √ | | √ |
| 27 | | | | √ | √ | | | √ | √ | √ | √ | |
| 28 | | | | √ | √ | | | √ | √ | √ | | √ |
| 29 | | | | √ | | √ | √ | | √ | √ | √ | |
| 30 | | | | √ | | √ | √ | | √ | √ | | √ |
| 31 | | | | √ | | √ | | √ | √ | √ | √ | |
| 32 | | | | √ | | √ | | √ | √ | √ | | √ |

Получали дополнительные варианты, включающие различное количество замен Lys→pAMF. В целом было обнаружено, что большее количество замен привело к получению носителей, которые обеспечивали конъюгаты с более высокой молекулярной массой (например, для серотипа 14 увеличение массы составило от 998 кДа с 2 заменами до 1238 кДа с 3 заменами, до 1789 кДа с 4 заменами и до 2547 кДа с 5 заменами), но носители имели более низкую растворимость. Носители с шестью остатками pAMF обычно обеспечивали как хорошую растворимость ("50 мг/мл), так и иммуногенность. Высокая растворимость была неожиданной, поскольку замена заряженных остатков Lys в нативной последовательности гидрофобными остатками pAMF увеличивала гидрофобность CRM197, который представляет собой белок, гидрофобность которого, как сообщалось, оказывала отрицательное влияние на его растворимость (Ott et al. 1999 Infect Immun 67:4290-4). Соответственно, эти результаты указывают на возможность сохранения тех же сайтов прикрепления, которые применяли в известных конъюгатах CRM197 (а именно остатки Lys), не вызывая нерастворимость при потере заряженных остатков.

Исследования CRM197 выявили Т-клеточные эпитопы в пределах остатков P272-D291, V322-G384 и Q412-I458 из SEQ ID NO: 1. Эти эпитопные области включают остатки Lys K420, K441, K446, K448 и K457, поэтому замена этих остатков лизина может разрушить Т-клеточные эпитопы, которые лежат в основе активности CRM197. Соответственно, предпочтительные остатки Lys для замещения нпАК в SEQ ID NO: 1 представляют собой K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523 и K527, как показано в табл. 2 выше.

Желательно, чтобы конъюгированные полисахариды не были локализованы слишком близко в одной области поверхности CRM197. Соответственно, в пределах близко расположенных остатков предпочтительно выбрать (i) только один из K25, K34, K38 и K40, и (ii) либо K213, либо K215. Кроме того, если выйти за рамки его первичной структуры, исследования трехмерной структуры CRM197 выявили две общие области (первая распространяется до Asn-374, и вторая распространяется от Ser-375), поэтому остатки предпочтительно должны быть выбраны в обеих этих областях, например, для 6 замен выбирают

по 3 в каждой области. Эта общая рекомендация обеспечивает пространственное отделение полисахаридов при прикреплении к носителю CRM197.

Одна последовательность, которая была особенно подходящей при создании пневмококковых конъюгатов, представляет собой вариант 12 в табл. 2, в котором K34, K213, K245, K265, K386 и K527 заменены нпАК. Этот белок имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, в которой каждый X представляет собой рАМФ (предпочтительную нпАК). Этот белок применяли для получения конъюгатов, описанных ниже.

Остатки лизина являются подходящими, поскольку они являются аминокислотами, которые применяли в известных конъюгатах CRM197, поэтому нпАК в этих положениях обеспечивают конъюгацию в тех же сайтах, которые, как уже известно, совместимы с CRM197. Однако, как указано выше, потеря заряженного лизина может привести к структурным изменениям, повышенной гидрофобности и меньшей растворимости. Модификация остатков фенилаланина на нпАК на основе фенилаланина (такие как пара-азидо-Phe, пара-азидометил-Phe, пара-фтор-Phe, пара-ацетил-Phe или пара-бензоил-Phe) приведет к уменьшению риска этих изменений. Соответственно, остатки F13, F54, F124, F128, F141, F168, F251, F390, F531 или F532 также отбирали для замены, отдельно или в комбинации. Испытывали замены до пяти остатков Phe рАМФ, которые приводили к получению растворимых конъюгатов, но с тенденцией к снижению молекулярной массы конъюгатов по сравнению с аналогичным количеством нескольких замен Lys.

Вместо замены аминокислот в CRM197 нпАК также могут быть вставлены в последовательность CRM197. Например, кодон TAG, кодирующий рАМФ, вставляли непосредственно после остатков лизина K34, K213, K245, K265, K386 и K527, либо по отдельности (для создания шеститочечных вставок), либо в комбинации (для вставки 2, 3, 4, 5 или 6 нпАК). Носители со вставленной нпАК, такие как упомянутые, можно применять для получения конъюгатов и поливалентных композиций, как описано выше.

Пример 3. Выявление Т-клеточных эпитопов в Pfs25.

Эпитопы, активирующие Т-клетки, специфического поверхностного белка оокинета малярийного плазмодия Pfs25 определяли экспериментально в соответствии с методами, описанными, например, в Diethelm-Okita et al., *J Infect Dis.* 1997 Feb; 175(2):382-91. В общих чертах, пептидные фрагменты из 20 аминокислот и перекрывающиеся на 5 аминокислот синтезировали в соответствии с полной экспрессированной последовательностью Pfs25. CD8⁺-истощенные и CD4⁺-обогащенные лимфоциты периферической крови человека (ЛПК) получали от нескольких субъектов. ЛПК высевали с тремя повторами и культивировали с отдельными синтетическими пептидами, охватывающими последовательность Pfs25, которые служили в качестве экспериментальных стимулов. Пролиферацию ЛПК в ответ на каждый пептидный фрагмент измеряли путем импульсного введения [³H]-тимидина в культуры и проводили сравнение культур, происходящих от разных индивидуумов. Было выявлено, что фрагменты Pfs25, которые стимулировали пролиферацию, содержат эпитоп Т-клеток. Фрагменты, которые стимулируют пролиферацию ЛПК от нескольких или всех субъектов, классифицировали как содержащие универсальный или иммунодоминантный Т-клеточный эпитоп в Pfs25.

Пример 4. Общий протокол для активации полисахарида мета-периодатом натрия.

Серотипические полисахариды (~30 мкмоль) растворяли в водном растворе (10 мМ HCl). Затем раствор нагревали при 45°C в течение 30 мин и затем охлаждали, при этом добавляли раствор NaOH для доведения pH до 6,70. Реакционную смесь подвергали диализу с помощью ультрацентрифуги AMICON (НОММ 30 кДа) против воды категории ВЭЖХ. Супернатант переносили в 50 мл пробирку Falcon, добавляли ацетатный буфер (pH 5,35) до конечной концентрации 25 мМ и добавляли 0,5 экв. NaIO₄. Смесь перемешивали при 25°C в течение 17 ч, по истечении этого времени окисленный образец необязательно обрабатывали избытком борогидрида натрия (10 экв.) и очищали с помощью ультрацентрифуги AMICON (НОММ 30 кДа), используя несколько замен воды категории ВЭЖХ, с получением раствора окисленного полисахарида.

Пример 5. Общая процедура дериватизации полисахарида, окисленного периодатом, с применением DBCO.

Окисленный полисахарид (~30 мкмоль) комбинировали с DBCO-PEG₄-NH₂ (~30 мкмоль) или DBCO-NH₂ (~30 мкмоль) в 72 мМ фосфате натрия с pH 6,79, содержащем 16% ДМСО, при 25°C. Затем реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 30 мин, по истечении этого времени добавляли раствор цианоборогидрида натрия (16 мг/мл в воде; 59,54 мкмоль, 20 экв.) и перемешивали в течение ночи-2 дней при 25°C. Затем реакционную смесь промывали 3 раза этилацетатом, переносили в ультрацентрифугу AMICON (НОММ 30 кДа) и затем подвергали диализу, используя 6 замен 20% этанола в воде с последующими 3 заменами воды, с получением раствора DBCO-производного полисахарида. DBCO-производное полисахарида затем смешивали с сахарозой в соотношении 10:1 (мас./мас.) и лиофилизировали с получением белого порошка для использования в следующей реакции конъюгации.

Пример 6. Общий протокол для активации полисахарида с применением СДАР.

Капсульный полисахарид (30 мг) (PS 3) растворяли в водном растворе (13,5 мл H₂O с 1,5 мл 2 М уксусной кислоты). Смесь нагревали при 85°C в течение 1 ч и после охлаждения до температуры окру-

жающей среды добавляли избыток хлорида магния из 1 М раствора. Полученный полисахарид очищали с помощью центрифуги Amicon при НОММ 30 кДа с использованием 6 замен воды.

Полученный полисахарид затем растворяли в воде с pH 7,0 и добавляли реагент для цианилирования, CDAP (тетрафторборат 1-циано-4-диметиламинопиридина в ацетонитриле). Затем pH раствора доводили до 9,5 или добавляли триметиламин (2,5 экв.). Затем к раствору добавляли DBCO-PEG₄-NH₂ или DBCO-NH₂. Количество ДМСО в растворе доводили до 5% и перемешивали в течение ночи при 25°C. Раствор промывали 3 раза с применением 20 мл этилацетата и очищали с помощью блоков для диализа Amicon при НОММ 30 кДа, используя 7 замен 3% ДМСО, 20% этанола, 0,9% хлорида натрия и 3 замены воды. DBCO-производное полисахарида затем смешивали с сахарозой в соотношении 10:1 (мас./мас.) и лиофилизировали.

Пример 7. Общая методика конъюгации полисахарида-DBCO с eCRM.

Образец полисахарида-DBCO лиофилизировали и смешивали с сахарозой в соотношении 10:1 мас./мас., (полученный согласно методике примеров 4 или 5), растворяли в 0,9% NaCl и смешивали с eCRM в растворе с получением входного массового соотношения PS:eCRM равного 1:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальной шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 18 ч. Реакцию клик-химии останавливали добавлением избытка раствора азида натрия. Смесь конъюгированного PS-eCRM переносили в предварительную промывную пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235060, НОММ 300000) и затем подвергали диализу против 5 замен 0,9% раствора хлорида натрия в течение 24 ч. Диализованный раствор фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата PS-eCRM.

Пример 8. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 1 с eCRM из табл. 2.

1. Окисление..

Степень чистоты PS типа 1: 80% (урононовая кислота).

Мол. масса: 625 г·моль⁻¹ (на повторяющееся звено).

Порядок проведения реакций.

Нативный полисахарид (19,7 мг, скорректировано до 80%, 15,8 мг, 25,2 мкмоль) растворяли в 9,85 мл водного раствора (7,0 мл воды и 2,85 мл ацетатного буфера, 200 мМ, pH 5,5). К этому раствору добавляли 300 мкл раствора периодата натрия (104 мкг, 3,78 мкмоль, 0,15 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 ч, по истечении этого времени добавляли большой молярный избыток борогидрида натрия (10 мол.экв.). Окисленный PS очищали с помощью центробежного диализа (Amicon, НОММ 30 кДа), используя по меньшей мере 6 замен воды, с получением раствора очищенного PS-1.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 1 (мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. урононовой кис. (мкМ) | Окисление (% ВСА) | Окисление (% колич. альдегидов) | Выход PS (%) | Примечание |
|-----------------------------|-----------|--------------------------|------------------------------------|-------------------|---------------------------------|--------------|------------|
| 0,15 | 19,7 | 2,86 | 11040 | 1,4 | Не определяли | 100 | Нет |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

PS1-OX (15,8 мг, 25,2 мкмоль) растворяли в фосфатном буфере (3,6 мл, 50 мМ, pH 7,0), к которому был добавлен DBCO-PEG₄-NHS сл. эфир (1,0 экв., 649,1 г·моль⁻¹ в ДМСО, 0,35 мл). Реакционную смесь перемешивали при 37°C в течение двух дней в термостатируемой водяной бане с последующей экстракцией этилацетатом (3×20 мл). DBCO-производное очищали с помощью блоков для центробежного диализа (Amicon, НОММ 30 кДа), используя 6 замен 20% этанола в воде с последующими 3 заменами воды (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного типа 1. К этому раствору (2,20 мл, 9,59 мг) добавляли раствор сахарозы (96 мг в 1 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на три равные части и каждую лиофилизировали с получением трех образцов белого порошка. Каждый образец содержал 3,18 мг 1-DBCO и 32 мг сахарозы для использования в следующей реакции конъюгации.

| Окисленный PS 1(мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. урононовой кис. (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|---------------------|--------------------------|------------------------------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 15,8 | 2,20 | 6976 | 0,280×4 | 116,16 | 1,67 | 65 | 602 |

3. Конъюгация производного PS 1-DBCO с eCRM.

PS 1-DBCO: 3,18 мг (с 32 мг сахарозы) лиофилизированного порошка.

%DBCO: 1,67%.

Концентрация CRM: 6,5 мг/мл раствор.

PS: CRM (входное соотношение): 1:1.

Порядок проведения реакций.

1-DBCO растворяли в растворе функционализованного азидом eCRM (0,51 мл), чтобы обеспечить входное массовое соотношение PS1:CRM равное 1:1 (мас./мас.). Дополнительное разбавление 0,9% раствором хлорида натрия (профильтрованным через фильтр с размером пор 0,22 мкм) до концентрации 1,0 мг·мл⁻¹ требовалось для того чтобы уменьшить образование геля. Раствор очень осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 18 ч. Реакцию клик-химии останавливали добавлением раствора азиды натрия (10 мг/мл, 50 мкл). Конъюгат CRM переносили в две предварительно промытые пробирки для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, НОММ 300000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 24 ч (3 замены, каждая по 800 мл). Диализированный раствор фильтровали через шприцевой фильтр Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 1-CRM.

| PS 1-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD* | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|----------------|----------|--------------------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|------------------|----------------|
| 3,18 | 3,315 | 7,17 | 0,177 | 40 | 0,099 | 21 | 1,79:1 | 9,39 | 2,13 |

*CJD = диализированный конъюгат.

Пример 9: Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 2 с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 2: 80%.

Мол. масса: 960,84 г·моль⁻¹.

Порядок проведения реакций.

Нативный полисахарид (25,5 мг, 26,5 мкмоль) растворяли в 12,75 мл водного раствора (9,24 мл воды и 3,51 мл ацетатного буфера, 200 мМ, pH 5,5). К этому раствору добавляли 216 мкл раствора периода-та натрия (5,26 мг/мл, 0,20 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 ч с контролем по поглощению УФ при 222 нм для NaIO₄. Окисленный PS очищали с помощью центробежного диализа (Amicon, НОММ 100 кДа), используя по меньшей мере 6 замен воды, с получением раствора очищенного PS-2.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 2 (мг) | Объем после очистки (мл) | Кол.ч. иссл. антрона (мкМ) | Окисление (%; BCA) | Окисление (%; колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) | Примечание |
|-----------------------------|-----------|--------------------------|----------------------------|--------------------|--|--------------|------------|
| 0,20 | 25,5 | 2,28 | 9041 | 22,8 | 5,4 | 78 | Нет |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

PS2-OX (18,1 мг, 18,8 мкмоль) в 2,14 мл воды разбавляли фосфатным буфером (1,95 мл, 200 мМ, pH 6,0), к которому был добавлен DBCO-PEG₄-NH₂ (9,85 мг, 1 экв., в ДМСО, 0,197 мл). Через 25 мин добавляли NaCNBH₃ (2,36 мг, 2 экв. 59 мкл из раствора в H₂O). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение двух дней в термостатируемой водяной бане и затем добавляли фосфатный буфер (0,5 мл 200 мМ, pH 6). К этой смеси добавляли NaBH₄ (60 мкл 10 мг/мл водного раствора, 1 экв.). После перемешивания в течение 30 мин смесь экстрагировали этилацетатом (4×5 мл). Остаточный этилацетат удаляли барботированием газообразным азотом, и смесь переносили в центрифужные фильтры Amicon с НОММ 100 кДа. DBCO-производное очищали с помощью центробежного диализа, используя 1 замену воды, затем 6 замен 20% этанола в воде с последующими 3 заменами воды (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного типа 2. К этому раствору (2,14 мл, 14,3 мг) добавляли раствор сахарозы (100 мг в 1 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на три практически равные части и каждую лиофилизировали с получением трех образцов белого порошка (4,96 мг, 4,96 мг и 4,4 мг).

| Окисленный PS 2(мг) | Объем после очистки (мл) | Кол.ч. иссл. антрона (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|---------------------|--------------------------|----------------------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 18,1 | 2,14 | 1956 | 0,848×4 | 315,5 | 4,03 | 89 | 375 |

3. Конъюгация производного PS 2-DBCO с eCRM.

PS 2-DBCO: 4,4 мг (с 32 мг сахарозы) лиофилизированного порошка.

% DBCO: 4,03%.

Концентрация CRM: 3,18 мг/мл раствор.

PS:CRM (входное соотношение): 1,5:1.

Порядок проведения реакций.

PS2-DBCO растворяли в 0,9% NaCl (3,01 мл) и добавляли ДМСО (0,44 мл). Затем добавляли раствор функционализованного азидом eCRM (0,95 мл), чтобы обеспечить входное массовое соотноше-

ние PS2:CRM равное 1,5:1 (мас./мас.). Раствор очень осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 18 ч. Реакцию клик-химии останавливали добавлением раствора азид натрия (10 мг/мл, 100 мкл). Конъюгат CRM переносили в две предварительно промытые пробирки для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, НОММ 300000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 24 ч (5 замен, каждая по 1000 мл). Диализированный раствор фильтровали через шприцевой фильтр Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 2-CRM.

| PS 2- DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC- MALS (МДа) |
|-----------------------|-------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| 4,4 | 2,93 | 4,77 | 0,683 | 91 | 0,387 | 75 | 1,76:1 | НПКО | 1,37 |

Пример 10. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 3 с eCRM из табл. 2.

1. Гидролиз.

Степень чистоты PS типа 3: 86% (антрон).

Мол. масса: 360,3 г·моль⁻¹.

Порядок проведения реакций.

Нативный полисахарид 3 (30,0 мг) растворяли в 15,0 мл водного раствора (13,5 мл воды и 1,5 мл уксусной кислоты, 2 М). Смесь нагревали при 85°C в течение 1 ч, по истечении этого времени после охлаждения до температуры окружающей среды добавляли раствор хлорида магния (1,5 мл, 1 М). Гидролизированный PS очищали с помощью центробежного диализа (Amicon, НОММ 30 кДа), используя по меньшей мере 6 замен воды, с получением раствора очищенного PS-3, который затем лиофилизировали в двух равных аликвотах.

| PS 3 (мг) | Вода (мл) | AcOH, 2 М (мл) | Колич. иссл. антрона (мкМ) | Выход PS (%) | MALS (кДа) |
|-----------|-----------|----------------|-------------------------------|--------------|------------|
| 30,0 | 13,5 | 1,50 | 10477,22 | 85 | 294 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

Гидролизированный PS3 (12,75 мг, 35,4 мкмоль) растворяли в воде (6,4 мл), доводили до pH 7,0 с помощью раствора гидроксида натрия (0,2 М, 100 мкл). Затем по каплям добавляли реагент для цианилирования, CDAP (0,426 М в ацетонитриле, 0,2 экв., 16,7 мкл). Через 90 с раствор быстро доводили до pH 9,5 с помощью раствора гидроксида натрия (0,2 М, 300 мкл). DBCO-PEG₄-NH₂ (0,032 М в ДМСО, 0,1 экв., 523 г·моль⁻¹, 0,110 мл) добавляли немедленно по каплям. Добавляли дополнительное количество ДМСО с получением 5% (об./об.) ДМСО (0,320 мл). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение ночи в термостатируемой водяной бане с последующей фильтрацией через шприцевой PES-фильтр с размером пор 0,22 мкм. Фильтрат экстрагировали этилацетатом (3×20 мл). DBCO-производное очищали с помощью блоков для центробежного диализа (Amicon, НОММ 30 кДа), используя в общей сложности 7 замен 3% ДМСО, 20% этанола в воде, 0,9% хлорида натрия, затем 3 замены воды (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного типа 3. Водный раствор затем фильтровали через шприцевой ПВДФ-фильтр с размером пор 0,45 мкм. К этому раствору (3,84 мл, 8,52 мг) добавляли 10-кратный массовый избыток сахарозы (85 мг в 0,85 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на три части, которые лиофилизировали с получением трех образцов белого порошка. Два образца содержали 5,0 мг 3-DBCO и 50 мг сахарозы для использования в следующей реакции конъюгации, при этом в оставшемся образце содержалось 8,5 мг, всего три.

| Гидролизированный PS 3(мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. антрона (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS- DBCO (%) | SEC- MALS (кДа) |
|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 12,8 | 4,04 | 2063,47 | 1,095×3 | 102,64 | 5,0 | 70 | 409 |

3. Конъюгация производного PS 3-DBCO с eCRM.

PS 3-DBCO: 5,0 мг (с 50 мг сахарозы) лиофилизированного порошка.

% DBCO: 5,0%.

Концентрация CRM: 4,0 мг/мл раствор.

PS:CRM (входное соотношение): 1:1.

Порядок проведения реакций.

