

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU⁽¹¹⁾ 2 575 752⁽¹³⁾ C2

(51) МПК
C08B 37/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012156708/13, 11.06.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.06.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
11.06.2010 PL PL391475

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2014 Бюл. № 14

(45) Опубликовано: 20.02.2016 Бюл. № 5

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: Tsujimura Misushi et al "Detection of serum thermolabile beta-2 macroglycoprotein (Hakata Antigen) by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Polysaccharide Produced by Aerococcus viridans", CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, MAR. 2001, vol.2, N3, 6 c. (c.455-456).WO 2005/051662 A1, 09.06.2005.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 11.01.2013

(86) Заявка РСТ:
PL 2011/050024 (11.06.2011)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/155859 (15.12.2011)

Адрес для переписки:
197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-ПАТЕНТ", И.И. Липатовой

(72) Автор(ы):

ЛУКАСЕВИЧ Йоланта (PL),
СВЕШКО Анна (PL),
ЦЕДЗЫНЬСКИЙ Мацей (PL),
ЛУГОВСКИЙ Чеслав (PL),
МАЦЕЕВСКАЯ Анна (PL),
ЯХЫМЕК Войцех (PL),
НЕДЗЕЛЯ Томаш (PL)

(73) Патентообладатель(и):

ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ И ТЕРАПИИ ДОСВЯДЧАЛЬНЕЙ ПАН (PL),
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ МЕДЫЧНЕЙ ПОЛЬСКЕЙ АКАДЕМИИ НАУК (PL)

C 2
2 5 7 5 7 5 2

R U
2 5 7 5 7 5 2
C 2

(54) ПОЛИСАХАРИД И ЕГО ПРОИЗВОДНЫЕ С АКТИВНОСТЬЮ К ФИКОЛИНУ-3, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

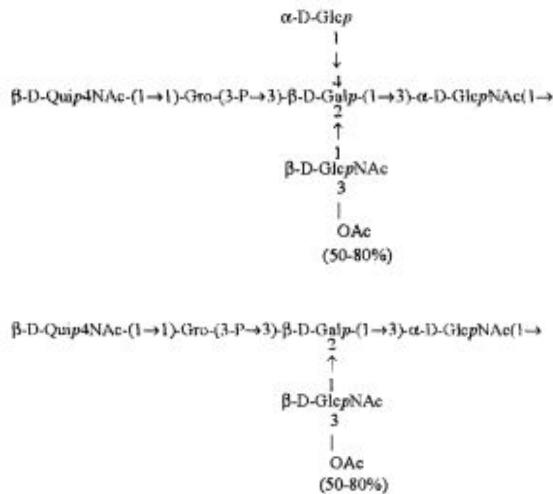
(57) Реферат:

Предложен полисахарид или его производное. Полисахарид обладает сродством к фиколину-3 и характеризуется наличием олигосахаридного повторяющегося блока общей формулы (I). Причем в формуле (I) является целым числом от 0 до 100, предпочтительно менее 50; PD_t обозначает повторяющийся олигосахаридный блок PD1_t формулы (II), повторяющийся

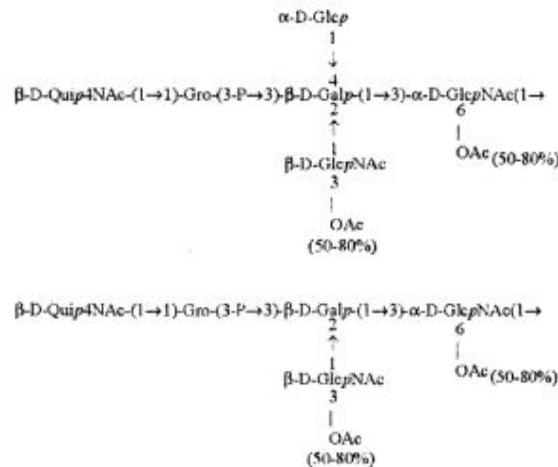
олигосахаридный блок PD2_t формулы (III) или повторяющийся олигосахаридный блок PD3_t формулы (IV); PD обозначает повторяющийся олигосахаридный блок PD1 формулы (V), повторяющийся олигосахаридный блок PD2 формулы (VI) или повторяющийся олигосахаридный блок PD3 формулы (VII); [Нер]-Kdo обозначает повторяющийся олигосахаридный блок формулы (VIII). Способ

получения предложенного полисахарида предусматривает культивирование штамма *H. alvei* и выделение бактериального липополисахарида. Полученный липополисахарид расщепляют и отделяют полисахаридную фракцию. Выделяют полисахаридную фракцию, содержащую полисахариды, образованные из повторяющихся блоков с молекулярной массой в диапазоне от 2400 до 26000 кДа. Необязательно полученные полисахариды восстанавливают, в частности в присутствии NaBH_4 , и предпочтительно коньюгируют с известным белком-носителем или хроматографической средой. Изобретение позволяет получить лиганды, которые специфично связываются с фиколином-3, и тем самым определить концентрацию активных форм фиколина-3 и их активности в организме человека. 4 н. и 10 з.п. ф.-лы, 10 ил., 3 табл., 13 пр.

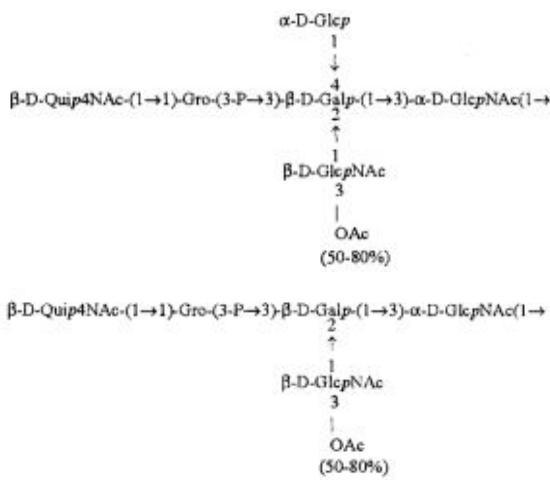
$\text{PD}_t\text{-}(\text{PD})_n\text{-}[\text{Hep}]\text{-Kdo}$ (I),



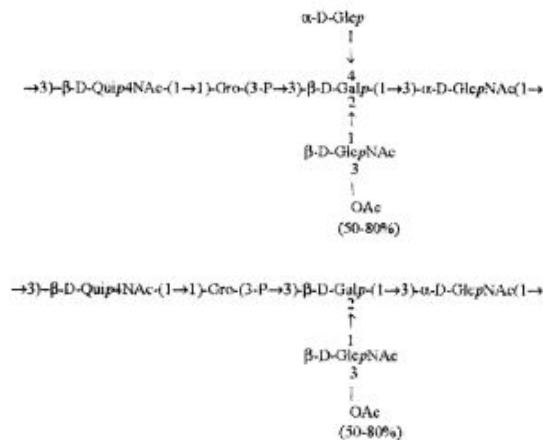
(II),



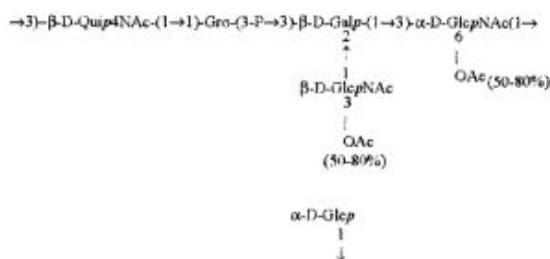
(III),



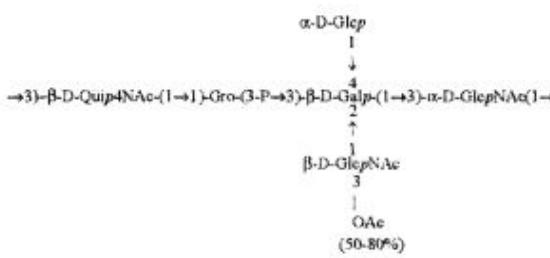
(IV),



(V),

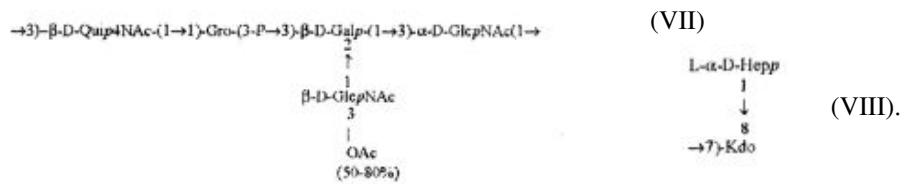


(VI),



R U 2 5 7 5 7 5 2 C 2

R U 2 5 7 5 7 5 2 C 2



RUSSIAN FEDERATION



(19) RU⁽¹¹⁾ 2 575 752⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
C08B 37/00 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2012156708/13, 11.06.2011

