

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047150**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.06.10

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

(21) Номер заявки
202293498

(22) Дата подачи заявки
2021.11.04

(54) ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ КОНЬЮГИРОВАННЫЕ КАПСУЛЬНЫЕ САХАРИДНЫЕ АНТИГЕНЫ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/111,765

(32) 2020.11.10

(33) US

(43) 2023.03.09

(86) PCT/IB2021/060217

(87) WO 2022/101745 2022.05.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПФАЙЗЕР ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Браун Пол Уэйн, Дутта Каушик,
Лотвин Джейсон Арнольд, Сакетт
Келли Джеффри (US)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(56) LEONTEIN KARIN ET AL.: "Structural studies of the capsular polysaccharide from Streptococcus pneumoniae Type 12F", CANADIAN JOURNAL OF CHEMISTRY, vol. 59, no. 14, 15 July 1981 (1981-07-15), pages 2081-2085, XP055904758, CA, ISSN: 0008-4042, DOI: 10.1139/v81-303, Retrieved from the Internet: URL: <https://cdn.sciencepub.com/doi/pdf/10.1139/v81-303>>, Abstract, Introduction, Table 1
CN-A-105999254
US-A1-2004170638

(57) Изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 10 до приблизительно 15 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и от приблизительно 10 до приблизительно 15 остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида, где белок-носитель в указанном гликоконъюгате представляет собой CRM197, и дополнительно содержащей гликоконъюгаты из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F *S. pneumoniae*, где каждый из указанных гликоконъюгатов индивидуально конъюгирован с CRM197; и где указанная композиция представляет собой 20-валентную пневмококковую конъюгатную композицию, а также к ее применению в качестве лекарственного средства.

047150
B1

047150
B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области иммуногенных композиций и вакцин, их изготовлению и применению таких композиций в медицине.

Более конкретно, оно относится к выделенному сахариду *Streptococcus pneumoniae* серотипа 12F, его гликоконъюгатам, способам получения гликоконъюгатов *Streptococcus pneumoniae* серотипа 12F и иммуногенной композиции, содержащей гликоконъюгат *Streptococcus pneumoniae* серотипа 12F.

Изобретение также относится к аналитическим методам для анализа выделенного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 12F, восстановленного полисахарида серотипа 12F или гликоконъюгатов *Streptococcus pneumoniae* серотипа 12F.

Сахарид и гликоконъюгаты *Streptococcus pneumoniae* серотипа 12F согласно настоящему изобретению можно использовать в качестве вакцины.

Уровень техники

Инфекции, вызванные пневмококками, являются основной причиной заболеваемости и смертности во всем мире. Пневмония, фебрильная бактериемия и менингит являются наиболее частыми проявлениями инвазивной пневмококковой инфекции, тогда как распространение бактерий в дыхательных путях может привести к инфекции среднего уха, синуситу или рецидивирующему бронхиту. По сравнению с инвазивным заболеванием неинвазивные проявления обычно менее выражены, но встречаются значительно чаще.

В Европе и Соединенных Штатах пневмококковая пневмония является наиболее распространенной внебольничной бактериальной пневмонией, которая, по оценкам, поражает приблизительно 100 человек на 100000 взрослых ежегодно. Соответствующие цифры для фебрильной бактериемии и менингита составляют 15-19 на 100000 и 1-2 на 100000 соответственно. Риск одного или нескольких из этих проявлений значительно выше у младенцев и пожилых людей, а также у лиц с ослабленным иммунитетом любого возраста. Даже в экономически развитых регионах инвазивная пневмококковая инфекция имеет высокую смертность; для взрослых с пневмококковой пневмонией смертность составляет в среднем 10-20%, в то время как в группах высокого риска она может превышать 50%. Пневмония на сегодняшний день является наиболее распространенной причиной смерти от пневмококков во всем мире.

Возбудитель пневмококковых заболеваний *Streptococcus pneumoniae* (пневмококк) представляет собой грамположительный инкапсулированный кокк, окруженный полисахаридной капсулой. Различия в составе этой капсулы позволяют провести серологическую дифференциацию приблизительно между 91 типом капсулы, некоторые из которых часто связаны с пневмококковой инфекцией, другие редко. Инвазивные пневмококковые инфекции включают пневмонию, менингит и фебрильную бактериемия; среди частых неинвазивных проявлений можно отметить средний отит, синусит и бронхит.

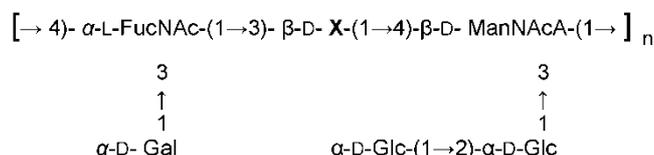
T-независимые антигены, например сахараиды, представляют собой антигены, которые вызывают выработку антител через В-лимфоциты без участия T-клеток. Было установлено, что конъюгация T-независимых антигенов с белками-носителями позволяет T-клеткам стать частью иммунного ответа на обычно T-независимый антиген. Успешные конъюгированные вакцины были разработаны путем конъюгации бактериальных капсульных сахаридов с белками-носителями, где указанный белок-носитель обладает известным эффектом превращения T-независимого сахаридного антигена в T-зависимый антиген, способный запускать отклик иммунной памяти. В данной области техники известно несколько белков-носителей, из которых столбнячный анатоксин, дифтерийный анатоксин, CRM197 и белок D из *Haemophilus influenzae* используют в качестве белка-носителя в коммерческих вакцинах. Пневмококковые конъюгированные вакцины (ПКВ) представляют собой пневмококковые вакцины, используемые для защиты от заболевания, вызываемого *S. pneumoniae* (пневмококком). В настоящее время на мировом рынке доступны три вакцины против ПКВ: PREVNAR® (PREVENAR® в некоторых странах) (гептавалентная вакцина), SYNFLORIX® (декавалентная вакцина) и PREVNAR 13® (PREVENAR 13® в некоторых странах) (тридекавалентная вакцина).

Сохраняется острая потребность в эффективных вакцинах против инфекции *Streptococcus pneumoniae*, которые можно безопасно производить в больших количествах.

Краткое изложение сущности изобретения

Для удовлетворения этих и других потребностей настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F, полученный способом, включающим стадии:

а) осуществление взаимодействия выделенного полисахарида со следующим повторяющимся звеном:



где n представляет собой количество повторяющихся звеньев;

X представляет собой либо N-ацетилгалактозамин, либо 4-кето-N-ацетилхиновозамин; указанный выделенный полисахарид содержит от приблизительно 80 до приблизительно 75 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 20 до приблизительно 25 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида,

с активирующим агентом с получением активированного сахара; и

б) осуществление взаимодействия указанного активированного сахара с белком-носителем, где указанный белок-носитель представляет собой CRM197,

и дополнительно содержащей гликоконъюгаты из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F *S. pneumoniae*, где каждый из гликоконъюгатов индивидуально конъюгирован с CRM197,

и где указанная композиция представляет собой 20-валентную пневмококковую конъюгатную композицию.

В одном аспекте иммуногенной композиции по настоящему изобретению указанный выделенный полисахарид со стадии (а) содержит приблизительно 75 остатков N-ацетилгалактозамина и приблизительно 25 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В еще одном аспекте иммуногенной композиции по настоящему изобретению указанный выделенный полисахарид со стадии (а) имеет среднemasсовую молекулярную массу от 100 до 500 кДа.

Настоящее изобретение также относится к иммуногенной композиции, содержащей гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 10 до приблизительно 15 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и от приблизительно 10 до приблизительно 15 остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида, где белок-носитель в указанном гликоконъюгате представляет собой CRM197, и дополнительно содержащей гликоконъюгаты из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F *S. pneumoniae*, где каждый из указанных гликоконъюгатов индивидуально конъюгирован с CRM197, и где указанная композиция представляет собой 20-валентную пневмококковую конъюгатную композицию.

В одном аспекте иммуногенной композиции по настоящему изобретению указанный гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F содержит капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 10 до приблизительно 12,5 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и от приблизительно 10 до приблизительно 12,5 остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В еще одном аспекте иммуногенной композиции по настоящему изобретению указанный гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F содержит полисахарид серотипа 12F, где среднemasсовая молекулярная масса (Mw) указанного полисахарида до конъюгации составляет от 150 до 400 кДа.

В еще одном аспекте иммуногенной композиции по настоящему изобретению среднemasсовая молекулярная масса (Mw) полисахарида составляет от 500 до 2500 кДа.

В еще одном аспекте иммуногенной композиции по настоящему изобретению степень конъюгации указанного гликоконъюгата *S. pneumoniae* серотипа 12F составляет от 2 до 10.

В еще одном аспекте иммуногенной композиции по настоящему изобретению отношение полисахарида серотипа 12F к белку-носителю в указанном гликоконъюгате *S. pneumoniae* серотипа 12F (мас./мас.) составляет от 0,5 до 3,0.

В еще одном аспекте иммуногенной композиции по настоящему изобретению отношение полисахарида серотипа 12F к белку-носителю в гликоконъюгате (мас./мас.) составляет от 0,8 до 1,2.

В еще одном аспекте иммуногенной композиции по настоящему изобретению CRM197 содержит от 1 до 15 остатков лизина из 39, ковалентно связанных с сахаридом.

В еще одном аспекте иммуногенной композиции по настоящему изобретению указанный гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F получают с использованием восстановительного аминирования.

В еще одном аспекте иммуногенной композиции по настоящему изобретению указанный гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F получают способом, включающим стадию а) осуществления взаимодействия сахара серотипа 12F со стабильным нитроксильным радикальным соединением и окислителем с получением активированного сахара и б) осуществления взаимодействия указанного активированного сахара с CRM197.

В еще одном аспекте иммуногенной композиции по настоящему изобретению указанный гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F получают способом, включающим стадии (а) осуществления взаимодействия выделенного полисахарида серотипа 12F с окисляющим агентом; (б) смешивания активированного полисахарида, полученного на стадии (а), с CRM197; и (в) осуществления взаимодействия смешанного активированного полисахарида и CRM197 с восстанавливающим агентом с получением гликоконъюгата.

В еще одном аспекте иммуногенной композиции по настоящему изобретению указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой свободный радикал 2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси (TEMPO) и указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид (NCS).

В еще одном аспекте иммуногенной композиции по настоящему изобретению указанный гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F получают способом, включающим стадии (а) осуществления взаимодействия выделенного полисахарида серотипа 12F с окисляющим агентом; (а') гашения реакции окисления путем добавления гасящего агента; (б) смешивания активированного полисахарида, полученного на стадии (а'), с CRM197 и (в) осуществления взаимодействия смешанного активированного полисахарида и CRM197 с восстанавливающим агентом с получением гликоконъюгата.

В еще одном аспекте иммуногенной композиции по настоящему изобретению степень окисления указанного активированного полисахарида серотипа 12F составляет от 2 до 30.

В изобретении также предложено применение иммуногенной композиции по изобретению в качестве лекарственного средства, в частности в качестве вакцины.

Подробное описание графических материалов

Фиг. 1А-1С. Схема организации повторяющихся единиц пневмококкового полисахарида 12F и популяций, включая первичную популяцию (А) примерно при 75-80 мол.%, соответствующую Leontein et al. ((1981), Can. J. Chem. 59:2081-2085), и вторичную популяцию (В) примерно при 20-25 мол.%, характеризующуюся заменой GalNAc на Sug (кетосахар). Во вторичной спиновой системе заштрихованными кружками показаны сайт-специфические резонансы основной цепи и разветвленного остатка ^{13}C и/или ^1H , на которые значительно влияет включение остатка Sug. (С) Схематическое изображение средней повторяющейся единицы пневмококкового полисахарида 12F с остатком центральной цепи, показанным либо как GalNAc, либо как Sug на основе статистического среднего (75%/25%).

Фиг. 2. Определение химического сдвига ^1H и ^{13}C для остатка Sug пневмококкового полисахарида 12F в форме гидрата. Sug (также называемый в настоящем документе 4-кето-N-ацетилхиновозамин, 2-ацетамидо-2,6-дидезокси-D-ксило-4-гексулозой или 4KQ) включается в основную цепь повторяющегося звена путем замены остатка GalNAc.

Фиг. 3. Равновесие кетон/гидрат.

Фиг. 4. Показаны 11 корреляций NOESY, обеспечивающие дополнительные доказательства замены GalNAc на D-Sug в повторяющейся единице полисахарида 12F.

Фиг. 5. Повторяющаяся единица, содержащая GalNAc полисахарида 12F, обнаруженная с помощью диссоциации, индуцированной столкновением в источнике (IS-CID).

Фиг. 6. Схематическое изображение остатка Sug серотипа 12F (4-кето-N-ацетилхиновозамин), показывающее равновесие кетон/гидрат в водном растворителе, а также изменения, вызванные специфическим восстановлением кетона с использованием NaBH_4 .

Фиг. 7. Схема повторяющейся единицы серотипа 12F, содержащей остаток Sug, после восстановления с помощью NaBD_4 .

Фиг. 8. Были протестированы иммунные сыворотки от субъектов, иммунизированных поливалентной вакциной, содержащей конъюгат 12F (12F conj.), мультивалентной вакциной, содержащей простой 12F (12F plain), или мультивалентной вакциной, не содержащей полисахарид 12F, относительно их способности вызывать реакцию уничтожения бактерий для изолятов с уровнями модификации 4KQ от 1,9 до 27,5%.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение частично основано на идентификации новой структуры (структур) пневмококкового полисахарида с использованием спектроскопии ядерного магнитного резонанса (NMR). Считается, что представленная в настоящем изобретении структура является первой идентификацией или первой правильной идентификацией *S. pneumoniae* серотипа 12F.

Полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F получали из различных штаммов и очищали. Полученный (и очищенный) полисахарид использовали для создания конъюгата полисахарид-белок (гликоконъюгаты). *S. pneumoniae* серотипа 12F имеет уникальную структуру полисахарида, что обеспечивает уникальный способ получения конъюгатов.

1. Выделенный сахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 12F согласно настоящему изобретению.

Используемый в настоящем документе термин "выделенный" в отношении полисахарида относится к выделению капсульного полисахарида, специфичного для серотипа *S. pneumoniae*, из очищенного полисахарида с использованием методов очистки, известных в данной области техники, включая использование центрифугирования, глубинной фильтрации, преципитации, ультрафильтрации, обработки активированным углем, диафильтрации и/или колоночной хроматографии. Как правило, выделенный полисахарид относится к частичному удалению белков, нуклеиновых кислот и неспецифического эндогенного полисахарида (С-полисахарида). Выделенный полисахарид содержит менее 10, 8, 6, 4 или 2% белковых примесей и/или нуклеиновых кислот. Выделенный полисахарид содержит менее 20% С-полисахарида по отношению к типоспецифическим полисахаридам.

Ранее была опубликована структура капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 12F (Leontein et al. (1981), Can. J. Chem. 59:2081-2085).

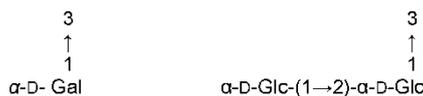
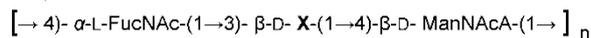
Согласно Leontein et al., полисахаридная повторяющаяся единица серотипа 12F состоит из линейного трисахаридного остова (один N-ацетилфукозамин (FucpNAc), один N-ацетилгалактозамин (GalpNAc) и одна N-ацетилманнуронозная кислота (ManpNAcA)) с двумя ответвлениями: боковая α -галактопираноза

(Galp), связанная по C3 FucpNAc, и дисахаридная ветвь α -Glc-(1 \rightarrow 2)- α -Glc, связанная по C3 ManpNAcA.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что структура *S. pneumoniae* серотипа 12F отличается. Авторы изобретения впервые обнаружили, что полисахарид серотипа 12F фактически содержит частичную замену N-ацетилгалактозамина на 4-кето-N-ацетилхиновозамин (также называемый Sug, D-Sug, 2-ацетамидо-2,6-дидезокси-D-ксило-4-гексулоза или 4KQ в настоящем документе).

Наличие включения 4KQ исследовали в различных клинических изолятах серотипа 12F и различных штаммах серотипа 12F. Все изученные клинические изоляты имели некоторый уровень включения 4KQ, что указывает на то, что замена 4KQ распространена в клинических изолятах серотипа 12F.

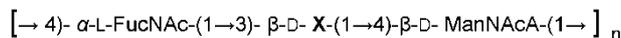
Соответственно, в одном воплощении настоящего изобретения предложен выделенный полисахарид со следующим повторяющимся звеном:



где n представляет собой количество повторяющихся звеньев;

X представляет собой либо N-ацетилгалактозамин, либо 4-кето-N-ацетилхиновозамин.

В одном воплощении настоящего изобретения предложен выделенный полисахарид со следующим повторяющимся звеном:



где n представляет собой число повторяющихся звеньев;

X представляет собой либо N-ацетилгалактозамин, либо 4-кето-N-ацетилхиновозамин,

где указанный полисахарид содержит от приблизительно 99,9 до приблизительно 50 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,1 до приблизительно 50 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В некоторых воплощениях выделенный полисахарид содержит от приблизительно 99,1 до приблизительно 50 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,9 до приблизительно 50 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В некоторых воплощениях выделенный полисахарид содержит от приблизительно 99 до приблизительно 50 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 1 до приблизительно 50 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В некоторых воплощениях выделенный полисахарид содержит от приблизительно 98 до приблизительно 50 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 2 до приблизительно 50 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В некоторых воплощениях выделенный полисахарид содержит от приблизительно 97 до приблизительно 50 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 3 до приблизительно 50 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В некоторых воплощениях выделенный полисахарид содержит от приблизительно 96 до приблизительно 50 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 4 до приблизительно 50 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В некоторых воплощениях выделенный полисахарид содержит от приблизительно 95 до приблизительно 50 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 5 до приблизительно 50 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В некоторых воплощениях выделенный полисахарид содержит от приблизительно 94 до приблизительно 50 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 6 до приблизительно 50 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В некоторых воплощениях выделенный полисахарид содержит от приблизительно 93 до приблизительно 50 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 7 до приблизительно 50 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В некоторых воплощениях выделенный полисахарид содержит от приблизительно 92 до приблизительно 50 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 8 до приблизительно 50 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В некоторых воплощениях выделенный полисахарид содержит от приблизительно 91 до приблизительно 50 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 9 до приблизительно 50 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В некоторых воплощениях выделенный полисахарид содержит от приблизительно 90 до приблизи-

В одном воплощении настоящего изобретения предложен выделенный капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий от приблизительно 99,9 до приблизительно 97 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,1 до приблизительно 3 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении настоящего изобретения предложен выделенный капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий от приблизительно 99,9 до приблизительно 95 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении настоящего изобретения предложен выделенный капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий от приблизительно 99,8 до приблизительно 99,5 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,2 до приблизительно 0,5 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении настоящего изобретения предложен выделенный капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий от приблизительно 99,8 до приблизительно 99 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,2 до приблизительно 1 остатка 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении настоящего изобретения предложен выделенный капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий от приблизительно 99,8 до приблизительно 98 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,2 до приблизительно 2 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении настоящего изобретения предложен выделенный капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий от приблизительно 99,8 до приблизительно 97 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,2 до приблизительно 3 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении настоящего изобретения предложен выделенный капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий от приблизительно 99,8 до приблизительно 95 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,2 до приблизительно 5 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении настоящего изобретения предложен выделенный капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий от приблизительно 99,5 до приблизительно 99 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,5 до приблизительно 1 остатка 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении настоящего изобретения предложен выделенный капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий от приблизительно 99,5 до приблизительно 98 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,5 до приблизительно 2 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении настоящего изобретения предложен выделенный капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий от приблизительно 99,5 до приблизительно 97 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,5 до приблизительно 3 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении настоящего изобретения предложен выделенный капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий от приблизительно 99,5 до приблизительно 95 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,5 до приблизительно 5 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В некоторых воплощениях выделенный полисахарид содержит от 10 до 5000 повторяющихся звеньев. В некоторых аспектах выделенный полисахарид содержит от 50 до 4500 повторяющихся звеньев. В некоторых аспектах выделенный полисахарид содержит от 100 до 4500 повторяющихся звеньев. В некоторых аспектах выделенный полисахарид содержит от 150 до 2000 повторяющихся звеньев.