3-DBCO растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия (6,39 мл, профильтрован через фильтр с размером пор 0,22 мкм), фосфатном буфере (pH 7,0, 0,5 М, 0,333 мл) и ДМСО (0,833 мл). Раствор функционализированного азидом eCRM (0,770 мл) добавляли по каплям, чтобы обеспечить входное массовое соотношение PS3:CRM равное 1:1 (мас./мас.). Раствор очень осторожно перемешивали вручную перед

осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 18 ч. Реакцию клик-химии останавливали добавлением раствора азид натрия (10 мг/мл, 50 мкл). Конъюгат CRM переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, НОММ 300000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 48 ч (4 замены, каждая по 1 л). Диализированный раствор фильтровали через шприцевой фильтр Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 3-CRM.

| PS 3-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрагон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJF* | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|----------------|----------|--------------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|------------------|----------------|
| 5,0 | 5,0 | 3,63 | 0,402 | 70 | 0,423 | 74 | 0,95:1 | 2,55 | 3,2 |

*CJF = диализированный и профильтрованный конъюгат.

Пример 11. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 3 с eCRM из табл. 2.

1. Окисление..

Степень чистоты PS типа 3: 86% (антрагон).

Мол. масса: 360,3 г·моль⁻¹.

Порядок проведения реакций.

Нативный полисахарид 3 (14,4 мг, скорректировано до 86%, 12,4 мг, 34,4 мкмоль) растворяли в 7,2 мл водного раствора (5,9 мл воды и 1,3 мл ацетатного буфера, 200 мМ, pH 5,5). К этому раствору добавляли 300 мкл раствора периодата натрия (1,10 мг, 5,16 мкмоль, 0,15 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 ч. Окисленный PS очищали с помощью центробежного диализа (Amicon, НОММ 30 кДа), используя по меньшей мере 6 замен воды, с получением раствора очищенного PS3-OX.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 3 (мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. антрагона (мкМ) | иссл. | Окисление (% BCA) | Окисление (% коллич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|-----------------------------|-----------|--------------------------|------------------------|-------|-------------------|--|--------------|
| 0,15 | 14,4 | 1,84 | 15940,33 | | 3,9 | 0,8 | 73 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

PS3-OX (9,05 мг, 25,1 мкмоль) растворяли в фосфатном буфере (2,11 мл, 50 мМ, pH 6,7), к которому был добавлен DBCO-PEG₄-NH₂ (1,0 экв, 523 г·моль⁻¹ в ДМСО 0,40 мл). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 25 мин перед добавлением раствора цианоборогидрида натрия (2 экв., 44,5 мг/мл, 35 мкл) и перемешивали в течение двух дней. По истечении этого времени реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (3×20 мл). DBCO-производное очищали с помощью блоков для центробежного диализа (Amicon, НОММ 30 кДа), используя 6 замен 20% этанола в воде с последующими 3 заменами воды (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного типа 3. К этому раствору (3,20 мл, 8,60 мг) добавляли 10-кратный массовый избыток сахарозы (86 мг в 0,86 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на четыре части и каждую лиофилизировали с получением трех образцов белого порошка. Три образца содержали 2,0 мг 3-DBCO и 20 мг сахарозы для использования в следующей реакции конъюгации, при этом в оставшемся образце содержалось 2,6 мг, всего четыре.

| Окисленный PS 3(мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. антрагона (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|---------------------|--------------------------|------------------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 15,8 | 2,76 | 2681,28 | 0,683×3 | 64,47 | 2,3 | 95 | 304 |

3. Конъюгация производного PS 3-DBCO с eCRM.

PS 3-DBCO: 2,0 мг (с 20 мг сахарозы) лиофилизированного порошка.

% DBCO: 2,3%.

Концентрация CRM: 4,0 мг/мл раствор.

PS: CRM (входное соотношение): 1:1.

Порядок проведения реакций.

3-DBCO растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия (0,400 мл, профильтрован через фильтр с размером пор 0,22 мкм) и ДМСО (0,100 мл). Раствор функционализированного азидом eCRM (0,330 мл) добавляли по каплям, чтобы обеспечить входное массовое соотношение PS3:CRM равное 1:1 (мас./мас.). Раствор очень осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 48 ч. Реакцию клик-химии останавливали добавлением раствора азид натрия (10 мг/мл, 50 мкл). Конъюгат CRM переносили в две предварительно промытые пробирки для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, НОММ 300000) и затем подвергали диализу.

зу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 48 ч (4 замены, каждая по 1 л). Диализированный раствор фильтровали через шприцевой фильтр Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 3-CRM.

| PS 3-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJF | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|----------------|----------|--------------------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 2,0 | 2,0 | 3,63 | 0,226 | 41 | 0,307 | 59 | 0,74:1 | 21,0 | 3,42 |

Пример 12. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 4 с eCRM из табл. 2.

1. Окисление..

Степень чистоты PS типа 4: 80% (антрон).

Мол. масса: 825,78.

Порядок проведения реакций.

Порошок PS типа 4 (27,5 мг, 33,30 мкмоль) растворяли в 13,75 мл водного раствора (12,38 мл воды и 1,37 мл 0,1 М HCl). Затем раствор нагревали при 45°C в течение 30 мин и затем охлаждали, после этого добавляли раствор NaOH (0,1 М, 1,37 мл) для доведения pH до 6,70. Реакционную смесь подвергали диализу с помощью ультрацентрифуги AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл), используя 3 замены воды категории ВЭЖХ (каждая по 12 мл). Супернатант переносили в 50 мл пробирку Falcon с 9,84 мл воды. К этому раствору добавляли 3,43 мл 200 мМ ацетатного буфера (pH 5,35) и 632 мкл раствора NaIO₄ (3,56 мг, 16,65 мкмоль, 0,5 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 17 ч, по истечении этого времени окисленный образец очищали с помощью ультрацентрифуги AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл), используя 6 замен (12 мл) воды категории ВЭЖХ, с получением раствора окисленного PS-4.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 4 (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Окисление (% ВСА) | Окисление (% колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|-----------------------------|-----------|--------------------------|--------------|-------------------|---------------------------------------|--------------|
| 0,5 | 27,5 | 2,71 | 12078 | 10,8 | 2,58 | 101 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного (предполагаемый уровень окисления 10%) PS типа 4 (24,58 мг, 29,77 мкмоль, 2,4 мл воды) добавляли буферный раствор (1,8 мл 200 мМ фосфатного буфера, pH 6,79), ДМСО (0,6 мл) и раствор DBCO-PEG-4-NH₂ (15 мг в 200 мкл ДМСО; 28,65 мкмоль, 9,6 эквивалента), все при 25°C. Реакционную смесь затем перемешивали при 25°C в течение 30 мин, по истечении этого времени добавляли 224 мкл раствора цианоборогидрида натрия (5,0 мг в 300 мкл воды; 59,54 мкмоль, 20 экв.) и перемешивали в течение 2 дней при 25°C. Реакционную смесь разбавляли фосфатным буфером (500 мкл 200 мМ раствора, pH 6) перед добавлением 225 мкл раствора борогидрида натрия (0,01 мг/мкл, 10 экв.) в воде. После перемешивания в течение 30 мин реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (3×20 мл этилацетата) и затем переносили в ультрацентрифугу AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл), после этого подвергали диализу, используя 6 замен 20% этанола в воде с последующими 3 заменами воды (каждая по 12 мл), с получением раствора DBCO-производного типа 4. К этому раствору (4,75 мл, 15,25 мг) добавляли раствор сахарозы (153 мг в 1 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на три части и каждую лиофилизировали с получением трех образцов белого порошка. Два образца содержали 5,35 мг 4 DBCO и 54 мг сахарозы, и один образец содержал 4,55 мг 4 DBCO и 45 мг сахарозы для использования в следующей реакции конъюгации.

| Окисленный PS 4 (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|----------------------|--------------------------|--------------|--|--------------------------|----------|-------------------|----------------|
| 24,58 | 5,25 | 3897 | 0,472×3 | 137,16 | 3,52 | 69 | 343 |

3. Конъюгация производного PS 4-DBCO с eCRM.

PS 4-DBCO: 5,35 мг (с 54 мг сахарозы) белого порошка.

% DBCO: 3,52%.

Концентрация CRM: 4 мг/мл раствор.

PS:CRM (входное соотношение): 1,20:1.

Порядок проведения реакций.

Образец тип 4-DBCO (5,35 мг белого порошка с 54 мг сахарозы) растворяли в 0,67 мл 0,9% раствора NaCl и затем добавляли раствор функционализированного азидом eCRM (0,74 мл). Через 10 мин добавляли еще одну порцию функционализированного азидом eCRM (0,37 мл), чтобы обеспечить входной массовое соотношение PS4:CRM равное 1,20:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали

вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 2 дней. Смесь конъюгированного PS-CRM переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235060, НОММ 300000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 24 ч (5 замен, каждая по 800 мл). Диализированный раствор фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) для получения раствора конъюгата PS типа 4-CRM.

| PS 4-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|----------------|----------|--------------------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 5,35 | 4,46 | 5,31 | 0,595 | 65 | 0,360 | 45 | 1,65:1 | 23,63 | 4,55 |

Пример 13. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 5 с eCRM из табл. 2.

1. Окисление..

Степень чистоты PS типа 5: 89% (уроновая кислота).

Мол. масса: 919,32.

Порядок проведения реакций.

Порошок PS типа 5 (22,8 мг, 24,36 мкмоль) растворяли в 8,26 мл воды и 3,14 мл 200 мМ ацетатного буфера (pH 5,26) и 163 мкл раствора NaIO₄ (1,3 мг, 6,1 мкмоль, 0,25 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 ч, по истечении этого времени окисленный образец очищали с помощью ультрацентрифуги AMICON (НОММ 100 кДа, 6-12 мл), используя 6 замен (12 мл) воды категории ВЭЖХ, с получением раствора окисленного PS-5.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 5 (мг) | Объем после очистки (мл) | Уроновая кислота (мкМ) | Окисление (% BCA) | Окисление (% колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|-----------------------------|-----------|--------------------------|------------------------|-------------------|---------------------------------------|--------------|
| 0,25 | 22,8 | 2,44 | 6735,97 | 84,87 | 5,71 | 68 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного (предполагаемый уровень окисления 10%) PS типа 5 (6,25 мг, 6,68 мкмоль, 0,992 мл воды) добавляли буферный раствор (0,063 мл 200 мМ фосфатного буфера, pH 6,74), ДМСО (25 мкл) и раствор DBCO-PEG-4-NH₂ (3,5 мг в 100 мкл ДМСО; 6,68 мкмоль, 10 экв.), все при температуре 25°C. Реакционную смесь затем перемешивали при 37°C в течение 30 мин, по истечении этого времени добавляли 84 мкл раствора цианоборогидрида натрия (0,84 мг в 84 мкл воды; 13,36 мкмоль, 20 экв.) и перемешивали в течение 24 ч при 37°C. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (6×10 мл). Экстракт переносили на ультрацентрифужный фильтр AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл) и затем подвергали диализу, используя 8 замен 20% этанола в воде (каждая по 12 мл) с последующими 3 заменами воды (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного типа 5. К этому раствору (5,35 мл, 6,0 мг) добавляли раствор сахарозы (60 мг в 0,6 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на две равные части и каждую лиофилизировали с получением двух образцов белого порошка. Каждый образец содержал 3,0 мг 5-DBCO и 30 мг сахарозы для использования в следующей реакции конъюгации.

| Окисленный PS 5 (мг) | Объем после очистки (мл) | Уроновая кислота (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|----------------------|--------------------------|------------------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 6,25 | 5,38 | 1219,4 | 0,688×3 | 63,044 | 5,17 | 98 | 300 |

3. Конъюгация производного PS 5-DBCO с eCRM.

PS 5-DBCO: 3,0 мг (с 30 мг сахарозы) белого порошка.

%DBCO: 5,17%.

Концентрация CRM: 3,25 мг/мл раствор.

PS:CRM (входное соотношение): 1:1.

Порядок проведения реакций.

DBCO-производное типа 5 (3,0 мг белого порошка с 30 мг сахарозы) растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия (4,48 мл) и ДМСО (0,6 мл). Добавляли раствор функционализированного азидом eCRM (0,92 мл), чтобы обеспечить входное массовое соотношение PS5:CRM равное 1:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 5 ч. Добавляли раствор азид натрия (20 мкл, 10 мг/мл в воде). Через 30 мин смесь конъюгированного PS-CRM переносили в предварительно промытое устройство для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, ката-

ложный номер G235060, НОММ 300000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 24 ч (5 замен, каждая по 800 мл). Диализированный раствор фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 5 PS-CRM.

| PS 5-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Уроновая кислота (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|----------------|----------|--------------------------|--------------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 3,0 | 3,0 | 5,466 | 0,231 | 46 | 0,239 | 48 | 0,97 | НПКО | 2,74 |

Пример 14. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 6А с eCRM из табл. 2.

1. Окисление..

Мол. масса PS типа 6А: 706.

Раствор NaIO₄ в воде (10 мг/мл).

Порядок проведения реакций.

Порошок PS-6А (15 мг, 21,2 мкмоль) растворяли в 7,5 мл водного раствора (10 мМ раствора ацетата натрия, pH 4,5). К этому раствору добавляли 36,3 мкл раствора NaIO₄ (0,363 мг, 1,69 мкмоль, 0,08 экв.). Смесь перемешивали при 4°C в течение 18 ч, по истечении этого времени окисленный образец переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235057, НОММ 20000) и затем подвергали диализу с применением 50 мМ PB-буфера с pH 6,8 в течение 24 ч (4 замены, каждая по 600 мл) с получением раствора окисленного PS-6А. После диализа добавляли ДМСО с получением PS-6А в 10% ДМСО с 50 мМ PB-буфера, pH 6,8.

| Мол. NaIO ₄ | экв. | PS 6А (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Окисление (%), BCA | Выход PS (%) |
|------------------------|------|------------|--------------------------|--------------|--------------------|--------------|
| 0,08 | | 15 | 4 | 4780 | 9,0 | 90 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Конечная концентрация PS: 3,37 мг/мл.

Конечная концентрация буфера: 10% ДМСО в 50 мМ PB (pH 6,8).

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного PS типа 6А (13,5 мг, 19,1 мкмоль, 4 мл в 10% ДМСО, 50 мМ PB, pH 6,8) добавляли раствор DBCO-PEG₄-NH₂ (10,01 мг в 100,1 мкл ДМСО; 19,1 мкмоль, 10 экв.) при 25°C. Реакционную смесь затем перемешивали при 25°C в течение 60 мин, по истечении этого времени добавляли раствор цианоборогидрида натрия (1,2 мг в 120 мкл воды; 19,1 мкмоль, 10 экв.) и продолжали перемешивать в течение 24 ч при 25°C. Затем реакционную смесь переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235057, НОММ 20000) и затем подвергали диализу, используя 4 замены 20% этанола в 50 мМ PB-буфере и затем 3 замены 50 мМ PB-буфера, с получением DBCO-производного типа 6А.

| Окисленный PS 6А (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|-----------------------|--------------------------|--------------|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 13,5 | 8 | 1685 | 148 | 8,78 | 70 | 193 |

3. Конъюгация производного PS 6А-DBCO с eCRM.

PS 6А-DBCO: 7,1 мг (с 71 мг сахарозы) белого порошка.

DBCO: 9%.

Концентрация CRM: 2,617 мг/мл раствор.

PS: CRM (входное соотношение): 2:1.

Конечная концентрация PS: 5,2 мг/мл.

Порядок проведения реакций.

Раствор функционализированного азидом eCRM (1,4 мл) добавляли к DBCO-производному типа 6А (7,1 мг белого порошка с 71 мг сахарозы), чтобы обеспечить массовое соотношение PS 6А:CRM равное 2:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (23°C) в течение 17 ч. Затем смесь помещали в инкубатор (37°C) на 3 ч. По окончании реакции смесь двукратно разбавляли 0,9% раствором хлорида натрия и восстанавливали борогидридом натрия (1,9 мг в 191 мкл воды; 50,2 мкмоль, 50 экв.) в течение 3 ч. Смесь конъюгированных PS-CRM переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235072, НОММ 300000) и затем подвергали диализу против ФСБ, pH 7 в течение 24 ч (3 замены, каждая по 1000 мл). Диализированный раствор фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 6А PS-CRM.

| PS 6A-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|-----------------|----------|--------------------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 7,1 | 3,6 | 10 | 0,424 | 60 | 0,170 | 47 | 2,5:1 | 16,1 | 1,15 |

Пример 15. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 6В с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 6В: 80% (антрон).

Мол. масса: 706,18.

Раствор NaIO₄ в воде (5,45 мг/мл).

Порядок проведения реакций.

Порошок PS-6В (27,28 мг, скорректировано до 80%, 21,82 мг, 30,9 мкмоль) растворяли в 14 мл водного раствора (9,5 мл воды и 4,5 мл 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,5). К этому раствору добавляли 145 мкл раствора NaIO₄ (0,79 мг, 3,71 мкмоль, 0,12 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 ч, по истечении этого времени окисленный образец очищали с помощью устройства для ультрацентрифугирования AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл), используя 6 замен (12 мл) воды категории ВЭЖХ, с получением раствора окисленного PS-6В.

| Мол. NaIO ₄ | экв. | PS 6В (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Окисление (% ВСА) | Окисление (% колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|------------------------|------|------------|--------------------------|--------------|-------------------|---------------------------------------|--------------|
| 0,12 | | 27,28 | 3,54 | 7783 | 8,1 | 7,33 | 89 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Конечная концентрация PS: 3,5 мг/мл.

Конечная концентрация буфера: 53 мкМ (pH 6,0).

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного (предполагаемый уровень окисления 10%) PS типа 6В (18,4 мг, 27,6 мкмоль, 3,35 мл воды) добавляли буферный раствор (1,4 мл 200 мМ фосфатного буфера, pH 6,0), ДМСО (700 мкл) и раствор DBCO-PEG-4-NH₂ (14,43 мг в 295 мкл ДМСО; 27,6 мкмоль, 10 экв.), все при температуре 25°C. Реакционную смесь затем перемешивали при 25°C в течение 30 мин, по истечении этого времени добавляли 75 мкл раствора цианоборогидрида натрия (9,39 мг в 200 мкл воды; 55,6 мкмоль, 20 экв.) и перемешивали в течение 2 дней при 25°C. Реакционную смесь разбавляли фосфатным буфером (500 мкл 200 мМ раствора, pH 6) перед добавлением 104 мкл раствора борогидрида натрия (0,01 мг/мкл, 10 экв.) в воде. После перемешивания в течение 30 мин реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (3x20 мл этилацетата), затем переносили в ультрацентрифугу AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл) и после этого подвергали диализу, используя 6 замен 20% этанола в воде с последующими 3 заменами воды (каждая по 12 мл), с получением раствора DBCO-производного типа 6В. К этому раствору (2,96 мл, 20,1 мг) добавляли раствор сахарозы (200 мг в 1 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на три равные части и каждую лиофилизировали с получением трех образцов белого порошка. Каждый образец содержал 6,7 мг 6В DBCO и 67 мг сахарозы для использования в следующей реакции конъюгации.

| Окисленный PS 6В (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|-----------------------|--------------------------|--------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 18,4 | 3,11 | 9620 | 0,796x4 | 311,17 | 3,2 | 115 | 403 |

3. Конъюгация производного PS 6В-DBCO с eCRM.

PS 6В-DBCO: 6,7 мг (с 67 мг сахарозы) белого порошка.

% DBCO: 3,2%.

Концентрация CRM: 2,617 мг/мл раствор.

PS:CRM (входное соотношение): 2:1.

Конечная концентрация PS: 5,23 мг/мл.

Порядок проведения реакций.

Раствор функционализированного азидом eCRM (1,28 мл) добавляли к DBCO-производному типа 6В (6,70 мг белого порошка с 67 мг сахарозы), чтобы обеспечить массовое соотношение PS6В:CRM равное 2:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 17 ч. Затем смесь помещали в печь (37°C) на 2 ч. Смесь конъюгированных PS-CRM переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235071, НОММ 100000) и

затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 24 ч (3 замены, каждая по 800 мл). Диализированный раствор фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 6B PS-CRM.

| PS 6B-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрагон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|-----------------|----------|--------------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 6,70 | 3,35 | 6,18 | 0,68 | 67 | 0,347 | 67 | 1,96:1 | 8,72 | 1,30 |

Пример 16. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 7F с eCRM из табл. 2.

1. Активация CDAP и поперечная сшивка DBCO.

Степень чистоты PS 7F: не определено (%) (антрагон) - предполагается 100%.

Мол. масса: 1227 г·моль⁻¹ (повторяющееся звено).

Порядок проведения реакций.