(24) Effective date for property rights:
11.06.2011

Priority:

(30) Convention priority:
11.06.2010 PL PL391475

(43) Application published: 20.07.2014 Bull. № 14

(45) Date of publication: 20.02.2016 Bull. № 5

(85) Commencement of national phase: 11.01.2013

(86) PCT application:
PL 2011/050024 (11.06.2011)

(87) PCT publication:
WO 2011/155859 (15.12.2011)

Mail address:
197101, Sankt-Peterburg, a/ja 128, "ARS-PATENT",
I.I. Lipatovoj

(72) Inventor(s):

LUKASEVICH Jolanta (PL),
SVEShKO Anna (PL),
TsEDZYN'SKIJ Matsej (PL),
LUGOVSKIJ Cheslav (PL),
MATsEEVSKAJA Anna (PL),
JaKhYMEK Vojtsek (PL),
NEDZELJa Tomash (PL)

(73) Proprietor(s):

INSTITUT IMMUNOLOGII I TERAPII
DOSVJaDChAL'NEJ PAN (PL),
INSTITUT BIOLOGII MEDYChNEJ
POL'SKEJ AKADEMII NAUK (PL)

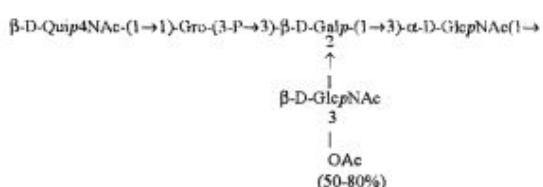
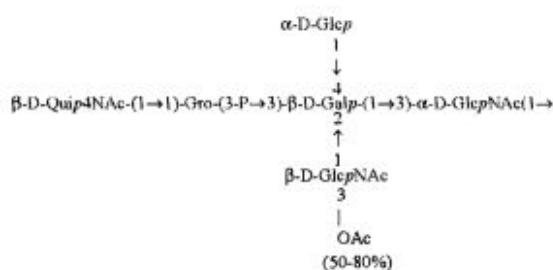
R U 2 5 7 5 7 5 2 C 2

(54) POLYSACCHARIDE AND ITS DERIVATIVES WITH ACTIVITY TO FICOLIN-3, METHOD FOR OBTAINING AND APPLICATION THEREOF

(57) Abstract:

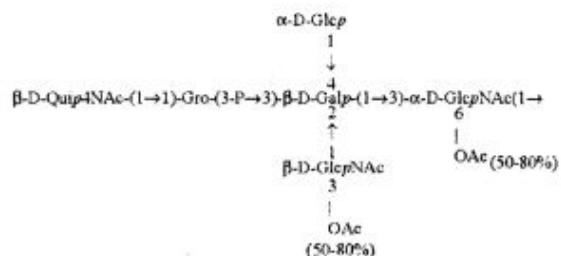
FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: polysaccharide possesses affinity to ficolin-3 and is characterised by presence of oligosaccharide repeating unit of general formula (I). In formula (I) n is integer number from 0 to 100, preferably smaller than 50; PD_t stands for oligosaccharide repeating unit PD1_t of formula

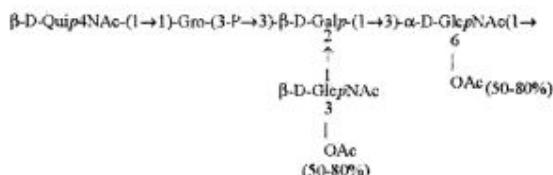


(II),

oligosaccharide repeating unit PD2_t of formula

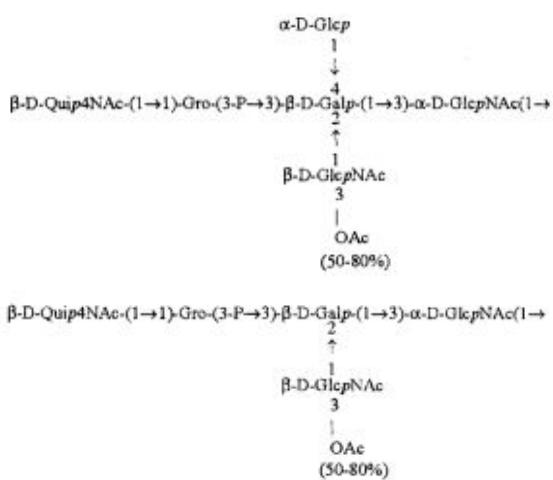


R U 2 5 7 5 7 5 2 C 2



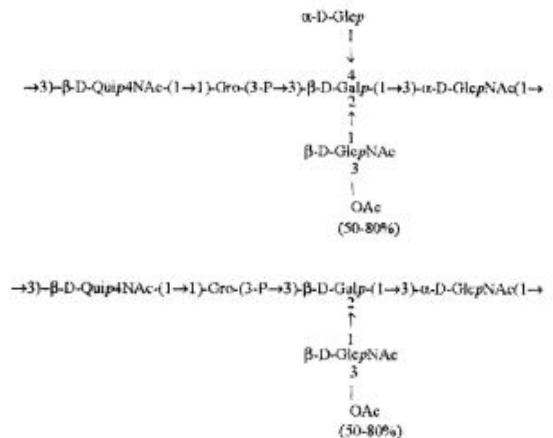
(III)

or oligosaccharide repeating unit PD3_t of formula



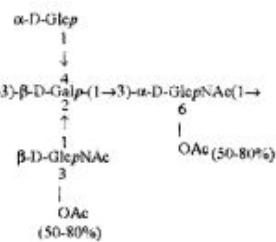
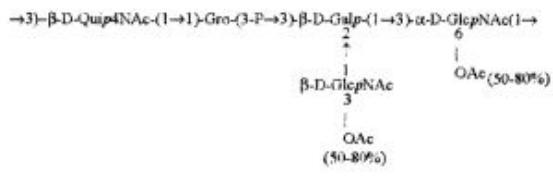
(IV),

PD stands for oligosaccharide repeating unit PD1 of formula



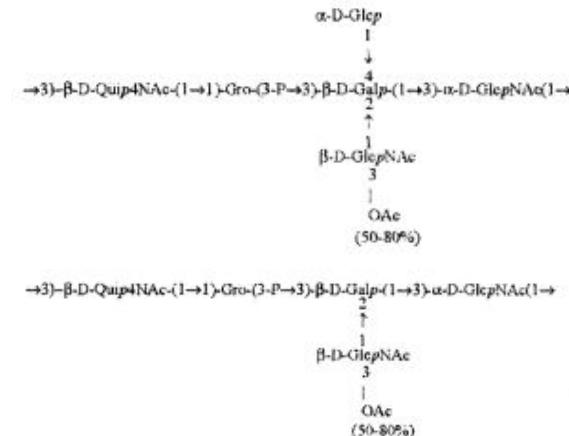
(V),

oligosaccharide repeating unit PD2 of formula



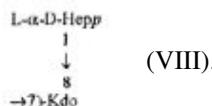
(VI),

or oligosaccharide repeating unit PD3 of formula



(VII)

[Hep]-Kdo stands for oligosaccharide repeating unit of formula



Method for obtaining claimed polysaccharide includes cultivation of H. alvei strain and separation of bacterial lipopolysaccharide. Obtained lipopolysaccharide is cleaved and polysaccharide fraction is separated. Polysaccharide fraction, containing polysaccharides, formed of repeating units with molecular weight in the range from 2400 to 26000 kDa, is separated. Obtained polysaccharides are optionally reduced, in particular in presence of NaBH₄, and preferably conjugated with known carrier-protein or chromatographic medium.

EFFECT: invention makes it possible to obtain ligands, which specifically bind with ficolin-3.

14 cl, 10 dwg, 3 tbl, 13 ex

Изобретение относится к бактериальному липополисахариду и его фрагментам, в частности к нативным и химически модифицированным полисахаридам, выделенных из липополисахаридов *Hafnia alvei*, конъюгатам таких липополисахаридов с носителями и применению полисахаридов в отдельности, а также их конъюгатов в качестве лигандов для фиколина-3 человека (фиколин-Н, антиген Nakata) в оценочных тестах.

Полисахариды, выделенные из липополисахаридов *H. alvei*, и их конъюгаты с носителями также можно применять в качестве лигандов для рекомбинантных форм человеческого фиколина-3, гомологов и аналогов человеческого фиколина-3, присутствующих в других видах, рекомбинантных форм гомологов и аналогов человеческого фиколина-3, присутствующих в других видах.