Выделенные капсульные сахараиды из *S. pneumoniae* серотипа 12F получают стандартными методами, известными специалистам в данной области. Обычно капсульные полисахариды получают путем выращивания штамма *S. pneumoniae* серотипа 12F в среде (например, в среде на основе сои), затем из указанной культуры бактерий получают полисахариды. Штаммы *Streptococcus pneumoniae* серотипа 12F могут быть получены из установленных коллекций культур (таких как, например, референс-лаборатория по стрептококкам (Streptococcal Reference Laboratory) (Центры по контролю и профилактике заболеваний (Centers for Disease Control and Prevention), Атланта, Джорджия)) или клинических образцов.

Популяцию организма (*S. pneumoniae* серотипа 12F) часто переносят из посевного флакона в бутылки для посевов и пропускают через один или более ферментаторов увеличивающегося объема до тех пор, пока не будут достигнуты объемы ферментации производственных масштабов. В конце цикла роста клетки лизируют, а затем среду с лизатом собирают для последующей обработки (очистки) (см., например, WO 2006/110381 и WO 2008/118752, публикации патентных заявок США № 2006/0228380, 2006/0228381, 2008/0102498 и 2008/0286838). Полисахариды обычно очищают с помощью центрифугирования, преципитации, ультрафильтрации и/или колоночной хроматографии (см., например,

WO 2006/110352, WO 2008/118752 и WO 2020/170190).

Выделенный полисахарид можно охарактеризовать различными параметрами, включая, например, среднюю молекулярную массу (ММ).

Молекулярную массу полисахарида можно измерить с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) в сочетании с детектором многоугольного рассеяния лазерного света (MALLS).

В одном воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 5 до 5000 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 5 до 2000 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 5 до 1000 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 5 до 500 кДа.

В одном воплощении выделенный капсульный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 5 до 400 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 5 до 300 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 5 до 200 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 5 до 100 кДа.

В одном воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 50 до 5000 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 50 до 2000 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 50 до 1000 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 50 до 500 кДа.

В одном воплощении выделенный капсульный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 50 до 400 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 50 до 300 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 50 до 200 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 50 до 100 кДа.

В одном воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 100 до 5000 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 100 до 2000 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 100 до 1000 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 100 до 500 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 100 до 400 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 100 до 300 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 100 до 200 кДа.

В одном воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 200 до 5000 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 200 до 2000 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 200 до 1000 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 200 до 500 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 200 до 400 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 200 до 300 кДа.

В одном воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 300 до 5000 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 300 до 2000 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 300 до 1000 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 300 до 500 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 300 до 400 кДа.

В одном воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 500 до 5000 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 500 до 2000 кДа. В другом воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 500 до 1000 кДа. В предпочтительном воплощении выделенный полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 100 до 500 кДа.

2. Гликоконъюгаты *Streptococcus pneumoniae* серотипа 12F согласно настоящему изобретению.

Выделенный полисахарид, описанный выше, может быть активирован (например, химически активирован), для придания ему способности реагировать (например, с линкером или непосредственно с белком-носителем), а затем включен в гликоконъюгаты, как дополнительно описано в настоящем документе.

Для целей настоящего изобретения термин "гликоконъюгат" означает сахарид, ковалентно связанный с белком-носителем. В одном воплощении сахарид связан непосредственно с белком-носителем. Во втором воплощении сахарид связан с белком-носителем через спейсер/линкер.

В общем, ковалентная конъюгация сахаридов с носителями повышает иммуногенность сахаридов, так как превращает их из Т-независимых антигенов в Т-зависимые антигены, тем самым обеспечивая праймирование иммунологической памяти. Конъюгация особенно полезна для вакцин, предназначенных

для детей.

Перед активацией размер выделенного полисахарида может быть уменьшен при сохранении критических особенностей структуры полисахарида. Может быть использована механическая или химическая сортировка по размерам. В одном воплощении размер выделенного полисахарида уменьшают химическим гидролизом. Размер выделенного полисахарида также можно уменьшить механической гомогенизацией. В одном варианте осуществления размер выделенного полисахарида уменьшают путем гомогенизации под высоким давлением. Гомогенизация под высоким давлением позволяет достичь высоких скоростей сдвига благодаря прокачке технологического потока через канал с достаточно малыми размерами. Скорость сдвига увеличивается за счет использования большего приложенного давления гомогенизации, а время воздействия может быть увеличено за счет рециркуляции потока сырья через гомогенизатор.

В одном воплощении настоящее изобретение относится к гликоконъюгату серотипа 12F, полученному способом, включающим стадии: а) осуществления взаимодействия выделенного полисахарида по воплощению 1, представленному выше, с активирующим агентом с получением активированного сахара и б) осуществления взаимодействия активированного сахара с белком-носителем.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению содержит полисахарид серотипа 12F, где средняя молекулярная масса (M_w) указанного полисахарида до конъюгации составляет от 50 до 1000 кДа.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению содержит полисахарид серотипа 12F, где средняя молекулярная масса (M_w) указанного полисахарида до конъюгации составляет от 100 до 600 кДа.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению содержит полисахарид серотипа 12F, где средняя молекулярная масса (M_w) указанного полисахарида до конъюгации составляет от 150 до 400 кДа.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению содержит полисахарид серотипа 12F, где средняя молекулярная масса (M_w) указанного полисахарида до конъюгации составляет от 150 до 300 кДа.

В некоторых воплощениях гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению имеет среднюю молекулярную массу (M_w) от приблизительно 250 до 15000 кДа.

В других воплощениях гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению имеет среднюю молекулярную массу (M_w) от приблизительно 500 до 2500 кДа.

В других воплощениях гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению имеет среднюю молекулярную массу (M_w) от приблизительно 750 до 2500 кДа.

В предпочтительных воплощениях гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению имеет среднюю молекулярную массу (M_w) от приблизительно 1000 до 2500 кДа.

Другим способом для характеристики гликоконъюгатов серотипа 12F согласно настоящему изобретению является характеристика по числу остатков лизина в белке-носителе (например, CRM197), который становится конъюгированным с сахаридом, что может характеризоваться диапазоном конъюгированных лизинов (степень конъюгации). Доказательства модификации лизина белка-носителя вследствие ковалентных связей с полисахаридами могут быть получены с помощью аминокислотного анализа с использованием обычных методов, известных специалистам в данной области техники. Конъюгация приводит к уменьшению количества извлеченных остатков лизина по сравнению с исходным материалом белка-носителя, используемым для получения материалов конъюгата. В предпочтительном воплощении степень конъюгации гликоконъюгата серотипа 12F согласно настоящему изобретению составляет от 2 до 15. В одном воплощении степень конъюгации гликоконъюгата серотипа 12F согласно настоящему изобретению составляет от 2 до 10. В одном воплощении степень конъюгации гликоконъюгата серотипа 12F согласно настоящему изобретению составляет от 3 до 5. В одном воплощении степень конъюгации гликоконъюгата серотипа 12F согласно настоящему изобретению составляет от 2 до 6. В одном воплощении степень конъюгации гликоконъюгата серотипа 12F согласно настоящему изобретению составляет от 4 до 10.

Гликоконъюгаты серотипа 12F согласно настоящему изобретению также могут быть охарактеризованы отношением (мас./мас.) сахара к белку-носителю. В некоторых воплощениях отношение полисахарида серотипа 12F к белку-носителю в гликоконъюгате (мас./мас.) составляет от 0,5 до 3,0. В других воплощениях отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) составляет от 0,5 до 2,0. В других воплощениях отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) составляет от 0,5 до 1,5. В других воплощениях отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) составляет от 0,8 до 1,2. В других воплощениях отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) составляет от 0,5 до 1,0. В других воплощениях отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) составляет от 1,0 до 1,5. В других воплощениях отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) составляет от 1,0 до 2,0. В других воплощениях отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) составляет от 0,8 до 1,2.

В предпочтительном воплощении отношение капсульного полисахарида серотипа 12F к белку-носителю в конъюгате составляет от 0,9 до 1,1. В некоторых таких воплощениях белок-носитель пред-

ставляет собой CRM197.

Способ получения гликоконъюгата серотипа 12F согласно настоящему изобретению может включать применение восстанавливающего агента. В частности, непрореагировавшие альдегидные группы после окисления (в частности, в случае применения восстановительного аминирования, см. ниже) могут быть блокированы с применением подходящего блокирующего агента (восстанавливающего агента). В одном воплощении указанный блокирующий агент представляет собой боргидрид натрия (NaBH_4).

Как указано в примере 2, остаток 4KQ (4-кето-N-ацетилхиновозамина) чувствителен к восстановлению с использованием NaBH_4 . Обработка полисахарида серотипа 12F NaBH_4 специфически восстанавливает положение 4 остатка 4KQ из кетона/гидрата до спирта и превращает остаток 4KQ в смесь D-FucNAc и D-QuiNAc, характеризующуюся гидроксилем в положении 4 в аксиальном и экваториальном направлениях соответственно, как показано на фиг. 6.

Таким образом, в одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению содержит капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 0,05 до приблизительно 25 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению содержит капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 0,05 до приблизительно 22,5 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению содержит капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 0,05 до приблизительно 15 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению содержит капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 0,05 до приблизительно 12,5 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению содержит капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 0,1 до приблизительно 25 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению содержит капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 0,1 до приблизительно 22,5 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению содержит капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 0,1 до приблизительно 15 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению содержит капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 0,1 до приблизительно 12,5 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению содержит капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 0,5 до приблизительно 25 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению содержит капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 0,5 до приблизительно 22,5 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению содержит капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 0,5 до приблизительно 15 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению содержит капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 0,5 до приблизительно 12,5 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению содержит капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 1 до приблизительно 25 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению содержит капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий приблизительно 25 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и приблизительно 25 остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

Гликоконъюгаты серотипа 12F и иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению могут содержать свободный сахарид, который не является ковалентно конъюгированным с белком-носителем, но, тем не менее, присутствует в композиции гликоконъюгата. Свободный сахарид может быть нековалентно связан (т.е. нековалентно связан, адсорбирован или захвачен) с гликоконъюгатом.

В предпочтительном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F содержит менее чем приблизительно 50% свободного полисахарида серотипа 12F относительно общего количества полисахарида серотипа 12F. В предпочтительном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F содержит менее чем приблизительно 25% свободного полисахарида серотипа 12F относительно общего количества полисахарида серотипа 12F. В другом предпочтительном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F содержит менее чем приблизительно 20% свободного полисахарида серотипа 12F относительно общего количества полисахарида серотипа 12F. В еще одном предпочтительном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F содержит менее чем приблизительно 15% свободного полисахарида серотипа 12F относительно общего количества полисахарида серотипа 12F.

Гликоконъюгаты серотипа 12F могут также быть охарактеризованы распределением их молекул по размеру (K_d). Для определения распределения по относительному размеру молекул в конъюгате может быть использована среда для эксклюзионной хроматографии (CL-4B). Эксклюзионная хроматография (SEC) используется в колонках с гравитационной подачей для профилирования молекулярного распределения конъюгатов по размерам. Крупные молекулы, исключенные из пор среды, элюируются быстрее, чем мелкие. Для сбора элюата колонки используют коллекторы фракций. Фракции анализируют колориметрически с помощью анализа сахаридов. Для определения K_d колонки калибруют, чтобы установить фракцию, при которой молекулы полностью исключаются (V_0), ($K_d=0$), и фракцию, отражающую максимальное удержание (V_i), ($K_d=1$). Фракция, при которой достигается указанный признак выборки (V_c), связана с K_d выражением $K_d=(V_c-V_0)/(V_i-V_0)$.

В предпочтительном воплощении по меньшей мере 30% гликоконъюгата серотипа 12F имеет K_d , меньшую или равную 0,3 в колонке CL-4B. В предпочтительном воплощении по меньшей мере 40% гликоконъюгата имеет K_d , меньшую или равную 0,3 в колонке CL-4B. В предпочтительном воплощении по меньшей мере 60% гликоконъюгата серотипа 12F имеет K_d , меньшую или равную 0,3 в колонке CL-4B. В предпочтительном воплощении от 50 до 80% гликоконъюгата серотипа 12F имеет K_d , меньшую или равную 0,3 в колонке CL-4B. В предпочтительном воплощении от 65% до 80% гликоконъюгата серотипа 12F имеет K_d , меньшую или равную 0,3 в колонке CL-4B.

Белки-носители.

Другим компонентом гликоконъюгата согласно настоящему изобретению является белок-носитель, с которым конъюгирован сахарид. Термин "белок-носитель", или "несущий белок", или "носитель" относится к любой белковой молекуле, которая может быть конъюгирована с антигеном (таким как капсулярный полисахарид), против которого желателен иммунный ответ.

Конъюгация с носителем может усилить иммуногенность антигена. Белки-носители для антигенов могут представлять собой токсины, анатоксины или любой мутантный перекрестно-реактивный материал (CRM) токсина столбняка, дифтерии, коклюша, *Pseudomonas*, *E.coli*, *Staphylococcus* и *Streptococcus*. В одном воплощении белок-носитель представляет собой CRM197, полученный из *C. diphtheriae* штамма C7 (β 197), который продуцирует белок CRM₁₉₇. Данный штамм находится в коллекции ATCC под номером 53281. Способ получения CRM₁₉₇ описан в патенте США № 5614382. В качестве альтернативы можно использовать фрагмент или эпитоп белка-носителя или другого иммуногенного белка. Например, гаптенный антиген может быть связан с T-клеточным эпитопом бактериального токсина, анатоксина или CRM. Другие подходящие белки-носители включают инактивированные бактериальные токсины, такие как холерный анатоксин (например, как описано в международной патентной заявке № WO 2004/083251), *E.coli* LT, *E.coli* ST и экзотоксин A из *Pseudomonas aeruginosa*. Также могут быть применены бактериальные белки внешней мембраны, такие как комплекс наружной мембраны с (OMP), порины, трансферрин-связывающие белки, пневмолизин, пневмококковый поверхностный белок A (PspA), пневмококковый адгезивный белок (PsaA) или белок D *Haemophilus influenzae*. Другие белки, такие как овальбумин, гемоцианин лимфы улитки (KLH), бычий сывороточный альбумин (BSA) или очищенное белковое производное туберкулина (PPD), также могут быть использованы в качестве белков-носителей.

В предпочтительном воплощении белок-носитель гликоконъюгата серотипа 12F согласно настоящему изобретению представляет собой TT (столбнячный анатоксин), DT (дифтерийный анатоксин), мутанты DT (такие как CRM197) или пептидазу C5a из *Streptococcus* (SCP).

В предпочтительном воплощении белок-носитель гликоконъюгата серотипа 12F согласно настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из TT (столбнячного анатоксина), DT (дифтерийного анатоксина), мутантов DT (таких как CRM197) и пептидазы из *Streptococcus* (SCP).

В одном воплощении белок-носитель гликоконъюгата капсульного полисахарида серотипа 12F представляет собой DT (дифтерийный анатоксин). В другом воплощении белок-носитель гликоконъюгата капсульного полисахарида серотипа 12F представляет собой TT (столбнячного анатоксина).

В другом воплощении белок-носитель гликоконъюгата капсульного полисахарида серотипа 12F представляет собой PD (белок D *H. influenzae*; см., например, EP0594610 B).

В предпочтительном воплощении белок-носитель гликоконъюгата капсульного полисахарида серотипа 12F представляет собой CRM₁₉₇.

Как обсуждалось в настоящем документе ранее, количество остатков лизина в белке-носителе, которые становятся конъюгированными с сахаридом, можно охарактеризовать диапазоном конъюгированных лизинов. Например, в конкретной иммуногенной композиции CRM₁₉₇ может содержать от 1 до 15 остатков лизина из 39, ковалентно связанных с сахаридом. Другой способ выражения этого параметра заключается в том, что от приблизительно 2,5 до приблизительно 40% лизинов CRM₁₉₇ ковалентно связаны с сахаридом. Например, в данной иммуногенной композиции CRM₁₉₇ может содержать от 1 до 20 остатков лизина из 39, ковалентно связанных с сахаридом 12F. Другой способ выразить этот параметр заключается в том, что от приблизительно 2,5% до приблизительно 50% лизинов CRM₁₉₇ ковалентно связаны с сахаридом 12F.

3. Способы получения гликоконъюгатов *Streptococcus pneumoniae* серотипа 12F согласно настоящему изобретению

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению получают с применением восстановительного аминирования.

Восстановительное аминирование включает две стадии: (1) окисление (активация) очищенного сахара, (2) восстановление активированного сахара и белка-носителя (например, CRM₁₉₇, TT или SCP) с получением гликоконъюгата (см, например, WO 2006/110381, WO 2008/079653, WO 2008/143709, WO 2008/079732, WO 2011/110531, WO 2012/119972, WO 2015/110941, WO 2015/110940, WO 2018/144439, WO 2018/156491).

Как упоминалось выше, перед окислением можно провести сортировку по размерам полисахарида до целевого диапазона молекулярной массы (ММ).

Соответственно, в одном воплощении выделенный полисахарид 12F сортируют по размерам перед окислением. В другом воплощении выделенный полисахарид 12F сортируют до любого целевого диапазона молекулярной массы, определенного выше.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению получают способом, включающим стадии: а) осуществления взаимодействия сахара серотипа 12F со стабильным нитроксильным радикальным соединением и антиокислителем с получением активированного сахара и б) осуществления взаимодействия указанного активированного сахара с белком-носителем.

В одном из аспектов указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой молекулу, несущую группировку TEMPO или PROXYL (2,2,5,5-тетраметил-1-пирролидинилокси). Предпочтительно указанная молекула способна селективно окислять первичный спирт в присутствии окислителя с получением альдегидных групп, не оказывая влияния на вторичные гидроксильные группы. Более предпочтительно указанная молекула способна селективно окислять первичный спирт в присутствии окислителя с получением альдегидных групп без сверхокисления до карбоксильных групп.

В одном из аспектов указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой TEMPO, 2,2,6,6-тетраметил-4-(метилсульфонилокси)-1-пиперидиноокси, 4-фосфоноокси-TEMPO, 4-оксо-TEMPO, 4-метокси-TEMPO, 4-изотиоцианато-TEMPO, 4-(2-йодацетамидо)-TEMPO свободный радикал, 4-гидрокси-TEMPO, 4-циано-TEMPO, 4-карбокси-TEMPO, 4-(2-бромацетамидо)-TEMPO или 4-амино-TEMPO, 4-ацетамидо-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил. Предпочтительно указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой TEMPO.

В одном из аспектов указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение выбрано из групп, состоящих из TEMPO, 2,2,6,6-тетраметил-4-(метилсульфонилокси)-1-пиперидиноокси, 4-фосфоноокси-TEMPO, 4-оксо-TEMPO, 4-метокси-TEMPO, 4-изотиоцианато-TEMPO, 4-(2-йодацетамидо)-TEMPO свободного радикала, 4-гидрокси-TEMPO, 4-циано-TEMPO, 4-карбокси-TEMPO, 4-(2-бромацетамидо)-TEMPO, 4-амино-TEMPO, 4-ацетамидо-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксила. Предпочтительно указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой TEMPO. В другом аспекте указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой 3 β -DOXYL-5 α -холестан, 5-BOXYL-стеариновую кислоту, 16-DOXYL-стеариновую кислоту, метил-5-DOXYL-стеарат, 3-(аминометил)-PROXYL, 3-карбамоил-PROXYL, 3-карбамоил-2,2,5,5-тетраметил-3-пирролин-1-оксила, 3-карбокси-PROXYL или 3-циано-PROXYL.

В другом аспекте указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение выбрано из групп, состоящих из 3 β -DOXYL-5 α -холестана, 5-BOXYL-стеариновой кислоты, 16-DOXYL-стеариновой кислоты, метил-5-DOXYL-стеарата, 3-(аминометил)-PROXYL, 3-карбамоил-PROXYL, 3-карбамоил-2,2,5,5-тетраметил-3-пирролин-1-оксила, 3-карбокси-PROXYL, 3-циано-PROXYL.

В одном из аспектов окислитель представляет собой молекулу, содержащую группировку

N-галоген. Предпочтительно указанная молекула способна селективно окислять первичный спирт в присутствии соединения с нитроксильным радикалом. В одном из аспектов указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид, N-бромсукцинимид, N-йодсукцинимид, дихлоризоциануровую кислоту, 1,3,5-трихлор-1,3,5-триазинан-2,4,6-трион, дибромизоциануровую кислоту, 1,3,5-трибром-1,3,5-триазинан-2,4,6-трион, диодозоциануровую кислоту или 1,3,5-триод-1,3,5-триазинан-2,4,6-трион. В одном из аспектов указанный окислитель выбран из группы, состоящей из N-хлорсукцинимид, N-бромсукцинимид, N-йодсукцинимид, дихлоризоциануровой кислоты, 1,3,5-трихлор-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона, дибромизоциануровой кислоты, 1,3,5-трибром-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона, диодозоциануровой кислоты и 1,3,5-триод-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона. Предпочтительно указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид.