PS7F (6,2 мг, 5,1 мкмоль) растворяли в воде (3,1 мл), к которой был добавлен CDAP (2,0 экв., 100 мг/мл в ацетонитриле, 24 мкл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре (КТ) в течение 30 с. В это время добавляли триэтиламин (ТЭА, 2,5 экв., 0,2 М, 63 мкл), и реакционную смесь перемешивали в течение 120 с. Добавляли DBCO-PEG₄-NH₂ (1,0 экв., 28,7 мкмоль/мл в ДМСО, 180 мкл) вместе с боратным буфером (0,1 М, pH 8,5, 1,0 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. DBCO-derivatизированный PS7F очищали с помощью осаждения этанолом и центробежного диализа (Amicon, NOMM 100 кДа) с использованием 3 замен воды. После анализа методом УФ-абсорбционной спектроскопии, количественного исследования антрагона и SEC этот раствор (3,61 мл, 3,05 мг) разбавляли раствором сахарозы (10-кратное массовое содержание, 100 мг/мл) и лиофилизировали с получением белого порошка.

| PS 7F (мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. антрагона (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|------------|--------------------------|------------------------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 6,2 | 3,61 | 686,3 | 0,619 | 55,52 | 8,1 | 49 | Не определяли |

2. Конъюгация производного PS 7F-DBCO с eCRM.

PS 7F-DBCO: 2,62 мг (с 26,2 мг сахарозы) лиофилизированного порошка.

%DBC0:8,1%.

CRM: 5,0 мг/мл в ФСБ.

PS:CRM (входное массовое соотношение): 1,73:1.

Порядок проведения реакций.

Ллиофилизированный 7F-DBCO растворяли в рассоле (0,9% (мас./об.), 0,938 мл), фосфатном буфере (0,5 М, pH 7,0, 58 мкл) и ДМСО (144 мкл), к которому был добавлен раствор CRM (0,300 мл), чтобы обеспечить входное массовое соотношение PS7F:CRM равное 1,73:1,00 (мас./мас.). Раствор очень осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 17 ч. Конъюгат CRM переносили в две предварительно промытые пробирки для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, NOMM 300000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 24 ч (3 замены, каждая по 800 мл). Диализированный раствор стерилизовали путем фильтрации через шприцевой фильтр Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 7F-CRM.

| PS 7F-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрагон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Соотн. PS:CRM CJF | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|-----------------|----------|--------------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|---------------------|----------------|
| 2,62 | 1,5 | 7,17 | 0,450 | 65 | 0,224 | 2,0:1,0 | НПК0 (<21,4 мкг/мл) | 1,95 |

Пример 17. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 8 с eCKM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 8: 84%.

Мол. масса: 684,54 г·моль⁻¹.

Порядок проведения реакций.

Нативный полисахарид (42 мг, 61,3 мкмоль) растворяли в 21 мл водного раствора (14,7 мл воды и 6,3 мл ацетатного буфера, 200 мМ, pH 5,5). К этому раствору добавляли раствор периодата натрия (в рас-

чете на 2,63 мг, 0,20 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 ч с контролем поглощения УФ при 222 нм для NaIO₄. Окисленный PS очищали с помощью центробежного диализа (Amicon, НОММ 30 кДа), используя по меньшей мере 6 замен воды, с получением раствора очищенного PS-8.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 8 (мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. антрона (мкМ) | Окисление (% ВСА) | Окисление (% колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|-----------------------------|-----------|--------------------------|----------------------------|-------------------|---------------------------------------|--------------|
| 0,20 | 42 | 3,26 | 15724 | 8,96 | 2,28 | 84 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

PS8-OX (33,8 мг, 49,4 мкмоль) в 3,14 мл воды разбавляли фосфатным буфером (789 мкл, 0,5 М, pH 6,0), 1 мл H₂O и ДМСО (313 мкл), к которому был добавлен DBCO-PEG₄-NH₂ (25 мг, 1 экв., в ДМСО, 250 мкл). Через 10 мин добавляли NaCNBH₃ (6,2 мг, 2 экв. путем добавления 132 мкл из 9,43 мг в 200 мкл H₂O). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение двух дней в термостатируемой водяной бане с последующим добавлением фосфатного буфера (0,5 мл 200 мМ, pH 6). К этой смеси добавляли NaBH₄ (1 экв.). После перемешивания в течение 30 мин смесь экстрагировали этилацетатом (3×5 мл). Остаточный этилацетат удаляли барботированием газообразным азотом, и смесь переносили в центрифужные фильтры Amicon с НОММ 100 кДа. DBCO-производное очищали с помощью центробежного диализа, используя 6 замен 20% EtOH и 3 замены воды (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного типа 8. К этому раствору (5,63 мл, 25 мг) добавляли раствор сахарозы и лиофилизировали.

| Окисленный PS 8(мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. антрона (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|---------------------|--------------------------|----------------------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 33,8 | 5,63 | 6492 | 0,813×3 | 232 | 3,57 | 74 | 392 |

3. Конъюгация производного PS 8-DBCO с eCRM.

PS 8-DBCO: 3,77 мг (с 38 мг сахарозы) лиофилизованного порошка.

% DBCO: 3,57%.

Концентрация CRM: 5,966 мг/мл раствор.

PS:CRM (входное соотношение): 1,5:1.

Порядок проведения реакций.

PS8-DBCO растворяли в 0,9% NaCl (2,28 мл), добавляли фосфатный буфер (0,126 мл, 0,5 М, pH 7,0) и ДМСО (0,314 мл). Затем добавляли раствор функционализированного азидом eCRM (0,42 мл), чтобы обеспечить входное массовое соотношение PS8:CRM равное 1,5:1 (мас./мас.). Раствор очень осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 1 ч и затем помещали в печь при 37°C на ночь. Реакцию клик-химии останавливали добавлением раствора азид натрия (10 мг/мл, 100 мкл). Конъюгат CRM переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, НОММ 300000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 48 ч (8 замен, каждая по 1000 мл). Диализованный раствор фильтровали через шприцевой фильтр Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 8-CRM.

| PS 8-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | ВСА (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|----------------|----------|--------------------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 3,77 | 2,51 | 7,13 | 0,372 | 70 | 0,237 | 67 | 1,57:1 | 11,53 | 1,2 |

Пример 18. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 9N с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 9N: 75%.

Мол. масса: 928,29 г·моль⁻¹.

Порядок проведения реакций.

Нативный полисахарид (19,0 мг, 20,4 мкмоль) растворяли в 9,49 мл водного раствора (7,12 мл воды и 2,37 мл ацетатного буфера, 200 мМ, pH 5,5). К этому раствору добавляли раствор периодата натрия (1,31 мг, 0,30 экв., 56 мкл из 23,65 мг в 1,0 мл водного раствора). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 ч с контролем поглощения УФ при 222 нм для NaIO₄. Окисленный PS очищали с помощью центробежного диализа (Amicon, НОММ 30 кДа), используя 4 замены воды, с получением раствора очищенного PS-9.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 9N (мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. антрона (мкМ) | Окисление (% ВСА) | Окисление (% колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|-----------------------------|------------|--------------------------|----------------------------|-------------------|---------------------------------------|--------------|
| 0,30 | 19,0 | 1,643 | 9229 | 7,0 | Не определяли | 71 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

PS9N-OX (12,6 мг, 13,6 мкмоль) в 1,643 мл воды разбавляли фосфатным буфером (0,945 мл, 200 мМ, pH 6,0, содержащим 94,5 мг сахарозы) и ДМСО (0,33 мл), к которому был добавлен DBCO-PEG₄-NH₂ (7,2 мг, 1 экв., в ДМСО, 0,142 мл). Через 10 мин добавляли NaCNBH₃ (1,71 мг, 2 экв. путем добавления 47 мкл из 7,36 мг в 200 мкл H₂O). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение двух дней в термостатируемой водяной бане с последующим добавлением фосфатного буфера (0,4 мл 200 мМ, pH 6). К этой смеси добавляли NaBH₄ (0,51 мг, 1 экв.). После перемешивания в течение 30 мин смесь экстрагировали этилацетатом (5×5 мл). Остаточный этилацетат удаляли путем барботирования газообразным азотом, и смесь переносили в центрифужные фильтры Amicon с НОММ 30 кДа. DBCO-производное очищали с помощью центробежного диализа, используя 3 замены воды (каждая по 12 мл), затем 6 замен 20% водного этанола (каждая по 12 мл) и, наконец, 3 замены воды (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного типа 9N. К этому раствору (2,388 мл, 9,05 мг) добавляли раствор сахарозы и лиофилизировали.

| Окисленный PS 9N(мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. антрона (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|----------------------|--------------------------|----------------------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 12,6 | 2,388 | 1485 | 0,782 | 72,8 | 4,9 | 78 | 474 |

3. Конъюгация производного PS 9N-DBCO с eCRM.

PS 9N-DBCO: 4,5 мг (с 45 мг сахарозы) лиофилизированного порошка.

% DBCO: 4,9%.

Концентрация CRM: 3,0 мг/мл раствор PS: CRM (входное соотношение): 1,5:1 Порядок проведения реакций.

PS9N-DBCO растворяли в 0,9% NaCl (1,30 мл) вместе с фосфатным буфером с pH 7 (96 мкл 0,5 М) и добавляли ДМСО (0,24 мл). Затем добавляли раствор функционализированного азидом eCRM (0,60 мл), чтобы обеспечить входное массовое соотношение PS:CRM равное 1,5:1 (мас./мас.). Раствор очень осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 18 ч. Реакцию клик-химии останавливали добавлением раствора азид натрия (10 мг/мл, 100 мкл). Конъюгат CRM переносили в две предварительно промытые пробирки для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, НОММ 300000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия, к которому было добавлено 3 мл буфера с pH 7, в течение 24 ч (7 замен, каждая по 1000 мл). Диализованный раствор фильтровали через шприцевой фильтр Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 9N-CRM.

| PS 9N-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | ВСА (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|-----------------|----------|--------------------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 4,5 | 3,0 | 5,28 | 0,77 | 90 | 0,407 | 72 | 1,89:1 | 10,9 | 1,17 |

Пример 19. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 9V с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 9V: 85% (антрон).

Мол. масса: 704 кДа (повторяющееся звено = 971,8 г/моль).

Порядок проведения реакций.

Порошок PS типа 9V (35,90 мг, 37,80 мкмоль) растворяли в 17,95 мл водного раствора (12,565 мл воды и 5,385 мл 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,5) в полистирольной пробирке для образцов объемом 50 мл с мешалкой. После растворения PS добавляли 852 мкл раствора NaIO₄ (2,83 мг, 13,23 мкмоль, 0,35 мол.экв.). Реакционную пробирку заворачивали в фольгу и помещали в водяную баню при 24°C. Смесь перемешивали при 24°C. Через 18 ч реакционную смесь подвергали диализу с применением трех центрифужных фильтрующих устройств AMICON® Ultra-15 (НОММ 30 кДа; 15 мл), используя 4 замены воды категории ВЭЖХ (каждая по 15 мл), с получением раствора окисленного PS-9V.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 9V (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрагон (мкМ) | Окисление (%, ВСА) | Окисление (%, колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|--------------------------------|------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------|---|-----------------|
| 0,35 | 35,90 | 4,55 | 5213,14 | 9,06 | 7,30 | 64 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного PS типа 9V (21,64 мг, 22,78 мкмоль, 4,27 мл) добавляли буферный раствор (0,541 мл 0,5 М фосфатного буфера, pH 6,0), ДМСО (66 мкл) и раствор DBCO-PEG₄-NH₂ (11,9 мг в 475 мкл ДМСО; 22,78 мкмоль, 1 мол.экв.). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 30 мин, по истечении этого времени добавляли 140 мкл раствора цианоборогидрида натрия (2,86 мг в 140 мкл воды; 45,56 мкмоль, 2 мол.экв.). Реакционную смесь оборачивали в алюминиевую фольгу и продолжали перемешивать в водяной бане, установленной на 25°C, в течение 2 дней. Реакцию останавливали на второй день добавлением 163 мкл раствора борогидрида натрия (1,72 мг в 163 мкл воды; 45,56 мкмоль, 2 мол.экв.). После перемешивания в течение 30 мин (после прекращения наблюдаемого образования пузрырьков) реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (2×10 мл) и затем дихлорметаном (2×10 мл). Экстракт барботировали N₂ в течение 20 мин для удаления остаточного дихлорметана и затем переносили в 2 центрифужных фильтрующих устройства AMICON® Ultra-15 (НОММ 50 кДа; 15 мл). Диализ осуществляли, выполняя три замены 3% раствора ДМСО (каждая по 15 мл), три замены 20% раствора этанола (каждая по 15 мл) и две замены воды категории ВЭЖХ (каждая по 15 мл), с получением DBCO-производного 9V. К этому раствору (4,40 мл, 12,144 мг) добавляли раствор сахарозы (121,44 мг, 1,214 мл воды). Этот комбинированный раствор разделяли на три фракции (2×5 мг и 1×2,14 мг) и каждую лиофилизировали с получением мелкодисперсного белого порошка. Все фракции хранили при 4°C до тех пор, пока они не требовались для реакции конъюгации.

| Окисленный PS 9V (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрагон (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS- DBCO (%) | SEC- MALS (кДа) |
|--------------------------|-----------------------------------|-------------------|---|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 21,6 | 4,40 | 949,00 | 0,341 | 28,00 | 3,0 | 56 | 267 |

3. Конъюгация производного PS 9V-DBCO с eCRM.

PS 9V-DBCO: 5 мг (с 50 мг сахарозы) белого порошка.

% DBCO: 3,0%.

Концентрация CRM: 6,009 мг/мл раствор.

PS: CRM (входное соотношение): 1,5:1.

Порядок проведения реакций.

DBCO-производное 9V (5,0 мг белого порошка с 50 мг сахарозы) растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия (0,881 мл), фосфатном буфере, pH 7 (0,067 мл, 0,5 М) и ДМСО (0,167 мл). Добавляли раствор функционализированного азидом eCRM (0,555 мл раствора), чтобы обеспечить массовое соотношение PS9V:CRM равное 1,5:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 18 ч, затем в течение еще 2 ч при 37°C. По истечении общего времени реакции к смеси для конъюгации добавляли объем азид натрия (0,33 мг; 5,15 мкмоль). Затем реакционную смесь разбавляли 0,9% раствором хлорида натрия (2,83 мл) и переносили в предварительно промытое устройство для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235060, НОММ 300000). Образец подвергали диализу в 0,9% растворе хлорида натрия в течение 48 ч (8 замен, каждая по 800 мл). Диализированный раствор фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 9V PS-CRM.

| PS 9V- DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрагон (мг/мл) | Выделен не PS (%) | ВСА (CRM) (мг/мл) | Выделен не CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свобо дный PS (%) | SEC- MALS (МДа) |
|------------------------|-------------|-----------------------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------|
| 5,0 | 3,33 | 1,67 | 0,86 | 87 | 0,450 | 68 | 1,9 | 14,2 | 0,94 |

Пример 20. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 9V с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 9V: 81% (антрагон).

Мол. масса: 949,83.

Раствор NaIO₄ в воде (5,41 мг/мл).

Порядок проведения реакций.

Порошок PS-9V (21,15 мг, скорректировано до 81%, 17,13 мг, 18,04 мкмоль) растворяли в 10,57 мл водного раствора (7,4 мл воды и 3,17 мл 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,5). К этому раствору добавляли

214 мкл раствора NaIO_4 (1,16 мг, 5,41 мкмоль, 0,3 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 20 ч. Окисленный образец очищали с помощью ультрацентрифужного фильтра AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл), используя 6 замен (12 мл) воды категории ВЭЖХ, с получением раствора окисленного PS-9V.

| Мол. экв. NaIO_4 | PS 9V (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Окисление (% ВСА) | Окисление (% колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|---------------------------|------------|--------------------------|--------------|-------------------|---------------------------------------|--------------|
| 0,30 | 21,15 | 2,49 | 7352 | 7,4 | 9,6 | 82 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного (предполагаемый уровень окисления 10%) PS типа 9V (15,36 мг, 16,17 мкмоль, 2,20 мл воды) добавляли буферный раствор (1,4 мл 200 мМ фосфатного буфера, pH 6,01), ДМСО (500 мкл) и раствор DBCO-PEG-4-NH₂ (8,46 мг в 131 мкл ДМСО; 16,17 мкмоль, 10 экв.), все при температуре 25°C. Реакционную смесь затем перемешивали при 25°C в течение 30 мин, по истечении этого времени добавляли 41 мкл раствора цианоборогидрида натрия (15,5 мг в 200 мкл воды; 32,34 мкмоль, 20 экв.) и перемешивали в течение 2 дней при 25°C. Реакционную смесь разбавляли фосфатным буфером (500 мкл 200 мМ раствора, pH 6) перед добавлением 62 мкл раствора борогидрида натрия (0,01 мг/мкл, 10 экв.) в воде. После перемешивания в течение 30 мин реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (3×20 мл). Экстракт переносили в ультрацентрифужный фильтр AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл) и затем подвергали диализу, используя 6 замен 20% этанола в воде (каждая по 12 мл) с последующими 3 заменами воды (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного типа 9V. К этому раствору (4,0 мл, 10,08 мг) добавляли раствор сахарозы (100 мг в 1 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на две равные части и каждую лиофилизировали с получением трех образцов белого порошка. Каждый образец содержал 5,04 мг 9V DBCO и 50 мг сахарозы для использования в следующей реакции конъюгации.

| Окисленный PS 9V (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|-----------------------|--------------------------|--------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 15,36 | 5,42 | 2642 | 0,216×4 | 90,32 | 3,42 | 89 | 324 |

3. Конъюгация производного PS 9V-DBCO с eCRM.

PS 9V-DBCO: 5,04 мг (с 50 мг сахарозы) белый порошок.

% DBCO: 3,42%.

Концентрация CRM: 3,923 мг/мл раствор.

PS: CRM (входное соотношение): 1,11:1.

Порядок проведения реакций.

Раствор функционализированного азидом eCRM (CRM в 0,1,156 мл раствора) добавляли к DBCO-производному 9V (5,04 мг белого порошка с 50 мг сахарозы), чтобы обеспечить массовое соотношение PS9V:CRM равное 1,11:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 18 ч. Смесь конъюгированных PS-CRM переносили в предварительно промытое устройство для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235060, НОММ 300000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 24 ч (5 замен, каждая по 800 мл). Диализованный раствор фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 9V PS-CRM.

| PS 9V-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | ВСА (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|-----------------|----------|--------------------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 5,04 | 4,53 | 5,73 | 0,61 | 69 | 0,298 | 39 | 2,05:1 | 14,64 | 1,26 |

Пример 21. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 10A с eCRM из табл. 2.

1. Активация CDAP и поперечная сшивка DBCO.

Степень чистоты PS 10A: 77% (антрон).

[Мол. масса: 1227 г·моль⁻¹ (повторяющееся звено).

Порядок проведения реакций.

PS10A (18,7 мг, 15,2 мкмоль) растворяли в воде (7,9 мл), к которой был добавлен CDAP (0,8 экв., 100 мг/мл в ацетонитриле, 30 мкл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре (КТ) в течение 30 с. В это время добавляли раствор гидроксида натрия (0,2 М, 200 мкл) до достижения pH 9,5,

и реакционную смесь перемешивали в течение 150 с. После этого добавляли ДМСО (1,2 мл), затем DBCO-PEG₄-NH₂ (0,5 экв., 32,0 мкмоль/мл в ДМСО, 238 мкл) и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. DBCO-derivatизированный PS10A очищали с помощью экстракции растворителем и центробежного диализа (Amicon, НОММ 30 кДа) с использованием 3 замен 3% (об./об.) ДМСО, 2 замен 0,9% (об./об.) рассола и 3 замен воды. После анализа методом УФ-абсорбционной спектроскопии, количественного исследования антрона и SEC этот раствор (3,18 мл, 13,5 мг) разбавляли раствором сахарозы (10-кратное массовое содержание, 100 мг/мл) и лиофилизировали с получением белого порошка.

| PS 10A (мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. антрона (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|-------------|--------------------------|----------------------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 18,7 | 3,18 | 1150,41 | 1,081 | 101,26 | 8,8 | 72 | 579 |

2. Конъюгация производного PS 10A-DBCO с eCRM.

PS 10A-DBCO: 5,00 мг (с 50,0 мг сахарозы) лиофилизованного порошка.

% DBCO: 8,8%.

CRM: 5,0 мг/мл в ФСБ.

PS:CRM (входное массовое соотношение): 1,75:1.

Порядок проведения реакций.

Леофилизированный 10A-DBCO растворяли в рассоле (0,9% (масс./об.), 3,759 мл), фосфатном буфере (0,5 М, pH 7,0, 200 мкл) и ДМСО (500 мкл), к которому был добавлен раствор eCRM (0,541 мл), чтобы обеспечить входное массовое соотношение PS10A:CRM равное 1,75:1,00 (мас./мас.). Раствор очень осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 17 ч. Конъюгат CRM переносили в две предварительно промытые пробирки для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, НОММ 300000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 24 ч (3 замены, каждая по 800 мл). Диализированный раствор стерилизовали путем фильтрации через шприцевой фильтр Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 10A-CRM.

| PS 10A-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Соотн. PS:CRM CJF | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|------------------|----------|--------------------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 5,00 | 2,86 | 6,86 | 0,678 | 93 | 0,311 | 2,18:1,0 | 5,64 | 1,048 |

Пример 22. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 11A с eCRM из табл. 2.

1. Гидролиз.