Липополисахариды (ЛПС, эндотоксин), состоящие из полисахаридной и липидной части, представляют собой амфи菲尔ные молекулы, находящиеся на поверхности грамотрицательных бактериальных клеток (Rietschel et al., 1996). Липополисахариды являются неотъемлемыми компонентами наружной мембранны оболочки клеток бактерий, которые уникальны и необходимы для функции и выживания грамотрицательных бактерий. Липополисахариды важны как факторы вирулентности грамотрицательных бактерий в случае сепсиса и септического шока (Hoist et al., 1996). Благодаря их биологической активности, ЛПС также называют эндотоксинами.

Вне зависимости от происхождения липополисахаридов, молекула, изолированная из бактерий гладкой (S) формы, характеризуется наличием следующих общих строительных блоков, включающих три области: (1) О-специфическую цепь (О-специфический полисахарид) - полимер, состоящий из повторяющихся олигосахаридных блоков, демонстрирующих высокую структурную изменчивость и определяющих серологическую специфичность ЛПС (О-антигенная специфичность); (2) коровий олигосахарид - область с ограниченной структурной межвидовой изменчивостью, которая может быть разделена на сегменты: дистальный - называемый внешним кором, участок гексозы и проксимальный сегмент, называемый внутренним кором, участок гептозы, относящийся к липиду А; (3) липид А - участок, связывающий ЛПС в наружной мембране оболочки грамотрицательных бактерий и большинства энтеробактерий, построенный из дисахарида β -D-GlcN-(1 \rightarrow 6)- α -D-GlcN, замещенного жирными кислотами, фосфатными группами и сахаридом или несахаридными заместителями (Rietschel, Brade et al., 1996). Липид А замещается коровым олигосахаридом через кетозидную связь (ketosidic linkage) между молекулой Kdo корового олигосахарида и остатком β -D-GlcN на невосстанавливющем конце углеводного остова липида А. Биологическая активность, приписываемая липополисахариду, строго связана со структурными особенностями этого участка, который представляет собой центр токсичности липополисахарида.

Аналогично бактериальной ДНК, вирусной РНК, микробактериальным гликолипидам, тейхоевым кислотам, дрожжевым маннанам и липопротеинам грамположительных бактерий, липополисахариды представляют собой так называемый патоген-ассоциированный молекулярный паттерн, ПАМП (pathogen-associated molecular pattern, PAMP). Эти молекулы представляют собой типичные структуры, присутствующие на поверхности патогенов, они не встречаются у высших организмов, но для микроорганизмов они являются важными до такой степени, что они достаточно консервативны в процессе эволюции (Aderem i Ulevitch, 2000). В клетках иммунной системы сформировалась универсальная система рецепторов, способных распознавать такие структуры и запускать быструю защитную реакцию (рецепторы включают в себя Toll-подобные рецепторы, фагоцитарные рецепторы, рецептор маннозы, а также

разнообразные растворимые молекулы, узнающие молекулярные паттерны (ПАМП), включающие компоненты системы комплемента, коллектины и антибактериальные пептиды).

Основным участком, ответственным за биологическую активность

- 5 липополисахаридов, является липид А, участок с низкой структурной изменчивостью. Основным рецептором, вовлеченным в механизмы врожденного иммунитета и в связывание с липидом А, является рецепторный комплекс CD14/TLR4/MD-2, присутствующий на поверхности макрофагов, моноцитов, нейтрофилов и В-лимфоцитов (Aderem i Ulevitch, 2000). Вслед за активацией сигнального пути происходит выработка
- 10 провоспалительных медиаторов клетками-мишениями ЛПС.

Другие участки ЛПС, О-специфический полисахарид и коровий олигосахарид, представляют собой участки, модулирующие активность липида А после взаимодействия

ЛПС с CD14/TLR4/MD-2. Благодаря свойственной им высокой структурной изменчивости, О-специфический полисахарид и коровий олигосахарид активируют

- 15 механизмы врожденного иммунитета в меньшей степени. Однако, среди всех структур ЛПС, проанализированных на сегодняшний день, были идентифицированы молекулы, способные активировать факторы врожденного иммунитета, помимо описанных выше. Структуры некоторых О-специфических цепей и коровых олигосахаридов могут узнаваться такими компонентами, как, например: маннан-связывающий лектин (МСЛ)
- 20 и другие человеческие лектин-подобные белки. Пектины связываются со специфическими углеводными структурами на поверхности патогена, а затем они активируют соответствующие эффекторные механизмы, такие как: активация или ингибирование системы комплемента, агглютинация, опсонизация (облегчение эндоцитоза), ингибирование роста микроорганизмов и модуляция провоспалительного или
- 25 аллергического ответа. Селективность и способность лектинов различать чужеродные и хозяйские структуры основана на пространственных различиях между узнаваемыми углеводами (Thiel, 2007).

Помимо МСЛ, в активацию комплемента, в один из механизмов врожденного иммунитета, вовлечена недавно открытая группа лектинов, называемых фиколинами,

- 30 лиганды которых охарактеризованы в недостаточной степени. У людей эта группа включает фиколин-1 (M), фиколин-2 (L) и фиколин-3 (H), а у мышей - фиколины A и B (Тиль, 2007).

Система комплемента представляет собой группу из нескольких десятков взаимозависимых белков, присутствующих в крови и других жидкостях организма.

- 35 Активность комплемента основана на активации каскада ферментов, запускающего серию реакций, которые играют важную роль в возникновении иммунного ответа и провоспалительных реакций. Были выявлены три способа активации комплемента: классический путь, лектиновый путь и альтернативный путь. Они отличаются, прежде всего, по стадиям активации. Активация каждого пути происходит как каскад событий,
- 40 в конечном счете, приводящих к: (I) опсонизации микроорганизмов (облегчению фагоцитоза), (II) хемотаксису макрофагов к сайту воспаления, (III) элиминации модифицированных или поврежденных клеток-хозяев, (IV) прямому лизису бактериальных клеток, вирусов, паразитов и грибов, и (V) началу воспалительной реакции.

- 45 При активации каскада комплемента через лектиновый путь ключевыми молекулами, распознающими патоген-ассоциированный молекулярный паттерн (ПАМП), являются МСЛ, фиколин-1 (M), фиколин-2 (L), фиколин-3 (H). Все эти белки имеют сходную структурную организацию. Они имеют олигомерную структуру, состоящую из базовой

субъединицы из трех полипептидных цепей. Каждая цепь включает N-домен, содержащий большое число остатков цистеина, коллаген-подобную область и лиганд-узнавающий домен. Для белка МСЛ характерен типичный лектиновый углевод-узнающий домен (англ. - carbohydrate-recognition domain, CRD). Для фиколина характерен фибриноген-подобный домен (англ. - fibrinogen-like region, FBG), который может иметь различную структуру (Thiel, 2007).

Среди перечисленных лектинов в настоящее время лучше всего охарактеризованы белок МСЛ и лиганды, полученные от патогенов, с которыми связывается этот белок. Известно, что МСЛ демонстрирует специфичность в отношении следующих

- 10 моносахаридов: D-манноза, L-фукоза, N-ацетил-О-глюкозамин, D-глюкоза, которые, как правило, являются компонентами поверхностных структур патогенов, таких как грамотрицательные и грамположительные бактерии, дрожжи, паразиты, микобактерии и вирусы (Degn et al., 2009).

В отличие от молекулярных механизмов активации МСЛ-зависимого лектинового 15 пути, активация комплемента через лектиновый путь фиколинами и, в частности, ее начальные стадии, т.е. взаимодействие фиколинов с ПАМП, является наименее охарактеризованным механизмом в системе комплемента. С точки зрения сывороточных концентраций, фиколины составляют доминирующую долю молекул, ответственных за активацию лектинового пути. В сыворотке средняя концентрация фиколина-3 (H),

- 20 фиколина-2 (M) и фиколина-1 (L) составляет 25 мкг/мл, 5 мкг/мл и 0,1 мкг/мл, соответственно, а уровень МСЛ составляет около 1-3 мкг/мл (Garred et al., 2009).