В одном из аспектов указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой свободный радикал 2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси (TEMPO), и указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид (NCS).

В одном из аспектов стадию (а) реакции проводят в водном растворителе. В другом аспекте стадию (а) проводят в апротонном растворителе. В одном из аспектов стадию (а) проводят в DMSO (диметилсульфоксиде), диметилацетамиде (DMA), сульфолане, N-метил-2-пирролидоне (NMP), гексаметилфосфорамиде (HMPA) или в DMF (диметилформамиде) в качестве растворителя. В одном из аспектов стадию (а) проводят в ДМСО (диметилсульфоксиде).

В одном из аспектов осуществляют взаимодействие сахара с 0,1-10 мольными эквивалентами окислителя. Предпочтительно осуществляют взаимодействие сахара с 0,2-5, 0,5-2,5 или 0,5-1,5 мольного эквивалента окислителя. В одном из аспектов осуществляют взаимодействие полисахарида с приблизительно 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8 или 5 мольными эквивалентами окислителя.

В одном из аспектов стабильное нитроксильное радикальное соединение присутствует в каталитическом количестве. В одном из аспектов осуществляют взаимодействие с менее чем приблизительно 0,3 мольного эквивалента стабильного соединения с нитроксильным радикалом. В одном из аспектов осуществляют взаимодействие сахара с менее чем приблизительно 0,005 мольного эквивалента стабильного соединения с нитроксильным радикалом. В одном из аспектов осуществляют взаимодействие сахара с приблизительно 0,005, 0,01, 0,05 или 0,1 мольного эквивалента стабильного соединения с нитроксильным радикалом.

В конце реакции восстановления в конъюгатах могут оставаться непрореагировавшие альдегидные группы, которые могут быть защищены (блокированы) с использованием подходящего защитного вещества. В одном воплощении защитное вещество представляет собой боргидрид натрия (NaBH_4).

В одном из воплощений блокировку осуществляют путем смешивания продукта со стадии (в) с 0,5-20 мольными эквивалентами боргидрида натрия. В одном из воплощений блокировку осуществляют путем смешивания продукта со стадии (в) с 1-15 мольными эквивалентами боргидрида натрия. В одном из воплощений блокировку осуществляют путем смешивания продукта со стадии (в) с 0,5-5 мольными эквивалентами боргидрида натрия. В одном из воплощений блокировку осуществляют путем смешивания продукта со стадии (в) с 0,75-3 мольными эквивалентами боргидрида натрия. В одном из воплощений блокировку осуществляют путем смешивания продукта со стадии (в) с 1 мольным эквивалентом боргидрида натрия. В одном из воплощений блокировку осуществляют путем смешивания продукта со стадии (в) с 2 мольными эквивалентами боргидрида натрия. В одном из воплощений блокировку осуществляют путем смешивания продукта со стадии (в) с 3 мольными эквивалентами боргидрида натрия.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению получают способом, включающим стадии:

(а) осуществление взаимодействия выделенного полисахарида серотипа 12F с окисляющим агентом;

(б) смешивание активированного полисахарида, полученного на стадии (а), с белком-носителем;

(в) осуществление взаимодействия смешанного активированного полисахарида и белка-носителя с восстанавливающим агентом с получением гликоконъюгата.

В одном воплощении гликоконъюгат серотипа 12F согласно настоящему изобретению получают способом, включающим стадии:

(а) осуществление взаимодействия выделенного полисахарида серотипа 12F с окисляющим агентом;

(а') гашение реакции окисления путем добавления гасящего агента;

(б) смешивание активированного полисахарида, полученного на стадии (а'), с белком-носителем;

(в) осуществление взаимодействия смешанного активированного полисахарида и белка-носителя с восстанавливающим агентом с получением гликоконъюгата.

После стадии окисления (а) сахарид считается активированным и называется "активированным полисахаридом".

В одном воплощении окисляющий агент представляет собой любой окисляющий агент, который окисляет концевую гидроксильную группу до альдегида. В одном воплощении окисляющий агент пред-

ставляет собой периодат. Для целей настоящего изобретения термин "периодат" включает периодат и периодную кислоту; этот термин также включает как метапериодат (IO_4^-), так и ортопериодат (IO_6^{5-}) и различные соли периодата (например, периодат натрия и периодат калия).

В одном воплощении окисляющий агент представляет собой ортопериодат.

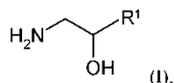
В предпочтительном воплощении окисляющий агент представляет собой периодат натрия. В одном варианте периодат, используемый для окисления, представляет собой метапериодат. В одном варианте периодат, используемый для окисления, представляет собой метапериодат натрия.

Когда полисахарид реагирует с периодатом, периодат окисляет вицинальные гидроксильные группы с образованием карбонильных или альдегидных групп и вызывает разрыв связи СС. По этой причине термин "реакция полисахарида с периодатом" включает окисление вицинальных гидроксильных групп периодатом.

В одном воплощении стадия (а) включает осуществление взаимодействия полисахарида с 0,01-2 мольными эквивалентами периодата. В одном воплощении стадия (а) включает осуществление взаимодействия полисахарида с 0,05-1,5 мольного эквивалента периодата. В одном воплощении стадия (а) включает осуществление взаимодействия полисахарида с 0,1-1,0 мольного эквивалента периодата. В одном воплощении стадия (а) включает осуществление взаимодействия полисахарида с 0,01-0,5 мольного эквивалента периодата. В одном воплощении стадия (а) включает осуществление взаимодействия полисахарида с 0,1-0,5 мольного эквивалента периодата.

В одном воплощении гасящий агент для стадии (а') выбран из вицинальных диолов, 1,2-аминоспиртов, аминокислот, глутатиона, сульфита, бисульфата, дитионита, метабисульфита, тиосульфата, фосфитов, гипофосфитов или фосфористой кислоты.

В одном воплощении гасящий агент представляет собой 1,2-аминоспирты формулы (I)



где R^1 выбран из H, метила, этила, пропила или изопропила.

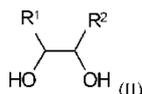
В одном воплощении гасящий агент выбран из натриевых и калиевых солей сульфита, бисульфата, дитионита, метабисульфита, тиосульфата, фосфитов, гипофосфитов или фосфористой кислоты.

В одном воплощении гасящий агент представляет собой аминокислоту. В таких воплощениях указанная аминокислота может быть выбрана из серина, треонина, цистеина, цистина, метионина, пролина, гидроксипролина, триптофана, тирозина и гистидина.

В одном воплощении гасящий агент представляет собой сульфит, такой как бисульфат, дитионит, метабисульфит, тиосульфат.

В одном воплощении гасящий агент представляет собой соединение, содержащее две вицинальные гидроксильные группы (вицинальные диолы), т.е. две гидроксильные группы, ковалентно связанные с двумя соседними атомами углерода.

Предпочтительно гасящий агент представляет собой соединение формулы (II)



где каждый из R^1 и R^2 независимо выбран из H, метила, этила, пропила или изопропила.

В предпочтительном варианте гасящим агентом является глицерин, этиленгликоль, пропан-1,2-диол, бутан-1,2-диол или бутан-2,3-диол или аскорбиновая кислота. В еще более предпочтительном варианте гасящим агентом является бутан-2,3-диол.

В предпочтительном варианте степень окисления активированного полисахарида серотипа 12F составляет от 2 до 30.

В одном воплощении реакцию восстановления (в) проводят в водном растворителе. В одном воплощении реакцию восстановления (в) проводят в апротонном растворителе.

В одном воплощении реакцию восстановления проводят в присутствии диметилсульфоксида (DMSO) или диметилформамида (DMF). В одном воплощении реакцию восстановления (в) проводят в присутствии диметилформамида (DMF). В одном воплощении реакцию восстановления (в) проводят в присутствии диметилсульфоксида (DMSO).

В одном воплощении реакцию восстановления проводят в растворе, состоящему по существу из диметилсульфоксида (DMSO) или диметилформамида (DMF). В одном воплощении реакцию восстановления проводят в растворе, состоящем по существу из диметилформамида (DMF). В одном воплощении реакцию восстановления проводят в растворе, состоящем по существу из диметилсульфоксида (DMSO).

В одном воплощении реакцию восстановления проводят в DMSO (диметилсульфоксиде) или в DMF (диметилформамиде) в качестве растворителя. В одном воплощении реакцию восстановления проводят в DMSO (диметилсульфоксиде) в качестве растворителя.

В одном воплощении восстанавливающий агент представляет собой цианоборгидрид натрия, триацетоксиборгидрид натрия, боргидрид натрия или цинка в присутствии кислот Бренстеда или Льюиса, аминоксидобораны, такие как пиридинборан, 2-пиколинборан, 2,6-диборанметанол, диметиламинборан,

t-BuMe¹PrN-BH₃, бензиламин-BH₃ или 5-этил-2-метилпиридинборан (PEMB). В одном воплощении восстанавливающий агент представляет собой триацетоксиборогидрид натрия. В предпочтительном воплощении восстанавливающий агент представляет собой цианоборгидрид натрия. В одном воплощении восстанавливающий агент представляет собой цианоборгидрид натрия в присутствии никеля (см. WO 2018/144439).

В одном воплощении на стадии (в) используют от 1,0 до 20 мольных эквивалентов восстанавливающего агента. В одном воплощении на стадии (в) используют от 2 до 15 мольных эквивалентов восстанавливающего агента. В одном воплощении на стадии (в) используют от 5 до 15 мольных эквивалентов восстанавливающего агента.

В конце реакции восстановления в конъюгатах могут остаться непрореагировавшие альдегидные группы, которые можно блокировать с помощью подходящего блокирующего агента. В одном воплощении этот блокирующий агент представляет собой боргидрид натрия (NaBH₄).

В одном из воплощений блокировку осуществляют путем смешивания продукта со стадии (в) с 1-20 мольными эквивалентами боргидрида натрия. В одном из воплощений блокировку осуществляют путем смешивания продукта со стадии (в) с 2-15 мольными эквивалентами боргидрида натрия. В одном из воплощений блокировку осуществляют путем смешивания продукта со стадии (в) с 5-10 мольными эквивалентами боргидрида натрия.

После конъюгации с белком-носителем гликоконъюгат может быть очищен (обогащен по отношению к количеству конъюгата сахарид-белок) с помощью различных методов, известных специалистам в данной области техники. Эти методы включают диализ, операции концентрирования/диафильтрации, преципитацию/элюирование при тангенциальной проточной фильтрации, колоночную хроматографию (DEAE или хроматографию гидрофобного взаимодействия) и глубинную фильтрацию. Следовательно, в одном воплощении способ получения гликоконъюгата согласно настоящему изобретению включает стадию очистки гликоконъюгата после его получения.

4. Иммуногенные композиции.

В одном из воплощений настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей сахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F согласно настоящему изобретению.

В одном из воплощений настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей гликоконъюгат *Streptococcus pneumoniae* серотипа 12F согласно настоящему изобретению.

В одном из воплощений настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей гликоконъюгат *Streptococcus pneumoniae* серотипа 12F согласно настоящему изобретению и включающей от 1 до 25 различных гликоконъюгатов.

В одном из воплощений настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей гликоконъюгат *Streptococcus pneumoniae* серотипа 12F согласно настоящему изобретению и содержащей от 1 до 25 гликоконъюгатов из различных серотипов *S. pneumoniae* (1-25 пневмококковых конъюгатов). В одном воплощении настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей гликоконъюгаты из 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 различных серотипов *S. pneumoniae*. В одном воплощении иммуногенная композиция включает гликоконъюгаты из 16 или 20 различных серотипов *S. pneumoniae*. В одном из воплощений иммуногенная композиция представляет собой 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18-, 19- или 20-валентные пневмококковые конъюгатные композиции. В одном из воплощений иммуногенная композиция представляет собой 14-, 15-, 16-, 17-, 18- или 19-валентные пневмококковые конъюгатные композиции. В одном из воплощений иммуногенная композиция представляет собой 16-валентную пневмококковую конъюгатную композицию. В одном из воплощений иммуногенная композиция представляет собой 19-валентную пневмококковую конъюгатную композицию. В одном из воплощений иммуногенная композиция представляет собой 20-валентную пневмококковую конъюгатную композицию.

В одном из воплощений настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей гликоконъюгат *Streptococcus pneumoniae* серотипа 12F согласно настоящему изобретению и содержащей от 26 до 45 гликоконъюгатов из различных серотипов *S. pneumoniae* (от 26 до 45 пневмококковых конъюгатов). В одном воплощении настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей гликоконъюгаты из 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 или 45 различных серотипов *S. pneumoniae*. В одном варианте реализации иммуногенная композиция содержит гликоконъюгаты из 35 или 45 различных серотипов *S. pneumoniae*. В одном из воплощений иммуногенная композиция представляет собой 35-, 36-, 37-, 38-, 39-, 40-, 41-, 42-, 43-, 44- или 45-валентные пневмококковые конъюгатные композиции. В одном из воплощений иммуногенная композиция представляет собой 40-, 41-, 42-, 43-, 44- или 45-валентные пневмококковые конъюгатные композиции. В одном из воплощений иммуногенная композиция представляет собой 40-валентную пневмококковую конъюгатную композицию. В одном из воплощений иммуногенная композиция представляет собой 41-валентную пневмококковую конъюгатную композицию. В одном из воплощений иммуногенная композиция представляет собой 42-валентную пневмококковую конъюгатную композицию. В одном из воплощений иммуногенная композиция представляет собой 43-валентную пневмококковую конъюгатную композицию. В одном из воплощений иммуногенная композиция представляет собой 44-валентную пневмококковую

иммуногенных композиций гликоконъюгат из *S. pneumoniae* серотипа 10А конъюгирован с CRM₁₉₇. В одном из воплощений любой из вышеуказанных иммуногенных композиций гликоконъюгат из *S. pneumoniae* серотипа 11А конъюгирован с CRM₁₉₇. В одном из воплощений любой из вышеуказанных иммуногенных композиций гликоконъюгат из *S. pneumoniae* серотипа 8 конъюгирован с CRM₁₉₇. В одном из воплощений любой из вышеуказанных иммуногенных композиций гликоконъюгаты из *S. pneumoniae* серотипов 4, 6В, 9V, 14, 18С, 19F и 23F конъюгированы с CRM₁₉₇. В одном из воплощений любой из вышеуказанных иммуногенных композиций гликоконъюгаты из *S. pneumoniae* серотипов 1, 5 и 7F конъюгированы с CRM₁₉₇. В одном из воплощений любой из вышеуказанных иммуногенных композиций гликоконъюгаты из *S. pneumoniae* серотипов 6А и 19А конъюгированы с CRM₁₉₇. В одном из воплощений любой из вышеуказанных иммуногенных композиций гликоконъюгат из *S. pneumoniae* серотипа 3 конъюгирован с CRM₁₉₇. В одном из воплощений любой из вышеуказанных иммуногенных композиций гликоконъюгат из *S. pneumoniae* серотипа 15С конъюгирован с CRM₁₉₇.

В одном из воплощений любой из вышеуказанных иммуногенных композиций гликоконъюгаты любой из вышеуказанных иммуногенных композиций индивидуально конъюгированы с CRM₁₉₇.

В одном из воплощений вышеуказанные иммуногенные композиции содержат от 8 до 20 различных серотипов *S. pneumoniae*. В одном из воплощений указанные иммуногенные композиции содержат от 21 до 45 различных серотипов *S. pneumoniae*.

Композиции согласно настоящему изобретению могут содержать небольшое количество свободного носителя. Когда конкретный белок-носитель присутствует в композиции согласно настоящему изобретению как в свободной, так и в конъюгированной форме, неконъюгированная форма предпочтительно составляет не более 5% от общего количества белка-носителя в композиции в целом и более предпочтительно присутствует в количестве менее 2% по массе.

Иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению можно использовать для защиты или лечения человека, восприимчивого к бактериальной инфекции, например, бактериям *S. pneumoniae*, путем введения иммуногенных композиций через системный, кожный или слизистый путь, или можно использовать для получения препарата поликлонального или моноклонального антитела, который можно использовать для создания пассивного иммунитета у другого субъекта. Эти введения могут включать внутримышечную, внутрибрюшинную, внутрикожную или подкожную инъекцию; или через слизистую оболочку ротовой полости/пищеварительной системы, дыхательной или мочеполовой системы. Иммуногенные композиции также могут быть использованы для получения антител, которые являются функциональными, что определяется уничтожением бактерий либо в модели эффективности на животных, либо с помощью анализа опсонофагоцитарного уничтожения.

Оптимальные количества компонентов для конкретной иммуногенной композиции могут быть установлены стандартными исследованиями, включающими наблюдение соответствующих иммунных ответов у субъектов. После первоначальной вакцинации субъекты могут получить одну или несколько бустерных иммунизаций через соответствующие промежутки времени.

В некоторых воплощениях раскрытые в настоящем документе иммуногенные композиции могут дополнительно содержать по меньшей мере один адъювант. В некоторых воплощениях раскрытые в настоящем документе иммуногенные композиции могут дополнительно содержать один адъювант. В некоторых воплощениях раскрытые в настоящем документе иммуногенные композиции могут дополнительно содержать два адъюванта. Термин "адъювант" относится к соединению или смеси, которые усиливают иммунный ответ на антиген. Антигены могут действовать в первую очередь как система доставки, в первую очередь как иммуномодулятор или иметь сильные стороны обоих. Подходящие адъюванты включают адъюванты, подходящие для применения у млекопитающих, включая человека.

Примеры известных подходящих адъювантов типа системы доставки, которые можно использовать у людей, включают, но не ограничиваются ими, квасцы (например, фосфат алюминия, сульфат алюминия или гидроксид алюминия), фосфат кальция, липосомы, эмульсии масло-в-воде, такие как MF59 (4,3% мас./об., сквалена, 0,5% мас./об., полисорбата 80 (Tween 80), 0,5% мас./об. сорбитантриолеата (Span 85)), эмульсии вода-в-масле, такие как Montanide и микрочастицы или наночастицы поли(D,L-лактид-ко-гликолида) (PLG).

В одном воплощении иммуногенные композиции, раскрытые в настоящем документе, содержат соли алюминия (квасцы) в качестве адъюванта (например, фосфат алюминия, сульфат алюминия или гидроксид алюминия). В предпочтительном воплощении раскрытые в настоящем документе иммуногенные композиции содержат фосфат алюминия или гидроксид алюминия в качестве адъюванта. В предпочтительном воплощении раскрытые в настоящем документе иммуногенные композиции содержат фосфат алюминия в качестве адъюванта.

Другие иллюстративные адъюванты для повышения эффективности иммуногенных композиций, раскрытых в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими: (1) составы эмульсий типа "масло-в-воде" (с другими специфическими иммуностимулирующими агентами, такими как мурамилоновые пептиды (см. ниже) или компоненты бактериальных клеточных стенок, или без них), такие как, например, (a) SAF, содержащий 10% сквалена, 0,4% Tween 80, 5% плуроник-блокированного полимера L121 и thr-MDP, либо микрофлюидизированный в субмикронную эмульсию, либо перемешанный вихре-

вым способом для получения эмульсии частиц большего размера, и (б) адьювантная система RIBI™ (RAS), (Ribi Immunochem, Гамильтон, Монтана), содержащая 2% сквалена, 0,2% Tween 80 и один или более компонентов бактериальной клеточной стенки, таких как монофосфорилипид А (MPL), трегалозодимиколат (TDM) и скелет клеточной стенки (CWS), предпочтительно MPL + CWS (DETOX™); (2) можно использовать сапониновые адьюванты, такие как QS21, STIMULON™ (Cambridge Bioscience, Вустер, Массачусетс), ABISCO® (Iscanova, Швеция) или ISCOMATRIX® (Commonwealth Serum Laboratories, Австралия), или полученные из них частицы, такие как ISCOMS (иммуностимулирующие комплексы), которые могут быть лишены дополнительного детергента (например, WO 00/07621); (3) полный адьювант Фрейнда (CFA) и неполный адьювант Фрейнда (IFA); (4) цитокины, такие как интерлейкины (например, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (например, WO 99/44636)), интерфероны (например, гамма-интерферон), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), фактор некроза опухоли (TNF) и т.д.; (5) монофосфорилипид А (MPL) или 3-О-деацелированный MPL (3dMPL) (см., например, GB-2220221, EP0689454), необязательно практически без квасцов при использовании с пневмококковыми сахарами (см., например, WO 00/56358); (6) комбинации 3dMPL, например, с QS21 и/или эмульсиями масло-в-воде (см., например, EP 0835318, EP 0735898, EP 0761231); (7) полиоксипропиленовый эфир или полиоксипропиленовый эфир (см., например, WO 99/52549); (8) поверхностно-активное вещество на основе сложного эфира полиоксипропиленсорбитана в комбинации с октоксинолом (например, WO 01/21207) или поверхностно-активное вещество на основе полиоксипропиленалкилового простого или сложного эфира в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным неионогенным поверхностно-активным веществом, таким как октоксинол (например, WO 01/21152); (9) сапонин и иммуностимулирующий олигонуклеотид (например, олигонуклеотид CpG) (например, WO 00/62800); (10) иммуностимулятор и частица соли металла (см., например, WO 00/23105); (11) сапонин и эмульсия масло-в-воде (например, WO 99/11241); (12) сапонин (например, QS21) + 3dMPL + IM2 (необязательно + стерол) (например, WO 98/57659); (13) другие вещества, которые действуют как иммуностимулирующие агенты для повышения эффективности композиции. Мурамиловые пептиды включают N-ацетилмурамил-L-треонил-D-изоглутамин (thr-MDP), N-25-ацетил-нормурамил-L-аланил-D-изоглутамин (nor-MDP), N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутаринил-L-аланин-2-(1'-2'-дипальмитоил-sn-глицеро-3-гидроксифосфорилокси)этиламин MTP-PE) и т.д.