Степень чистоты PS типа 11A: 69% (антрон).

Мол. масса: 908,7 г·моль⁻¹.

Порядок проведения реакций.

Нативный полисахарид 11A (35,0 мг) растворяли в 17,5 мл водного раствора (15,75 мл воды и 1,75 мл уксусной кислоты, 2 М). Смесь нагревали при 80°C в течение 1 ч, по истечении этого времени добавляли раствор гидроксида натрия до достижения pH 5,5 (3,2 мл, 1 М) после охлаждения до температуры окружающей среды. Гидролизированный PS очищали с помощью центробежного диализа (Amicon, НОММ 30 кДа), используя по меньшей мере 6 замен воды, с получением раствора очищенного PS-3, который затем лиофилизировали как одну аликвоту.

| PS 11A (мг) | Вода (мл) | AcOH, 2M (мл) | Колич. иссл. антрона (мкМ) | Выход PS (%) | MALS (кДа) |
|-------------|-----------|---------------|----------------------------|--------------|------------|
| 35,0 | 15,75 | 1,75 | 6294,58 | 85 | 461 |

2. Окисление.

Порядок проведения реакций.

К раствору гидролизованного полисахарида (5,027 мл, 28,75 мг, 31,6 мкмоль) дополнительно добавляли воду (5,75 мл) и ацетатный буфер (0,2 М, pH 5,5, 3,6 мл). К этому раствору по каплям добавляли 135 мкл раствора периодата натрия (1,35 мг, 6,32 мкмоль, 0,20 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 ч. Окисленный PS очищали с помощью центробежного диализа (Amicon, НОММ 100 кДа), используя по меньшей мере 6 замен воды, с получением раствора очищенного PS-11A-OX.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 11A (мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. антрона (мкМ) | Окисление (%; BCA) | Окисление (%; колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|-----------------------------|-------------|--------------------------|----------------------------|--------------------|--|--------------|
| 0,20 | 28,75 | 2,42 | 9525,39 | 10,2 | 4,82 | 73 |

3. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

PS11A-OX (22,0 мг, 24,2 мкмоль, 2,235 мл) добавляли в фосфатный буфер (1,37 мл, 200 мМ, pH 6,0), к которому был добавлен DBCO-PEG₄-NH₂ (1,0 экв., 523 г·моль⁻¹ в ДМСО, 100 мг/мл, 127 мкл) и дополнительное количество ДМСО (560 мкл). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 25 мин перед добавлением раствора цианоборогидрида натрия (2 экв., 44,5 мг/мл, 68 мкл) и перемешивали в течение двух дней. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (3×20 мл) и фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0,45 мкм. DBCO-производное очищали с помощью блоков для центробежного диализа (Amicon, НОММ 100 кДа), используя 7 замен 20% этанола в воде с последующими 3 заменами воды (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного типа 11A. К этому раствору (2,535 мл, 15,00 мг) добавляли раствор сахарозы (150 мг в 1,5 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на три равные части и каждую лиофилизировали с получением трех образцов белого порошка. Каждый образец содержал 5,00 мг 11A-DBCO и 50 мг сахарозы для использования в следующей реакции конъюгации.

| Гидролизированный PS 11A (мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. антрона (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|-------------------------------|--------------------------|----------------------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 22,0 | 3,44 | 1628,30 | 1,000×4 | 93,93 | 5,77 | 93 | 543 |

4. Конъюгация производного PS 11A-DBCO с eCRM.

PS 11 A-DBCO: 5,0 мг (с 50 мг сахарозы) лиофилизированного порошка.

% DBCO: 5,77%.

Концентрация CRM: 5,42 мг/мл раствор.

PS: CRM (входное соотношение): 1,5:1.

Порядок проведения реакций.

11A-DBCO растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия (7,656 мл, профильтрован через фильтр с размером пор 0,22 мкм), фосфатном буфере (pH 7,0, 0,5 М, 0,385 мл) и ДМСО (0,962 мл). Раствор функционализированного азидом eCRM (5,42 мг/мл, 0,617 мл) добавляли по каплям, чтобы обеспечить входное массовое соотношение PS11A:CRM равное 1,5:1 (мас./мас.). Раствор очень осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 17 ч. Реакцию клик-химии останавливали добавлением раствора азидата натрия (10 мг/мл, 50 мкл). Конъюгат CRM переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, НОММ 300000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 48 ч (4 замены, каждая по 1 л). Диализированный раствор фильтровали через шприцевой фильтр Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 11A-CRM.

| PS 11A-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJF | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|------------------|----------|--------------------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 5,0 | 3,33 | 9,14 | 0,454 | 83 | 0,271 | 74 | 1,68:1 | 0,92 | 0,987 |

Пример 23. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 12F с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 12F: 82% (антрон).

Мол. масса: 1094 г·моль⁻¹.

Порядок проведения реакций.

Порошок PS типа 12F (21,8 мг, 20 мкмоль) растворяли в 10,9 мл водного раствора (8,175 мл воды и 2,725 мл 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,5) в полистирольной пробирке для образцов объемом 50 мл с мешалкой. После растворения PS добавляли 160 мкл раствора NaIO₄ (0,64 мг, 3 мкмоль, 0,15 мол.экв.). Реакционную пробирку заворачивали в фольгу и помещали в водяную баню при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C. Через 18 ч реакционную смесь подвергали диализу с применением двух центрифужных фильтрующих устройств AMICON® Ultra-15 (30 кДа НОММ; 15 мл), используя 6 замен воды категории ВЭЖХ (каждая по 15 мл), с получением раствора окисленного PS-12F.

| Мол. NaIO ₄ | экв. | PS 12F (мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. антрона (мкМ) | Окисление (% BCA) | Окисление (% колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|------------------------|------|-------------|--------------------------|----------------------------|-------------------|---------------------------------------|--------------|
| 0,15 | | 21,8 | 3,06 | 4462,11 | 37 | 5,62 | 69 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

PS12F-OX (13,1 мг, 12 мкмоль, 2,68 мл) добавляли в фосфатный буфер (1,00 мл, 200 мМ, рН 6,0), к которому был добавлен DBCO-PEG₄-NH₂ (1,0 экв., 523 г·моль⁻¹ в ДМСО, 33 мг/мл, 199 мкл) и дополнительное количество ДМСО (500 мкл). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 25 мин перед добавлением раствора цианоборогидрида натрия (2 экв., 52,5 мг/мл, 29 мкл) и перемешивали в течение двух дней. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (3×20 мл) и барботировали без растворителя. DBCO-производное дважды очищали с применением блоков для центробежного диализа (Amicon, НОММ 30 кДа), используя 6 замен 20% этанола в воде с последующими 3 заменами воды каждый раз (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного 12F. К этому раствору (2,2 мл, 10,45 мг) добавляли раствор сахарозы (104,5 мг в 1,05 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на две равные части и каждую лиофилизировали с получением трех образцов белого порошка. Каждый образец содержал 5,0 мг 12F-DBCO и 50 мг сахарозы для использования в реакции конъюгации.

| PS 12F- OX (мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. антрона (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS- DBCO (%) | SEC- MALS (кДа) |
|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 13,1 | 2,20 | 1447,92 | 0,302×3 | 28,2 | 2,0 | 80 | 544 |

3. Конъюгация производного PS 12F-DBCO с eCRM.

PS 12F-DBCO: 5,0 мг (с 50 мг сахарозы) лиофилизованного порошка.

% DBCO: 2,0%.

Концентрация CRM: 5,29 мг/мл раствор.

PS: CRM (входное соотношение): 1,5:1.

Порядок проведения реакций.

12F-DBCO растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия (6,542 мл, профильтрован через фильтр с размером пор 0,22 мкм), фосфатном буфере (рН 7,0, 0,5 М, 0,334 мл) и ДМСО (0,834 мл). Раствор функционализированного азидом eCRM (5,29 мг/мл, 0,630 мл) добавляли по каплям, чтобы обеспечить входное массовое соотношение PS12F:CRM равное 1,5:1 (мас./мас.). Раствор очень осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 17 ч. Реакцию клик-химии останавливали добавлением раствора азидата натрия (10 мг/мл, 50 мкл). Конъюгат CRM переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, НОММ 300000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 48 ч (4 замены, каждая по 1 л). Диализированный раствор фильтровали через шприцевой фильтр Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением стерильного раствора конъюгата 12F-CRM.

| PS 12F- DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJF | Свободный PS (%) | SEC- MALS (МДа) |
|----------------------------|-------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| 5,0 | 3,33 | 8,06 | 0,547 | 88 | 0,200 | 48 | 2,73:1 | 13,3 | 0,931 |

Пример 24. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 14 с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 14: 91% (антрон).

Мол. масса: 689,25.

Раствор NaIO₄ в воде (7,8 мг/мл).

Порядок проведения реакций.

Порошок PS-14 (28,3 мг, скорректировано до 80%, 25,75 мг, 37,36 мкмоль) растворяли в 14 мл водного раствора (10 мл воды и 4 мл 0,2 М ацетатного буфера, рН 5,5). К этому раствору добавляли 110 мкл раствора NaIO₄ (0,86 мг, 4,05 мкмоль, 0,13 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 3 ч, по истечении этого времени окисленный образец очищали с применением ультрацентрифуги AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл), используя 6 замен (12 мл) воды категории ВЭЖХ, с получением раствора окисленного PS-14.

| Мол. NaIO ₄ | экв. | PS 14 (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Окисление (%, BCA) | Окисление (%, колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|---------------------------|------|------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------|---|-----------------|
| 0,13 | | 28,3 | 3,042 | 10189 | 6,59 | 3,67 | 83 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного (предполагаемый уровень окисления 10%) PS типа 14 (20,5 мг, 29,74 мкмоль, 2,92 мл воды) добавляли буферный раствор (1,3 мл 200 мМ фосфатного буфера, pH 6,8), ДМСО (550 мкл) и раствор DBCO-PEG-4-NH₂ (11,68 мг в 150 мкл ДМСО; 22,3 мкмоль, 0,75 эквивалента), все при 25°C. Реакционную смесь затем перемешивали при 25°C в течение 30 мин, по истечении этого времени добавляли 70 мкл раствора цианоборогидрида натрия (6,39 мг в 120 мкл воды; 59,48 мкмоль, 20 экв.) и перемешивали в течение 2 дней при 25°C. Реакционную смесь разбавляли фосфатным буфером (500 мкл 200 мМ раствора, pH 6) перед добавлением 100 мкл раствора борогидрида натрия (1,13 мг на 10 экв.) в воде. После перемешивания в течение 30 мин реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (3×20 мл этилацетата), затем переносили в ультрацентрифугу AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл) и после этого подвергали диализу, используя 7 замен 20% этанола в воде (каждая по 12 мл) с последующими 3 заменами воды (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного типа 14. К этому раствору (3,78 мл, 17,7 мг) добавляли раствор сахарозы (177 мг в 1,17 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на три равные части и каждую лиофилизировали с получением трех образцов белого порошка. Каждый образец содержал 5,9 мг 14 DBCO и 59 мг сахарозы для использования в следующей реакции конъюгации.

| Окисленный PS 14 (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|-----------------------|--------------------------|--------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 20,5 | 3,91 | 1694,06 | 0,622×4 | 238 | 3,51 | 91 | 463 |

3. Конъюгация производного PS 14-DBCO с eCRM.

PS 6B-DBCO: 5,9 мг (с 59 мг сахарозы) в виде порошка.

% DBCO: 3,5%.

Концентрация CRM: 5,06 мг/мл раствор.

PS: CRM (входное соотношение): 1,5:1.

Порядок проведения реакций.

Раствор функционализированного азидом eCRM (0,779 мл) добавляли к DBCO-производному 14 (5,9 мг белого порошка с 59 мг сахарозы), чтобы обеспечить массовое соотношение PS14:CRM равное 1,5:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 18 ч. Смесь конъюгированных PS-CRM переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235071, НОММ 100000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 48 ч (8 замен, каждая по 800 мл). Диализированный раствор фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 14 PS-CRM.

| PS 14-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделен не PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделен не CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|-----------------|----------|--------------------------|----------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 5,9 | 3,94 | 4,27 | 0,648 | 93 | 0,283 | 61 | 2,29:1 | 5,29 | 0,925 |

Пример 25. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 14 с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 14:91% (антрон).

Мол. масса: 689,25.

Раствор NaIO₄ в воде (10,19 мг/мл).

Порядок проведения реакций.

Порошок PS-14 (23,5 мг, скорректировано до 80%, 21,38 мг, 31,02 мкмоль) растворяли в 11,75 мл водного раствора (8,2 мл воды и 3,55 мл 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,5). К этому раствору добавляли 97 мкл раствора NaIO₄ (0,95 мг, 4,03 мкмоль, 0,13 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 ч, по истечении этого времени окисленный образец очищали с помощью ультрацентрифуги AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл), используя 6 замен (12 мл) воды категории ВЭЖХ, с получением раствора окисленного PS-14.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 14 (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Окисление (% BCA) | Окисление (% колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) | Примечание |
|-----------------------------|------------|--------------------------|--------------|-------------------|---------------------------------------|--------------|------------|
| 0,13 | 23,5 | 3,76 | 5994 | 6,60 | 2,28 | 73 | Нет |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного (предполагаемый уровень окисления 10%) PS типа 14 (14,3 мг, 20,75 мкмоль, 3,46 мл воды) добавляли буферный раствор (1,3 мл 200 мМ фосфатного буфера, pH 6,8), ДМСО (637 мкл) и раствор DBCO-PEG-4-NH₂ (10,86 мг в 263 мкл ДМСО; 20,75 мкмоль, 10 экв.), все при температуре 25°C. Реакционную смесь затем перемешивали при 25°C в течение 30 мин, по истечении этого времени добавляли 51 мкл раствора цианоборогидрида натрия (10,2 мг в 200 мкл воды; 41,50 мкмоль, 20 экв.) и перемешивали в течение 2 дней при 25°C. Реакционную смесь разбавляли фосфатным буфером (500 мкл 200 мМ раствора, pH 6) перед добавлением 78 мкл раствора борогидрида натрия (0,01 мг/мкл, 10 экв.) в воде. После перемешивания в течение 30 мин реакцию смесь экстрагировали этилацетатом (3×20 мл этилацетата) и затем переносили в ультрацентрифугу AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл), и затем подвергали диализу, используя 6 замен 20% этанола в воде (каждая по 12 мл) с последующими 3 заменами воды (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного типа 14. К этому раствору (4,12 мл, 12,24 мг) добавляли раствор сахарозы (12 мг в 1 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на три равные части и каждую лиофилизировали с получением трех образцов белого порошка. Каждый образец содержал 6,12 мг 14 DBCO и 6 мг сахарозы для использования в следующей реакции конъюгации.

| Окисленный PS 14 (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) |
|-----------------------|--------------------------|--------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|
| 14,3 | 4,43 | 4307 | 0,621×3 | 190,14 | 4,42 | 92 |

3. Конъюгация производного PS 14-DBCO с eCRM.

PS 6B-DBCO: 6,12 мг (с 62 мг сахарозы) белого порошка.

% DBCO: 4,42%.

Концентрация CRM: 2,617 мг/мл раствор.

PS: CRM (входное соотношение): 1,8:1.

Порядок проведения реакций.

Раствор функционализированного азидом eCRM (1,3 мл) добавляли к DBCO-производному 14 (6,12 мг белого порошка с 62 мг сахарозы), чтобы обеспечить массовое соотношение PS14:CRM равное 1,8:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 17 ч. Смесь конъюгированных PS-CRM переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235071, НОММ 100000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 24 ч (3 замены, каждая по 800 мл). Диализированный раствор (1,5 мл) фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 14 PS-CRM.

| PS 14-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM М СJD | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) | № партии |
|-----------------|----------|--------------------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|---------------------|------------------|----------------|----------|
| 6,12 | 3,4 | 4,85 | 1,24 | 98 | 0,472 | 67 | 2,63:1 | 3,48 | 2,5 | СJD |
| 6,12 | 3,4 | 2,31 | 0,24 | | 0,094 | | 2,55:1 | Нет данные x | 1,56 | СJF |

Пример 26. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 15B с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 15B: 71% (антрон).

Мол. масса: 1185 кДа (повторяющееся звено = 1069,80 г/моль).

Порядок проведения реакций.

Порошок PS типа 15B (14,6 мг, 13,65 мкмоль) растворяли в 7,30 мл водного раствора (5,1 мл воды и 2,2 мл 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,5) в полистирольной пробирке для образцов объемом 50 мл с мешалкой. После растворения PS добавляли 160 мкл раствора Na₂CO₃ (0,59 мг, 2,75 мкмоль, 0,20 мол.экв.). Реакционную пробирку заворачивали в фольгу и помещали в водяную баню для перемешивания при 24°C. Через 3,5 ч реакцию смесь подвергали диализу с помощью одного центрифужного фильтрующего устройства AMICON® Ultra-15 (НОММ 30 кДа; 15 мл), используя 6 замен воды категории ВЭЖХ (каждая по 15 мл), с получением раствора окисленного PS-15B.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 15B (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Окисление (% ВСА) | Окисление (% колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|-----------------------------|-------------|--------------------------|--------------|-------------------|---------------------------------------|--------------|
| 0,20 | 14,6 | 1,521 | 5560,34 | 27,01 | 9,52 | 62 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного PS типа 15B (7,56 мг, 7,07 мкмоль, 1,271 мл) добавляли буферный раствор (0,640 мл 0,5 М фосфатного буфера, pH 6,0), ДМСО (0,063 мл) и раствор DBCO-PEG₄-NH₂ (17 мг в 221 мкл ДМСО; 7,07 мкмоль, 1 мол.экв.). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 30 мин, после этого добавляли 350 мкл раствора цианоборогидрида натрия (0,90 мг в 350 мкл воды, 2 мол.экв.). Реакционную смесь оборачивали в алюминиевую фольгу и продолжали перемешивать в водяной бане, установленной на 25°C, в течение 2 дней. Реакцию останавливали на второй день добавлением 163 мкл раствора борогидрида натрия (0,27 мг; 7,07 мкмоль, 2 мол.экв.). После перемешивания в течение 30 мин реакционную смесь экстрагировали дихлорметаном (3×15 мл). Экстракт барботировали N₂ в течение 20 мин для удаления остаточного дихлорметана и затем переносили в одно центрифужное фильтрующее устройство AMICON® Ultra-15 (НОММ 30 кДа; 15 мл). Диализ выполняли путем проведения трех замен 3% раствора ДМСО (каждая по 15 мл), трех замен 20% раствора этанола (15 мл) и трех замен воды категории ВЭЖХ (каждая по 15 мл), с получением DBCO-производного 15B. К этому раствору (1,982 мл, 6,86 мг) добавляли раствор сахарозы (68,6 мг в 0,686 мл воды). Этот комбинированный раствор разделяли на две фракции и каждую лиофилизировали с получением мелкодисперсного белого порошка. Все фракции хранили при 4°C после лиофилизации до сухости до тех пор, пока они не потребовались для реакции конъюгации.

| Окисленный PS 15B (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|------------------------|--------------------------|--------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 7,56 | 1,982 | 1122,13 | 0,732 | 66,71 | 5,9 | 91 | Нет данных |

3. Конъюгация производного PS 15B-DBCO с eCRM.

PS 15B-DBCO: 3,85 мг (с 38,5 мг сахарозы) белого порошка.

% DBCO: 5,9%.

Концентрация CRM: 6,009 мг/мл раствор.

PS: CRM (входное соотношение): 1,5:1.

Порядок проведения реакций.

DBCO-производное 15B (3,85 мг белого порошка с 38,5 мг сахарозы) растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия (4,302 мл), фосфатном буфере, pH 7 (0,220 мл, 0,5 М) и ДМСО (0,550 мл). Добавляли раствор функционализированного азидом eCRM (0,467 мл раствора), чтобы обеспечить массовое соотношение PS15B:CRM равное 1,5:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 18 ч, затем еще в течение 2 ч при 37°C. Реакцию конъюгации останавливали добавлением азидата натрия (0,23 мг; 3,60 мкмоль). Затем реакционную смесь разбавляли 0,9% раствором хлорида натрия до конечного объема 7 мл и переносили в предварительно промытое устройство для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235060, НОММ 300000). Образец подвергали диализу в 0,9% растворе хлорида натрия в течение 48 ч (8 замен, каждая по 800 мл). Диализованный раствор фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 15B PS-CRM.

| PS 15B-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделен не PS (%) | ВСА (CRM) (мг/мл) | Выделен не CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|------------------|----------|--------------------------|----------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 3,85 | 2,57 | 7,52 | 0,515 | 100 | 0,289 | 85 | 1,8:1 | 7,68 | 2,40 |

Пример 27. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 17F с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 17F: 84% (антрон).

Мол. масса: 1274 кДа (повторяющееся звено = 1203,00 г/моль).

Порядок проведения реакций.