Специфичность фиколинов к лигандам мало изучена. Знания в этой области ограничиваются наблюдением того, что потенциальными лигандами для фиколинов могут являться N-ацетильные группы природных сахаров, таких как GlcNAc, GalNAc, 25 а также N-ацетилированный глицин. Лицаны для фиколинов также включают искусственно полученные лиганды, такие как N-ацетилированный бычий сывороточный альбумин (BSA-NAc), BSA-GlcNAc и N-ацетилированный липопротеин низкой плотности (LDL-NAc). Было показано, что фиколины также способны связываться с C-реактивным белком (C-reactive protein, CRP) (Thiel, 2007). Все фиколины, а также МСЛ, связываются

30 с сериновыми протеазами MASP (MBL-associated serine proteases, MBL-ассоциированные сериновые протеазы), и это позволяет им запускать активацию комплемента через лектиновый путь. В этом процессе ключевую роль играет фермент MASP-2. Из молекулярных паттернов, ассоциированных с патогенами, узнаваемыми человеческими фиколинами, в литературе описано лишь несколько примеров, которые являются

35 довольно разнообразными по химической структуре. Больше известно о лигандах для фиколина M и L. Среди лигандов для фиколина-1 (M) выявлены липотеichoевые кислоты грамположительных бактерий, бактериальные поверхностные антигены *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium*, 1,3-β-O-глюкан грибов, сиаловые кислоты и их производные, O-ацетилированные в положении 9 (Le Gout et al., 2009). Этот лектин

40 обладает сродством к N-ацетил-D-глюкозамину (GlcNAc), N-ацетил-D-галактозамину (GalNAc), и сиаловой кислоте (Neu5Ac), связываясь с их ацетильными группами (Garlatti et al.; Liu et al., 2005; Matsushita, 2007; Runza et al., 2008).

Такая особенность, которая является типичной для фиколинов, облегчает связывание 45 с несахаридными лигандами, такими как N-ацетил-L-цистеин и ацетилированный альбумин (Wittenborn et al., 2010). Сайт связывания, расположенный в фибриногеновом домене, гомологичен сайту S1 тахилектина. Фиколин M узнает поверхностные структуры некоторых штаммов стрептококков, стафилококков, *E. coli* и *S. enterica* (Runza, Schwaebel et al., 2008). Фиколин-2 (L) показывает сродство к N-ацетил-D-глюкозамину, N-ацетил-

D-галактозамину и сиаловой кислоте, но он также может связываться с несахаринными лигандами, такими как N-ацетилцистеин, N-ацетилглицин, ацетилхолин, эластин и некоторые кортикоиды, а также окисленные и ацетилированные формы ЛНП или ДНК (Matsushita, 2007; Thiel, 2007; Runza, Schwaebel et al., 2008; Garred, Honore et al., 2009;

⁵ Garred et al., 2010; Matsushita, 2010). Было показано, что фиколин L узнает некоторые из липополисахаридов, капсулные полисахариды, A-1-3-D-глюканы грибов и липотефоевые кислоты. Благодаря этому он связывается с некоторыми штаммами *S. enterica* и *E. coli*, но в первую очередь со стафилококками и стрептококками:

Staphylococcus aureus, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* и *S. agalactiae* (Matsushita, 2007).

¹⁰ Возможно, связывание с бета-гемолитическими стрептококками группы В (*Streptococcus agalactiae*) является особенно важным, поскольку эти бактерии являются наиболее частой причиной менингита и сепсиса у новорожденных. Среди лигандов для этого лектина также описаны трисахариды и тетрасахариды, содержащие на конце LacNAc-(β -Gal[3-O-SO₃][6-O-SO₃]-(1→4)-(β -GlcNAc-носитель) или GlcNAc, гепарин (его

¹⁵ фиброногенный домен) и высоко сульфатированные гликозаминогликаны (Gout, Garlatti et al., 2009).

Фиколин Н (также известный как фиколин 3 или антиген Nakata, первоначально описанный как термолабильный макроглобулин β 2) синтезируются в гепатоцитах, клетках эпителия желчных протоков, альвеолярных клетках II типа, в эпителии бронхов и глиальных клетках. Низкий уровень экспрессии был выявлен в клетках сердца, почек, поджелудочной железы, селезенки и плаценты. Белок высвобождается в кровь, желчные протоки и слизь, покрывающую дыхательные пути. Поскольку количество фиколина Н, синтезируемого в легких, выше, чем в печени, вероятно, этому лектину можно приписать не только системную (поскольку он высвобождается в кровь), но и локальную защитную роль в дыхательных путях. Его концентрация в сыворотке крови здоровых взрослых людей является относительно высокой. Согласно первоначальной широком цитируемой работе (Yae et al., 1991), такая концентрация колеблется от 7 до 23 мкг/мл (в среднем около 18 мкг/мл). Последние данные, опубликованные Андерсеном и соавторами (Andersen et al., 2009) указывают на то, что она может быть даже выше (в среднем выше 32 мкг/мл, в диапазоне от 10 до более 80 мкг/мл). Среди лигандов фиколина-3 (Н) был выявлен полисахарид, выделенный из бактерий *Aerococcus viridans* 86965 (вероятно, капсулный полисахарид) (Tetta et al., 1998; Matsushita et al., 2002), BSA-NAC (Lacroix et al., 2009; Munthe-Fog et al., 2009), BSA-Gal, D-фукозы и D-галактозы (Gout, Garlatti et al., 2009), поверхностные антигены клеточной линии лимфомы Т-лимфоцитов (клеточная линия Jurkat) (Gout, Garlatti et al., 2009).

Как показано в тестах на агглютинацию и анализе ингибиции агглютинации человеческих эритроцитов (Sugimoto, Yae et al., 1998), фиколин-3 связывается с ЛПС из *Salmonella Minnesota* и *Typhimurium*, а также *E. coli*. В процитированном выше исследовании Gout и соавторов (Gout, Garlatti et al., 2009) предприняты наиболее точные попытки определить специфичность фиколинов к сахаридным лигандам. В этом исследовании был использован матрикс (гликоматрикс), содержащий 377 родственных гликанов. Анализируемые гликаны как природные, так и синтетические, представляли собой компоненты, встречающиеся в клетках млекопитающих.

Как показано, специфичность фиколина-3 (Н) по отношению к лигандам очень слабо ⁴⁵ охарактеризована. Кроме того, по последовательности аминокислот фиколин-3 (Н) существенно отличается от других фиколинов, демонстрируя лишь 45% гомологии с фиколином-1 и фиколином-2 и 58% гомологии с доменом FGB. Что касается различных типов синтетических соединений, недавно было показано, что фиколин-3 также

связывается с BSA-NAc (Munthe-Fog, Hummelshoj et al., 2009). Лиганд BSA-NAc был использован в упомянутом исследовании для индукции активации лектинового пути сывороткой крови человека. Взаимодействие фиколина-3 как с BSA-NAc, так и с бактериями штамма A. viridans 86965 и их полисахаридами не были охарактеризованы

- 5 на молекулярном уровне (Tsujimura et al., 2002). Как уже отмечалось, специфичность фиколинов очень плохо изучена и в настоящее время продолжаются споры о природе химических лигандов, которые они признают. Химическая структура некоторых ПАМП или наличие специфичных антител в крови подтверждает предположение, что они могут активировать систему комплемента одновременно через все пути: классический путь,
- 10 лектиновый путь и альтернативный путь. Кроме того, эти пути активации системы комплемента взаимозависимы на определенных этапах. На настоящий момент описан механизм усиления классического и лектинового пути через активацию альтернативного пути (Degn, Hansen et al., 2009).

Для исследований, направленных на выяснение механизмов, лежащих в основе таких процессов, проводимых *in vitro*, *in vivo* или с использованием изолированных модельных систем типа лиганд-белок, требуется широкий ассортимент экспериментальных инструментов, позволяющих выделять и очищать ключевые белки, определять их уровень в жидкостях организма и тестировать их активность с использованием иммунохимических методов и блокирования их активности. Как показано в большинстве

- 20 исследований механизмов иммунной системы, комплемент представляет собой сложную систему в отношении применяемых методов исследований.

В настоящее время основной упор делается на получении таких экспериментальных инструментов, которые позволяют оценивать различные способы активации комплемента независимо, в условиях, приближенных к физиологическим (Herpers et al., 2009; Inoshita et al., 2009). В таких тестах важное значение имеет выбор адекватного лиганда, и эта задача является чрезвычайно трудной в случае фиколинов из-за отсутствия соответствующих данных. Был описан коньюгат BSA-NAc, и он используется как лиганд для фиколина-3 (Н). Однако он не встречается в природе и был получен в результате химического синтеза.