В одном из воплощений настоящего изобретения иммуногенные композиции, раскрытые в настоящем документе, содержат олигонуклеотид CpG в качестве адьюванта. Олигонуклеотид CpG, используемый в настоящем изобретении, относится к иммуностимулирующему олигодезоксинуклеотиду CpG (CpG ODN), и, соответственно, эти термины используются взаимозаменяемо, если не указано иное. Иммуностимулирующие олигодезоксинуклеотиды CpG содержат один или более иммуностимулирующих мотивов CpG, которые представляют собой метилированные цитозин-гуаниновые динуклеотиды, необязательно в определенных предпочтительных контекстах оснований. Статус метилирования иммуностимулирующего мотива CpG обычно относится к остатку цитозина в динуклеотиде. Иммуностимулирующий олигонуклеотид, содержащий по меньшей мере один метилированный динуклеотид CpG, представляет собой олигонуклеотид, который содержит 5'-метилированный цитозин, связанный фосфатной связью с 3'-гуанином, и который активирует иммунную систему посредством связывания с Toll-подобным рецептором 9 (TLR-9). В другом воплощении иммуностимулирующий олигонуклеотид может содержать один или более метилированных динуклеотидов CpG, которые будут активировать иммунную систему через TLR9, но не так сильно, как если бы мотив(ы) CpG был/были метилированы. Иммуностимулирующие олигонуклеотиды CpG могут содержать один или более палиндромов, которые, в свою очередь, могут охватывать динуклеотид CpG. Олигонуклеотиды CpG описаны в ряде выданных патентов, опубликованных патентных заявках и других публикациях, включая патенты США № 6194388; 6207646; 6214806; 6218371; 6239116 и 6339068.

5. Применения иммуногенных композиций согласно настоящему изобретению.

В качестве антигенов можно использовать сахарид *S. pneumoniae* serotina 12F или гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F, описанные в настоящем документе. Например, они могут быть частью вакцины.

Следовательно, в одном из воплощений иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению предназначены для применения в качестве лекарственного средства.

В одном воплощении иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению предназначены для применения в качестве вакцины.

Таким образом, в одном воплощении иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, предназначены для применения для создания иммунного ответа у субъекта. В одном аспекте субъект представляет собой млекопитающее, такое как человек, кошка, овца, свинья, лошадь, крупный рогатый скот или собака. В одном аспекте субъект представляет собой человека.

Иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, можно использовать в терапевтических или профилактических способах предупреждения, лечения или облегчения бактериальной инфекции, заболевания или состояния у субъекта. В частности, иммуногенные композиции, описанные в

настоящем документе, можно использовать для предупреждения, лечения или облегчения у субъекта инфекции, заболевания или состояния, вызванного *S. pneumoniae* серотипа 12F.

Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения предложен способ предупреждения, лечения или облегчения у субъекта инфекции, заболевания или состояния, связанного с *S. pneumoniae* серотипа 12F, включающий введение субъекту иммунологически эффективного количества иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению.

В некоторых таких воплощениях инфекция, заболевание или состояние представляют собой пневмонию, синусит, средний отит, острый средний отит, менингит, бактериемию, сепсис, эмпиему плевры, конъюнктивит, остеомиелит, септический артрит, эндокардит, перитонит, перикардит, мастоидит, целлюлит, инфекцию мягких тканей или абсцесс головного мозга.

В некоторых таких воплощениях инфекция, заболевание или состояние выбраны из группы, состоящей из пневмонии, синусита, среднего отита, острого среднего отита, менингита, бактериемии, сепсиса, эмпиемы плевры, конъюнктивита, остеомиелита, септического артрита, эндокардита, перитонита, перикардита, мастоидита, целлюлита, инфекции мягких тканей и абсцесса головного мозга.

В одном из воплощений настоящего изобретения предложен способ индукции иммунного ответа на *S. pneumoniae* серотипа 12F у субъекта, включающий введение субъекту иммунологически эффективного количества иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению. В одном аспекте субъект представляет собой млекопитающее, такое как человек, кошка, овца, свинья, лошадь, крупный рогатый скот или собака. В одном аспекте субъект представляет собой человека.

В одном из воплощений раскрытые в настоящем документе иммуногенные композиции предназначены для применения в качестве вакцины. В таких воплощениях иммуногенные композиции, описанные в настоящем документе, можно использовать для предупреждения инфекции *S. pneumoniae* серотипа 12F у субъекта. Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу предупреждения инфекции *S. pneumoniae* серотипа 12F у субъекта, включающему введение указанному субъекту иммунологически эффективного количества иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению. В некоторых таких воплощениях инфекция представляет собой пневмонию, синусит, средний отит, острый средний отит, менингит, бактериемию, сепсис, эмпиему плевры, конъюнктивит, остеомиелит, септический артрит, эндокардит, перитонит, перикардит, мастоидит, целлюлит, инфекцию мягких тканей или абсцесс головного мозга. В одном аспекте субъект представляет собой млекопитающее, такое как человек, кошка, овца, свинья, лошадь, крупный рогатый скот или собака. В одном аспекте субъект представляет собой человека. В некоторых таких воплощениях инфекция выбрана из группы, состоящей из пневмонии, синусита, среднего отита, острого среднего отита, менингита, бактериемии, сепсиса, эмпиемы плевры, конъюнктивита, остеомиелита, септического артрита, эндокардита, перитонита, перикардита, мастоидита, целлюлита, инфекции мягких тканей и абсцесса головного мозга. В одном аспекте субъект представляет собой млекопитающее, такое как человек, кошка, овца, свинья, лошадь, крупный рогатый скот или собака. В одном аспекте субъектом является человек.

Иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению может быть применена для защиты или лечения человека, восприимчивого к инфекции *S. pneumoniae* серотипа 12F, посредством введения иммуногенной композиции системным путем или через слизистую оболочку. В одном воплощении иммуногенную композицию согласно настоящему изобретению вводят внутримышечным, внутрибрюшинным, внутрикожным или подкожным путем. В одном воплощении иммуногенную композицию согласно настоящему изобретению вводят с помощью внутримышечной, внутрибрюшинной, внутрикожной или подкожной инъекции. В одном воплощении иммуногенную композицию согласно настоящему изобретению вводят с помощью внутримышечной или подкожной инъекции. В одном воплощении иммуногенную композицию согласно настоящему изобретению вводят с помощью внутримышечной инъекции. В одном воплощении иммуногенную композицию согласно настоящему изобретению вводят путем подкожной инъекции.

6. Аналитические методы.

В одном из воплощений настоящее изобретение относится к способу определения наличия остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина в выделенном полисахариде *S. pneumoniae* серотипа 12F, где указанный способ включает стадию а) выделения полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 12F и б) определения наличия остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина в указанном полисахариде.

В одном из воплощений наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью NMR или масс-спектрометрии (MS). В одном воплощении наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью NMR. В одном воплощении наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью 1D NMR. В одном воплощении наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью 1D ¹H или 1D ¹³C NMR. В одном воплощении наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью 2D NMR. В одном воплощении наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью гетероядерной одноквантовой когерентной спектроскопии (HSQC), гетероядерной корреляционной спектроскопии множественных связей (HMBC), спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY), корреляционной спектроскопии (COSY), полной корреляционной спектроскопии (TOCSY) или гетероядерной одноквантовой когерент-

ной спектроскопии - полной корреляционной спектроскопии (HSQC-TOCSY).

В одном воплощении наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью 1D ^1H , 2D ^1H - ^{13}C гетероядерной одноквантовой когерентной спектроскопии (HSQC), 2D ^1H - ^{13}C гетероядерной корреляционной спектроскопии множественных связей (HMBC), 2D ^1H - ^{13}C спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY), 2D ^1H - ^{13}C корреляционной спектроскопии (COSY), 2D ^1H - ^{13}C полной корреляционной спектроскопии (TOCSY), 2D ^1H - ^{13}C гетероядерной одноквантовой когерентной спектроскопии-полной корреляционной спектроскопии (HSQC-TOCSY) или 1D ^{13}C NMR.

В предпочтительном воплощении наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью 1D ^1H , 2D ^1H - ^{13}C гетероядерной одноквантовой когерентной спектроскопии (HSQC) или 1D ^{13}C NMR.

В одном воплощении наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью 2D ^1H - ^{13}C гетероядерной одноквантовой когерентной спектроскопии (HSQC).

В одном из воплощений наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью масс-спектрометрии (MS). В одном из воплощений наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью тандемной масс-спектрометрии (MS/MS). В одном из воплощений наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью газовой хроматографии - масс-спектрометрии (GC-MS), жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (LC-MS), капиллярного электрофореза - масс-спектрометрии (CE-MS) или спектрометрии ионной подвижности - масс-спектрометрии (IMS/MS или IMMS). В одном из воплощений наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью эксклюзионной хроматографии, объединенной с масс-спектрометрией (SEC/MS).

В одном из воплощений наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью газовой хроматографии - масс-спектрометрии (GC-MS). В одном из воплощений наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (LC-MS). В одном из воплощений наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью капиллярного электрофореза - масс-спектрометрии (CE-MS). В одном из воплощений наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью спектрометрии ионной подвижности - масс-спектрометрии (IMS/MS). В одном из воплощений наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия - масс-спектрометрии (HILIC-LC/MS).

В одном воплощении настоящее изобретение относится к способу определения количества остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина в выделенном полисахариде *S. pneumoniae* серотипа 12F, где указанный способ включает стадию а) выделения полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 12F и б) определения количества остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина в указанном полисахариде.

В одном из воплощений количество остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью NMR. В одном из воплощений количество остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью 1D NMR. В одном воплощении количество остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью 1D ^1H или 1D ^{13}C NMR. В предпочтительном воплощении количество остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью ^1D ^1H NMR. В одном воплощении количество остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью интегрирования или деконволюции 1D ^1H спектров.

В одном из воплощений количество остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью 2D NMR. В одном из воплощений количество остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью кросс-пиковой интеграции спектров 2D ^1H - ^{13}C HSQC.

В одном из воплощений количество остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью масс-спектрометрии (MS). В одном из воплощений количество остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью тандемной масс-спектрометрии (MS/MS). В одном из воплощений количество остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью газовой хроматографии - масс-спектрометрии (GC-MS), жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (LC-MS), капиллярного электрофореза - масс-спектрометрии (CE-MS) или спектрометрии ионной подвижности - масс-спектрометрии (IMS/MS или IMMS). В одном из воплощений количество остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью эксклюзионной хроматографии, объединенной с масс-спектрометрией (SEC/MS).

В одном из воплощений количество остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью газовой хроматографии - масс-спектрометрии (GC-MS). В одном из воплощений количество остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (LC-MS). В одном из воплощений количество остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью капиллярного электрофореза - масс-спектрометрии (CE-MS). В одном из воплощений количество остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью спектрометрии ионной подвижности - масс-спектрометрии (IMS/MS). В одном из воплощений количество остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия - масс-спектрометрии (HILIC-LC/MS).

В одном воплощении настоящее изобретение относится к способу определения наличия остатков

N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) в восстановленном полисахариде серотипа 12F, где указанный способ включает стадию а) осуществления взаимодействия выделенного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 12F с восстанавливающим агентом и б) определения количества остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) в указанном восстановленном полисахариде.

В одном из воплощений количество остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью NMR. В одном из воплощений количество остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью 2D NMR.

В предпочтительном воплощении наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR.

В одном воплощении наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью масс-спектрометрии (MS). В одном воплощении наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью тандемной масс-спектрометрии (MS/MS). В одном воплощении наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью газовой хроматографии - масс-спектрометрии (GC-MS), жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (LC-MS), капиллярного электрофореза - масс-спектрометрии (CE-MS) или спектрометрии ионной подвижности - масс-спектрометрии (IMS/MS или IMMS). В одном воплощении наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью эксклюзионной хроматографии, объединенной с масс-спектрометрией (SEC/MS).

В одном воплощении наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью газовой хроматографии - масс-спектрометрии (GC-MS). В одном воплощении наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (LC-MS). В одном воплощении наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью капиллярного электрофореза - масс-спектрометрии (CE-MS). В одном воплощении наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью спектрометрии ионной подвижности - масс-спектрометрии (IMS/MS). В одном воплощении наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия - масс-спектрометрии (HILIC-LC/MS).

В одном воплощении указанный восстанавливающий агент представляет собой боргидрид натрия (NaBH_4).

В одном воплощении указанный выделенный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F предварительно обработан окисляющим агентом. В одном воплощении окисляющий агент представляет собой любой окисляющий агент, который окисляет концевую гидроксильную группу до альдегида. В одном воплощении окисляющий агент представляет собой периодат. В одном воплощении окисляющий агент представляет собой ортопериодат. В предпочтительном воплощении окисляющий агент представляет собой периодат натрия. В одном воплощении окисляющий агент представляет собой метапериодат. В предпочтительном воплощении окисляющий агент представляет собой метапериодат натрия.

В одном воплощении указанный выделенный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F предварительно обработан стабильным нитроксильным радикальным соединением и окислителем. В одном из аспектов указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой молекулу, содержащую фрагмент: TEMPO или PROXYL (2,2,5,5-тетраметил-1-пирролидинилокси). Предпочтительно указанная молекула способна селективно окислять первичный спирт в присутствии окислителя с получением альдегидных групп без влияния на вторичные гидроксильные группы. Более предпочтительно указанная молекула способна селективно окислять первичный спирт в присутствии окислителя с получением альдегидных групп без сверхокисления до карбоксильных групп. В одном из аспектов указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой TEMPO, 2,2,6,6-тетраметил-4-(метилсульфонилокси)-1-пиперидиноокси, 4-фосфоноокси-TEMPO, 4-оксо-TEMPO, 4-метокси-TEMPO, 4-изотиоцианато-TEMPO, 4-(2-йодацетамидо)-TEMPO свободный радикал, 4-гидрокси-TEMPO, 4-циано-TEMPO, 4-карбоксо-TEMPO, 4-(2-бромацетамидо)-TEMPO, 4-амино-TEMPO или 4-ацетамидо-2,2,6,6-тетраметилпиперидин 1-оксил. В одном из аспектов указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение выбрано из групп, состоящих из TEMPO, 2,2,6,6-тетраметил-4-(метилсульфонилокси)-1-пиперидиноокси, 4-фосфоноокси-TEMPO, 4-оксо-TEMPO, 4-метокси-TEMPO, 4-изотиоцианато-TEMPO, 4-(2-йодацетамидо)-TEMPO свободного радикала, 4-гидрокси-TEMPO, 4-циано-TEMPO, 4-карбоксо-TEMPO, 4-(2-бромацетамидо)-TEMPO, 4-амино-TEMPO, 4-ацетамидо-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксила. Предпочтительно указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой TEMPO. В другом аспекте указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой 3β -DOXYL-5 α -холестан, 5-DOXYL-стеариновую кислоту, 16-DOXYL-стеариновую кислоту, метил-5-DOXYL-стеарат, 3-(аминометил)-PROXYL, 3-карбамоил-PROXYL, 3-карбамоил-2,2,5,5-тетраметил-3-пирролин-1-оксил, 3-карбоксо-PROXYL или 3-циано-PROXYL. В другом аспекте указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение выбрано из групп, состоящих из 3β -DOXYL-5 α -холестана, 5-DOXYL-стеариновой кислоты, 16-DOXYL-стеариновой кислоты, метил-5-DOXYL-стеарата, 3-(аминометил)-PROXYL, 3-карбамоил-PROXYL, 3-карбамоил-

2,2,5,5-тетраметил-3-пирролин-1-оксила, 3-карбокси-PROXYL, 3-циано-PROXYL. В одном из аспектов окислитель представляет собой молекулу, содержащую группировку N-галоген. Предпочтительно указанная молекула способна селективно окислять первичный спирт в присутствии нитроксильного радикального соединения. В одном из аспектов указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид, N-бромсукцинимид, N-йодсукцинимид, дихлоризоциануровую кислоту, 1,3,5-трихлор-1,3,5-триазинан-2,4,6-трион, дибромизоциануровую кислоту, 1,3,5-трибром-1,3,5-триазинан-2,4,6-трион, дийодизоциануровую кислоту или 1,3,5-трийод-1,3,5-триазинан-2,4,6-трион. В одном из аспектов указанный окислитель выбран из группы, состоящей из N-хлорсукцинимид, N-бромсукцинимид, N-йодсукцинимид, дихлоризоциануровой кислоты, 1,3,5-трихлор-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона, дибромизоциануровой кислоты, 1,3,5-трибром-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона, дийодизоциануровой кислоты и 1,3,5-трийод-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона. Предпочтительно указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид.

В одном из аспектов указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой свободный радикал 2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси (TEMPO) и указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид (NCS).

В одном воплощении настоящее изобретение относится к способу определения наличия остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) в восстановленном полисахариде серотипа 12F, где указанный способ включает стадию а) осуществления взаимодействия выделенного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 12F с восстанавливающим агентом и б) определения наличия остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) в указанном восстановленном полисахариде.

В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью NMR. В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью 2D NMR.

В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью гетероядерной одноквантовой когерентной спектроскопии (HSQC), гетероядерной корреляционной спектроскопии множественных связей (HMBC), корреляционной спектроскопии (COSY) и/или гетероядерной одноквантовой когерентной спектроскопии-полной корреляционной спектроскопии (HSQC-TOCSY).

В предпочтительном воплощении наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR.

В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью масс-спектрометрии (MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью тандемной масс-спектрометрии (MS/MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью газовой хроматографии - масс-спектрометрии (GC-MS), жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (LC-MS), капиллярного электрофореза - масс-спектрометрии (CE-MS) или спектрометрии ионной подвижности - масс-спектрометрии (IMS/MS или IMMS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью эксклюзионной хроматографии, объединенной с масс-спектрометрией (SEC/MS).

В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью газовой хроматографии - масс-спектрометрии (GC-MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (LC-MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью капиллярного электрофореза - масс-спектрометрии (CE-MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью спектрометрии ионной подвижности - масс-спектрометрии (IMS/MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия -масс-спектрометрии (HILIC-LC/MS).

В одном воплощении указанный восстанавливающий агент представляет собой боргидрид натрия (NaBH_4).

В одном воплощении указанный выделенный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F предварительно обработан окисляющим агентом. В одном воплощении указанный окисляющий агент представляет собой любой окисляющий агент, который окисляет концевую гидроксильную группу с получением альдегида. В одном воплощении окисляющий агент представляет собой периодат. В одном воплощении окисляющий агент представляет собой ортопериодат. В предпочтительном воплощении окисляющий агент представляет собой периодат натрия. В одном воплощении окисляющий агент представляет собой метапериодат. В предпочтительном воплощении окисляющий агент представляет собой метапериодат натрия.

В одном воплощении указанный выделенный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F предварительно обработан стабильным нитроксильным радикальным соединением и окислителем. В одном из аспектов указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой молекулу, содержащую группировку TEMPO или PROXYL (2,2,5,5-тетраметил-1-пирролидинилокси). Предпочти-

тельно указанная молекула способна селективно окислять первичный спирт в присутствии окислителя с получением альдегидных групп без влияния на вторичные гидроксильные группы. Более предпочтительно указанная молекула способна селективно окислять первичный спирт в присутствии окислителя с получением альдегидных групп без сверхокисления до карбоксильных групп. В одном из аспектов указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой ТЕМПО, 2,2,6,6-тетраметил-4-(метилсульфонилокси)-1-пиперидиноокси, 4-фосфоноокси-ТЕМПО, 4-оксо-ТЕМПО, 4-метокси-ТЕМПО, 4-изотиоцианато-ТЕМПО, 4-(2-йодацетамидо)-ТЕМПО свободный радикал, 4-гидрокси-ТЕМПО, 4-циано-ТЕМПО, 4-карбоксо-ТЕМПО, 4-(2-бромацетамидо)-ТЕМПО, 4-амино-ТЕМПО или 4-ацетамидо-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил.