Порошок PS типа 17F (28,50 мг, 23,69 мкмоль) растворяли в 14,25 мл водного раствора (9,925 мл воды и 4,275 мл 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,5) в полистирольной пробирке для образцов объемом 50 мл с мешалкой. После растворения PS добавляли 53,8 мкл раствора NaIO₄ (0,65 мг,

3,03 мкмоль, 0,128 мол.экв.). Реакционную пробирку заворачивали в фольгу и помещали в водяную баню для перемешивания при 24°C. Через 1 ч реакционную смесь подвергали диализу с применением двух центрифужных фильтрующих устройств AMICON® Ultra-15 (НОММ 30 кДа; 15 мл), используя 5 замен воды категории ВЭЖХ (каждая по 15 мл), с получением раствора окисленного PS-17F.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 17F (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Окисление (%, ВСА) | Окисление (%, колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|--------------------------------|-------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------|---|-----------------|
| 0,128 | 28,50 | 2,63 | 7378,81 | 12,60 | 6,81 | 82 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного PS типа 17F (22,0 мг, 18,29 мкмоль, 2,48 мл) добавляли буферный раствор (1,31 мл 0,5 М фосфатного буфера, pH 6,0) и раствор DBCO-PEG₄-NH₂ (9,58 мг в 95,8 мкл ДМСО; 18,29 мкмоль, 1 мол.экв.). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 30 мин, по истечении этого времени добавляли раствор цианоборогидрида натрия (2,30 мг в 200 мкл воды; 36,60 мкмоль; 2 мол.экв.). Реакционную смесь оборачивали в алюминиевую фольгу и продолжали перемешивать в водяной бане, установленной на 25°C, в течение 2 дней. Реакцию останавливали на второй день добавлением раствора борогидрида натрия (0,48 мг; 18,29 мкмоль, 1 мол.экв.). После перемешивания в течение 30 мин реакционную смесь экстрагировали дихлорметаном (3×15 мл). Экстракт барботировали N₂ в течение 20 мин для удаления остаточного дихлорметана и затем переносили в одно центрифужное фильтрующее устройство AMICON® Ultra-15 (НОММ 30 кДа; 15 мл). Диализ осуществляли, выполняя пять замен 20% раствора этанола (15 мл) и три замены воды категории ВЭЖХ (каждая по 15 мл), с получением DBCO-производного 17F. К этому раствору (3,27 мл, 11,58 мг) добавляли раствор сахарозы (115,8 мг в 1,158 мл воды). Этот комбинированный раствор делили на три фракции (2×5 мг; 1 × 1,58 мг) и каждую лиофилизировали с получением мелкодисперсного белого порошка. Все фракции хранили при 4°C после лиофилизации до сухости до тех пор, пока они не потребовались для реакции конъюгации.

| Окисленный PS 17F (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS- DBCO (%) | SEC- MALS (кДа) |
|---------------------------|-----------------------------------|-----------------|---|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 22 | 4,40 | 978,16 | 0,350 | 30,45 | 3,1 | 53 | 209 |

3. Конъюгация производного PS 17F-DBCO с eCRM.

PS 17F-DBCO: 5 мг (с 50 мг сахарозы) белого порошка.

%DBCO:3,1%.

Концентрация CRM: 5,996 мг/мл раствор.

PS:CRM (входное соотношение): 1,5:1.

Порядок проведения реакций.

DBCO-производное 17F (5 мг белого порошка с 50 мг сахарозы) растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия (3,742 мл), фосфатном буфере, pH 7 (0,200 мл, 0,5 М) и ДМСО (0,500 мл). Добавляли раствор функционализированного азидом eCRM (0,558 мл раствора), чтобы обеспечить массовое соотношение PS17F:CRM равное 1,5:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 19 ч. Реакцию конъюгации останавливали добавлением азидата натрия (0,27 мг; 4,16 мкмоль; 1 мол.экв.). Затем реакционную смесь разбавляли 0,9% раствором хлорида натрия до конечного объема 8 мл и переносили в предварительно промытое устройство для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235060, НОММ 300000). Образец подвергали диализу в 0,9% растворе хлорида натрия в течение 48 ч (8 замен, каждая по 800 мл). Диализированный раствор фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 17F PS-CRM.

| PS 17F- DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделен ие PS (%) | ВСА (CRM) (мг/мл) | Выделен ие CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свобо дный PS (%) | SEC- MALS (МДа) |
|-------------------------|-------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
| 5 | 3,33 | 6,71 | 461,30 | 99 | 0,349 | 70 | 1,59:1 | 9,41 | 1,072 |

Пример 28. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 18С с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 18С: 72% (антрон).

Мол. масса: 970,76.

Раствор NaIO_4 в воде (5,41 мг/мл).

Порядок проведения реакций.

Порошок PS типа 18C (61 мг, 62,84 мкмоль) растворяли в 30,5 мл водного раствора (27,45 мл воды и 3,05 мл 2 М уксусной кислоты). Затем раствор нагревали при 95°C в течение 40 мин и затем охлаждали, при этом добавляли раствор NaOH (1 н, 5,2 мл) для доведения pH до 6,0. Реакционную смесь подвергали диализу с помощью ультрацентрифуги Amicon (100 кДа НОММ, 6-12 мл), используя 3 замены воды (каждая по 12 мл). Супернатант переносили в 50 мл пробирку Falcon с 12,4 мл воды. К этому раствору добавляли 5,15 мл воды и 5,8 мл 200 мМ ацетатного буфера (pH 5,35) и 153 мкл раствора NaIO_4 (1,53 мг, 7,175 мкмоль, 0,15 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 3 ч, по истечении этого времени окисленный образец очищали с помощью ультрацентрифуги AMICON (НОММ 100 кДа, 6-12 мл), используя 6 замен (12 мл) воды категории ВЭЖХ, с получением раствора окисленного PS-18C.

| Мол. экв. NaIO_4 | PS 18C (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Окисление (% ВСА) | Окисление (% колич. альдегидов) иссл. | Выход PS (%) |
|---------------------------|-------------|--------------------------|--------------|-------------------|---------------------------------------|--------------|
| 0,15 | 61 | 5,29 | 6480,2 | 4,84 | 7,1 | 55 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного (предполагаемая степень окисления 10%) PS типа 18C (10,0 мг, 10,3 мкмоль, 1,55 мл воды) добавляли буферный раствор (0,211 мл 200 мМ фосфатного буфера, pH 6,74), ДМСО (141 мкл) и раствор DBCO-PEG-4- NH_2 (5,4 мг в 54 мкл ДМСО; 16,17 мкмоль, 10 экв.), все при температуре 25°C. Реакционную смесь затем перемешивали при 25°C в течение 30 мин, по истечении этого времени добавляли 130 мкл раствора цианоборогидрида натрия (1,3 мг в 130 мкл воды; 20,6 мкмоль, 20 экв.) и перемешивали в течение 2 дней при 37°C. Реакционную смесь разбавляли фосфатным буфером (500 мкл 200 мМ раствора, pH 6) перед добавлением 80 мкл раствора борогидрида натрия (0,01 мг/мкл, 10 экв.) в воде. После перемешивания в течение 30 мин реакционную смесь экстрагировали дихлорметаном (2×10 мл) и затем этилацетатом (10 мл). Экстракт переносили в ультрацентрифужный фильтр AMICON (НОММ 100 кДа, 6-12 мл) и затем подвергали диализу, используя 4 замены 20% этанола в воде (каждая по 12 мл) с последующими 3 заменами воды (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного типа 18C. К этому раствору (1,31 мл, 7,0 мг) добавляли раствор сахарозы (70 мг в 0,7 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на две равные части и каждую лиофилизировали с получением двух образцов белого порошка. Каждый образец содержал 3,5 мг 18C DBCO и 35 мг сахарозы для использования в следующей реакции конъюгации.

| Окисленный PS 18C (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC- (кДа) |
|------------------------|--------------------------|--------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|------------|
| 10,0 | 1,52 | 5469,4 | 1,031×3 | 291 | 5,32 | 81 | 203 |

3. Конъюгация производного PS 18C-DBCO с eCRM.

PS 18C-DBCO: 3,5 мг (с 35 мг сахарозы) в виде белого порошка.

% DBCO: 5,32%.

Концентрация CRM: 2,76 мг/мл раствор.

PS: CRM (входное соотношение): 1,5:1.

Порядок проведения реакций.

DBCO-производное 18C (3,5 мг белого порошка с 35 мг сахарозы) растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия (0,661 мл), фосфатном буфере, pH 7 (0,07 мл, 0,5 М) и ДМСО (0,175 мл). Добавляли раствор функционализированного азидом eCRM (0,844 мл раствора), чтобы обеспечить массовое соотношение PS18C:CRM равное 1,5:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 2 ч. Затем реакционную смесь разбавляли 0,9% раствором хлорида натрия (0,661 мл), фосфатным буфером pH 7 (0,07 мл, 0,5 М) и ДМСО (0,175 мл), чтобы довести конечную концентрацию PS-18 до 1 мг/мл, и обеспечивали взаимодействие в течение 18 ч. Добавляли раствор азидата натрия (23 мкл, 10 мг/мл в воде). Через 30 мин конъюгированную смесь PS-CRM переносили в предварительно промытое устройство для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235060, НОММ 300000) и затем подвергали диализу с 0,9% раствором хлорида натрия в течение 48 ч (8 замен, каждая по 800 мл). Диализированный раствор фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 18C PS-CRM.

| PS 18C-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC-MALS (кДа) |
|------------------|----------|--------------------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 3,5 | 2,33 | 4,11 | 0,287 | 34 | 0,168 | 29,6 | 1,7 | 13,7 | 1,97 |

Пример 29. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 18C с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Мол. масса повторяющегося звена PS типа 18C: 1012.

Раствор NaIO₄ в воде (10 мг/мл).

Порядок проведения реакций.

Порошок PS-18C (20 мг, 19,76 мкмоль) растворяли в 3 мл водного раствора (10 mM раствор ацетата натрия, pH 4,5). К этому раствору добавляли 63,4 мкл раствора NaIO₄ (0,634 мг, 2,96 мкмоль, 0,15 экв.). Смесь перемешивали при 23°C в течение 18 ч, по истечении этого времени окисленный образец переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235057, НОММ 20000) и затем подвергали диализу с применением 50 mM PB-буфера, pH 6,8, в течение 24 ч (4 замены, каждая по 600 мл) с получением раствора окисленного PS-18C. После диализа добавляли ДМСО с получением PS-18C в 10% ДМСО с 50 mM PB-буфера, pH 6,8.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 18C (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Окисление (% BCA) | Выход PS (%) |
|-----------------------------|-------------|--------------------------|--------------|-------------------|--------------|
| 0,15 | 20 | 4 | 3705 | 7,05 | 75 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Конечная концентрация PS: 3,75 мг/мл.

Конечная концентрация буфера: 10% ДМСО в 50 mM PB (pH 6,8).

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного PS типа 18C (15 мг, 14,8 мкмоль, 4,4 мл в 10% ДМСО 50 mM PB, pH 6,8) добавляли раствор DBCO-PEG₄-NH₂ (7,76 мг в 77,6 мкл ДМСО; 14,8 мкмоль, 10 экв.) при 25°C. Затем реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 60 мин, по истечении этого времени добавляли раствор цианоборогидрида натрия (0,93 мг в 93 мкл воды; 14,8 мкмоль, 10 экв.) и продолжали перемешивание в течение 24 ч при 25°C. Затем реакционную смесь переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235057, НОММ 20000) и затем подвергали диализу, используя 4 замены 20% этанола в 50 mM PB-буфере с последующими 3 заменами 50 mM PB-буфера, с получением DBCO-производного типа 18C.

| Окисленный PS 18C (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|------------------------|--------------------------|--------------|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 15 | 5 | 2460,4 | 75,12 | 3,05 | 83 | 350 |

3. Конъюгация производного PS 18C-DBCO с eCRM.

PS 18C-DBCO: 6 мг (с 60 мг сахарозы) белого порошка.

DBCO: 3%.

Концентрация eCRM: 6,5 мг/мл.

PS:CRM (входное соотношение): 1,5:1.

Конечная концентрация PS: 2 мг/мл.

Порядок проведения реакций.

Раствор функционализированного азидом eCRM (0,615 мл) добавляли к DBCO-производному 18C (6 мг белого порошка, предварительно растворенного в 3 мл воды, 5,9 мкмоль), чтобы обеспечить массовое соотношение PS 18C:CRM равное 1,5:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (23°C) в течение 17 ч. Затем смесь помещали в инкубатор (37°C) на 3 ч. После реакции смесь разбавляли в 2 раза 0,9% раствором хлорида натрия и восстанавливали борогидридом натрия (1,12 мг в 112 мкл воды; 29,64 мкмоль, 50 экв.) в течение 3 ч. Смесь конъюгированных PS-CRM переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (Spectrum Lab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235072, НОММ 300000) и затем подвергали диализу против ФСБ с pH 7 в течение 24 ч (3 замены, каждая по 1000 мл). Диализованный раствор фильтровали через Millex-GP (0,45 мкм и 0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 18C PS-CRM.

| PS 18C- DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Соотн. PS: CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) (фильтрованный через 0,22 мкм фильтр) |
|----------------------------|-------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------------|---------------------|--|
| 6 | 4 | 10 | 0,42 | 70 | 0,15 | 2,65:1 | 14,80 | 8,25 |

Пример 30: Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 19А с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 19А: 90% (антрон).

Мол. масса: 614,44.

Раствор NaO₄ в воде (5,69 мг/мл).

Порядок проведения реакций.

Порошок PS-19А (22,10 мг, скорректировано до 90%, 19,89 мг, 32,37 мкмоль) растворяли в 11,05 мл водного раствора (7,73 мл воды и 3,32 мл 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,5). К этому раствору добавляли 304 мкл раствора NaO₄ (1,73 мг, 8,09 мкмоль, 0,25 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 ч, по истечении этого времени окисленный образец очищали с помощью ультрацентрифуги AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл), используя 6 замен (10 мл) воды категории ВЭЖХ, с получением раствора окисленного PS-19А.

| Мол. NaO ₄ | экв. | PS 19А (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Окисление (%, BCA) | Окисление (%, колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|--------------------------|------|-------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------|--|-----------------|
| 0,25 | | 22,10 | 2,72 | 11148 | 11,5 | 6,1 | 99,39 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного (предполагаемый уровень окисления 10%) PS типа 19А (17,14 мг, 27,9 мкмоль, 2,50 мл воды) добавляли буферный раствор (1,0 мл 200 мМ фосфатного буфера, pH 6,01), ДМСО (0,4 мл) и раствор DBCO-PEG-4-NH₂ (14,61 мг в 190 мкл ДМСО; 27,9 мкмоль, 10 экв.), все при температуре 25°C. Реакционную смесь затем перемешивали при 25°C в течение 30 мин, по истечении этого времени добавляли 70,2 мкл раствора цианоборогидрида натрия (15,6 мг в 313 мкл воды; 55,8 мкмоль, 20 экв.) и продолжали перемешивать в течение 2 дней при 25°C. Реакционную смесь разбавляли фосфатным буфером (500 мкл 200 мМ раствора, pH 6) перед добавлением 105 мкл раствора борогидрида натрия (0,01 мг/мкл, 10 экв.) в воде. После перемешивания в течение 30 мин реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (3×20 мл этилацетата), затем переносили в ультрацентрифугу AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл) и после этого подвергали диализу, используя 6 замен 20% этанола в воде с последующими 3 заменами воды (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного типа 19А. К этому раствору (3,12 мл, 11,4 мг) добавляли раствор сахарозы (114 мг в 1 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на две равные части и каждую лиофилизировали с получением двух образцов белого порошка. Каждый образец содержал 5,70 мг 19А DBCO и 57 мг сахарозы для использования в следующей реакции конъюгации.

| Окисленный PS 19А (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS- DBCO (%) | SEC- MALS (кДа) |
|---------------------------|-----------------------------------|-----------------|---|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 17,14 | 4,87 | 5976 | 0,482×4 | 197,76 | 3,31 | 105 | 139 |

3. Конъюгация производного PS 19А-DBCO с eCRM.

PS 19А-DBCO: 5,7 мг (с 57 мг сахарозы) белого порошка.

% DBCO: 3,31%.

Концентрация CRM: 6,5 мг/мл раствор.

PS: CRM (входное соотношение): 1,8:1.

Порядок проведения реакций.

Раствор функционализированного азидом eCRM (0,49 мл) добавляли к DBCO-производному 19А (5,7 мг белого порошка с 57 мг сахарозы), чтобы обеспечить массовое соотношение PS19А:CRM равное 1,8:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 18 ч. Смесь конъюгированных PS-CRM переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235060, НОММ 300000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 24 ч (3 замены, каждая по 800 мл). Диализированный раствор фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 19А PS-CRM.

| PS 19A-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|------------------|----------|--------------------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 5,7 | 3,185 | 5,42 | 0,62 | 70 | 0,40 | 61 | 1,55:1 | 25,23 | 1 |

Пример 31. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 19A с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 19A: 90% (антрон).

Мол. масса: 614,44.

Раствор NaIO₄ в воде (5,45 мг/мл).

Порядок проведения реакций.

Порошок PS-19A (20,83 мг, скорректировано до 90%, 18,75 мг, 30,5 мкмоль) растворяли в 9,5 мл водного раствора (6,5 мл воды и 3 мл 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,5). К этому раствору добавляли 305 мкл раствора NaIO₄ (1,63 мг, 7,62 мкмоль, 0,25 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 ч, по истечении этого времени окисленный образец очищали с помощью ультрацентрифуги AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл), используя 6 замен (10 мл) воды категории ВЭЖХ, с получением раствора окисленного PS-19A.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 19A (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Окисление (%; BCA) | Окисление (%; колич.) | Выход PS (%) | Примечание |
|-----------------------------|-------------|--------------------------|--------------|--------------------|-----------------------|--------------|------------|
| | | | | | иссл. альдегидов) | | |
| 0,25 | 20,83 | 2,95 | 9858 | 7,2 | 4,2 | 95,32 | Нет |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного (предполагаемый уровень окисления 10%) PS типа 19A (17,57 мг, 28,59 мкмоль, 2,90 мл воды) добавляли буферный раствор (0,87 мл 200 мМ фосфатного буфера, pH 6,01), ДМСО (0,7 мл) и раствор DBCO-PEG₄-NH₂ (14,97 мг в 306 мкл ДМСО; 28,59 мкмоль, 10 экв.), все при температуре 25°C. Реакционную смесь затем перемешивали при 25°C в течение 30 мин, по истечении этого времени добавляли 79 мкл раствора цианоборогидрида натрия (9,39 мг в 200 мкл воды; 57,2 мкмоль, 20 экв.) и продолжали перемешивать в течение 2 дней при 25°C. Реакционную смесь разбавляли фосфатным буфером (500 мкл 200 мМ раствора, pH 6) перед добавлением 110 мкл раствора борогидрида натрия (0,01 мг/мкл, 10 экв.) в воде. После перемешивания в течение 30 мин реакцию смесь экстрагировали этилацетатом (3×20 мл этилацетата), затем переносили в ультрацентрифугу AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл) и после этого подвергали диализу, используя 6 замен 20% этанола в воде с последующими 3 заменами воды (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного типа 19A. К этому раствору (3,56 мл, 11,9 мг) добавляли раствор сахарозы (120 мг в 1 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на две равные части и каждую лиофилизировали с получением двух образцов белого порошка. Каждый образец содержал 5,95 мг 19A DBCO и 60 мг сахарозы для использования в следующей реакции конъюгации.

| Окисленный PS 19A (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Дериватизация DBCO; абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|------------------------|--------------------------|--------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 17,57 | 3,76 | 5424 | 0,831×3 | 254,1 | 4,68 | 71 | 111 |

3. Конъюгация производного PS 19A-DBCO с eCRM.

PS 19A-DBCO: 5,95 мг (с 60 мг сахарозы) белого порошка.

% DBCO: 4,68%.

Концентрация CRM: 6,5 мг/мл раствор.

PS: CRM (входное соотношение): 1,8:1.

Порядок проведения реакций.

Раствор функционализированного азидом eCRM (0,51 мл) добавляли к DBCO-производному 19A (5,95 мг белого порошка с 60 мг сахарозы), чтобы обеспечить массовое соотношение PS19A:CRM равное 1,8:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 18 ч. Затем смесь помещали в печь (37°C) на 2 ч. Смесь конъюгированных PS-CRM переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235071, НОММ 100000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 24 ч (3 замены, каждая по 800 мл). Диализованный раствор фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 19A PS-CRM.

| PS 19A-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|------------------|----------|--------------------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 5,95 | 3,305 | 6,821 | 0,53 | 61 | 0,314 | 65 | 1,68:1 | 9,48 | 0,752 |

Пример 32. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 19F с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 19F: 90,7% (антрон).

Мол. масса: 614,44.

Раствор NaIO₄ в воде (5,21 мг/мл).

Порядок проведения реакций.