- 30 Определение уровня фиколина, активности и способности активировать систему комплемента является важным в отношении диагностики и определения характеристик иммунодефицитов, связанных с комплементом, что часто связано с полиморфизмом в генах, кодирующих лектин. Как было показано с помощью достаточно хорошо охарактеризованного примера МСЛ человека, последствия мутации могут включать нарушения структуры и функции, более короткий период полужизни и снижение концентрации в сыворотке крови. Для МСЛ последствия такой недостаточности наиболее критичны для людей с незрелой или неисправной иммунной системой, и чаще всего они включают повышенную восприимчивость к инфекции (иногда угрожающую жизни). Можно предположить, что в результате дальнейших исследований значения
- 35 фиколинов, их роль в иммунном ответе и клинические эффекты, связанные с их дефицитом, будут выяснены и документально подтверждены. Так, по-прежнему крайне мало опубликованных данных о потенциальных рисках, которые могут быть обусловлены недостатком фиколина-2 (L). Более высокая распространенность такой недостаточности (определенная количественно) наблюдается у женщин с рецидивами
- 40 самопроизвольных выкидышей (Kilpatrick et al., 1999). Значительно более низкие концентрации фиколина L также наблюдались у беременных женщин с преэклампсией, по сравнению со здоровыми беременными женщинами (Wang et al., 2007). В будущем исследование одиночных нуклеотидных полиморфизмов в гене FCN2, кодирующем
- 45

фиколин-2, и концентрации белка может быть полезным диагностическим инструментом. У детей с недостатком фиколина L наблюдается более высокая частота мутаций в положениях 64 и 6424, по сравнению с детьми с высоким содержанием этого белка. Напротив, частота вариантов аллелей пары -4 и 6359 значительно ниже у детей с недостатком фиколина L (Cedzynski et al., 2007). Также у детей с повторяющимися 5 респираторными инфекциями, сопровождающимися астмой и аллергическим ринитом, наблюдается более высокий показатель распространения дефицита количества фиколина, по сравнению со здоровыми детьми (но без исключения детей с повторяющимися 10 инфекциями и аллергическими заболеваниями) (Atkinson et al., 2004; Cedzynski et al., 2009).

Было показано, что дефицит фиколина L увеличивает риск преждевременных родов, низкого веса при рождении и врожденные инфекции (Swierzko et al., 2009).

Физиологическая роль фиколина H и клиническое значение его недостаточности изучены 15 в незначительной степени. Показано, что у лиц с саркоидозом наблюдаются значительно более низкие концентрации этого лектина, по сравнению с контрольной группой (Svendsen et al., 2008).

Попытки выявить, влияет ли дефицит этого фактора на риск возникновения вспышки заболевания, влияет ли заболевание на регуляцию экспрессии гена FCN3, происходит ли потребление активного белка, не увенчались успехом. Более 20 низкие концентрации фиколина H также выявлены у пациентов с системной красной волчанкой, и, как упоминалось ранее, это связано с выработкой аутоантител, направленных против этого белка, но не с генетически детерминированными нарушениями синтеза (Yae, Inaba et al., 1991; Andersen, Munthe-Fog et al., 2009).

Концентрация в сыворотке фиколина H резко повышается во время беременности, что 25 может указывать на его важную защитную роль. Однако, как отмечалось выше, значительно более низкие концентрации фиколина L наблюдались у беременных женщин с преэкламсией, по сравнению со здоровыми беременными женщинами. В синцитиотрофобластах из плаценты больных женщин было обнаружено значительное количество фиколина H, что предположительно связано с местным воспалительным процессом и указывает на вероятное участие белка в патологии (Wang, Yim et al., 2007).

Недавно Шлапбах с соавторами показал, что низкая концентрация фиколина H в 30 сыворотке крови детей, перенесших противоопухолевую химиотерапию, увеличивает риск нейтропенической лихорадки и сепсиса (Schlapbach et al., 2009). Фукутоми с соавторами отметил, что концентрация фиколина H также снижается с развитием цирроза печени, поэтому его концентрация может служить диагностическим маркером, 35 указывающим на уровень дисфункции этого органа (Fukutomi et al., 1996).

Лечение некоторых иммунодефицитов основано на доставке (замещении) соответствующего фактора, полученного от здоровых доноров или его рекомбинантной формы. Рекомбинантный или нативный белок МСЛ в настоящее время проходит клинические испытания как потенциальное лекарственное средство в случаях 40 недостаточности этого лектина.

Отправной точкой для диагностики недостаточности, мониторинга терапии такой недостаточности, а также объяснения ее механизмов являются методы определения концентрации и активности в жидкостях организма. Первым шагом в лечении этого типа недостаточности является получение активных, очищенных препаратов этого 45 белка в нативной или рекомбинантной форме.

Для определения концентрации фиколина-3 в жидкостях организма в основном используются два метода. Один из них («сэндвич»-ИФА) основан на применении моноклональных антител против человеческого фиколина-3 (H), используемых как в

качестве так называемых «антител захвата», так и в качестве детектирующих антител для детекции белков. Во втором методе используется бычий альбумин, который химически модифицирован путем N-ацетилирования (BSA-NAc). В настоящее время доступен коммерческий тест, разработанный компанией Hycult, который позволяет определить общую концентрацию фиколина-3 (H) с использованием «сэндвич»-ИФА.

Что касается второго способа, в котором используется в качестве лиганда коньюгат BSA-NAc, недавно была описана возможность его применения на практике для оценки активности комплексов фиколина-3-MASP (Munthe-Fog, Hummelshoj et al., 2009).

Первый метод позволяет определить уровень белка в сыворотке, который не

обязательно отражает уровень активной формы фиколина-3. Второй метод отличается недостаточно описанным молекулярным механизмом взаимодействия фиколина-3 (H) с N-ацетильными группами. Кроме того, BSA-NAc не является природным лигандром.

Целью в соответствии с настоящим изобретением является предоставление лигандов, которые специфично связываются с фиколином-3, и способа их получения, которые можно применять для определения концентрации активных форм фиколина-3 и их активности. Неожиданно, эта цель была достигнута в настоящем изобретении.

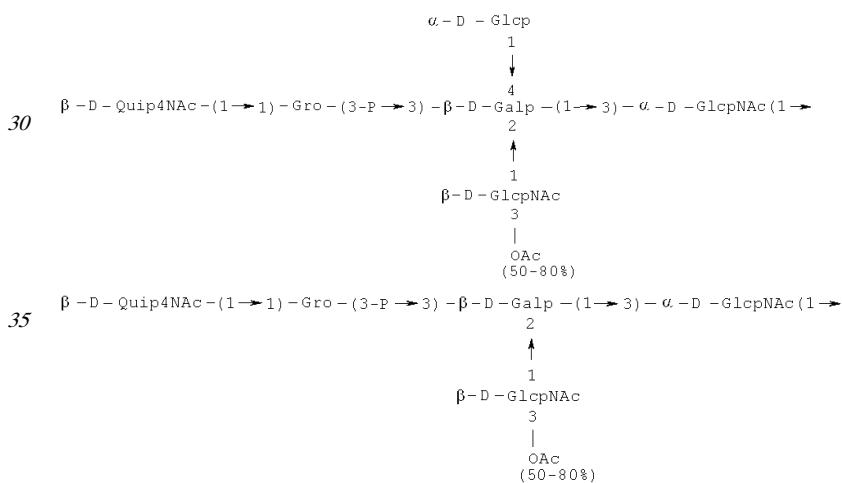
Предметом в соответствии с настоящим изобретением является полисахарид со сродством к фиколину-3 или его производное, отличающийся тем, что его структура описывается общей формулой:

PD_t-(PD)_n-[Hep]-Kdo

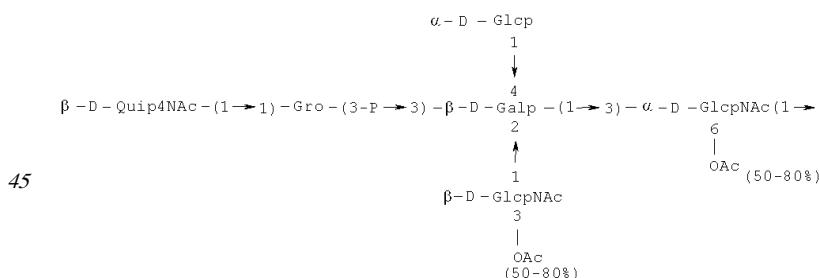
где n является целым числом от 0 до 100, предпочтительно менее 50, более предпочтительно менее 40, а в случае полисахаридов бактериального происхождения обычно менее 30,

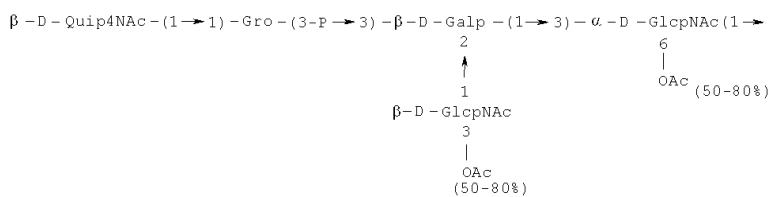
PD_t обозначает:

- повторяющийся олигосахаридный блок (repeating oligosaccharide unit) PD1t, имеющий формулу:



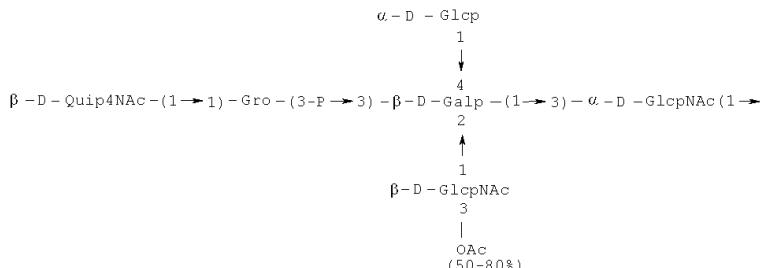
- повторяющийся олигосахаридный блок PD2t, имеющий формулу:



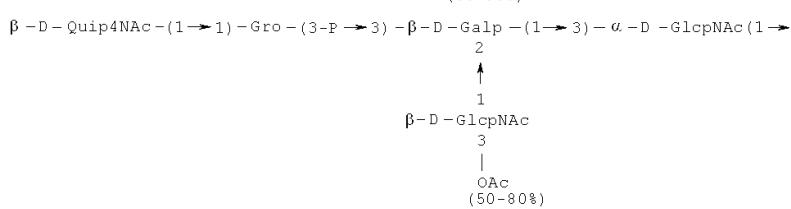


5

- повторяющийся олигосахаридный блок РD3_t, имеющий формулу:



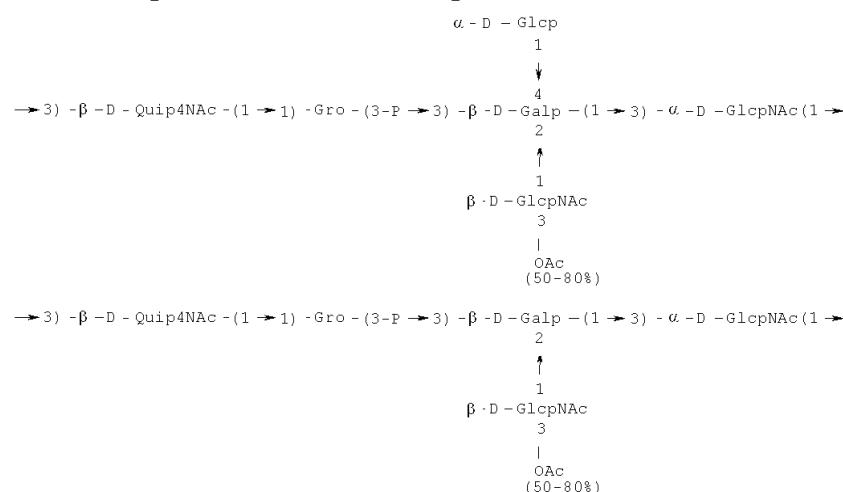
10



PD обозначает:

20

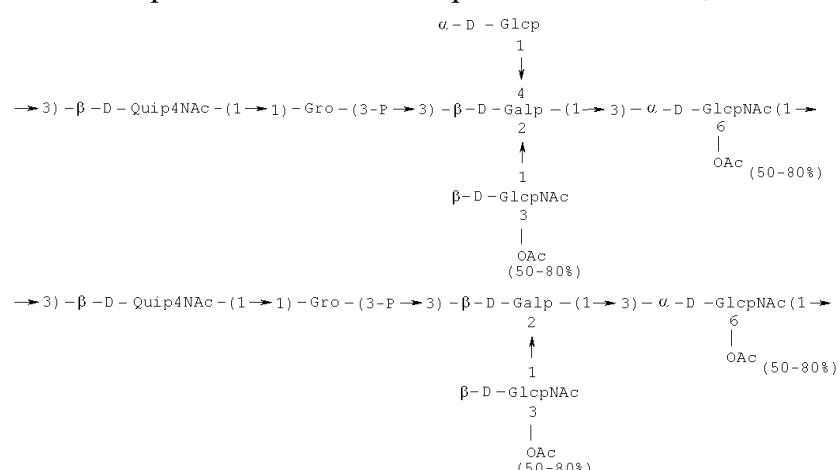
- повторяющийся олигосахаридный блок PD1, имеющий формулу:



30

- повторяющийся олигосахаридный блок PD2, имеющий формулу:

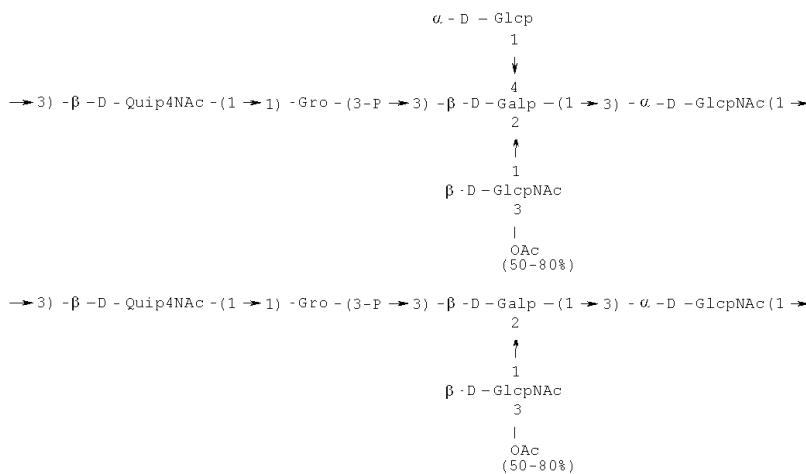
35



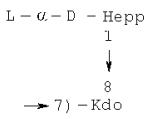
45

ИПИ

- повторяющийся олигосахарилный блок РД3, имеющий формулу:



- [Hep]-Kdo обозначает дисахарид, имеющий формулу:



Предпочтительно, полисахарид в соответствии с настоящим изобретением отличается тем, что он содержит соединения, выбранные из полисахаридов общей формулы:

PD1_t-PD1-[Hep]-Kdo, PD2_t-PD2-[Hep]-Kdo or PD3_t-PD3-[Hep]-Kdo.

В равной мере предпочтительным является производное полисахарида в соответствии с настоящим изобретением, который характеризуется тем, что оно выбрано из группы, включающей восстановленный полисахарид PD_t-(PD)_n-[Hep]-Kdo, его конъюгат с известным белком-носителем или хроматографическим носителем.

В соответствии с настоящим изобретением фраза «восстановленный полисахарид PD_t-(PD)_n-[Hep]-Kdo» обозначает соединение, в котором остаток Kdo присутствует в виде линейного полиспирта, 1-карбокси-3-дезоксиоктитола, в котором первый и третий атом углерода заменен карбоксильной и дезокси-группой, соответственно. Такое производное образуется в результате восстановления, в частности с применением боргидрида натрия.

Известные белки-носители, применяемые для получения конъюгата в соответствии с настоящим изобретением, могут представлять собой сывороточный альбумин позвоночных, оваальбумин.

Известные хроматографические носители, которые можно применять для получения конъюгатов в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно представляют собой модифицированную агарозу, целлюлозу или полиакриламид.

Кроме того, изобретение относится к способу получения полисахаридов и их производных со сродством к фиколину-3, отличающейся тем, что:

- а) выделяют бактериальный липополисахарид, предпочтительно из штамма *H. alvei*,
- б) полученный липополисахарид расщепляют и отделяют полисахаридную фракцию,
- в) выделяют полисахаридную фракцию, содержащую полисахариды, образованные из повторяющихся блоков с молекулярной массой в диапазоне от 2400 до 26000 кДа,
- г) как альтернатива, полученные полисахариды восстанавливают, в частности, в присутствии NaBH₄ и, предпочтительно, конъюгируют с известным белком-носителем или хроматографическим носителем.