В одном из аспектов указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение выбрано из групп, состоящих из ТЕМПО, 2,2,6,6-тетраметил-4-(метилсульфонилокси)-1-пиперидиноокси, 4-фосфоноокси-ТЕМПО, 4-оксо-ТЕМПО, 4-метокси-ТЕМПО, 4-изотиоцианато-ТЕМПО, 4-(2-йодацетамидо)-ТЕМПО свободный радикал, 4-гидрокси-ТЕМПО, 4-циано-ТЕМПО, 4-карбоксо-ТЕМПО, 4-(2-бромацетамидо)-ТЕМПО, 4-амино-ТЕМПО, 4-ацетамидо-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил. Предпочтительное указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой ТЕМПО. В другом аспекте указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой 3 β -DOXYL-5 α -холестан, 5-DOXYL-стеариновую кислоту, 16-DOXYL-стеариновую кислоту, метил-5-DOXYL-стеарат, 3-(аминометил)-PROXYL, 3-карбамоил-PROXYL, 3-карбамоил-2,2,5,5-тетраметил-3-пирролин-1-оксил, 3-карбоксо-PROXYL или 3-циано-PROXYL. В другом аспекте указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение выбрано из групп, состоящих из 3 β -DOXYL-5 α -холестана, 5-DOXYL-стеариновой кислоты, 16-DOXYL-стеариновой кислоты, метил-5-DOXYL-стеарата, 3-(аминометил)-PROXYL, 3-карбамоил-PROXYL, 3-карбамоил-2,2,5,5-тетраметил-3-пирролин-1-оксила, 3-карбоксо-PROXYL, 3-циано-PROXYL. В одном из аспектов окислитель представляет собой молекулу, содержащую группировку N-галоген. Предпочтительно указанная молекула способна селективно окислять первичный спирт в присутствии нитроксильного радикального соединения. В одном из аспектов указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид, N-бромсукцинимид, N-йодсукцинимид, дихлоризоциануровую кислоту, 1,3,5-трихлор-1,3,5-триазинан-2,4,6-трион, дибромизоциануровую кислоту, 1,3,5-трибром-1,3,5-триазинан-2,4,6-трион, диiodизоциануровую кислоту или 1,3,5-триiod-1,3,5-триазинан-2,4,6-трион. В одном из аспектов указанный окислитель выбран из группы, состоящей из N-хлорсукцинимид, N-бромсукцинимид, N-йодсукцинимид, дихлоризоциануровой кислоты, 1,3,5-трихлор-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона, дибромизоциануровой кислоты, 1,3,5-трибром-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона, диiodизоциануровой кислоты и 1,3,5-триiod-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона. Предпочтительно указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид.

В одном из аспектов указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой свободный радикал 2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидиноокси (ТЕМПО) и указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид (NCS).

В одном воплощении настоящее изобретение относится к способу определения наличия остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) в восстановленном полисахариде серотипа 12F, где указанный способ включает стадию а) осуществления взаимодействия выделенного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 12F с восстанавливающим агентом и б) определения наличия остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) в указанном восстановленном полисахариде.

В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью NMR.

В предпочтительном воплощении наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью 2D-NMR.

В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью масс-спектрометрии (MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью тандемной масс-спектрометрии (MS/MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью газовой хроматографии - масс-спектрометрии (GC-MS), жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (LC-MS), капиллярного электрофореза - масс-спектрометрии (CE-MS) или спектрометрии ионной подвижности - масс-спектрометрии (IMS/MS или IMMS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью эксклюзионной хроматографии, объединенной с масс-спектрометрией (SEC/MS).

В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью сочетания газовой хроматографии и масс-спектрометрии (GC-MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью сочетания жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (LC-MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина

(D-FucNAc) и N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью сочетания капиллярного электрофореза и масс-спектрометрии (CE-MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью спектрометрии ионной подвижности - масс-спектрометрии (IMS/MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия - масс-спектрометрии (HILIC-LC/MS).

В одном воплощении указанный восстанавливающий агент представляет собой боргидрид натрия (NaBH_4).

В одном воплощении указанный выделенный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F предварительно обработан окисляющим агентом. В одном воплощении окисляющий агент представляет собой любой окисляющий агент, который окисляет концевую гидроксильную группу до альдегида. В одном воплощении окисляющий агент представляет собой периодат. В одном воплощении окисляющий агент представляет собой ортопериодат. В предпочтительном воплощении окисляющий агент представляет собой метaperиодат. В предпочтительном воплощении окисляющий агент представляет собой метапериодат натрия.

В одном воплощении указанный выделенный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F предварительно обработан стабильным нитроксильным радикальным соединением и окислителем. В одном из аспектов указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой молекулу, содержащую фрагмент: TEMPO или PROXYL (2,2,5,5-тетраметил-1-пирролидинилокси). Предпочтительно указанная молекула способна селективно окислять первичный спирт в присутствии окислителя с получением альдегидных групп без влияния на вторичные гидроксильные группы. Более предпочтительно указанная молекула способна селективно окислять первичный спирт в присутствии окислителя с получением альдегидных групп без сверхокисления до карбоксильных групп. В одном из аспектов указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой TEMPO, 2,2,6,6-тетраметил-4-(метилсульфонилокси)-1-пиперидиноокси, 4-фосфоноокси-TEMPO, 4-оксо-TEMPO, 4-метокси-TEMPO, 4-изотиоцианато-TEMPO, 4-(2-йодацетамидо)-TEMPO свободный радикал, 4-гидрокси-TEMPO, 4-циано-TEMPO, 4-карбоксо-TEMPO, 4-(2-бромацетамидо)-TEMPO, 4-амино-TEMPO или 4-ацетамидо-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил.

В одном из аспектов указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение выбрано из групп, состоящих из TEMPO, 2,2,6,6-тетраметил-4-(метилсульфонилокси)-1-пиперидиноокси, 4-фосфоноокси-TEMPO, 4-оксо-TEMPO, 4-метокси-TEMPO, 4-изотиоцианато-TEMPO, 4-(2-йодацетамидо)-TEMPO свободного радикала, 4-гидрокси-TEMPO, 4-циано-TEMPO, 4-карбоксо-TEMPO, 4-(2-бромацетамидо)-TEMPO, 4-амино-TEMPO, 4-ацетамидо-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксила. Предпочтительно указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой TEMPO. В другом аспекте указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой 3 β -DOXYL-5 α -холестан, 5-DOXYL-стеариновую кислоту, 16-DOXYL-стеариновую кислоту, метил-5-DOXYL-стеарат, 3-(аминометил)-PROXYL, 3-карбамоил-PROXYL, 3-карбамоил-2,2,5,5-тетраметил-3-пирролин-1-оксил, 3-карбоксо-PROXYL или 3-циано-PROXYL.

В другом аспекте указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение выбрано из групп, состоящих из 3 β -DOXYL-5 α -холестана, 5-DOXYL-стеариновой кислоты, 16-DOXYL-стеариновой кислоты, метил-5-DOXYL-стеарата, 3-(аминометил)-PROXYL, 3-карбамоил-PROXYL, 3-карбамоил-2,2,5,5-тетраметил-3-пирролин-1-оксила, 3-карбоксо-PROXYL, 3-циано-PROXYL. В одном из аспектов окислитель представляет собой молекулу, содержащую группировку N-галоген. Предпочтительно указанная молекула способна селективно окислять первичный спирт в присутствии нитроксильного радикального соединения. В одном из аспектов указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид, N-бромсукцинимид, N-йодсукцинимид, дихлоризоциануровую кислоту, 1,3,5-трихлор-1,3,5-триазинан-2,4,6-трион, дибромизоциануровую кислоту, 1,3,5-трибром-1,3,5-триазинан-2,4,6-трион, дийодизоциануровую кислоту или 1,3,5-трийод-1,3,5-триазинан-2,4,6-трион. В одном из аспектов указанный окислитель выбран из группы, состоящей из N-хлорсукцинимид, N-бромсукцинимид, N-йодсукцинимид, дихлоризоциануровой кислоты, 1,3,5-трихлор-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона, дибромизоциануровой кислоты, 1,3,5-трибром-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона, дийодизоциануровой кислоты и 1,3,5-трийод-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона. Предпочтительно указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид.

В одном из аспектов указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой свободный радикал 2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси (TEMPO), и указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид (NCS).

В одном из воплощений настоящее изобретение относится к способу определения наличия остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и/или N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) в гликоконъюгате *S. pneumoniae* серотипа 12F, где указанный способ включает стадию а) получения гликоконъюгата *S. pneumoniae* серотипа 12F и б) определения наличия остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и/или N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) в указанном гликоконъюгате.

и остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (LC-MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью капиллярного электрофореза - масс-спектрометрии (CE-MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью спектрометрии ионной подвижности - масс-спектрометрии (IMS/MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия - масс-спектрометрии (HILIC-LC/MS).

В одном из воплощений настоящее изобретение относится к способу определения наличия остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) в гликоконъюгате *S. pneumoniae* серотипа 12F, где указанный способ включает стадию а) получения гликоконъюгата *S. pneumoniae* серотипа 12F и б) определения наличия остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) в указанном гликоконъюгате.

В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью NMR. В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью 2D NMR.

В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью гетероядерной одноквантовой когерентной спектроскопии (HSQC), гетероядерной корреляционной спектроскопии множественных связей (HMBC), корреляционной спектроскопии (COSY) и/или гетероядерной одноквантовой когерентной спектроскопии-полной корреляционной спектроскопии (HSQC-TOCSY).

В предпочтительном воплощении наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR.

В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью масс-спектрометрии (MS), наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью tandemной масс-спектрометрии (MS/MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью газовой хроматографии -масс-спектрометрии (GC-MS), жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (LC-MS), капиллярного электрофореза - масс-спектрометрии (CE-MS) или спектрометрии ионной подвижности - масс-спектрометрии (IMS/MS или IMMS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью эксклюзионной хроматографии, объединенной с масс-спектрометрией (SEC/MS).

В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью газовой хроматографии - масс-спектрометрии (GC-MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (LC-MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью капиллярного электрофореза - масс-спектрометрии (CE-MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью спектрометрии ионной подвижности - масс-спектрометрии (IMS/MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия - масс-спектрометрии (HILIC-LC/MS).

В одном из воплощений настоящее изобретение относится к способу определения наличия остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) в гликоконъюгате *S. pneumoniae* серотипа 12F, где указанный способ включает стадию а) получения гликоконъюгата *S. pneumoniae* серотипа 12F и б) определения наличия остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) в указанном гликоконъюгате.

В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью NMR. В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью 2D NMR.

В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью гетероядерной одноквантовой когерентной спектроскопии (HSQC), гетероядерной корреляционной спектроскопии множественных связей (HMBC), корреляционной спектроскопии (COSY) и/или гетероядерной одноквантовой когерентной спектроскопии-полной корреляционной спектроскопии (HSQC-TOCSY).

В предпочтительном воплощении наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR.

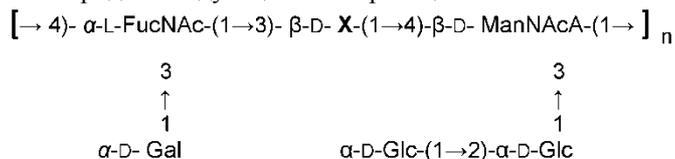
В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью масс-спектрометрии (MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью tandemной масс-спектрометрии (MS/MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью газовой хроматографии - масс-спектрометрии (GC-MS), жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (LC-MS), капиллярного электрофореза - масс-спектрометрии (CE-MS) или спектрометрии ионной подвижности - масс-спектрометрии (IMS/MS или IMMS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью эксклюзионной хроматографии, объединенной с масс-

спектрометрией (SEC/MS).

В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью газовой хроматографии - масс-спектрометрии (GC-MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (LC-MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью капиллярного электрофореза - масс-спектрометрии (CE-MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью спектрометрии ионной подвижности - масс-спектрометрии (IMS/MS). В одном из воплощений наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия -масс-спектрометрии (HILIC-LC/MS).

7. В настоящем изобретении также предложены следующие воплощения, определенные следующими пронумерованными пунктами 1-296.

1. Выделенный полисахарид со следующим повторяющимся звеном:



где n представляет собой количество повторяющихся звеньев;

X представляет собой либо N-ацетилгалактозамин, либо 4-кето-N-ацетилхиновозамин.

2. Выделенный полисахарид по п.1, содержащий от приблизительно 99,9 до приблизительно 50 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,1 до приблизительно 50 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

3. Выделенный полисахарид по п.1, содержащий от приблизительно 99,8 до приблизительно 50 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,2 до приблизительно 50 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

4. Выделенный полисахарид по п.1, содержащий от приблизительно 99,1 до приблизительно 50 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,9 до приблизительно 50 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

5. Выделенный полисахарид по п.1, содержащий от приблизительно 99 до приблизительно 50 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 1 до приблизительно 50 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

6. Выделенный полисахарид по п.1, содержащий от приблизительно 95 до приблизительно 50 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 5 до приблизительно 50 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

7. Выделенный полисахарид по п.1, содержащий от приблизительно 90 до приблизительно 50 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 10 до приблизительно 50 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

8. Выделенный полисахарид по п.1, содержащий от приблизительно 99,9 до приблизительно 55 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,1 до приблизительно 45 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

9. Выделенный полисахарид по п.1, содержащий от приблизительно 99,1 до приблизительно 55 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,9 до приблизительно 45 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

10. Выделенный полисахарид по п.1, содержащий от приблизительно 90 до приблизительно 55 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 10 до приблизительно 45 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

11. Выделенный полисахарид по п.1, содержащий от приблизительно 99,9 до приблизительно 75 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,1 до приблизительно 25 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

12. Выделенный полисахарид по п.1, содержащий от приблизительно 99 до приблизительно 75 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 1 до приблизительно 25 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

13. Выделенный полисахарид по п.1, содержащий от приблизительно 90 до приблизительно 75 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 10 до приблизительно 25 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

14. Выделенный полисахарид по п.1, содержащий от приблизительно 99,9 до приблизительно 99,5 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

15. Выделенный полисахарид по п.1, содержащий от приблизительно 99,9 до приблизительно 99 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,1 до приблизительно 1 остатков 4-кето-N-

33. Выделенный капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий от приблизительно 99,9 до приблизительно 99,5 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

34. Выделенный капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий от приблизительно 99,9 до приблизительно 99 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,1 до приблизительно 1 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

35. Выделенный капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий от приблизительно 99,8 до приблизительно 99,5 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 0,2 до приблизительно 0,5 остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

36. Выделенный полисахарид по любому из пп.1-35, содержащий от 10 до 5000 повторяющихся звеньев.

37. Выделенный полисахарид по любому из пп.1-35, содержащий от 50 до 4500 повторяющихся звеньев.

38. Выделенный полисахарид по любому из пп.1-35, содержащий от 100 до 4500 повторяющихся звеньев.

39. Выделенный полисахарид по любому из пп.1-35, содержащий от 150 до 2000 повторяющихся звеньев.

40. Выделенный полисахарид по любому из пп.1-39, имеющий среднюю молекулярную массу от 5 до 5000 кДа.

41. Выделенный полисахарид по любому из пп.1-39, имеющий среднюю молекулярную массу от 5 до 2000 кДа.

42. Выделенный полисахарид по любому из пп.1-39, имеющий среднюю молекулярную массу от 50 до 1000 кДа.

43. Выделенный полисахарид по любому из пп.1-39, имеющий среднюю молекулярную массу от 50 до 300 кДа.

44. Выделенный полисахарид по любому из пп.1-39, имеющий среднюю молекулярную массу от 100 до 500 кДа.

45. Выделенный полисахарид по любому из пп.1-39, имеющий среднюю молекулярную массу от 100 до 300 кДа.

46. Выделенный полисахарид по любому из пп.1-39, имеющий среднюю молекулярную массу от 200 до 1000 кДа.

47. Выделенный полисахарид по любому из пп.1-39, имеющий среднюю молекулярную массу от 200 до 500 кДа.

48. Выделенный полисахарид по любому из пп.1-39, имеющий среднюю молекулярную массу от 300 до 400 кДа.

49. Выделенный полисахарид по любому из пп.1-39, имеющий среднюю молекулярную массу от 100 до 500 кДа.

50. Гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F, полученный способом, включающим стадию а) осуществления взаимодействия выделенного полисахарида по любому из пп.1-49 с активирующим агентом с получением активированного сахара и б) осуществления взаимодействия указанного активированного сахара с белком-носителем.

51. Гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 0,05 до приблизительно 25 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

52. Гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 0,05 до приблизительно 22,5 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

53. Гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 0,05 до приблизительно 15 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

54. Гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 0,05 до приблизительно 12,5 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

55. Гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 0,1 до приблизительно 25 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

56. Гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 0,1 до приблизительно 22,5 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

182. Гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий приблизительно 25 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и приблизительно 25 остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

183. Гликоконъюгат по любому из пп.50-182, содержащий полисахарид серотипа 12F, где средняя молекулярная масса (ММ) указанного полисахарида до конъюгации составляет от 50 до 1000 кДа.

184. Гликоконъюгат по любому из пп.50-182, содержащий полисахарид серотипа 12F, где средняя молекулярная масса (Мw) указанного полисахарида до конъюгации составляет от 100 до 600 кДа.

185. Гликоконъюгат по любому из пп.50-182, содержащий полисахарид серотипа 12F, где средняя молекулярная масса (Мw) указанного полисахарида до конъюгации составляет от 150 до 400 кДа.

186. Гликоконъюгат по любому из пп.50-185, имеющий среднюю молекулярную массу (ММ) от 250 до 15000 кДа.

187. Гликоконъюгат по любому из пп.50-185, имеющий среднюю молекулярную массу (ММ) от 500 до 2500 кДа.

188. Гликоконъюгат по любому из пп.50-185, имеющий среднюю молекулярную массу (ММ) от 1000 до 2500 кДа.

189. Гликоконъюгат по любому из пп.50-188, где степень конъюгации составляет от 2 до 15.

190. Гликоконъюгат по любому из пп.50-188, где степень конъюгации составляет от 2 до 10.

191. Гликоконъюгат по любому из пп.50-188, где степень конъюгации составляет от 2 до 6.

192. Гликоконъюгат по любому из пп.50-188, где степень конъюгации составляет от 3 до 5.

193. Гликоконъюгат по любому из пп.50-188, где степень конъюгации составляет от 4 до 10.

194. Гликоконъюгат по любому из пп.50-193, где отношение полисахарида серотипа 12F к белку-носителю в гликоконъюгате (мас./мас.) составляет от 0,5 до 3,0.

195. Гликоконъюгат по любому из пп.50-193, где отношение полисахарида серотипа 12F к белку-носителю в гликоконъюгате (мас./мас.) составляет от 0,5 до 2,0.

196. Гликоконъюгат по любому из пп.50-193, где отношение полисахарида серотипа 12F к белку-носителю в гликоконъюгате (мас./мас.) составляет от 0,5 до 1,5.

197. Гликоконъюгат по любому из пп.50-193, где отношение полисахарида серотипа 12F к белку-носителю в гликоконъюгате (мас./мас.) составляет от 0,8 до 1,2.

198. Гликоконъюгат по любому из пп.50-193, где отношение полисахарида серотипа 12F к белку-носителю в гликоконъюгате (мас./мас.) составляет от 0,5 до 1,0.

199. Гликоконъюгат по любому из пп.50-193, где отношение полисахарида серотипа 12F к белку-носителю в гликоконъюгате (мас./мас.) составляет от 1,0 до 1,5.

200. Гликоконъюгат по любому из пп.50-193, где отношение полисахарида серотипа 12F к белку-носителю в гликоконъюгате (мас./мас.) составляет от 0,9 до 1,1.

201. Гликоконъюгат по любому из пп.50-200, содержащий менее чем приблизительно 50% свободного полисахарида серотипа 12F относительно общего количества полисахарида серотипа 12F.