Порошок PS-19F (22,0 мг, 35,8 мкмоль) растворяли в 13,75 мл водного раствора (11 мл воды и 2,75 мл 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,5). К этому раствору добавляли 117 мкл раствора NaIO₄ (0,61 мг, 2,86 мкмоль, 0,08 экв.). Смесь перемешивали при 4°C в холодильнике в течение 17 ч, по истечении этого времени окисленный образец очищали с помощью ультрацентрифуги AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл), используя 6 замен (12 мл) 10 мМ фосфатного буфера, pH 6,7, с получением раствора окисленного PS-19F.

| Мол. NaIO ₄ | экв. | PS 19F (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Окисление (%; BCA) | Окисление (%; колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|------------------------|------|-------------|--------------------------|--------------|--------------------|--|--------------|
| 0,08 | | 22,0 | 2,89 | 8786,24 | 5,56 | Не данных | 99,39 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного (предполагаемый уровень окисления 10%) PS типа 19F (13,7 мг, 22,3 мкмоль, 2,50 мл воды) добавляли буферный раствор (1,0 мл 200 мМ фосфатного буфера, pH 6,0), ДМСО (0,483 мл) и раствор DBCO-PEG-4-NH₂ (11,68 мг в 117 мкл ДМСО; 22,3 мкмоль, 10 экв.), все при температуре 25°C. Реакционную смесь затем перемешивали при 25°C в течение 30 мин, по истечении этого времени добавляли 70,2 мкл раствора цианоборогидрида натрия (2,8 мг в 280 мкл воды; 44,6 мкмоль, 20 экв.) и перемешивали в течение ночи при 25°C. Реакционную смесь разбавляли фосфатным буфером (500 мкл 200 мМ раствора, pH 6) перед добавлением 84 мкл раствора борогидрида натрия (0,01 мг/мкл, 10 экв.) в воде. После перемешивания в течение 30 мин реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (5×12 мл этилацетата), затем переносили в ультрацентрифугу AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл) и после этого подвергали диализу, используя 5 замен 20% этанола в воде с последующими 3 заменами 5 мМ фосфатного буфера с pH 7,0 (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного типа 19F. К этому раствору (1,11 мл, 7,0 мг) добавляли раствор сахарозы (70 мг в 1 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на две порции по 4 мг и 3 мг каждая и лиофилизировали с получением двух образцов белого порошка. Эти лиофилизированные образцы 19F DBCO использовали в следующей реакции конъюгации.

| Окисленный PS 19F (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|------------------------|--------------------------|--------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 13,7 | 1,92 | 1714 | 0,920×4 | 1714 | 5,14 | 88 | 93 |

3. Конъюгация производного PS 19F-DBCO с eCRM.

PS 19F-DBCO: 4,0 мг (с 40 мг сахарозы) белого порошка.

% DBCO: 5,14%.

Концентрация CRM: 5,0 мг/мл раствор.

PS: CRM (входное соотношение): 1,6:1.

Порядок проведения реакций.

Раствор функционализированного азидом eCRM (0,5 мл) добавляли к DBCO-производному 19F (4,0 мг белого порошка с 40 мг сахарозы), чтобы обеспечить массовое соотношение PS19F:CRM равное 1,6:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 18 ч и дополнительно в течение 1 ч при 37°C. Добавляли 42 мкл азиды натрия (0,42 мг, 1 эквивалент). Через 30 мин смесь конъюгированных PS-CRM переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235060, НОММ 300000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 2 дней (8 замен, каждая по 800 мл). Диализированный раствор фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 19F PS-CRM.

| PS 19F-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|------------------|----------|--------------------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|---------------|------------------|----------------|
| 4,0 | 2,5 | 3,75 | 0,84 | 79 | 0,52 | 77 | 1,63: 1 | 16,55 | 1,89 |

Пример 33. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 19F с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Мол. масса PS типа 19F: 613.

Раствор NaIO₄ в воде (10 мг/мл).

Порядок проведения реакций.

Порошок PS-19F (10 мг, 16,31 мкмоль) растворяли в 2 мл водного раствора (10 мМ раствор ацетата натрия, pH 4,5). К этому раствору добавляли 34,9 мкл раствора NaIO₄ (0,349 мг, 1,63 мкмоль, 0,1 экв.). Смесь перемешивали при 4°C в течение 18 ч, по истечении этого времени окисленный образец переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235057, НОММ 20000) и затем подвергали диализу против 50 мМ РВ-буфера с pH 6,8 в течение 24 ч (4 замены, каждая по 600 мл), с получением раствора окисленного PS-19F. После диализа добавляли ДМСО с получением PS-19F в 10% ДМСО с 50 мМ РВ-буфера, pH 6,8.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 19F (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (М) | Окисление (%), BCA) | Выход PS (%) | Примечание |
|-----------------------------|-------------|--------------------------|------------|---------------------|--------------|------------|
| 0,1 | 10 | 2 | 6769 | 9,0 | 83 | Нет |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Конечная концентрация PS: 3,32 мг/мл.

Конечная концентрация буфера: 10% ДМСО в 50 мМ РВ (pH 6,8).

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного PS типа 19F (8,3 мг, 13,53 мкмоль, 2,5 мл в 10% ДМСО 50 мМ РВ, pH 6,8) добавляли раствор DBCO-PEG₄-NH₂ (7,08 мг в 70,84 мкл ДМСО; 13,53 мкмоль, 10 экв.) при 25°C. Затем реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 60 мин, по истечении этого времени добавляли раствор цианоборогидрида натрия (0,85 мг в 85 мкл воды; 13,53 мкмоль, 10 экв.) и продолжали перемешивание в течение 24 ч при 25°C. Затем реакционную смесь переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235057, НОММ 20000) и затем подвергали диализу, используя 4 замены 20% этанола в 50 мМ РВ-буфере с последующими 3 заменами 50 мМ РВ-буфера, с получением DBCO-производного типа 19F.

| Окисленный PS 19F (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|------------------------|--------------------------|--------------|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 8,3 | 4 | 3385 | 235,4 | 7,15 | 78 | 186 |

3. Конъюгация производного PS 19F-DBCO с eCRM.

PS 19F-DBCO: 6 мг (с 60 мг сахарозы) белого порошка.

DBCO: 7%.

Концентрация CRM: 2,617 мг/мл раствор.

PS:CRM (входное соотношение): 2:1.

Конечная концентрация PS: 5,2 мг/мл.

Порядок проведения реакций.

Раствор функционализированного азидом eCRM (1,15 мл) добавляли к DBCO-производному 19F (6 мг белого порошка с 60 мг сахарозы, 9,7 мкмоль), чтобы обеспечить массовое соотношение PS 19F:CRM равное 2:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (23°C) в течение 17 ч. Затем смесь помещали в инкубатор (37°C) на 3 ч. После реакции смесь разбавляли в 2 раза 0,9% раствором хлорида натрия и восстанавливали борогидридом натрия (1,849 мг в 184,9 мкл воды; 48,9 мкмоль, 50 экв.) в течение 3 ч. Смесь конъюгированных PS-CRM переносили в предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235071, НОММ 100000) и затем подвергали диализу с применением ФСБ, pH 7, в течение 24 ч (3 замены, каждая по 1000 мл). Диализированный раствор фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 19F PS-CRM.

| PS 19F- DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS: CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC- MALS (кДа) |
|----------------------------|-------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| 6 | 3 | 12 | 0,241 | 48 | 0,166 | 66 | 1,5:1 | 15,12 | 736 (1,05 МДа- 414 кДа) |

Пример 34. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 20 с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 20: 68% (антрон).

Мол. масса: 1157,9 г·моль⁻¹.

Порядок проведения реакций.

Порошок PS типа 20 (30,1 мг, 26 мкмоль) растворяли в 15,00 мл водного раствора (11,25 мл воды и 3,75 мл 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,5) в полистирольной пробирке для образцов объемом 50 мл с мешалкой. После растворения PS добавляли 160 мкл раствора Na₂CO₃ (1,11 мг, 5,2 мкмоль, 0,20 мол.экв.). Реакционную пробирку заворачивали в фольгу и помещали в водяную баню при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C. Через 18 ч реакционную смесь подвергали диализу с применением трех центрифужных фильтрующих устройств AMICON® Ultra-15 (НОММ 30 кДа; 15 мл), используя 5 замен воды категории ВЭЖХ (каждая по 15 мл), с получением раствора окисленного PS-20.

| Мол. экв. Na ₂ O ₄ | PS 20 (мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. антрона (мкМ) | Окисление (%, BCA) | Окисление (%, колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) | Примечание |
|---|------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|---|-----------------|------------|
| 0,20 | 30,1 | 2,6 | 6254,57 | 59,06 | 10,34 | 63 | - |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

PS20-OX (11,7 мг, 10,1 мкмоль, 1,61 мл) добавляли в фосфатный буфер (0,600 мл, 200 мМ, pH 6,0), к которому был добавлен DBCO-PEG₄-NH₂ (1,0 экв., 523 г·моль⁻¹ в ДМСО, 33 мг/мл, 160 мкл) и дополнительное количество ДМСО (207 мкл). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 25 мин перед добавлением раствора цианоборогидрида натрия (2 экв., 52,5 мг/мл, 24 мкл) и перемешивали в течение одного дня. После нейтрализации 1 экв. раствора борогидрида натрия реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (3×20 мл) и барботировали без растворителя. DBCO-производное дважды очищали с помощью блоков для центробежного диализа (Amicon, НОММ 30 кДа), используя 5 замен 20% этанола в воде с последующими 3 заменами воды каждый раз (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного типа 20. К этому раствору (2,09 мл, 13,65 мг) добавляли раствор сахарозы (136,5 мг в 1,37 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на две равные части и каждую лиофилизировали с получением трех образцов белого порошка. Каждый образец содержал 6,0 мг 20-DBCO и 60 мг сахарозы для использования в реакции конъюгации.

| PS 20- OX (мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. антрона (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS- DBCO (%) | SEC- MALS кДа |
|----------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------|
| 11,7 | 2,09 | 1112,43 | 0,336×4 | 29,04 | 2,6 | 123 | 610 |

3. Конъюгация производного PS 20-DBCO с eCRM.

PS 20-DBCO: 5,0 мг (с 50 мг сахарозы) лиофилизованного порошка.

% DBCO: 2,0%.

Концентрация CRM: 5,29 мг/мл раствор.

PS: CRM (входное соотношение): 1,5:1.

Порядок проведения реакций.

20-DBCO растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия (2,684 мл, профильтрован через фильтр с размером пор 0,22 мкм), фосфатном буфере (pH 7,0, 0,5 М, 0,160 мл) и ДМСО (0,400 мл). Раствор азидо-CRM (5,29 мг/мл, 0,756 мл) добавляли по каплям, чтобы обеспечить входное соотношение PS20:CRM равное 1,5:1 (мас./мас.). Раствор очень осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 36 ч. Реакцию клик-химии останавливали добавлением раствора азидата натрия (10 мг/мл, 50 мкл). Конъюгат CRM переносили в

предварительно промытую пробирку для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, НОММ 300000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 48 ч (4 замены, каждая по 1 л). Диализированный раствор фильтровали через шприцевой фильтр Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением стерильного раствора конъюгата 20-CRM.

| PS 20-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJF | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|-----------------|----------|--------------------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 6,0 | 4,0 | 7,00 | 0,640 | 75 | 0,366 | 64 | 1,75:1 | НПКО | 1,224 |

Пример 35. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 22F с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 22F: 89% (антрон).

Мол. масса: 996,88.

Раствор NaIO₄ в воде (5 мг/мл).

Порядок проведения реакций.

Порошок PS типа 22F (30,2 мг, 30,3 мкмоль) растворяли в 10,5 мл воды и 4,5 мл 200 мМ ацетатного буфера (рН 5,26) и 132 мкл раствора NaIO₄ (0,65 мг, 3,03 мкмоль, 0,1 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 ч, по истечении этого времени окисленный образец очищали с помощью ультрацентрифуги AMICON (НОММ 100 кДа, 6-12 мл), используя 6 замен (12 мл) воды категории ВЭЖХ, с получением раствора окисленного PS-22F.

| Мол. NaIO ₄ | экв. | PS 22F (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Окисление (%; BCA) | Окисление (%; кол-во иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|------------------------|------|-------------|--------------------------|--------------|--------------------|--|--------------|
| 0,10 | | 30,2 | 3,351 | 7389,41 | 20,02 | 3,3 | 81,73 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного (предполагаемый уровень окисления 10%) PS типа 22F (7,0 мг, 7,02 мкмоль, 0,956 мл воды) добавляли буферный раствор (0,525 мл 200 мМ фосфатного буфера, рН 6,0), ДМСО (151 мкл) и раствор DBCO-PEG₄-NH₂ (3,67 мг в 112 мкл ДМСО; 7,02 мкмоль, 10 экв.), все при температуре 25°C. Реакционную смесь затем перемешивали при 25°C в течение 30 мин, по истечении этого времени добавляли 17 мкл раствора цианоборогидрида натрия (0,88 мг в 17 мкл воды; 14,06 мкмоль, 20 экв.) и перемешивали в течение 2 дней при 25°C. Реакционную смесь разбавляли фосфатным буфером (250 мкл 200 мМ раствора, рН 6) перед добавлением 9 мкл раствора борогидрида натрия (31 мг/мл, 10 экв.) в воде. Через 30 мин реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (4×5 мл). Экстракт переносили в ультрацентрифужный фильтр AMICON (НОММ 100 кДа, 6-12 мл) и затем подвергали диализу, используя 6 замен 20% этанола в воде (каждая по 12 мл) с последующими 3 заменами воды (каждая по 12 мл). Результаты SEC/ВЭЖХ указывали на присутствие свободного DBCO, поэтому образец подвергли повторному диализу, используя 3 замены 20% этанола в воде (каждая по 12 мл) с последующими 3 заменами воды (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного типа 22F. К этому раствору (2,35 мл, 5,2 мг) добавляли раствор сахарозы (52 мг в 0,520 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на две части и каждую лиофилизировали с получением двух образцов белого порошка. Образец содержал 2,4 мг и 2,8 мг 22F DBCO и 24 мг и 28 мг сахарозы, соответственно, для использования в следующей реакции конъюгации.

| Окисленный PS 22F (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|------------------------|--------------------------|--------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 7,0 | 2,53 | 739,74 | 0,144x3 | 27,57 | 1,24 | 80 | 844 |

3. Конъюгация производного PS 22F-DBCO с eCRM.

PS 22F-DBCO: 2,4 мг (с 24 мг сахарозы) белого порошка.

%DBCO: 1,24%.

Концентрация CRM: 4 мг/мл раствор.

PS:CRM (входное соотношение): 1,4:1.

Порядок проведения реакций.

DBCO-производное 22F (2,4 мг белого порошка с 24 мг сахарозы) растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия (0,075 мл). Добавляли раствор функционализированного азидом eCRM (0,142 мл раствора), чтобы обеспечить массовое соотношение PS22F:CRM равное 1,4:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной тем-

пературе (20°C) в течение 48 ч. Добавляли раствор азид натрия (16 мкл, 10 мг/мл в воде). Через 30 мин смесь конъюгированных PS-CRM переносили в предварительно промытое устройство для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235060, НОММ 300000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 24 ч (5 замен, каждая по 800 мл). Диализированный раствор фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 22F PS-CRM.

| PS 22F- DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC- MALS (МДа) |
|----------------------------|-------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| 2,4 | 1,71 | 3,834 | 0,29 | 55 | 0,37 | 49 | 1,53 | 20,6 | 2,42 |

Пример 36. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 23F с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 23F: 85% (антрон).

Мол. масса: 792,62.

Раствор NaIO₄ в воде (5,86 мг/мл).

Порядок проведения реакций.

Порошок PS-23F (20,21 мг, скорректировано до 85%, 17,18 мг, 26,7 мкмоль) растворяли в 10 мл водного раствора (7,5 мл воды и 2,5 мл 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,5). К этому раствору добавляли 119 мкл раствора NaIO₄ (0,695 мг, 4,0 мкмоль, 0,15 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 4 ч. Окисленный образец затем очищали с помощью ультрацентрифужного фильтра AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл), используя 6 замен (12 мл) воды категории ВЭЖХ, с получением раствора окисленного PS- 23F.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 23F (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Окисление (%, BCA) | Окисление (%, колч. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) | Примечание |
|--------------------------------|----------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------|--|-----------------|------------|
| 0,15 | 20,21 | 2,41 | 7967 | 4,11 | 3,51 | 88 | Нет |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного (предполагаемый уровень окисления 10%) PS типа 23F (13,51 мг, 17,0 мкмоль, 2,14 мл воды) добавляли буферный раствор (0,85 мл 200 мМ фосфатного буфера, pH 6,01), ДМСО (310 мкл) и раствор DBCO-PEG₄-NH₂ (8,93 мг в 170 мкл ДМСО; 17,0 мкмоль, 10 экв.), все при температуре 25°C. Реакционную смесь затем перемешивали при 25°C в течение 30 мин, по истечении этого времени добавляли 42 мкл раствора цианоборогидрида натрия (6,1 мг в 120 мкл воды; 34,0 мкмоль, 20 экв.) и перемешивали в течение 2 дней при 25°C. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (3×20 мл этилацетата) и затем переносили в ультрацентрифужный фильтр AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл) и после этого подвергали диализу, используя 6 замен 20% этанола (каждая по 12 мл) в воде с последующими 3 заменами воды (каждая по 12 мл), с получением DBCO-производного типа 23F. К этому раствору (7,58 мл, 13,8 мг) добавляли раствор сахарозы (138 мг в 1 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на две равные части и каждую лиофилизировали с получением трех образцов белого порошка. Каждый образец содержал 6,9 мг 23F DBCO и 69 мг сахарозы для использования в следующей реакции конъюгации.

| Окисленный | Объем | Антрон | Дериватизация | Дериватизация | Включение | Выход | SEC- |
|-------------|--------------------------|--------|----------------------------------|---------------|-----------|--------------------|---------------|
| PS 23F (мг) | после очистки (мл) | (мкМ) | DBCO, абсорбция при 309 нм | DBCO (мкМ) | DBCO (%) | PS- DBCO (%) | MALS (кДа) |
| 13,51 | 7,61 | 2292 | 0,601×2 | 116,98 | 5,1 | 102 | 361 |

3. Конъюгация производного PS 23F-DBCO с eCRM.

PS 23F-DBCO: 6,90 мг белого порошка с 69 мг сахарозы.

%DBCO: 5,1%.

Концентрация CRM: 2,617 мг/мл раствор.

PS: CRM (входное соотношение): 2:1.

Порядок проведения реакций.

Раствор функционализированного азидом eCRM (1,32 мл раствора) добавляли к DBCO-производному 23F (6,90 мг белого порошка с 69 мг сахарозы), чтобы обеспечить массовое соотношение PS23F:CRM равное 2:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 17 ч.

Затем смесь помещали в печь (37°C) на 3 ч. Смесь конъюгированных PS-CRM переносили в предварительно промытый фильтр для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235071, НОММ 100000) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 24 ч (3 замены, каждая по 800 мл). Диализированный раствор фильтровали через фильтр Millex-HV (0,45 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 23F PS-CRM.

| PS 23F- DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC- MALS (МДа) |
|----------------------------|-------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| 6,90 | 3,45 | 5,65 | 0,87 | 71 | 0,422 | 69 | 2,06:1 | 23,62 | 1,4 |

Пример 37. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 33F с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 33F: 75% (антрон).

Мол. масса: 973.

Порядок проведения реакций.

Порошок PS типа 33F (34,0 мг, 35,0 мкмоль) растворяли в 17,0 мл водного раствора (12,0 мл воды и 5,0 мл 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,5) в полистирольной пробирке для образцов объемом 50 мл с мешалкой. После растворения PS добавляли 59 мкл раствора NaIO₄ (1,49 мг, 7,0 мкмоль, 0,20 мол.экв.). Реакционную пробирку заворачивали в фольгу и помещали в водяную баню при 4°C. Смесь перемешивали при 4°C. Через 18 ч реакционную смесь подвергали диализу с применением трех центрифужных фильтрующих устройств AMICON® Ultra-15 (НОММ 100 кДа; 15 мл), используя 4 замены воды категории ВЭЖХ (каждая по 15 мл), с получением раствора окисленного PS-33F.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 33F (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Окисление (%, BCA) | Окисление (%, колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|--------------------------------|-------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------|---|-----------------|
| 0,20 | 34,0 | 2,74 | 4637,58 | 47,90 | 7,62 | 36 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного PS типа 33F (11,2 мг, 11,51 мкмоль, 2,49 мл) добавляли буферный раствор (0,114 мл 0,5 М фосфатного буфера, pH 6,0), раствор DBCO-PEG₄-NH₂ (6,039 мг в 200 мкл ДМСО; 6,33 мкмоль, 0,55 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 30 мин, по истечении этого времени добавляли 63 мкл раствора цианоборогидрида натрия (4,5 мг в 100 мкл воды; 34,54 мкмоль, 2,0 экв.). Реакционную смесь оборачивали в алюминиевую фольгу и продолжали перемешивать в водяной бане, установленной на 25°C, в течение 2 дней. Реакцию останавливали на второй день добавлением 44 мкл раствора борогидрида натрия (3,12 мг в 312 мкл воды; 11,51 мкмоль, 1,0 экв.). После перемешивания в течение 30 мин реакционную смесь экстрагировали дихлорметаном (3×10 мл) и затем этилацетатом (3×10 мл). Экстракт барботировали N₂ в течение 20 мин для удаления остаточного этилацетата и затем переносили в 2 центрифужных фильтрующих устройства AMICON® Ultra-15 (НОММ 100 кДа; 15 мл). Диализ осуществляли, выполняя три замены 3% раствора ДМСО (каждая по 15 мл), шесть замен 20% раствора этанола (каждая по 15 мл) и три замены воды категории ВЭЖХ (каждая по 15 мл), с получением DBCO-производного 33F. К этому раствору (1,23 мл, 4,0 мг) добавляли раствор сахарозы (40 мг, 0,4 мл воды). Этот комбинированный раствор лиофилизировали с получением мелкодисперсного белого порошка. Образец PS33F DB хранили при 4°C до тех пор, пока он не потребовался для реакции конъюгации.

| Окисленный PS 33F (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS- DBCO (%) | SEC- MALS (кДа) |
|---------------------------|-----------------------------------|-----------------|---|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|
| | | | 309 нм | | | | |
| 11,2 | 2,44 | 1112,4 | 0,390 | 32,85 | 3,0 | 71 | 1290 |

3. Конъюгация производного PS 33F-DBCO с eCRM.