Предпочтительно, способ в соответствии с настоящим изобретением отличается тем, что культивирование штамма *H. alvei* осуществляется на этапе (а), и такой штамм *H. alvei* выбран из штаммов: *H. alvei* 981, 1200, 1203, 1205, и 1208. Эти штаммы были

депонированы 07 июня 2010 г. в Польской коллекции микроорганизмов (Институт иммунологии и экспериментальной терапии Польской академии наук, Вроцлав) в соответствии с Будапештским договором, под номерами, представленными в следующей Таблице:

Штамм	Номер доступа в Польской коллекции микроорганизмов (PCM)
H. alvei 981	B/00030
H. alvei 1200	B/00031
H. alvei 1203	B/00032
H. alvei 1205	B/00033
H. alvei 1208	B/00034

Предпочтительно, способ в соответствии с настоящим изобретением отличается тем, что экстрагирование липополисахарида из бактериальной массы осуществляют на этапе (а) в течение примерно 15 минут при температуре около 65°C в водном растворе фенола, предпочтительно растворе фенола в концентрации около 45%, с последующим восстановлением липополисахарида из отделенной водной фазы.

Предпочтительно, способ в соответствии с настоящим изобретением отличается тем, что отделенный полисахарид гидролизуют на этапе (б) в примерно 1-1.5% растворе уксусной кислоты, примерно от 15 до 60 мин при температуре 100°C.

Предпочтительно, способ в соответствии с настоящим изобретением отличается тем, что полисахаридную фракцию разделяют с помощью хроматографии на этапе (в) для отделения О-специфических цепей от более коротких цепей полисахаридов и коровых олигосахаридов, при этом хроматографию предпочтительно проводят на колонке, заполненной полиакриламидным гелем, таким как коммерчески доступный Bio-Gel P-10, уравновешенной буфером, содержащим 0,05 М пиридин/уксусная кислота/вода в соотношении 10/4/986 при pH около 5,6.

Предпочтительно, способ в соответствии с настоящим изобретением отличается тем, что полученные полисахариды восстанавливают и конъюгируют с белком-носителем на этапе (г), при этом такой белок-носитель может, в частности, представлять собой бычий сывороточный альбумин или хроматографический носитель, и особенно предпочтительным является модифицированная агароза, такая как коммерчески доступная сефароза Sepharose ®.

Еще одним аспектом в соответствии с настоящим изобретением является применение бактериального липополисахарида или полисахарида, содержащегося в нем, или их производных в качестве лиганда для фиколин-3, в частности для очистки или детекции фиколина-3 или его производных.

Как используется в настоящей заявке, термин «фиколин-3» или «его производные» относится к человеческому фиколину-3, который может представлять собой природный белок или белок, полученный искусственным путем, в частности рекомбинантный белок, в том числе возможные мутантные формы и другие производные, имеющие по существу активность природного фиколина-3.

Предпочтительно, применение в соответствии с настоящим изобретением отличается тем, что применяют липополисахарид, полученный из штаммов: H. alvei 981, 1200, 1203, 1205, 1208, или полисахарид, содержащийся в нем или его производное. Как описано выше, все штаммы, относящиеся к данной заявке, были депонированы в Польской коллекции микроорганизмов.

Предпочтительно, применение в соответствии с настоящим изобретением отличается тем, что применяют полисахарид или его производное в соответствии с настоящим изобретением, которые определены выше или получены способом в соответствии с

настоящим изобретением, как описано выше.

Предпочтительно, применение в соответствии с настоящим изобретением отличается тем, что производное фиколина-3 представляет собой комплекс фиколина-3 с сывороточными или полученными из плазмы сериновыми протеазами, MASP (МСЛ-ассоциированными сериновыми протеазами).

Также предпочтительное применение в соответствии с настоящим изобретением отличается тем, что для определения активности и/или уровня фиколина-3 или его производных в сыворотке крови и других жидкостях организма осуществляют очистку.

Кроме того, предпочтительное применение в соответствии с настоящим изобретением

10 отличается тем, что очистка проводится с целью получения сыворотки или плазмы, лишенной фиколина-3.

В начале подробного описания выбранных предпочтительных вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением следует отметить, что отправной точкой настоящего изобретения послужило открытие с помощью дот-блот 15 анализа сильного взаимодействия между человеческим фиколином-3 (Н) и бактериальными липополисахаридами, в частности, ЛПС, изолированными из штаммов *H. alvei* 2, 23, 37, 38, 981, 1200, 1203, 1205 и 1208. Пара ЛПС-фиколин представляет собой еще один пример ключевого взаимодействия, которое является важным для врожденного иммунитета. Липополисахарид (ЛПС) представляет собой один из молекулярных 20 паттернов ПАМП, а также основной поверхностный антиген и фактор вирулентности грамотрицательных бактерий, а фиколин-3 (Н) является компонентом системы комплемента (ключевой механизм врожденного иммунитета), который связывается с ЛПС и активирует каскад комплемента через лектиновый путь.

В ходе исследований, которые привели к настоящему изобретению, авторы 25 изобретения идентифицировали и выделили бактериальные лиганды, в которых специфично и прочно связываются, в частности, с человеческим фиколином-3 (Н). В предпочтительном варианте реализации в соответствии с настоящим изобретением, лиганды представляют собой полисахаридные фрагменты липополисахаридов *H. alvei*, которые получают путем химической деградации липополисахарида. В результате скрининга ЛПС *H. alvei* было выявлено девять ЛПС, составляющих область, с которой 30 связывается человеческий фиколин-3 (Н): ЛПС 2, 23, 37, 38, 981, 1200, 1203, 1205 и 1208. Полная структура этих липополисахаридов на сегодняшний день не была определена и не была опубликована. Единственно доступными были данные, касающиеся структуры повторяющихся блоков О-специфических цепей, присутствующих в ЛПС 2, 23, 38, 1200, 35 1203, 1205, 1208 (Gamian et al., 1991, Katzenellenbogen et al., 1992, Katzenellenbogen et al., 1999; Dag et al., 2004). Эти структуры были определены с помощью инструментальных и химических анализов высокомолекулярных фракций О-специфических полисахаридов, имеющих число повторяющихся блоков, большее или равное 4. Такие фракции были получены путем кислого гидролиза липополисахарида в присутствии детергента (1,5% 40 CH_3COOH , 2% SDS) в течение 15 мин при 100°C. Такие условия обеспечили гидролиз кислотолабильной кетозидной связи между липидом М и сахаром в ЛПС (коровий олигосахарид, замещенный О-специфической цепью). После отделения липида А полученную смесь поли- и олигосахаридов разделяли с помощью гель-фильтрационной хроматографии. Учитывая современные представления об общей структуре 45 липополисахаридов энтеробактерий, наличие гликозидной связи между коровым олигосахаридом и О-специфической цепью, которая не разрушается при таких условиях, как правило, должно приводить к образованию продуктов, включающих коровий олигосахарид и полисахаридные фракции, образованные коровым олигосахаридом,

замещенным с помощью различного числа повторяющихся блоков О-специфической цепи. В ходе последующих исследований липополисахаридов *H. alvei*, которые привели к настоящему изобретению, авторы настоящего изобретения выявили необычный структурный элемент, отличающийся от известных ЛПС энтеробактерий: наличие остатка Kdol в дистальной области корового олигосахарида (Lukasiewicz et al., 2009). Был выделен фрагмент ЛПС *H. alvei* 32, содержащий сахарную часть липида A, замещенного коровым олигосахаридом, содержащий на конце трисахаридный фрагмент L- α -D-Нерр-(1 \rightarrow 4)-[α -D-Galp6OAc-(1 \rightarrow 7)]- α -Kdop-(2 \rightarrow]. Наличие двух областей Kdo внутри молекулы ЛПС существенно изменяет состав смеси поли- и олигосахаридов, полученных в результате кислого гидролиза ЛПС. Для ЛПС *H. alvei* гидролиз связи кетозидной связи происходит в двух местах: (I) между липидом A и остатком Kdol, который замещает липид A, и (II) между остатком Kdol, присутствующим во внешней части коровой области олигосахарида, и остальной частью коровой области. Для липополисахарида, фрагменты которого представляют предмет одного из аспектов в соответствии с настоящим изобретением, было показано, что остаток Kdol представляет собой место замещения О-специфической цепи. Таким образом, было возможно получить полисахариды, лишенные почти всей коровой области, с мотивом Нер-Kdo на его восстанавливающих концах в результате кислого гидролиза ЛПС *H. alvei* 23, 1200, 1203, и 1205. Таким образом, данное сообщение является первым раскрытия присутствия этого элемента в О-специфических полисахаридных фракциях, выделенных из ЛПС *H. alvei* 1200, 1203 и 1205. Эти полисахариды построены из одного, двух и больше углеводных повторяющихся блоков. Кроме того, настоящее изобретение представляет собой первое сообщение о строении биологических повторяющихся блоков О-специфического полисахарида *H. alvei* ЛПС 1200, 1203 и 1205. Что касается структурного анализа повторяющихся блоков О-специфических цепей ЛПС *H. alvei*, структурный элемент Нер-Kdo, описанный в настоящей заявке, не был выявлен в процитированных выше публикациях (Jachymek et al. 1995; Sunday et al., 1996, Petersson et al., 1997; Jachymek et al., 1999, Dag et al., 2004). Эти исследования были проведены для фракций, содержащих полимеры с числом повторяющихся единиц больше чем 4-5. Мотив Нер-Kdo не был обнаружен в связи с преобладанием компонентов повторяющихся блоков. Фрагмент О-специфической цепи, содержащий от 4 до 8 сахарных остатков, характерных для О-специфической цепи и дисахаридом Нер-Kdo на восстанавливающем конце был выделен только в том случае ЛПС *H. alvei* 2 (Gamian, Romanowska et al., 1991).