202. Гликоконъюгат по любому из пп.50-200, содержащий менее чем приблизительно 25% свободного полисахарида серотипа 12F относительно общего количества полисахарида серотипа 12F.

203. Гликоконъюгат по любому из пп.50-200, содержащий менее чем приблизительно 20% свободного полисахарида серотипа 12F относительно общего количества полисахарида серотипа 12F.

204. Гликоконъюгат по любому из пп.50-200, содержащий менее чем приблизительно 15% свободного полисахарида серотипа 12F относительно общего количества полисахарида серотипа 12F.

205. Гликоконъюгат по любому из пп.50-204, где по меньшей мере 30% гликоконъюгата серотипа 12F имеет K_d , меньшую или равную 0,3 в колонке CL-4B.

206. Гликоконъюгат по любому из пп.50-204, где по меньшей мере 60% гликоконъюгата серотипа 12F имеет K_d , меньшую или равную 0,3 в колонке CL-4B.

207. Гликоконъюгат по любому из пп.50-204, где от 50 до 80% гликоконъюгата серотипа 12F имеет K_d , меньшую или равную 0,3 в колонке CL-4B.

208. Гликоконъюгат по любому из пп.50-204, где от 65 до 80% гликоконъюгата серотипа 12F имеет K_d , меньшую или равную 0,3 в колонке CL-4B.

209. Гликоконъюгат по любому из пп.50-208, где белок-носитель в указанном гликоконъюгате выбран из группы, состоящей из ТТ (столбнячного анатоксина), ДТ (дифтерийного анатоксина), мутантов ДТ (таких как CRM197) и пептидазы C5a из *Streptococcus* (SCP).

210. Гликоконъюгат по любому из пп.50-208, где белок-носитель в указанном гликоконъюгате представляет собой ДТ (дифтерийный анатоксин).

211. Гликоконъюгат по любому из пп.50-208, где белок-носитель в указанном гликоконъюгате представляет собой ТТ (столбнячный анатоксин).

212. Гликоконъюгат по любому из пп.50-208, где белок-носитель в указанном гликоконъюгате представляет собой PD (белок D H. influenzae).

213. Гликоконъюгат по любому из пп.50-208, где белок-носитель в указанном гликоконъюгате представляет собой CRM197.

214. Гликоконъюгат по п.213, где CRM197 содержит от 1 до 15 остатков лизина из 39 ковалентно связанных с сахаридом.

215. Гликоконъюгат по п.213, где CRM197 содержит от 1 до 20 остатков лизина на 39 ковалентно связанных с сахаридом.

216. Гликоконъюгат по любому из пп.50-215, полученный с использованием восстановительного аминирования.

217. Гликоконъюгат по п.216, где перед окислением проводят сортировку полисахарида по размерам до целевого диапазона молекулярной массы (ММ).

218. Гликоконъюгат по любому из пп.50-217, где указанный гликоконъюгат получают способом, включающим стадии а) осуществления взаимодействия сахара серотипа 12F со стабильным нитроксильным радикальным соединением и окислителем с получением активированного сахара и б) осуществления взаимодействия активированного сахара с белком-носителем.

219. Гликоконъюгат по п.218, где указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой молекулу, содержащую группировку TEMPO или PROXYL (2,2,5,5-тетраметил-1-пирролидинилокси).

220. Гликоконъюгат по п.218, где указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение выбрано из групп, состоящих из TEMPO, 2,2,6,6-тетраметил-4-(метилсульфонилокси)-1-пиперидиноокси, 4-фосфоноокси-TEMPO, 4-оксо-TEMPO, 4-метокси-TEMPO, 4-изотиоцианато-TEMPO, 4-(2-йод-ацетидами)-TEMPO свободного радикала, 4-гидрокси-TEMPO, 4-циано-TEMPO, 4-карбокси-TEMPO, 4-(2-бромацетидами)-TEMPO, 4-амино-TEMPO, 4-ацетидами-2,2,6,6-тетраметилпиперидин 1-оксил.

221. Гликоконъюгат по п.218, где указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой TEMPO.

222. Гликоконъюгат по любому из пп.218-221, где указанный окислитель представляет собой молекулу, содержащую группировку N-галоген.

223. Гликоконъюгат по любому из пп.218-221, где указанный окислитель выбран из группы, состоящей из N-хлорсукцинимид, N-бромсукцинимид, N-йодсукцинимид, дихлоризоциануровой кислоты, 1,3,5-трихлор-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона, дибромизоциануровой кислоты, 1,3,5-трибром-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона, диiodизоциануровой кислоты и 1,3,5-триiod-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона.

224. Гликоконъюгат по любому из пп.218-221, где указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид.

225. Гликоконъюгат по п.218, где указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой свободный радикал 2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси (TEMPO) и указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид (NCS).

226. Гликоконъюгат по любому из пп.218-225, где в конце реакции восстановления непрореагировавшие альдегидные группы, оставшиеся в конъюгатах, блокируют с применением блокирующего агента.

227. Гликоконъюгат по п.226, где указанный блокирующий агент представляет собой боргидрид натрия (NaBH_4).

228. Гликоконъюгат по любому из пп.50-217, где указанный гликоконъюгат получают способом, включающим стадии (а) осуществления взаимодействия выделенного полисахарида серотипа 12F с окисляющим агентом; (б) смешивания активированного полисахарида, полученного на стадии (а), с белком-носителем и (в) осуществления взаимодействия смешанного активированного полисахарида и белка-носителя с восстанавливающим агентом с получением гликоконъюгата.

229. Гликоконъюгат по любому из пп.50-217, где указанный гликоконъюгат получают способом, включающим стадии (а) осуществления взаимодействия выделенного полисахарида серотипа 12F с окисляющим агентом; (а') гашения реакции окисления путем добавления гасящего агента; (б) смешивания активированного полисахарида, полученного на стадии (а'), с белком-носителем и (в) осуществления взаимодействия смешанного активированного полисахарида и белка-носителя с восстанавливающим агентом с получением гликоконъюгата.

230. Гликоконъюгат по любому из пп.228-229, где указанный окисляющий агент представляет собой периодат.

231. Гликоконъюгат по любому из пп.228-230, где степень окисления активированного полисахарида серотипа 12F составляет от 2 до 30.

232. Гликоконъюгат по любому из пп.228-231, где в конце реакции восстановления непрореагировавшие альдегидные группы, оставшиеся в конъюгатах, блокируют с применением блокирующего агента.

233. Гликоконъюгат по п.232, где указанный блокирующий агент представляет собой боргидрид натрия (NaBH_4).

234. Иммуногенная композиция, содержащая полисахарид по любому из пп.1-49.

235. Иммуногенная композиция, содержащая гликоконъюгат по любому из пп.50-234.

236. Иммуногенная композиция по п.235, содержащая от 1 до 25 гликоконъюгатов из различных серотипов *S. pneumoniae*.

237. Иммуногенная композиция по п.235, содержащая 20 гликоконъюгатов из различных серотипов *S. pneumoniae*.
238. Иммуногенная композиция по п.235, которая представляет собой 20-валентную пневмококковую конъюгатную композицию.
239. Иммуногенная композиция по п.235, дополнительно содержащая гликоконъюгаты из *S. pneumoniae* серотипов 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F.
240. Иммуногенная композиция по п.239, дополнительно содержащая гликоконъюгаты из *S. pneumoniae* серотипов 1, 5 и 7F.
241. Иммуногенная композиция по п.240, дополнительно содержащая гликоконъюгат из *S. pneumoniae* серотипа 3.
242. Иммуногенная композиция по п.241, дополнительно содержащая гликоконъюгаты из *S. pneumoniae* серотипов 6A и 19A.
243. Иммуногенная композиция по п.242, дополнительно содержащая гликоконъюгаты из *S. pneumoniae* серотипа 22F и 33F.
244. Иммуногенная композиция по п.243, дополнительно содержащая гликоконъюгаты из *S. pneumoniae* серотипов 8, 10A, 11A и 15B.
245. Иммуногенная композиция по п.244, представляющая собой 20-валентную пневмококковую конъюгатную композицию.
246. Иммуногенная композиция по любому из пп.235-245, где гликоконъюгат из *S. pneumoniae* серотипа 12F конъюгирован с CRM197.
247. Иммуногенная композиция по любому из пп.235-246, где указанные гликоконъюгаты все индивидуально конъюгированы с CRM197.
248. Иммуногенная композиция по любому из пп.235-247 для применения в качестве лекарственного средства.
249. Иммуногенная композиция по любому из пп.235-247 для применения в качестве вакцины.
250. Способ определения наличия остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина в выделенном полисахариде *S. pneumoniae* серотипа 12F, где указанный способ включает стадию а) выделения полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 12F и б) определения наличия остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина в указанном полисахариде.
251. Способ по п.250, где наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью NMR или масс-спектрометрии (MS).
252. Способ по п.250, где наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью NMR.
253. Способ по п.250, где наличие остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью масс-спектрометрии (MS).
254. Способ определения количества остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина в выделенном полисахариде *S. pneumoniae* серотипа 12F, где указанный способ включает стадию а) выделения полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 12F и б) определения количества остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина в указанном полисахариде.
255. Способ по п.254, где количество остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью NMR.
256. Способ по п.254, где количество остатков 4-кето-N-ацетилхиновозамина определяют с помощью масс-спектрометрии (MS).
257. Способ определения наличия остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) в восстановленном полисахариде серотипа 12F, где указанный способ включает стадию а) осуществления взаимодействия выделенного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 12F с восстанавливающим агентом и б) определения наличия остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) в указанном восстановленном полисахариде.
258. Способ по п.257, где наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью NMR.
259. Способ по п.254, где наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью масс-спектрометрии (MS).
260. Способ по любому из пп.254-259, где указанный восстанавливающий агент представляет собой боргидрид натрия (NaBH_4).
261. Способ по любому из пп.254-260, где указанный выделенный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F предварительно обработан окисляющим агентом.
262. Способ по п.261, где окисляющий агент представляет собой любой окисляющий агент, который окисляет концевую гидроксильную группу до альдегида.
263. Способ по п.261, где указанный окисляющий агент представляет собой периодат.
264. Способ по любому из пп.254-260, где указанный выделенный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F предварительно обработан стабильным нитроксильным радикальным соединением и окислителем.
265. Способ по п.263, где указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представ-

ляет собой свободный радикал 2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси (TEMPO) и указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид (NCS).

266. Способ определения наличия остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) в восстановленном полисахариде серотипа 12F, где указанный способ включает стадию а) осуществления взаимодействия выделенного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 12F с восстанавливающим агентом и б) определения наличия остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) в указанном восстановленном полисахариде.

267. Способ по п.266, где наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью NMR.

268. Способ по п.266, где наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью масс-спектрометрии (MS).

269. Способ по любому из пп.266-268, где указанный восстанавливающий агент представляет собой боргидрид натрия (NaBH_4).

270. Способ по любому из пп.266-269, где указанный выделенный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F предварительно обработан окисляющим агентом.

271. Способ по п.270, где указанный окисляющий агент представляет собой любой окисляющий агент, который окисляет концевую гидроксильную группу до альдегида.

272. Способ по п.270, где указанный окисляющий агент представляет собой периодат.

273. Способ по любому из пп.266-269, где указанный выделенный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F предварительно обработан стабильным нитроксильным радикальным соединением и окислителем.

274. Способ по п.273, где указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой свободный радикал 2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси (TEMPO) и указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид (NCS).

275. Способ определения наличия остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) в восстановленном полисахариде серотипа 12F, где указанный способ включает стадию а) осуществления взаимодействия выделенного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 12F с восстанавливающим агентом и б) определения наличия остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) в указанном восстановленном полисахариде.

276. Способ по п.275, где наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью NMR.

277. Способ по п.275, где наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью масс-спектрометрии (MS).

278. В одном воплощении указанный восстанавливающий агент представляет собой борогидрид натрия (NaBH_4).

279. Способ по любому из пп.275-278, где указанный восстанавливающий агент представляет собой борогидрид натрия (NaBH_4).

280. Способ по любому из пп.275-279, где указанный выделенный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F ранее был обработан окисляющим агентом.

281. Способ по п.280, где указанный окисляющий агент представляет собой любой окисляющий агент, который окисляет концевую гидроксильную группу альдегида.

282. Способ по п.280, где указанный окисляющий агент представляет собой периодат.

283. Способ по любому из пп.275-279, где указанный выделенный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 12F предварительно обработан стабильным нитроксильным радикальным соединением и окислителем.

284. Способ по п.283, где указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой свободный радикал 2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси (TEMPO) и указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид (NCS).

285. Способ определения наличия остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и/или N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) в гликоконъюгате *S. pneumoniae* серотипа 12F, где указанный способ включает стадию а) получения гликоконъюгата *S. pneumoniae* серотипа 12F и б) определения наличия остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и/или N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) в указанном гликоконъюгате.

286. Способ по п.285, где наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и/или N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью NMR.

287. Способ по п.285, где наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и/или N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью масс-спектрометрии (MS).

288. Способ определения наличия остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) в гликоконъюгате *S. pneumoniae* серотипа 12F, где указанный способ включает стадию а) получения гликоконъюгата *S. pneumoniae* серотипа 12F и б) определения наличия остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) в указанном гликоконъюгате.

289. Способ по п.288, где наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью NMR.

290. Способ по п.288, где наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью масс-спектрометрии (MS).

291. Способ определения наличия остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) в гликоконъюгате *S. pneumoniae* серотипа 12F, где указанный способ включает стадию а) получения гликоконъюгата *S. pneumoniae* серотипа 12F и б) определения наличия остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) в указанном гликоконъюгате.

292. Способ по п.291, где наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью NMR.

293. Способ по п.291, где наличие остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) определяют с помощью масс-спектрометрии (MS).

294. Способ определения наличия остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) в гликоконъюгате *S. pneumoniae* серотипа 12F, где указанный способ включает стадию а) получения гликоконъюгата *S. pneumoniae* серотипа 12F и б) определения наличия остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) в указанном гликоконъюгате.

295. Способ по п.294, где наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью NMR.

296. Способ по п.294, где наличие остатков N-ацетил-D-хиновозамина (D-QuiNAc) определяют с помощью масс-спектрометрии (MS).

Используемый в настоящем документе термин "приблизительно" означает в пределах статистически значимого разброса значений, такого как установленный диапазон концентраций, временные рамки, диапазон молекулярной массы, температуры или pH. Такой разброс может быть в пределах порядка величины, обычно в пределах 20%, более типично в пределах 10% и еще более типично в пределах 5% или в пределах 1% от заданного значения или диапазона. Иногда такой разброс может находиться в пределах экспериментальной ошибки, типичной для стандартных методов, используемых для измерения и/или определения заданного значения или диапазона. Допустимая вариация, охватываемая термином "приблизительно", будет зависеть от конкретной исследуемой системы и может быть легко оценена специалистом в данной области техники. Всякий раз, когда в этом документе указывается диапазон, каждое число в пределах диапазона также рассматривается как воплощение изобретения.

Термины "содержащий", "содержать" и "содержит" в данном документе предназначены авторами настоящего изобретения для возможной замены терминов "состоящий по существу из", "состоять по существу из", "состоит по существу из", "состоит из", "состоит из" и "состоит из" соответственно в каждом случае.

Термины "иммуногенное количество", "иммунологически эффективное количество", "терапевтически эффективное количество", "профилактически эффективное количество" или "доза", каждый из которых используется здесь взаимозаменяемо, обычно относятся к количеству антигена или иммуногенной композиции, достаточному для вызывающего иммунный ответ, либо клеточный (Т-клеточный), либо гуморальный (В-клеточный или гуморальный), либо оба из них, что определяется стандартными анализами, известными специалисту в данной области техники.

Любое целое число в любом из диапазонов согласно настоящему документу рассматривается как воплощение настоящего изобретения.

Все ссылки или патентные заявки, цитируемые в настоящем патентном описании, включены в настоящее описание посредством ссылки.

Настоящее изобретение иллюстрируется сопровождающими примерами. Приведенные ниже примеры осуществляют с использованием стандартных методов, которые хорошо известны и являются обычными для специалистов в данной области техники, за исключением случаев, когда подробно описано иное. Примеры являются иллюстративными и не ограничивают настоящее изобретение.

Примеры

Пример 1. Капсульный полисахарид серотипа 12F содержит 4-кето-N-ацетилхиновозамин (4KQ).

Согласно Leontein et al. (Leontein et al. (1981), *Can. J. Chem.* 59:2081-2085), повторяющееся звено полисахарида серотипа 12F состоит из линейной трисахаридной основной цепи (одна молекула N-ацетилфукозамина (FucpNAc), одна молекула N-ацетилгалактозамина (GalpNAc) и одна молекула N-ацетилманнуриновой кислоты (ManpNAcA)) с двумя ветвями: боковой группой α -галактопиранозы (Galp), присоединенной к C3 FucpNAc, и дисахаридной ветвью α -Glc(1 \rightarrow 2)- α -Glc, присоединенной к C3 ManpNAcA.

Полисахарид пневмококка 12F исследовали методами 2D NMR и масс-спектрометрии для получения характеристик повторяющегося звена полимера. Неожиданно было обнаружено, что полисахарид серотипа 12F фактически содержит частичную замену N-ацетилгалактозамина на 4-кето-N-ацетилхиновозамин (также называемый в настоящем документе 2-ацетиамидо-2,6-дидезокси-D-ксило-4-гексулозой и Sug). Был идентифицирован этот вариант кетосахара (4KQ), который заменяет остаток

GalNAc со статистическим средним значением примерно 20-25 мол.% в повторяющихся звеньях полисахарида 12F первого штамма.

Способы.

NMR. Образцы для анализа методом ядерного магнитного резонанса (NMR), как правило, подвергали обработке ультразвуком с помощью наконечника, и полисахарид 12F, растворенный в водном растворителе, подвергали обработке ультразвуком с помощью наконечника в течение периода до 90 мин на ледяной бане. Образцы фильтровали с помощью фильтра с диаметром пор 0,22 мкм для удаления частиц наконечника и в некоторых случаях осуществляли разделение частиц по размеру с помощью центрифужных колонок с размером пор, обеспечивающим фиксированный предел отсечения по молекулярной массе (MWCO). Обработанные ультразвуком с последующим разделением частиц по размеру или без него образцы подвергали диализу против воды с помощью кассет для диализа с MWCO 3 кДа, замораживали, подвергали сублимационной сушке и повторно растворяли в D₂O с добавлением примерно 0,55 мМ TSP-d₄. pH образцов находился в диапазоне примерно 6-7, и в случае образцов с высокой концентрацией его корректировали с помощью небольших количеств NaOD вследствие кислотности карбоновой кислоты в остатке MannNAcA основной цепи. Данные NMR получали с помощью 5 мм криодатчика Bruker DCH на NMR-спектрометре Bruker-Biospin AVANCE III с рабочей частотой 500 МГц.

Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения M-Nova v 12.0. Эталонном химического сдвига являлся TSP-d₄ при 0 и -1,8 ppm ¹H и ¹³C соответственно.

Для обработки ID-спектров ¹H использовали уширение ЭМ-линий 0,5 Гц и применяли ручную коррекцию базовой линии методом кубических сплайнов. ID-спектры ¹³C получали с применением стробирования мощности с временем ожидания восстановления между циклами сканирования 0,5 с. 2D-анализ включал ¹H - ¹H COSY, ¹H - ¹H NOESY, ¹H - ¹³C HSQC, ¹H - ¹³C HMBC, ¹H - ¹³C HSQC-TOCSY.

LC-MS. Данные LC-MS и LC-MS/MS получали в режиме положительной ионизации на масс-спектрометре Thermo Orbitrap Fusion Lumos Tribrid, оснащенный системой HPLC Agilent 1260. Образцы вводили и разделяли на колонке Waters со сферическими гибридными частицами с этиленовым мостиком (BEH) для жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (HILIC). Подвижная фаза (MP) А представляет собой воду с добавлением 0,1% муравьиной кислоты (FA), а подвижная фаза В (MPB) представляет собой ацетонитрил (ACN) с добавлением 0,1% FA. Градиент элюирования подавали со скоростью 200 мкл/мин; 10-95% МРА за 35 мин, возврат к 10% МРА за 1 мин и уравнивание в течение 15 мин. Напряжение радиочастотной (RF) линзы было увеличено до 70 В, чтобы вызвать фрагментацию полисахарида в источнике ионов. Данные MS/MS были получены с использованием диссоциации, активированной соударениями при повышенной энергии (HCD).