PS 33F-DBCO: 4 мг (с 40 мг сахарозы) белого порошка.

% DBCO: 3,0%.

Концентрация CRM: 6,009 мг/мл раствор.

PS:CRM (входное соотношение): 1,5:1.

Порядок проведения реакций.

DBCO-производное 33F (4,0 мг белого порошка с 40 мг сахарозы) растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия (5,32 мл), фосфатном буфере с pH 7 (0,267 мл, 0,5 М) и ДМСО (0,667 мл). Добавляли раствор

функционализированного азидом eCRM (0,445 мл раствора), чтобы обеспечить массовое соотношение PS33F:CRM равное 1,5:1 (мас./мас.). Реакционную смесь осторожно перемешивали на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 19 ч. Реакцию клик-химии останавливали добавлением раствора азид натрия (10 мг/мл, 50 мкл). Затем реакционную смесь разбавляли 0,9% раствором хлорида натрия (7,0 мл) и переносили в предварительно промытое устройство для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235060, НОММ 300000). Образец подвергали диализу в 0,9% растворе хлорида натрия в течение 48 ч (8 замен, каждая по 800 мл). Диализированный раствор фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 33F PS-CRM.

| PS 33F-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрагон (мг/мл) | Выделен не PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделен не CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|------------------|----------|--------------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 4,0 | 2,67 | 7,82 | 0,545 | 106 | 0,212 | 62 | 2,57 | НПКО | 1,87 |

Пример 38. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 7F с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 7F: 86% (антрагон, CRB-21-20).

Мол. масса: 1227 г·моль⁻¹.

Порядок проведения реакций.

Нативный полисахарид (19,5 мг, скорректировано до 86%, 16,8 мг, 13,7 мкмоль), растворяли в 3,9 мл воды. К этому раствору добавляли 4,58 мл воды и 0,293 мл натрий-ацетатного буфера (1,5 М, pH 5,4). Затем к перемешиваемому раствору добавляли 30 мкл раствора периодата натрия (300 мкг, 1,4 мкмоль, 0,1 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 22°C в течение 3 ч. Окисленный PS затем двукратно концентрировали с помощью центрифуги-концентратора (Amicon, НОММ 30 кДа). Затем буфер в концентрированном PS заменяли водой с применением колонок для гель-фильтрации (GE Healthcare PD-10, метод центрифугирования).

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 7F (мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. антрона (мкМ) | Окисление (% ВСА) | Окисление (% колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) | Примечание |
|-----------------------------|------------|--------------------------|----------------------------|-------------------|---------------------------------------|--------------|------------|
| 0,1 | 16,8 | 4,0 | 3260 | 6,2 | Не определяли | 95 | Нет |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

К 7F-OX (1,9 мл 4,0 мг/мл; 7,6 мг, 6,2 мкмоль) добавляли 0,15 мл фосфата натрия (1 М, pH 6,3). Затем к перемешиваемому раствору добавляли 0,23 мл DBCO-PEG₄-NH₂ (27,1 мМ в ДМСО, партия 1730; 6,2 мкмоль, 1,0 экв.). После перемешивания в течение 5 мин к перемешиваемому раствору добавляли 0,039 мл NaCNBH₃ (20 мг/мл в воде; 12,4 мкмоль, 2,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 22°C в течение 40 ч. Затем к раствору добавляли 0,024 мл борогидрида натрия (10 мг/мл в воде; 6,3 мкмоль, 1,0 экв.). После перемешивания в течение 15 мин PS очищали путем замены буфера водой с помощью колонки для гель-фильтрации (колонокки Thermo Zeba, НОММ 40 кДа).

| Окисленный PS 7F(мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. антрона (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|----------------------|--------------------------|----------------------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 7,6 | 2,3 | 2282 | 0,14×2 | 111 | 4,8 | 85 | 175 |

3. Конъюгация производного PS 7F-DBCO с eCRM.

PS 7F-DBCO: 2,8 мг (2,8 мг/мл в воде).

% DBCO: 4,8%.

Концентрация CRM: 4,7 мг/мл раствор.

PS:CRM (входное соотношение): 1,6:1.

Порядок проведения реакций.

К 7F-DBCO (1 мл 2,8 мг/мл в воде) в пробирке для центрифугирования объемом 5 мл добавляли 0,128 мл фосфата калия (0,5 М, pH 7,5). Затем к этому раствору добавляли 0,372 мл функционализированного азидом eCRM (4,7 мг/мл в 20 мМ фосфате калия, pH 7,1, 7,5% сахарозы) с получением входного массового соотношения 1,6:1 (мас./мас.). Раствор помещали на орбитальную качалку и качали (так, что раствор перемещался из конца в конец пробирки) в течение 16 ч при температуре 22°C. Затем конъюгат подвергали диализу в 0,9% хлориде натрия с применением диализной мембраны 300 кДа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, 1 мл) в течение 48 ч с заменами диализата (500 мл) через 1 ч и 4 ч. Диализированный раствор фильтровали через шприцевой фильтр (Pall

Acrodisc Supor, 0,22 мкм, диаметром 13 мм) с получением раствора конъюгата 7F-CRM.

Пример 39. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 1 с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Степень чистоты PS типа 1: 80% (количественное исследование уроновой кислоты).

Мол. масса: 625 г·моль⁻¹.

Порядок проведения реакций.

Нативный полисахарид (20,2 мг, 32,32 мкмоль) растворяли в 9,5 мл водного раствора (7,0 мл воды и 2,5 мл ацетатного буфера, 200 мМ, рН 5,24). К этому раствору добавляли 492 мкл раствора периодата натрия (3,45 мг, 16,16 мкмоль, 0,5 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 ч. Окисленный PS очищали с помощью центробежного диализа (Amicon, НОММ 30 кДа), используя 6 замен воды, с получением раствора очищенного PS-1.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 1 (мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. уроновой кис. (мкМ) | Окисление (% ВСА) | Окисление (% колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|-----------------------------|-----------|--------------------------|----------------------------------|-------------------|---------------------------------------|--------------|
| 0,50 | 20,2 | 2,61 | 10777,6 | 2,3 | 2,16 | 87 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного (предполагаемый уровень окисления 10%) PS типа 1 (16 мг, 25,6 мкмоль, 2,4 мл воды) добавляли буферный раствор (0,424 мл 500 мМ фосфатного буфера, рН 6,74), ДМСО (572 мкл) и раствор DBCO-PEG₄-NH₂ (13,4 мг в 134 мкл ДМСО; 25,6 мкмоль, 10 экв.). Затем реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 30 мин, по истечении этого времени добавляли 32 мкл раствора цианоборогидрида натрия (3,2 мг в 32 мкл воды; 51,2 мкмоль, 20 экв.) и продолжали перемешивание в течение 3 дней при 25°C. Добавляли буферный раствор (0,300 мл 200 мМ фосфатного буфера, рН 6,0), затем борогидрид натрия (0,97 мг в 100 мкл, 25,6 мкмоль, 10 экв.) и перемешивали в течение 30 мин при 25°C. Реакционную смесь экстрагировали дихлорметаном (4×5 мл). Водный экстракт переносили в два ультрацентрифужных фильтра AMICON (НОММ 30 кДа, 6-12 мл) и затем подвергали диализу, используя 5 замен 20% этанола в воде (каждая по 12 мл) с последующими 3 заменами 3% ДМСО в воде (каждая по 12 мл), 3 заменами 0,9% хлорида натрия и 3 заменами воды, с получением DBCO-производного типа 1. К этому раствору (1,37 мл, 10,0 мг) добавляли раствор сахарозы (100 мг в 1 мл воды). Комбинированный раствор разделяли на две равные части и каждую лиофилизировали с получением двух образцов белого порошка. Каждый образец содержал 5,0 мг 1-DBCO и 50 мг сахарозы для использования в следующей реакции конъюгации.

| Окисленный PS 1(мг) | Объем после очистки (мл) | Колич. иссл. уроновой кис. (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|---------------------|--------------------------|----------------------------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 16 | 2,0 | 2909,0 | 0,784×4 | 290,19 | 2,5 | 91 | 315 |

3. Конъюгация производного PS 1-DBCO с eCRM.

PS 1-DBCO: 5,0 мг (с 50 мг сахарозы) лиофилизованного порошка.

% DBCO: 2,5%.

Концентрация CRM: 4,86 мг/мл раствор.

PS:CRM (входное соотношение): 1,7:1.

Порядок проведения реакций.

Лиофилизированный порошок тип 1-DBCO (5 мг) растворяли в растворе фильтрованного 0,9% хлорида натрия (5,39 мл) и фосфатного буфера (250 мкл, 0,5 М, рН 7,0). Раствор функционализированного азидом eCRM (0,47 мл) добавляли, чтобы обеспечить массовое соотношения PS-1:CRM равное 1,7:1 (мас./мас.). Раствор очень осторожно перемешивали вручную перед осторожным перемешиванием на орбитальном шейкере при комнатной температуре (20°C) в течение 18 ч. Реакцию клик-химии останавливали добавлением раствора азидата натрия (10 мг/мл, 52 мкл). Конъюгат CRM переносили в предварительно промытые пробирки для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, НОММ 300000, 10 мл) и затем подвергали диализу с применением 0,9% раствора хлорида натрия в течение 48 ч (8 замен, каждая по 800 мл). Диализированный раствор фильтровали через шприцевой фильтр Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 1-CRM.

| PS 1-DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Уроновая кислота (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC-MALS (МДа) |
|----------------|----------|--------------------------|--------------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 5,0 | 2,94 | 6,47 | 0,56 | 72 | 0,283 | 62 | 1,98:1 | 8,25 | 1,02 |

Пример 40. Получение конъюгатов пневмококкового PS серотипа 10А с eCRM из табл. 2.

1. Окисление.

Партия PS серотипа 10А: 63662302 (ATCC).

Степень чистоты PS 10А: 77% (антрон).

Мол. масса: 1013 кДа (повторяющееся звено = 1227 г/моль).

Порядок проведения реакций.

Порошок PS типа 10А (25,99 мг, 21,18 мкмоль) растворяли в 12,995 мл водного раствора (9,746 мл воды и 3,249 мл 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,5) в полистирольной пробирке для образцов объемом 50 мл с мешалкой. После растворения PS добавляли 135 мкл раствора NaIO₄ (0,27 мг, 1,26 мкмоль, 0,06 мол.экв.). Реакционную пробирку заворачивали в фольгу и помещали в холодильник для перемешивания при 4°C. Через 45 мин реакционную смесь подвергали диализу с применением трех центрифужных фильтрующих устройств AMICON® Ultra-15 (НОММ 30 кДа; 15 мл), используя 6 замен воды категории ВЭЖХ (каждая по 15 мл), с получением раствора окисленного PS-10А.

| Мол. экв. NaIO ₄ | PS 10А (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Окисление (% BCA) | Окисление (% колич. иссл. альдегидов) | Выход PS (%) |
|-----------------------------|-------------|--------------------------|--------------|-------------------|---------------------------------------|--------------|
| 0,06 | 25,99 | 2,381 | 6757,20 | 16,58 | 3,13 | 76 |

2. Дериватизация с применением DBCO.

Порядок проведения реакций.

К раствору окисленного PS типа 10А (18,15 мг, 14,79 мкмоль, 3,371 мл) добавляли буферный раствор (0,259 мл 0,5 М фосфатного буфера, pH 6,0), ДМСО (0,145 мл) и раствор DBCO-PEG₄-NH₂ (7,7 мг в 154 мкл ДМСО; 14,79 мкмоль, 1 мол.экв.).

Реакционную смесь перемешивали при 4°C в течение 30 мин, по истечении этого времени добавляли 101 мкл раствора цианоборогидрида натрия (1,9 мг в 101 мкл воды, 2 мол.экв.). Реакционную смесь оборачивали в алюминиевую фольгу и продолжали перемешивать в холодильнике при 4°C в течение 2 дней. Реакцию останавливали на второй день добавлением 85 мкл раствора борогидрида натрия (0,56 мг; 14,79 мкмоль, 1 мол.экв.). После перемешивания в течение 30 мин реакционную смесь экстрагировали дихлорметаном (3×15 мл). Экстракт барботировали N₂ в течение 15 мин для удаления остаточного дихлорметана и затем переносили в одно центрифужное фильтрующее устройство AMICON® Ultra-15 (НОММ 30 кДа; 15 мл). Диализ осуществляли путем проведения трех замен 3% раствора ДМСО (каждая по 15 мл), трех замен 20% раствора этанола (15 мл), двух замен 0,9% раствора хлорида натрия и двух замен воды категории ВЭЖХ (каждая по 15 мл) с получением DBCO-производного 10А. К этому раствору (3,371 мл, 15,06 мг) добавляли раствор сахарозы (150,6 мг в 1,506 мл воды). Этот комбинированный раствор разделяли на три равные фракции и каждую лиофилизировали с получением мелкодисперсного белого порошка. После лиофилизации все фракции хранили при 4°C до тех пор, пока они не понадобились для реакции конъюгации.

| Окисленный PS 10А (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мкМ) | Дериватизация DBCO, абсорбция при 309 нм | Дериватизация DBCO (мкМ) | Включение DBCO (%) | Выход PS-DBCO (%) | SEC-MALS (кДа) |
|------------------------|--------------------------|--------------|--|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| 18,15 | 3,371 | 1290,30 | 0,333 | 27,21 | 2,1 | 88 | 540 |

3. Конъюгация производного PS 10А-DBCO с eCRM.

PS 10А-DBCO: 5,20 мг (с 52,0 мг сахарозы) лиофилизованного порошка.

% DBCO: 2,1%.

CRM: 4,962 мг/мл в 20 мМ гистидина, pH 7,1 (7,5% сахарозы).

[PS:CRM (входное массовое соотношение): 1,25:1.

Порядок проведения реакций.

DBCO-производное 10А (5,2 мг белого порошка с 52,0 мг сахарозы) растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия (1,502 мл), фосфатном буфере с pH 7 (0,104 мл, 0,5 М) и ДМСО (0,156 мл). Добавляли раствор функционализованного азидом eCRM (0,838 мл раствора), чтобы обеспечить массовое соотношение PS10А:CRM равное 1,25:1 (мас./мас.). Реакционную смесь, при концентрации PS 2,0 мг/мл, осторожно перемешивали на орбитальном шейкере при комнатной температуре (22°C) в течение 2 ч. Затем реакционную смесь разбавляли до

1,0 мг/мл и оставляли перемешиваться при 22°C в течение еще 20 ч. Реакцию конъюгации останавливали добавлением азидата натрия (7,5 мг, 115 мкмоль). Реакционную смесь затем разбавляли 0,9% раствором хлорида натрия до конечного объема 7 мл и переносили в предварительно промытое устройство для диализа (SpectrumLab Float-A-Lyzer G2, каталожный номер G235060, НОММ 300000). Образец подвергали диализу в 0,9% растворе хлорида натрия в течение 48 ч (2 замены, каждая по 1 л; 1 замена, 4 л). Диализированный раствор фильтровали через Millex-GP (0,22 мкм, 33 мм полиэфирсульфона) с получением раствора конъюгата 10APS-CRM.

| PS 10A- DBCO (мг) | CRM (мг) | Объем после очистки (мл) | Антрон (мг/мл) | Выделение PS (%) | BCA (CRM) (мг/мл) | Выделение CRM (%) | Соотн. PS:CRM CJD | Свободный PS (%) | SEC- MALS (МДа) |
|----------------------------|-------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| 5,20 | 4,16 | 8,21 | 0,553 | 87 | 0,229 | 45 | 2,4:1 | 17,71 | 1,047 |

Пример 41. Оценка включения DBCO-PEG₄-амина и DBCO-амина в пневмококковые полисахариды.

Различные пневмококковые полисахариды окисляли, как описано выше, и подвергали взаимодействию с DBCO-PEG₄-амином (DBCO или DB) или DBCO-амином (DBCA или DA) в одинаковых условиях, чтобы определить влияние линкера на эффективность включения. В таблице ниже показано, что во всех, за исключением одного, испытанных серотипах DBCO-амин включался с более высокой эффективностью по сравнению с DBCO-PEG₄-амином на 100 повторяющихся звеньев полисахарида.

| Образец окисленного PS | Образец PS DB/DA | Условия реакции DB/DA | Включение DBCO/DBCA (%) | Выход DB/DA- PS (%) | Размер DB/DA- PS (кДа) |
|------------------------------|---------------------|---|-------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| 5-OX | 5-DB (15,5 мг) | 5 мг/мл, 1 экв. DBCO, 10% ДМСО, 50 мМ фосфатный буфер, pH=6,7, 25°C, 3 дня | 4,9 | 89 | |
| | 5-DA (15,5 мг) | 5 мг/мл, 1 экв. DBCA, 10% ДМСО, 50 мМ фосфатный буфер, pH=6,7, 25°C, 3 дня | 8,3 | 83 | |
| 9V-OX | 9V-DB (17,1 мг) | 5,0 мг/мл, 2 дня, 50 мМ фосфатный буфер, pH=6,0, 1 мол. экв. | 3,9 | 56 | |

044044

| | | | | | |
|--------|------------------|--|-----|-----|-----|
| | | ДВСО, 15% ДМСО, 25°C | | | |
| | 9V-DA (17,1 мг) | 5,0 мг/мл, 2 дня, 50 мМ фосфатный буфер, рН=6,0, 1 мол. экв. ДВСА, 15% ДМСО, 25°C | 6 | 80 | |
| 14-ОХ | 14-DB (15,65 мг) | 5,0 мг/мл, 50 мМ фосфатный буфер, рН=6,7, 1,0 мол. экв. ДВСО, 15% ДМСО, 25°C, 48 ч | 8 | 80 | |
| | 14-DA (15,65 мг) | 5,0 мг/мл, 50 мМ фосфатный буфер, рН=6,7, 1,0 мол. экв. ДВСА, 15% ДМСО, 25°C, 48 ч | 4,6 | 67 | |
| 23F-ОХ | 23F-DB (22,3 мг) | 4 мг/мл, 48 ч, 100 мМ, рН=6,0, 0,8 экв. ДВСО, 15% ДМСО, 25°C | 5,5 | 68 | |
| | 23F-DA (22,3 мг) | 4 мг/мл, 48 ч, 100 мМ, рН=6,0, 0,8 экв. ДВСА, 15% ДМСО, 25°C | 7,5 | 63 | |
| 22F-ОХ | 22F-DB (7,0 мг) | 2 мг/мл, 1 экв. ДВСО, 15% ДМСО, рН=6, 25°C, 48 ч | 0,8 | 101 | |
| | 22F-DA (7,0 мг) | 2 мг/мл, 1 экв. ДВСА, 15% ДМСО, рН=6, 25°C, 48 ч, очистка полипептида | 4,3 | 104 | |
| 22F-ОХ | 22F-DB (7,0 мг) | 4 мг/мл, 1 экв. ДВСО, | 1,2 | 80 | 838 |

| | | | | | |
|--------|----------------------|---|-----|----|-----|
| | мг) | 15% ДМСО, рН=6, 25°C, 48 ч | | | |
| | 22F-DA (14,0 мг) | 4 мг/мл, 1 экв. ДВСА, 15% ДМСО, рН=6, 25°C, 48 ч, очистка полипептида | 4,3 | 73 | 790 |
| 10A-OX | 10A-DB (14,60 мг) | 7 мг/мл, 10% ДМСО, 50 мМ фосфатный буфер, рН=6,0, 1 мол. экв. ДВСО, 4°C, 2 дня | 1,5 | 88 | |
| | 10A-DA (14,60 мг) | 7 мг/мл, 10% ДМСО, 50 мМ фосфатный буфер, рН=6,0, 1 мол. экв. ДВСА, 4°C, 2 дня | 3,8 | 82 | |
| 7F-OX | 7F-DB (12 мг) | 2,9 мг/мл, 1 экв. ДВСО (партия № 1730), 99 мМ фосфат, рН=6,3, 21 ч при комнатной температуре, 10% ДМСО | 1,9 | 78 | 160 |
| | 7F-DA (12 мг) | 2,9 мг/мл 1 экв. ДВСА (партия № 1818), 99 мМ фосфат, рН=6,3, 21 ч при комнатной температуре, 10% ДМСО | 4,5 | 76 | 177 |

Пример 42. Сравнение конъюгации ДВСО-PEG₄-амина и ДВСО-амина с eCRM.