SEC/MS. Данные SEC/MS для экспериментов с частичным кислотным гидролизом получали на масс-спектрометре Thermo Orbitrap Elite, оснащенный системой HPLC Agilent 1260. Образцы вводили и разделяли на колонке BEH200 для эксклюзионной хроматографии (SEC). Подвижная фаза (MP) А представляет собой воду с добавлением 0,05% трифторуксусной кислоты (TFA), а MPB представляет собой ацетонитрил (ACN) с добавлением 0,05% TFA. Градиент для изократического элюирования подавали со скоростью 200 мкл/мин: 80% МРА А и 20% MPB.

Частичный кислотный гидролиз. Нативный полисахарид 12F в концентрации 6,3 мг/мл в воде обрабатывали TFA. Во флакон для HPLC добавляли 100 мкл образца 12F и 2 мкл неразбавленной TFA. Полученную смесь перемешивали вихревым способом и помещали на нагревательную поверхность, настроенную на следующий режим: 60°C в течение 100 мин, затем 70°C в течение 120 мин, затем 80°C в течение 60 мин. Образец анализировали методом SEC/MS на масс-спектрометре Thermo Orbitrap Elite.

Результаты.

Данные NMR подтверждают наличие одного гетерологичного полисахарида серотипа 12F с двумя различными группами повторяющихся звеньев. Основная совокупность повторяющихся звеньев (примерно 75-80 мол.%) соответствует данным о входящих в состав сахарах и структурной организации, опубликованным в Leontein et al., (Leontein et al. (1981), Can. J. Chem. 59:2081-2085). Дополнительная совокупность повторяющихся звеньев (примерно 20-25 мол.%) характеризуется заменой остатка GalNAc в основной цепи на остаток Sug (2-ацетамидо-2,6-дидезокси-D-ксилогексоз-4-улозы), который находится преимущественно в форме гидрата в основном объеме водного растворителя при типичных для анализа условиях температуры и pH (а именно 75°C и pH примерно 6-7).

На фиг. 1А-1С представлены две совокупности повторяющихся звеньев (без замены GalNAc на Sug (фиг. 1А) и с заменой GalNAc на Sug (фиг. 1В)). Отсутствуют доказательства присутствия двух различных полисахаридов серотипа 12F, и данные NMR в наибольшей степени соответствуют одному полисахариду серотипа 12F с заменой в среднем 20-25% остатков GalNAc на Sug (кетосахар) (фиг. 1С). Полученные с сайт-специфичным разрешением изменения в химическом сдвиге ¹H и/или ¹³C остатка сахара повторяющегося звена полисахарида серотипа 12F вследствие включения остатка Sug представлены затененными кружками на фиг. 1В.

Полученные с хорошим разрешением сдвиги, обусловленные присутствием остатка Sug, включают сигналы ¹H CH₃ в положении 6 Sug, а также модификацию сигнала ¹H CH₃ в положении 6 соседнего FucNAc вследствие включения Sug. Характерной особенностью остатка Sug является значительно экра-

нированный сигнал ^{13}C CH₃ в положении 6 примерно при 12,36 ppm при химическом сдвиге соответствующего протона 1,3 ppm. Это более сильное экранирование, чем ожидается для этого типа атома углерода метила, и оно обусловлено соседним гидратированным кетоном в положении 4. Гидратированный кетон находится в состоянии sp³-гибридизации, не имеет связанного протона, и резкий и разрешенный резонанс ^{13}C примерно при 94 ppm относится, что было подтверждено корреляцией HMBC, к атому углерода гидратированного кетона в положении 4 остатка Sug (фиг. 2). Резонанс ^{13}C гидратированного кетона в состоянии sp³-гибридизации в положении 4 примерно при 94 ppm представляет собой сигнал серотипа 12F, уникальный для остатка Sug.

При типичных условиях анализа (водный растворитель, pH примерно 6-7, 75°C) кетон Sug преимущественно находится в форме гидрата, при этом слабый сигнал примерно при 203 ppm обусловлен кетоном Sug при примерном отношении 9:1 (гидрат : кетон) в положении 4 остатка Sug в полисахариде серотипа 12F (см. фиг. 3).

Точное молярное отношение остатков Сахаров в полисахариде серотипа 12F было установлено на основе деконволюции ID-спектров ^{13}C . С помощью этого подхода деконволюции было обнаружено, что отношение остатков полисахарида серотипа 12F является следующим: $\alpha\text{-L-FucNAc}:\alpha\text{-D-Gal}:\beta\text{-D-GalNAc}:\text{Sug}:\beta\text{-D-MannNAc}:\alpha\text{-D-Glc}$ (1:1:0,75:0,25:1:2), как показано на фиг. 1.

Компонент полисахарида серотипа 12F, представляющий собой остаток Sug, систематически присутствует в количестве примерно 20-25 мол.% в различных партиях полисахарида из одного и того же штамма (штамм 3 в табл. 3 ниже) и является продуктом культивирования.

Положение остатка Sug в повторяющемся звене полисахарида устанавливается с помощью 2D-спектров NMR $^1\text{H}-^1\text{H}$ NOESY. Данные NMR NOESY указывают на то, что Sug заменяет GalNAc в повторяющемся звене (см. корреляции NOESY на фиг. 4).

Для дальнейшего установления структуры этого уникального сигнала в NMR также применяли масс-спектрометрию. Был разработан масс-спектрометрический эксперимент с получением псевдомолекулярного иона повторяющегося звена (repeat unit, RU) полисахарида. Проведение экспериментов методом MS/MS с псевдомолекулярным ионом RU полисахарида 12F, имеющим m/z 1094,3892, обеспечивало возможность получения полной последовательности повторяющегося звена.

На фиг. 5 представлен пример определения последовательности повторяющихся звеньев (RU), которое может быть выполнено с помощью масс-спектрометрии. На этой фигуре обнаружены и идентифицированы все кольцевые формы сахаров. На фиг. 5 имеются отметки в виде букв от А до F, обозначающие 5 кольцевых форм сахаров в RU 12F. Как показано на фиг. 5, линейная часть повторяющегося звена образована кольцами ABC. Сахара боковых цепей расположены поверх сахара, к которому они присоединены.

На фиг. 5 показана структура полисахарида 12F в качестве примера интерпретации данных масс-спектрометрии. Кольца обозначены буквами от А до F, а также показана краткая конфигурация порядка колец. В табл. 1 приведены молекулярные массы.

Таблица 1

Обозначение	Моносахарид	Химическая формула	Масса (Да)
A	N-ацетилгалактозамин	C ₈ O ₅ NH ₁₃	203,07937
B	N-ацетилманнуриновая кислота	C ₈ H ₁₁ NO ₆	217,05864
C	Гексоза	C ₆ H ₅ O ₁₀	162,05282
D	Гексоза	C ₆ H ₅ O ₁₀	162,05282
E	N-ацетилфукоза	C ₈ H ₁₃ NO ₄	187,08446
F	Гексоза	C ₆ H ₅ O ₁₀	162,05282

Чтобы определить, является ли содержащий кетосахар вариант 12F уникальным полисахаридом, присутствующим в полисахариде серотипа 12F, или кетосахар является частью полисахарида 12F, заменяющей GalNAc примерно в 20% случаев, было проведено несколько экспериментов. Цель первого эксперимента заключалась в том, чтобы выяснить, можно ли разделить два различных полисахарида с помощью колонки для HILIC. Был обнаружен только один вид полисахарида, который содержал как GalNAc, так и кетосахар.

Следующий эксперимент заключался в поиске димера или тримера со всеми кетосахарами в полисахариде, что свидетельствовало бы о наличии двух различных полисахаридов.

Анализировали частично гидролизованный полисахарид 12F. Частичный кислотный гидролиз обеспечивает расщепление гликозидной связи с получением частиц с различной длиной остатков. 4KQ имеет массу на 18 Да меньше по сравнению с N-ацетилгалактозамином, а димер и тример будут обеспечивать продукты гидролиза, которые имеют массу на 18 Да меньше, в случае, если только один полисахарид содержит кетосахар. В случае второго варианта частиц (если имеется цепь, в которой на кетосахар заменены все остатки N-ацетилгалактозамина) димер и тример будут обеспечивать продукты гидролиза, которые имеют массу на 36 и 54 Да меньше соответственно.

Обнаруженные соединения соответствуют включению, при котором примерно 1 из каждых 4 RU содержит кетосахар. Эти данные указывают на то, что каждая полисахаридная цепь 12F содержит кето-

сахар, а в соседних повторяющихся звеньях нет двух кетосахаров. Отсутствуют сведения, подтверждающие наличие цепи, в которой каждый N-ацетилгалактозамин заменен на кетосахар.

Эти данные подтверждают тот факт, что 12F представляет собой один полисахарид, который содержит кетосахар в повторяющемся звене в 20-25% случаев.

В совокупности указанные данные подтверждают, что полисахарид серотипа 12F состоит из отдельных гетерологичных полисахаридных цепей, при этом кетосахар заменяет N-ацетилгалактозамин в основной цепи повторяющегося звена со статистическим средним значением 20-25% (фиг. 1). Отсутствуют сведения, подтверждающие наличие цепи, в которой каждый N-ацетилгалактозамин заменен на кетосахар.

Пример 2. Структура восстановленного капсульного полисахарида серотипа 12F.

Способы.

Восстановленный полисахарид 12F.

Восстановленный полисахарид 12F получали следующим образом: 150 мг гидролизованного 12F в 60 мл воды (2,5 мг/мл) при pH 7,0 смешивали с 2 мл раствора NaBH₄ (примерно 807 мМ в воде) при 150 об/мин в течение ночи при 23°C, затем проводили диализ против воды с помощью кассеты для диализа с MWCO 7 кДа. Для обработки 1D-спектров ¹H использовали уширение ЭМ-линий 0,5 Гц и применяли ручную коррекцию базовой линии методом кубических сплайнов. 1D-спектры ¹³C получали с применением стробирования мощности с временем ожидания восстановления между циклами сканирования 0,5 с. 2D-анализ включал ¹H - ¹H COSY, ¹H - ¹H NOESY, ¹H - ¹³C HSQC, ¹H - ¹³C HMBC, ¹H - ¹³C HSQC-TOCSY.

LC-MS и LC-MS/MS.

Данные LC-MS и LC-MS/MS для эксперимента с восстановлением 12F под действием NaBD₄ получали в режиме положительной ионизации на масс-спектрометре Thermo Orbitrap Q Exactive, оснащенной системой HPLC Agilent 1260. Образцы вводили и разделяли на колонке Waters со сферическими гибридными частицами с этиленовым мостиком (BEH) для жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (HILIC). Подвижная фаза (MP) A представляет собой воду с добавлением 0,1% TFA, а MPB представляет собой ацетонитрил (ACN) с добавлением 0,1% TFA. Градиент элюирования подавали со скоростью 200 мкл/мин; 30-70% MPA за 35 мин, возврат к 30% MPA за 1 мин и уравнивание в течение 14 мин. Напряжение радиочастотной (RF) линзы было увеличено до 60 В, чтобы вызвать фрагментацию полисахарида в источнике ионов. Данные MS/MS были получены с использованием диссоциации, активированной соударениями при повышенной энергии (HCD).

Реакция с NaBD₄.

Растворяли NaBD₄ в воде с обеспечением концентрации 6,7 мг/мл. К 0,27 мл полисахарида 12F (с концентрацией примерно 3 мг/мл в воде) добавляли 0,03 мл NaBD₄ и инкубировали в течение 3 ч при комнатной температуре. Затем добавляли 1 мкл неразбавленной уксусной кислоты для остановки реакции.

Результаты.

Кетон/гидрат остатка Sug чувствителен к восстановлению под действием NaBH₄. Полисахарид серотипа 12F, обработанный NaBH₄, характеризуется специфичными изменениями в остатке Sug, включая дезкранирование атома углерода метила в положении 6, потерю атома углерода в состоянии sp³-гибридизации примерно при 94 ppm без непосредственно связанного протона и появление двух более слабых новых спиновых систем, соответствующих D-FucNAc и D-QuiNAc (фиг. 6). При восстановлении основная спиновая система полисахарида серотипа 12F остается неизменной (фиг. 1A) и наблюдается такой же паттерн гетерогенности в остатках, соседних с сайтом включения.

Обработка полисахарида серотипа 12F NaBH₄ специфично восстанавливает группу в положении 4 остатка Sug от кетона/гидрата до спирта и превращает остаток Sug в смесь D-FucNAc и D-QuiNAc, характеризующихся гидроксилом в положении 4 в аксиальной и экваториальной ориентации соответственно, как показано на фиг. 6.

После восстановления NaBD₄ масса RU и фрагментных ионов, содержащих остаток кетосахара, сдвигается на 3,0219 Да выше. Этот нетипичный сдвиг массы, обусловленный дейтерием, является неприродным и обеспечивает уникальные ионы, которые не испытывают интерференции от фрагментных ионов, содержащих природные изотопы ¹²C, ¹³C, ¹H, ¹⁶O и ¹⁴N. Эти данные подтверждают восстановление кетона под действием NaBD₄ (см. табл. 2 и фиг. 7).

Таблица 2. Корреляция массы со структурой иона для RU 12F после восстановления под действием NaBD₄.

Все фрагментные ионы, содержащие остаток A^D , подвергаются сдвигу на 3,0219 Да, что указывает на восстановление (присоединение двух атомов водорода) и включение одного атома дейтерия в остаток кетосахара, A^D . Это является превосходным доказательством того, что N-ацетилгалактозамин был заменен на кетосахар.

Остаток (см. фигуру 7)	Теоретическое значение m/z	Наблюдаемое значение m/z	Ошибка массы (ppm)
$A^{13}BCDEF$	1079,3996	1079,3997	0,1
$BCDEF$	891,3088	891,3092	0,4
$A^{13}BCEF$	917,3468	917,3471	0,4
$A^{13}BCD$	730,2623	730,2622	-0,1
$A^{13}BCE$	755,2939	755,2935	-0,6
$BCDE$	729,2560	729,2563	0,4
$A^{13}BC$	568,2095	568,2091	-0,7
$A^{13}BE$	593,2411	593,2406	-0,9
BCE	567,2032	567,2035	0,5
BCD	542,1716	542,1715	-0,1
$A^{13}EF$	538,2353	538,2353	0,0
$A^{13}CD$	513,2037	513,2034	-0,5
EF плюс гекс.	512,1974	512,1978	0,8
$A^{13}B$	406,1566	406,1561	-1,4
BC	380,1187	380,1186	-0,4
BE	405,1504	405,1501	-0,7
EF	350,1446	350,1445	-0,2
CD	325,1129	325,1129	0,0
$A^{13}E$	376,1825	376,1825	0,0
$A^{13}C$	351,1508	351,1499	-2,7
A^{13}	189,0980	189,0981	0,5
B	218,0659	218,0660	0,4
E	188,0917	188,0918	0,4
$^{\wedge}A^{13}$	207,1086	207,1086	0,1
A^{13*}	171,0874	171,0876	0,9

$^{\wedge}$ = добавление воды;

* = удаление воды.

Пример 3. Уровень замены на 4KQ среди циркулирующих клинических изолятов 12F. Способы.

Получение, очистка и анализ полисахаридов 12F.

Исходные культуры в виде замороженных суспензий клеток получали путем выращивания до поздней экспоненциальной фазы в среде с гидролизатом сои и замораживания при -70°C . Получение полисахарида 12F в культуральной среде осуществляли путем первоначальной наработки культур для посева из замороженных исходных культур в среде с гидролизатом сои. Затем стартовую культуру применяли для засева той же культуральной среды; культивирование осуществляли в биореакторе с мешалкой при 36°C . Затем проводили лизис культуральной жидкости путем добавления N-лаурилсульфоната до 0,1% и подвергали ее процедурам очистки.

Очистку полисахаридов проводили, как описано в источнике WO 2020/170190.

Результаты.

Чтобы определить, распространена ли замена на 4KQ среди циркулирующих клинических изолятов, анализировали 17 подтвержденных клинических изолятов 12F. Все 17 клинических изолятов 12F имели признаки указанной замены на 4KQ в диапазоне от 2,5 до 10,2% повторяющихся звеньев (табл. 3).

Также были проанализированы четыре культуральных штамма и очищенные полисахариды пневмококка 12F, доступные в ATCC (Американская коллекция типовых культур (ATCC, Manassas, VA, США), эталонный штамм 196-X) (табл. 3).

Количество заместителя 4-KQ количественно определяли с помощью 2D-NMR (см. пример 1). Процент (%) замены на кетоформу в Pn-12F определяют, используя отношение интенсивностей пика метила, соответствующего 4KQ, по сравнению с FucNAc.

Уровень замены на 4KQ, происходящий при культивировании, зависит от применяемого штамма (см. табл. 3).

Таблица 3

Исходная коллекция культур	Страна происхождения	% 4KQ по данным NMR
Штамм 1	Неизвестна	1,9
Штамм 2	Неизвестна	5,0
Штамм 3	США	24,6
Штамм 4	Германия	4,7
Штамм 5	Неизвестна	примерно 45 ^a
Очищенный 12F (эталонный штамм ATCC 196-X)	Неизвестна	0,1
Клинический изолят №1	Великобритания	5,6
Клинический изолят №2	Испания	3,9
Клинический изолят №3	Израиль	4,7
Клинический изолят №4	Канада	4,5
Клинический изолят №5	США	7,0
Клинический изолят №6	Франция	10,2
Клинический изолят №7	Канада	10,2
Клинический изолят №8	Канада	7,7
Клинический изолят №9	Канада	7,6
Клинический изолят №10	Канада	7,0
Клинический изолят №11	Канада	6,1
Клинический изолят №12	Греция	5,7
Клинический изолят №13	Франция	4,1
Клинический изолят №14	Бельгия	4,2
Клинический изолят №15	Сингапур	2,5
Клинический изолят №16	США	5,6
Клинический изолят №17	США	5,8

^a Образец содержал большее количество примеси С-полисахарида (по сравнению с другими образцами), что приводило к появлению некоторых мешающих сигналов, которые, вероятно, увеличивали погрешность измерения.

Пример 4. Иммуногенность конъюгатов содержащих 4KQ полисахаридов 12F в анализе ОРА с применением клинических изолятов с различным содержанием 4KQ.

Способы.

Анализ опсонофагоцитирующей активности (ОРА) микроколоний *S. pneumoniae* Анализ опсонофагоцитирующей активности выполняли, как описано в литературе (см., например, WO 2018/134693). Указанный анализ обеспечивает возможность количественного определения функционально активных антител к *S. pneumoniae* путем оценки уничтожения бактерий в реакционных смесях, содержащих серийные разведения исследуемых сывороток, комплемент крольчат и дифференцированные эффекторные клетки (HL-60). Титр ОРА является величиной, обратной разведению сыворотки, обеспечивающему снижение количества бактериальных колониеобразующих единиц (КОЕ) на 50% по сравнению с контролем без сыворотки (определяемым как исходное количество КОЕ). Титр рассчитывают путем интерполяции по двум разведениям, которые охватывают это пороговое значение уничтожения клеток, составляющее 50%. Титры, полученные на основе нескольких определений для образца, называют среднегеометрическими титрами (GMT).

Результаты.

Чтобы определить, влияет ли содержание 4KQ в капсульном полисахариде на способность индуцированных вакциной антител связываться с изолятами *S. pneumoniae* серотипа 12F и уничтожать их, оценивали иммуногенность поливалентной вакцины, содержащей конъюгат 12F, и поливалентной вакцины, содержащей неконъюгированный полисахарид 12F, в отношении набора изолятов *S. pneumoniae* 12F с различными уровнями модификации 4KQ. Проводили анализ ОРА для шести изолятов 12F с различными уровнями модификации 4KQ и получали титры для набора сывороток от субъектов, иммунизированных поливалентной вакциной, содержащей конъюгат 12F (n=41), поливалентной вакциной, содержащей неконъюгированный полисахарид 12F (n=26), или поливалентной вакциной, не содержащей полисахарида 12F (в качестве отрицательного контроля, n=28). Полисахарид 12F, включенный в поливалентную вакцину, содержащую неконъюгированный полисахарид 12F, имеет очень низкое содержание 4KQ (примерно 0,2%), тогда как полисахарид 12F, применяемый в поливалентной вакцине, содержащей конъюгат 12F, имеет уровень модификации 4KQ примерно 25%.

Как показано на фиг. 8, иммунные сыворотки, полученные с применением как вакцины, содержащей конъюгат 12F (конъюгат 12F), так и вакцины, содержащей неконъюгированный полисахарид 12F (неконъюгированный 12F), были способны вызывать реакции уничтожения бактерий изолятов с уровнями модификации 4KQ от 1,9 до 27,5% без статистически значимых различий между титрами. Эти данные указывают на то, что вакцины обеспечивали схожие титры ОРА для штаммов, характеризующихся уровнями модификации 4KQ от низких до высоких.