Пневмококковые полисахариды, соединенные с ДВСО-PEG₄-амином (DB) или ДВСО-амином (DA), конъюгировали с одинаковым eCRM из табл. 2 в идентичных условиях реакции в соответствии с приведенными выше примерами, чтобы оценить влияние линкера на эффективность конъюгации. В таблице ниже показано, что конъюгаты, образованные с полисахаридом, соединенным с ДВСО-амином, обычно приводили к меньшему количеству свободного полисахарида и большему размеру конъюгата.

| DBC O PS | Масштаб PS (мг) | Конц. PS (мг/мл) | Конц. белка (мг/мл) | Входное соотнош. е | Условия реакции конъюгации | Выход PS (%) | Соотнош. PS:белок | Свободный PS % | Размер конъюгата (МДа) |
|-------------|-----------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|---|--------------------|----------------------|-------------------|------------------------------|
| 22F- DB | 2,4 | 3,2 | 2,3 | 1,4 | 3,2 мг/мл, 10% ДМСО, 48 ч, КТ, диализ 300 кДа, фильтр Millex-GP | 53 | 1,5 | 20,5 | 3,6 |
| 22F- DA | 2 | 3,2 | 2,3 | 1,4 | 3,2 мг/мл, 10% ДМСО, 48 ч, КТ, диализ 300 кДа, фильтр Millex-GP | 37 | 1,7 | НПКО <9,2% | 6,2 |
| 7F- DB | 4 | 2,6 | 1,6 | 1,6 | 2,6 мг/мл, 18 ч, КТ, диализ 300 кДа, фильтр Millex-MP | 94 | 2 | 31 | 1,3 |
| 7F- DA | 4 | 2,6 | 1,6 | 1,6 | 2,6 мг/мл, 18 ч, КТ, диализ 300 кДа, фильтр Millex-MP | 84 | 2 | 14 | 1,8 |

Пример 43. Иммуногенность конъюгатов пневмококкового серотипического PS и eCRM.

Эксперименты проводили с целью определения общего IgG и ответов функциональных OPA-антител у мышей или кроликов после введения различных одновалентных конъюгатов пневмококковый полисахарид-eCRM, полученных в соответствии с настоящим изобретением. Количественные исследования опсонофагоцитарной активности (OPA) использовали для измерения функциональных антител в сыворотке крови мышей, специфичных для различных серотипов *S. pneumoniae*. Измерения OPA были основаны на Moon H. Nahm & Robert L. Burton, "Protocol for opsonophagocytic killing assay for antibodies against Group B Streptococcus (UAB GBS OPA)," версия B.04, март 2016 (исходная версия A.01 опубликована в сентябре 2011) (www.vaccine.uab.edu/uploads/mdocs/UAB-GBS-OPA.pdf) и "Protocol for multiplexed opsonophagocytic killing assay (UAB-MOPA) for antibodies against Streptococcus pneumoniae", версия E.02, декабрь 2014 (www.vaccine.uab.edu/uploads/mdocs/UAB-MOPA.pdf). На фиг. 3 показана опсонофагоцитарная (OPA) активность у мышей после введения моновалентных конъюгатов пневмококковый полисахарид-eCRM. Общее количество антитела, связывающего полисахарид (IgG), специфичного для каждого пневмококкового полисахарида, также измеряли в соответствии со способами, описанными в Yu et al., "Development of an Automated and Multiplexed Serotyping Assay for Streptococcus pneumoniae" Clin Vaccine Immunol. 2011, 18(11): 1900-7. На фиг. 4 показаны ответы IgG у мышей после введения моновалентных конъюгатов пневмококкового полисахарида-eCRM.

Согласно обобщенным данным в приведенных ниже таблицах, каждый испытанный конъюгат вызывал ответы IgG и ответы функциональных антител у мышей или кроликов, которые были сопоставимы или превосходили результаты OPA и IgG, показанные на фиг. 3 и 4.

| Типы PS | Иммуногенность у мышей | | Типы PS | Иммуногенность у мышей и кроликов | |
|---------|------------------------|-----|---------|-----------------------------------|-----|
| | IgG | OPA | | IgG | OPA |
| 1 | √ | √ | 22F | √ | √ |
| 3 | √ | √ | 33F | √ | √ |
| 4 | √ | √ | 15B | √ | √ |
| 5 | √ | √ | 2 | √ | √ |
| 6A | √ | √ | 9N | √ | √ |
| 6B | √ | √ | 11A | √ | √ |
| 7F | √ | √ | 12F | √ | √ |
| 9V | √ | √ | 20 | √ | √ |
| 14 | √ | √ | 10A | √ | √ |
| 18C | √ | √ | 8 | √ | √ |
| 19A | √ | √ | 17F | √ | √ |
| 19F | √ | √ | | | |
| 23F | √ | √ | | | |

Комбинацию конъюгатов для каждого из 24 пневмококковых серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F и 33F получали с применением производного CRM197 из SEQ ID NO: 9 в качестве носителя в каждом конъюгате. Иммуногенность этой композиции испытывали с применением схемы с 3 дозами в группах по 7 кроликов. Ее также сравнивали с конъюгированной 13-валентной вакциной PnevnaTM и неконъюгированной 23-валентной вакциной PneumovaTM, к которой добавляли неконъюгированный полисахарид серотипа 6A, чтобы облегчить сравнение. Три композиции содержали эквивалентные дозы полисахарида на серотип (за исключением 6B, поскольку PnevnaTM содержит двойную дозировку), что включало разведение PnevnaTM и PneumovaTM. Все три композиции содержали 60 мкг адьюванта на основе фосфата алюминия на дозу, что включало добавление адьюванта к PneumovaTM.

Методики конъюгации, описанные в настоящем документе, позволили получить композицию с более низким количеством носителя CRM197, чем в одобренной вакцине Pnevna-13TM, и при этом включить капсульные полисахариды из 11 дополнительных серотипов. Общее массовое соотношение капсульного полисахарида и CRM197 в конъюгированной 24-валентной композиции было приблизительно в два раза выше, чем в 13-валентной PnevnaTM.

Ответы после введения третьей дозы показаны на фиг. 5 (ответы IgG) и фиг. 6 (ответы OPA). Как и ожидалось, ответы при применении двух конъюгированных вакцин были намного больше, чем для неконъюгированной вакцины. Кроме того, ответы IgG и OPA при применении 24-валентной вакцины были сопоставимы с ответами, полученными при использовании Pnevna-13TM, в отношении серотипов, охватываемых одобренной вакциной, но в дополнение были лучше против 11 серотипов, которые не включены в Pnevna-13. Удивительным фактом явилось отсутствие признаков подавления эпитопа, вызванного носителем.

Пример 44. Получение конъюгированной вакцины от периодонтита.

Вакцину против *Porphyromonas gingivalis* получали путем конъюгирования капсульных полисахаридов (CPS) из серотипов *P. gingivalis* K1, K2, K3, K4, K5 и/или K6 с белком-носителем eCRM следующим образом.

P. gingivalis выращивали и обрабатывали любым подходящим способом; см., например, Huang et al., Mol Oral Microbiol. 30:438-50 (2015). CPS очищали любым способом по выбору; см., например, Gonzalez et al., Infect. Immun. 71:2283-2287 (2003); Schifferle et al., J. Immunol. 143:3035-3042 (1989); Pantosti et al., Infect. Immun. 59:2075-2082 (1991). В общих чертах, *P. gingivalis* собирали с помощью центрифугирования, промывали солевым раствором, суспендировали в воде и подвергали экстракции горячей смесью фенол-вода. Водную фазу собирали, экстрагировали простым эфиром и подвергали диализу против сте-

рильной профильтрованной воды. рН водного материала доводили до 5,5 и подвергали расщеплению в течение ночи с помощью коктейля нуклеаз, состоящего из ДНКазы I и РНКазы А (Sigma). рН доводили до нейтрального значения, к образцу добавляли протеиназу К (1 мг/мл; Sigma) и инкубировали в течение ночи при 37°C при легком встряхивании. Затем проводили второе расщепление протеиназой К и полученный углевод концентрировали с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 10000. CPS осаждали холодным этанолом, суспендировали в дезоксихолатном буфере и выделяли с использованием колонки для гель-фильтрации S-400 (Pharmacia, Упсала, Швеция). Фракции, содержащие высокомолекулярный CPS (согласно данным SEC-MALS), объединяли, и фракции, содержащие LPS, удаляли в отходы. Объединенные фракции концентрировали, осаждали, подвергали диализу и лиофилизировали.

К забуференному раствору полисахарида добавляли X молярных эквивалентов (к повторяющемуся звену полисахарида; X определяли с помощью скрининга) тетрафторбората 1-циано-4-диметиламинопиридина (CDAP; из 100 мг/мл раствора в ацетонитриле) при интенсивном перемешивании. Через пять минут после добавления CDAP добавляли 0,5 мол.экв. линкера дибензоциклооктинамина (из концентрированного раствора в ДМСО). Спустя еще 1 ч для нейтрализации любых не вступивших в реакцию сложных цианатных эфиров добавляли глицин. Согласно другому варианту CPS может быть модифицирован с использованием химических реакций с участием периодата или TEMPO/NCS. Дериватизированный полисахарид затем очищали с помощью диализа или ультрафильтрации/диафильтрации (UF/DF). Концентрацию полисахарида измеряли с помощью количественного колориметрического исследования антрона и концентрацию дибензоциклооктина измеряли по абсорбции при 309 нм. Эти два значения можно комбинировать для оценки процентного содержания полисахарида, дериватизированного дибензоциклооктиновой функциональной группой.

Конъюгат получали, смешивая дериватизированный полисахарид с выбранным белком eCRM, таким как те, которые представлены в табл. 2. После 18 ч инкубации добавляли один молярный эквивалент азида натрия, чтобы нейтрализовать любые не вступившие в реакцию дибензоциклооктиновые функциональные группы. Затем конъюгат очищали с помощью диализа или UF/DF для удаления не вступившего в реакцию белка eCRM. Конъюгат затем исследовали для определения концентрации полисахарида (колориметрически), концентрации белка (колориметрически), и рассчитывали процент свободного/неконъюгированного сахара. Молекулярную массу измеряли с помощью SEC-MALS.

Конъюгаты полисахарид:белок осаждали путем добавления 1% раствора дезоксихолата (рН 6,8) и инкубации на льду в течение 30 мин. После инкубации добавляли 1 М HCl, и смесь центрифугировали в течение 20 мин при 10000 об./мин. Оставшийся супернатант содержал неконъюгированный полисахарид. Для определения концентрации полисахарида к образцам добавляли растворенный в серной кислоте антрон и нагревали до 95°C в течение 10 мин. Смесь охлаждали и измеряли абсорбцию при 620 нм. Концентрацию рассчитывали с применением стандартной кривой моносахаридных компонентов полисахарида.

Варианты реализации, описанные в настоящем документе, представлены только в качестве примера, и различные альтернативные варианты реализации не исключены при практическом осуществлении вариантов реализации, описанных в настоящем документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая множество конъюгатов белок-носитель - антиген, где множество конъюгатов белок-носитель - антиген содержат по меньшей мере 21 различающихся конъюгатов белок-носитель - антиген, где указанный антиген представляет собой капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae*, и где:

а) капсульный полисахарид в каждом различающемся конъюгате белок-носитель -антиген получен из разного серотипа *Streptococcus pneumoniae*;

(b) указанный белок-носитель из конъюгатов белок-носитель - антиген содержит полипептид, содержащий по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки, и по меньшей мере три неприродные аминокислоты (нпАК), содержащие реакционную группу, подходящую для "клик-химии", замещенную природными аминокислотами в полипептиде, где капсульные полисахариды конъюгированы с нпАК;

(c) для каждого из серотипов *Streptococcus pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F присутствует отличающийся конъюгат белок-носитель - антиген;

(d) присутствуют по меньшей мере один дополнительный различающийся конъюгат белок-носитель - антиген, содержащий капсульный полисахарид из серотипов *Streptococcus pneumoniae*, выбранных из группы, состоящей из серотипов 2, 6C, 9N, 15A, 15C, 16F, 17F, 20, 20A, 20B, 23A, 23B, 24F, 24B, 31, 34, 35B, 35F и 38; и

(e) общее (мас./мас.) соотношение полисахаридов всех серотипов и белка-носителя в композиции составляет по меньшей мере 0,8.

2. Иммуногенная композиция, содержащая по меньшей мере 24 различающихся конъюгатов белок-носитель - антиген, где по меньшей мере 24 различающихся конъюгатов белок-носитель - антиген содержат:

(i) различающийся конъюгат белок-носитель-антиген, содержащий капсульный полисахарид для каждого из серотипов *Streptococcus pneumoniae* 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F и 33F.

3. Композиция по п.1 или 2, отличающаяся тем, что серотип 20 *Streptococcus pneumoniae* представляет собой серотип 20B.

4. Композиция по любому из пп.1-3, где композиция дополнительно содержит различающийся конъюгат белок-носитель - антиген, где антиген представляет собой капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 6C или 7C.

5. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-4, где капсульные полисахариды *Streptococcus pneumoniae* конъюгированы с нпАК через соединяющий фрагмент, где капсульные полисахариды *Streptococcus pneumoniae* содержат циклооктиновую группу и конъюгированы с реакционной группой, подходящей для "клик-химии", причем реакционная группа, подходящая для "клик-химии", содержит азидогруппу.

6. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-5, где указанные нпАК в полипептиде выбраны из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановой кислоты (рАФ), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты (рАМФ), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропановой кислоты, 2-амино-5-азидопентановой кислоты и 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановой кислоты.

7. Иммуногенная композиция по п.6, где нпАК в полипептиде представляют собой рАМФ.

8. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-7, где белок-носитель содержит по меньшей мере один эпитоп, активирующий Т-клетки, из белка, выбранного из группы, состоящей из токсина *Corynebacterium diphtheriae*, тетаноспазмина *Clostridium tetani*, белка D *Haemophilus influenzae* и CRM197.

9. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-8, где белок-носитель имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1.

10. Иммуногенная композиция по п.9, где белок-носитель имеет по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1.

11. Иммуногенная композиция по п.9 или 10, где белок-носитель содержит по меньшей мере три нпАК, заменяющие природную аминокислоту в пределах SEQ ID NO: 1, где природная аминокислота выбрана из K25, K34, K38, K40, K213, K215, K228, K245, K265, K386, K523 или K527 из SEQ ID NO: 1.

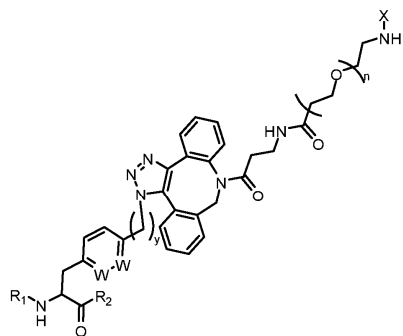
12. Иммуногенная композиция по п.11, где белок-носитель содержит по меньшей мере три нпАК, заменяющие природную аминокислоту в пределах SEQ ID NO: 1, где только одна природная аминокислота выбрана из K25, K34, K38 и K40, и где одна природная аминокислота представляет собой K213 или K215.

13. Композиция по п.11 или 12, где белок-носитель содержит нпАК, содержащие реакционную группу, подходящую для "клик-химии", замещенную остатками лизина следующим образом: 1) один остаток из группы, состоящей из K25, K34, K38 и K40; 2) один остаток, выбранный из группы, состоящей из K213 и K215; и 3) от 2 до 4 остатков, выбранных из группы, состоящей из K228, K245, K265, K386, K523 и K527.

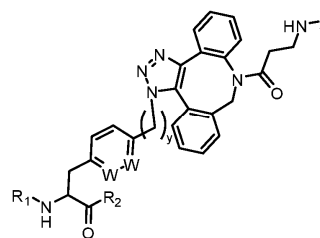
14. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-13, где общее (мас./мас.) соотношение полисахаридов всех серотипов и белка-носителя в композиции составляет по меньшей мере 0,9, по меньшей мере 1,0, по меньшей мере 1,1, по меньшей мере 1,2, по меньшей мере 1,3, по меньшей мере 1,4 или по меньшей мере 1,5.

15. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-14, где белок-носитель в конъюгатах белок-носитель - антиген содержит по меньшей мере 4 нпАК или 4-6 нпАК.

16. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-15, где антиген соединен с белком-носителем согласно формуле XI или XIa

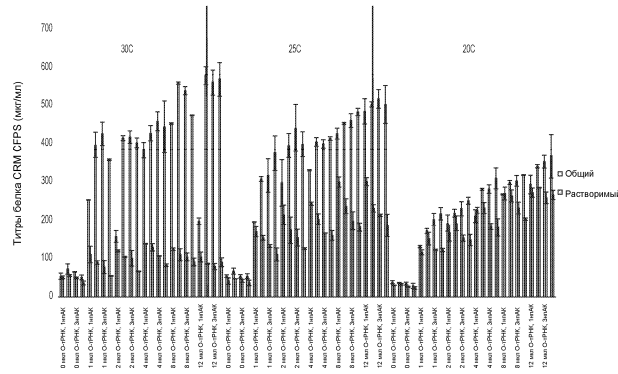


(формула XI)

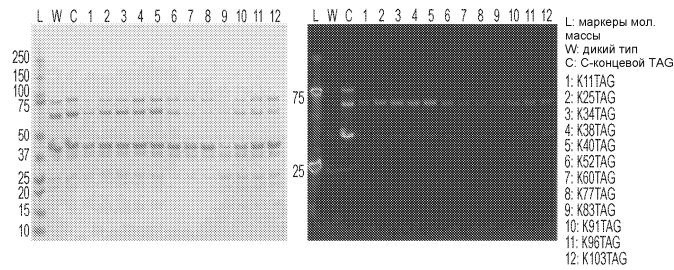


(формула XIa)

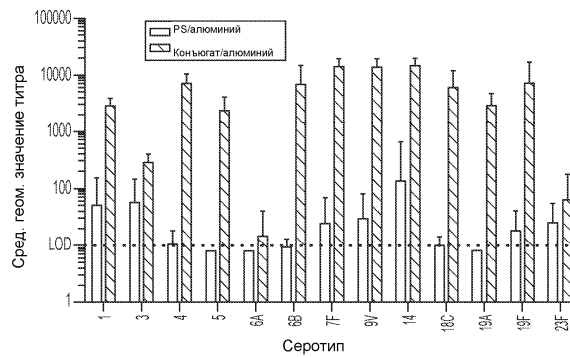
где R_1 представляет собой H, формил или по меньшей мере одну аминокислоту белка-носителя;
 R_2 представляет собой OH или по меньшей мере одну аминокислоту белка-носителя;
 W представляет собой C или N;
 u составляет по меньшей мере 1;
 n составляет по меньшей мере 1 и
 X представляет собой один моносахарид в капсульном полисахариде.



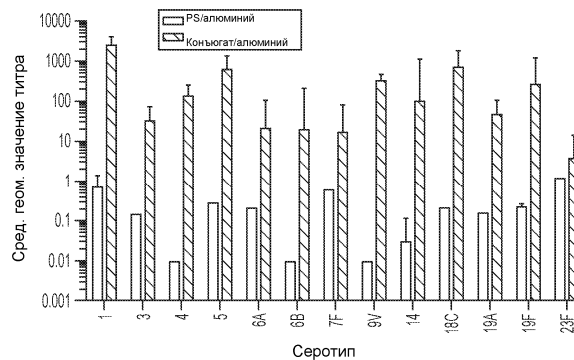
Фиг. 1



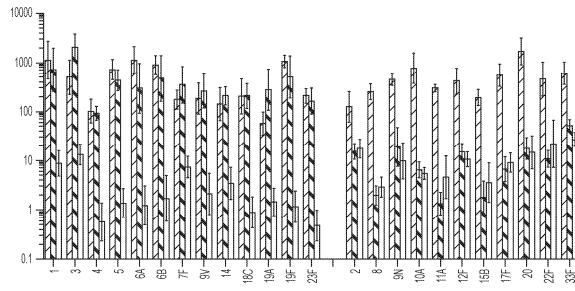
Фиг. 2



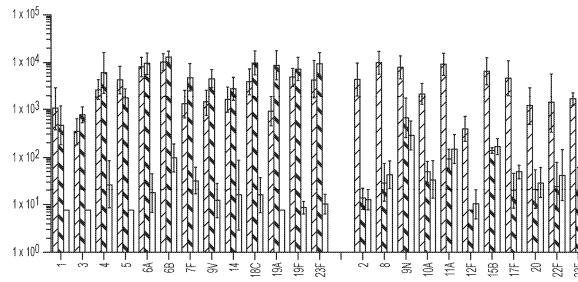
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