Все публикации и патентные заявки, упомянутые в настоящем описании, указывают на уровень

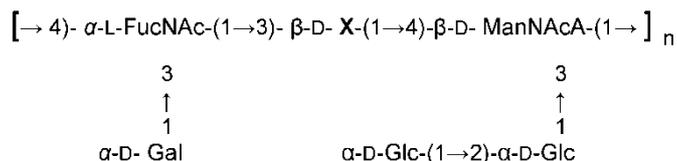
специалистов в области, к которой относится данное изобретение. Все публикации и патентные заявки настоящим включены в настоящее описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки.

Несмотря на то, что вышеуказанное изобретение было описано довольно подробно посредством иллюстрации и примера в целях ясности понимания, на практике могут быть реализованы некоторые изменения и модификации в рамках объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F, полученный способом, включающим стадии:

а) осуществление взаимодействия выделенного полисахарида со следующим повторяющимся звеном:



где n представляет собой количество повторяющихся звеньев;

X представляет собой либо N-ацетилгалактозамин, либо 4-кето-N-ацетилхинозосамин;

где указанный выделенный полисахарид содержит от приблизительно 80 до приблизительно 75 остатков N-ацетилгалактозамина и от приблизительно 20 до приблизительно 25 остатков 4-кето-N-ацетилхинозосамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида,

с активирующим агентом с получением активированного сахара; и

б) осуществление взаимодействия указанного активированного сахара с белком-носителем, где указанный белок-носитель представляет собой CRM197,

и дополнительно содержащая гликоконъюгаты из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F *S. pneumoniae*, где каждый из гликоконъюгатов индивидуально конъюгирован с CRM197, и

где указанная композиция представляет собой 20-валентную пневмококковую конъюгатную композицию.

2. Иммуногенная композиция по п.1, где указанный выделенный полисахарид со стадии (а) содержит приблизительно 75 остатков N-ацетилгалактозамина и приблизительно 25 остатков 4-кето-N-ацетилхинозосамина на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

3. Иммуногенная композиция по любому из пп.1, 2, где указанный выделенный полисахарид со стадии (а) имеет среднюю молекулярную массу от 100 до 500 кДа.

4. Иммуногенная композиция, содержащая гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F, содержащий капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 10 до приблизительно 15 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и от приблизительно 10 до приблизительно 15 остатков N-ацетил-D-хинозосамина (D-QuiNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида, где белок-носитель в указанном гликоконъюгате представляет собой CRM197, и дополнительно содержащая гликоконъюгаты из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F *S. pneumoniae*, где каждый из указанных гликоконъюгатов индивидуально конъюгирован с CRM197, и где указанная композиция представляет собой 20-валентную пневмококковую конъюгатную композицию.

5. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-4, где указанный гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F содержит капсульный полисахарид серотипа 12F, содержащий от приблизительно 10 до приблизительно 12,5 остатков N-ацетил-D-фукозамина (D-FucNAc) и от приблизительно 10 до приблизительно 12,5 остатков N-ацетил-D-хинозосамина (D-QuiNAc) на каждые 100 сахаридных повторяющихся единиц полисахарида.

6. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-5, где указанный гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F содержит полисахарид серотипа 12F, где средняя молекулярная масса (Mw) указанного полисахарида до конъюгации составляет от 150 до 400 кДа.

7. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-6, где средняя молекулярная масса (Mw) составляет от 500 до 2500 кДа.

8. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-7, где степень конъюгации указанного гликоконъюгата *S. pneumoniae* серотипа 12F составляет от 2 до 10.

9. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-8, где отношение полисахарида серотипа 12F к белку-носителю в указанном гликоконъюгате *S. pneumoniae* серотипа 12F (мас./мас.) составляет от 0,5 до 3,0.

10. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-9, где отношение полисахарида серотипа 12F к

белку-носителю в гликоконъюгате (мас./мас.) составляет от 0,8 до 1,2.

11. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-10, где CRM197 содержит от 1 до 15 остатков лизина из 39, ковалентно связанных с сахаридом.

12. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-11, где указанный гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F получают с использованием восстановительного аминирования.

13. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-11, где указанный гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F получают способом, включающим стадию а) осуществления взаимодействия сахара серотипа 12F со стабильным нитроксильным радикальным соединением и окислителем с получением активированного сахара и б) осуществления взаимодействия указанного активированного сахара с CRM197.

14. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-11, где указанный гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F получают способом, включающим стадии (а) осуществления взаимодействия выделенного полисахарида серотипа 12F с окисляющим агентом; (б) смешивания активированного полисахарида, полученного на стадии (а), с CRM197 и (в) осуществления взаимодействия смешанного активированного полисахарида и CRM197 с восстанавливающим агентом с получением гликоконъюгата.

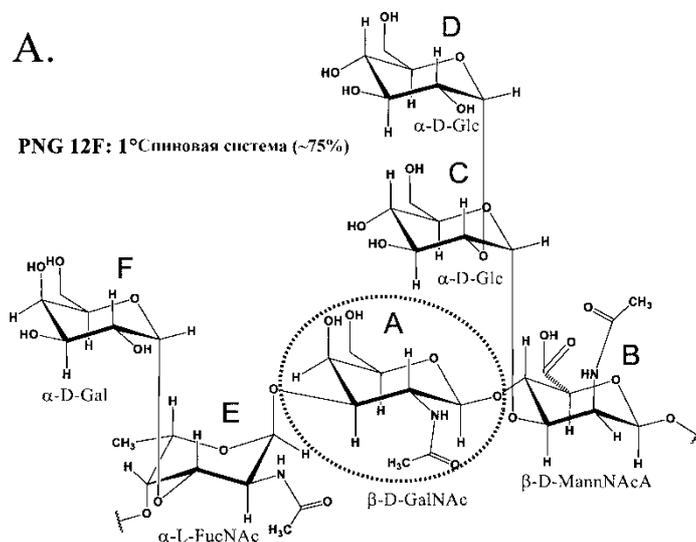
15. Иммуногенная композиция по п.13, где указанное стабильное нитроксильное радикальное соединение представляет собой свободный радикал 2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси (TEMPO) и указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид (NCS).

16. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-11, где указанный гликоконъюгат *S. pneumoniae* серотипа 12F получают способом, включающим стадии (а) осуществления взаимодействия выделенного полисахарида серотипа 12F с окисляющим агентом; (а') гашения реакции окисления путем добавления гасящего агента; (б) смешивания активированного полисахарида, полученного на стадии (а'), с CRM197 и (в) осуществления взаимодействия смешанного активированного полисахарида и CRM197 с восстанавливающим агентом с получением гликоконъюгата.

17. Иммуногенная композиция по любому из пп.11-16, где степень окисления указанного активированного полисахарида серотипа 12F составляет от 2 до 30.

18. Применение иммуногенной композиции по любому из пп.1-17 в качестве лекарственного средства.

19. Применение иммуногенной композиции по любому из пп.1-17 в качестве вакцины.

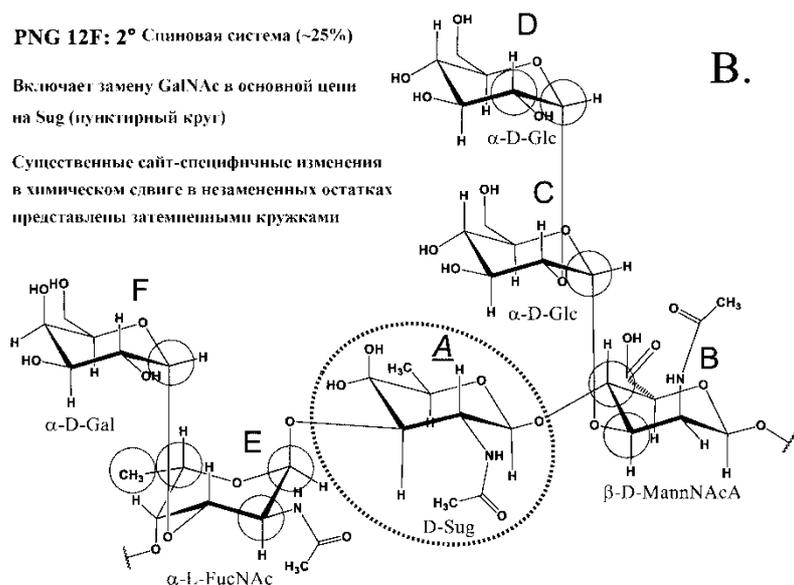


Фиг. 1А

PNG 12F: 2° Спиновая система (~25%)

Включает замену GalNAc в основной цепи на Sug (пунктирный круг)

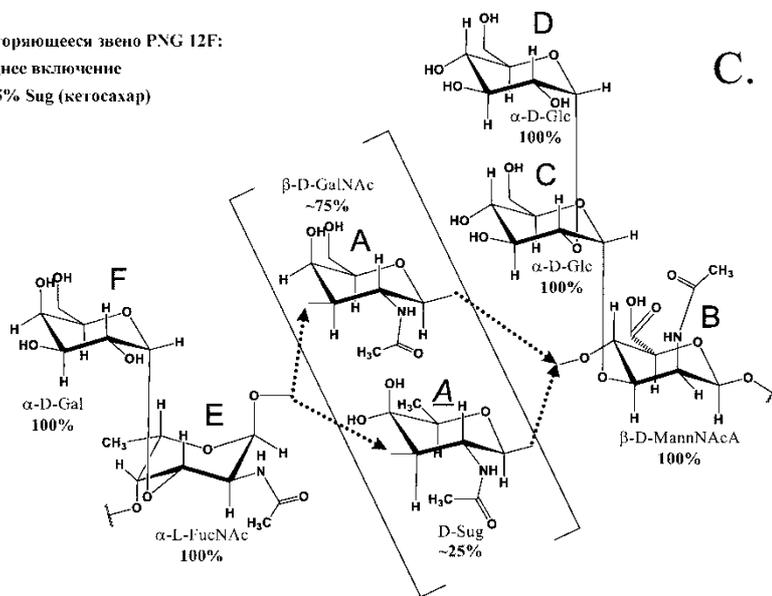
Существенные сайт-специфичные изменения в химическом сдвиге в незамененных остатках представлены затемненными кружками



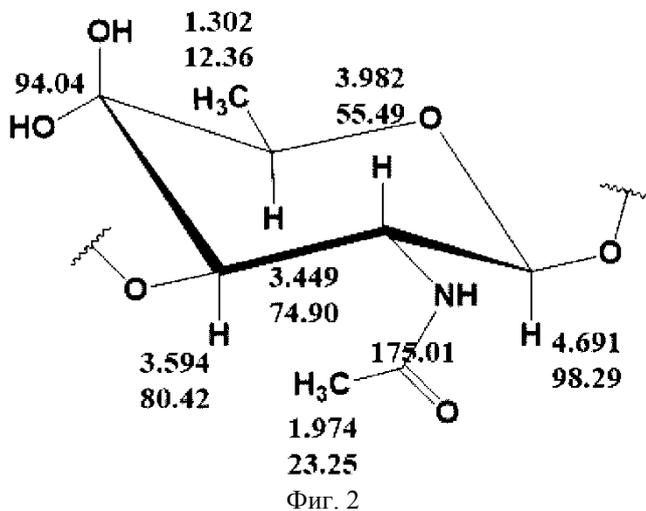
Фиг. 1B

Повторяющееся звено PNG 12F:

Среднее включение
20-25% Sug (кетосахар)

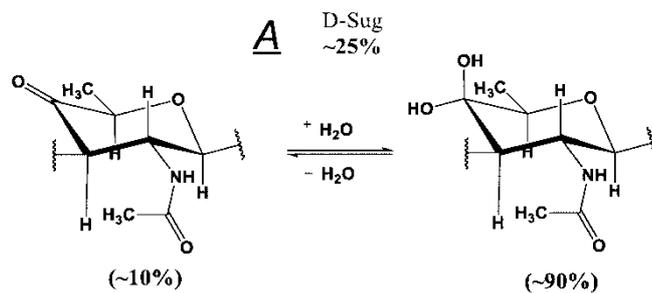


Фиг. 1C



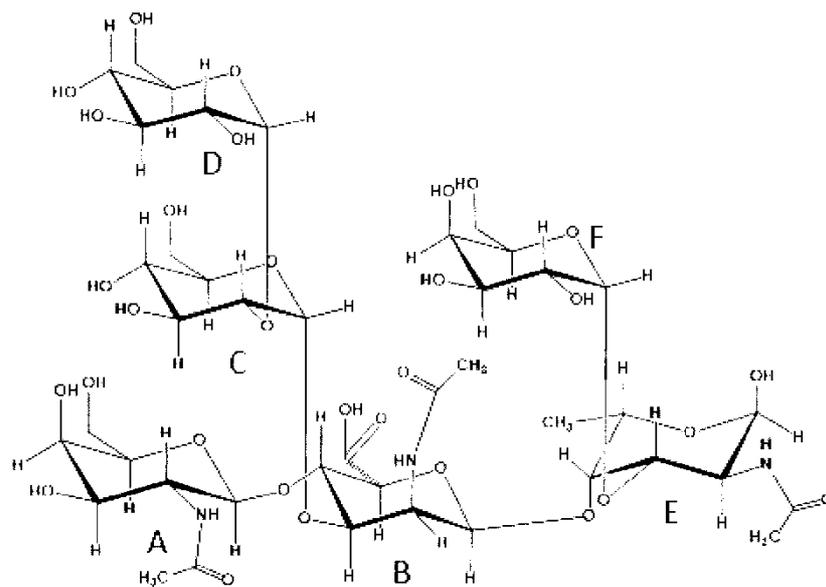
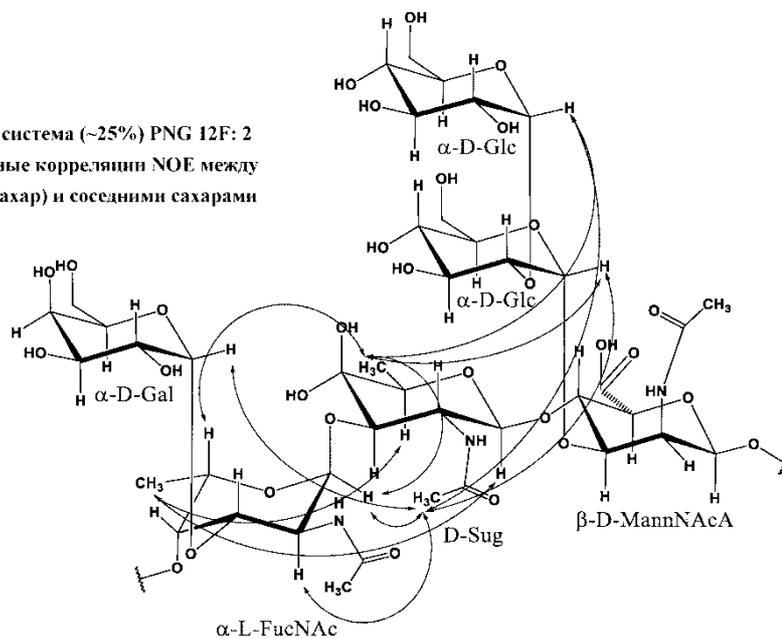
Фиг. 2

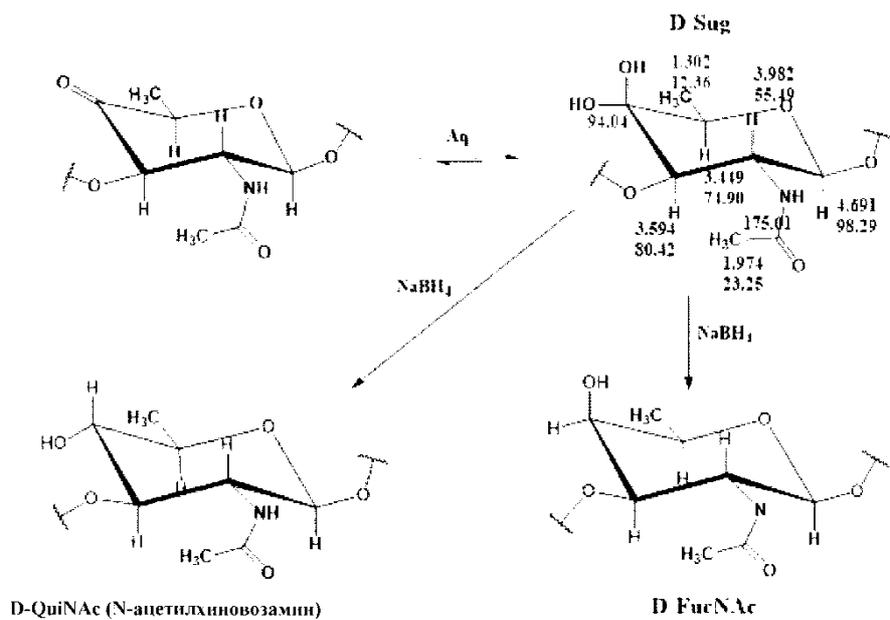
В основном объеме водного растворителя при типичном pH ~ 6
 ~90% D-Sug находится в форме гидрата и ~10% D-Sug находится в форме кетона



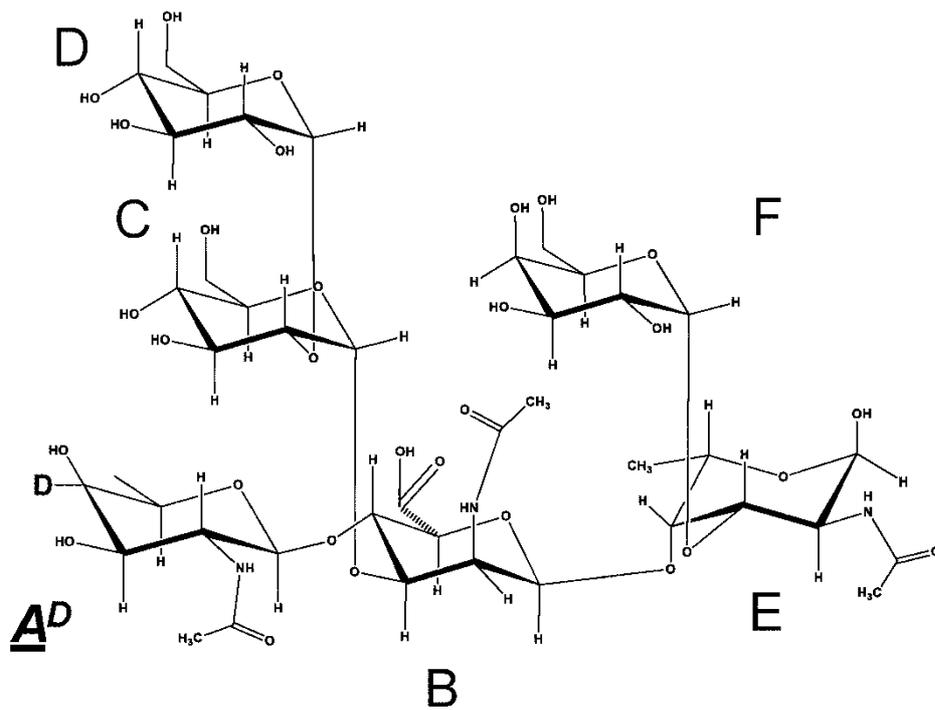
Фиг. 3

Спиновая система (~25%) PNG 12F: 2
 Разрешенные корреляции NOE между
 Sug (кетосахар) и соседними сахарами

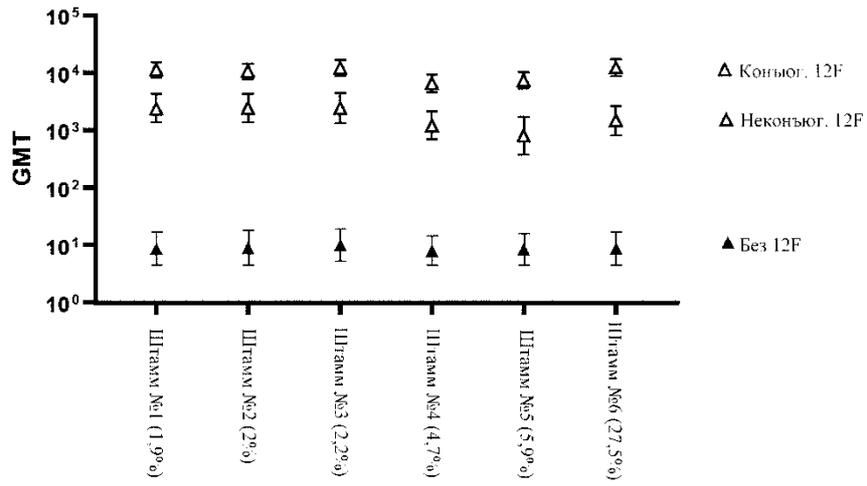




Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