Примерами лигандов фиколина-3, раскрытых в настоящей заявке, являются 35 полисахаридные фрагменты липополисахаридов *H. alvei* 1200, 1203, 1205, в частности ЛПС 1200, которые получают путем химической деградации липополисахарида. Эти полисахариды имеют структуру общей формулы:

PS1: PD1_t-(PD1)_n-[Нер]-Kdo,

PS2: PD2_t(PD2)_n-[Нер]-Kdo,

40 PS3: PD3_t(PD3)_n-[Нер]-Kdo,

где символ PD обозначает субъединицу О-специфических цепей, изолированных из липополисахаридов *H. alvei* 1200 (PD1), 1203 (PD2) и 1205 (PD3), соответственно.

Кроме того, все полисахариды дополнительно О-ацетилированы (Фиг.1). Число n 45 является целым числом, большим или равным 0. Дисахарид, обозначенный символом «[Нер]Kdo», имеет следующую структуру: →7)-[L-глицеро-D-манно-Нер-(1→8)-]-Kdo. Независимо от типа повторяющегося блока (PD1 или PD2, или PD3), этот дисахарид замещен в положении 7 остатка Kdo первым остатком О-специфической цепи

повторяющегося блока. →3)-(-D-GlcNAc является первым остатком в случае PD1, PD2, PD3. Структуры фрагментов PD1_t-(PD1)_n-[Hep]-Kdo (n=1), PD2_t-(PD2)_n-[hep]-Kdo (n=1), PD3_t(PD3)_n-[Hep]-Kdo (n=1) показаны на Фиг.1. Символы PD1_t, PD2_t и PD3_t обозначают концевые повторяющиеся блоки на невосстановливающем конце каждого полисахарида.

5 В случае PD1_t, PD2_t и PD3_t β-D-Quip4NAc-(1→ является концевым сахаром на невосстановливающем конце концевой субъединицы.

Все полисахариды, описанные в настоящей заявке (PS1, PS2 и PS3), получают путем химического расщепления липополисахаридов. PS1 получают путем химического расщепления липополисахарида, изолированного из *H. alvei* 1200 (Пример 5). PS2 получают путем химического расщепления ЛПС, изолированного из *H. alvei* 1203. PS3 получают путем химического расщепления ЛПС, изолированного из *H. alvei* 1205. Полисахаридная фракция может содержать один или более повторяющийся блок О-специфической цепи. Полисахарид PS1 и его редуцированная форма, описанные в качестве примера в экспериментальном разделе, содержат по меньшей мере четыре повторяющихся блока О-специфической цепи.

Один из аспектов в соответствии с настоящим изобретением также относится к восстановленным полисахаридам. В одном предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к PS1_{восст}, PS2_{восст}, PS3_{восст}, которые сохраняют структурные особенности, обеспечивающие связывание человеческого фиколина-3 и его рекомбинантной формы. По сравнению с нативными полисахаридами, восстановленные полисахариды характеризуются наличием поли-гидрокси-3-дезоксиоктановой кислоты на восстановливающем конце, образующейся в результате редукции Kdo. Восстановление полисахаридов осуществляли с применением NaBH₄. Полученный продукт очищали с помощью гель-проникающей хроматографии. Пример получения восстановленных полисахаридов подробно описан в экспериментальном разделе (Пример 6).

Другой аспект в соответствии с настоящим изобретением относится к применению восстановленных полисахаридов в соответствии с настоящим изобретением, в частности PS1_{восст}, PS2_{восст}, PS3_{восст}, в качестве лигандов человеческого фиколина-3 и его рекомбинантных форм, других компонентов системы комплемента и их рекомбинантных форм со специфичностью, схожей со специфичностью фиколина-3, и белков системы комплемента, полученных от других организмов и имеющих схожую специфику, а также активаторов *in vitro* и *in vivo* системы комплемента. Особенно предпочтительным является применение этих молекул в качестве лигандов, исключающих взаимодействие таких полисахаридов с МСЛ, фиколином-L, фиколином-M и IgG.

Еще один аспект в соответствии с настоящим изобретением относится к ковалентным коньюгатам полисахаридов в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно PS1_{восст}, PS2_{восст}, PS3_{восст}, с белками-носителями, такими как, например, БСА и другие носители, которые можно применять для иммобилизации полисахаридов на твердых подложках, таких как поверхность планшета для твердофазного ИФА. Получение типичного коньюгата PS1red с БСА (PS1200-BSA) подробно описано в экспериментальном разделе (Пример 7).

Было показано, что коньюгат такого типа может быть компонентом функционального диагностического теста, теста на измерение концентрации и теста для селективного измерения активности комплекса фиколин-3/MASP-2 в сыворотке крови и других жидкостях организма, а также для детекции комплексов рекомбинантных форм фиколина-3. Пример такого применения коньюгатов подробно описан в экспериментальном разделе. В Примере 9 описан иммуноферментный анализ связывания

по выявлению связывания рекомбинантного фиколина-3 (Н) с липополисахаридом Н. alvei 1200 и конъюгатом PS1200-BSA. В Примере 10 представлено сравнение связывания сывороточного фиколина-3, -2, -1, МСЛ и природных иммуноглобулинов с различными лигандами (БСА, BSA-Ac, ЛПС 1200 и PS1200-BSA) с применением буфера,

5 включающего Нерес-буфер, или буфера с высокой ионной силой. В Примере 11 описано сравнение детекции сывороточного фиколина-3 (Н) с применением твердофазного ИФА и лиганда PS1200-BSA с помощью метода типа «сэндвич».

В Примерах 12 и 13 описано измерение концентраций фиколина-3 и активности комплексов фиколин-3/MASP-2 у здоровых взрослых доноров с применением ИФА и лиганда PS1200-BSA, соответственно. Любому специалисту в данной области на основании имеющейся информации понятно, что конъюгаты в соответствии с настоящим изобретением могут быть элементом функционального диагностического теста для селективного измерения активности комплексов фиколин-3/MASP-1, фиколин-3/MASP-3 и комплексов фиколина-3 с любым другим фактором или фактором, модулирующим 15 активность фиколина-3 и гомологов и/или их аналогов, а также комплексов подобного типа, которые формируются с рекомбинантными формами фиколина-3, его аналогов и/или гомологов.

Еще один аспект в соответствии с настоящим изобретением относится к ковалентным конъюгатам полисахаридов в соответствии с настоящим изобретением, в частности 20 PS1_{восст}, PS2_{восст}, PS3_{восст}, с носителями, помимо белков, такими носителями, которые можно применять для иммобилизации восстановленных полисахаридов на твердых носителях, которые можно в дальнейшем применять в качестве лигандов для фиколина-3 и его гомологов и/или аналогов, рекомбинантного фиколина-3 и его гомологов и аналогов, или комплексов подобного типа, которые формируются с рекомбинантными 25 формами фиколина-3 и рекомбинантными формами аналогов и гомологов фиколина-3 в иммуноферментном анализе, иммуноблотинге, методах очистки фиколина-3 из сыворотки крови и других жидкостей организма и методов подготовки бессырьевой фиколина-3 на основании аффинной хроматографии. Такой носитель для получения указанных конъюгатов для аффинной хроматографии может 30 представлять собой модифицированную агарозу, целлюлозу или полиакриламид, например, коммерчески доступный носитель сепарозе 4B (Пример 8).

Такие конъюгаты также можно применять в аффинной хроматографии для получения сыворотки/плазмы или других жидкостей организма, лишенных фиколина-3 (Н).

Особый вариант реализации в соответствии с настоящим изобретением относится к 35 применению полисахаридов, изолированных из ЛПС, выделенных из других штаммов Н. alvei, с которыми связывается фиколин-3 в дот-блот-анализе (Пример 1), для целей, описанных выше. Такие полисахариды включают полисахариды, изолированные из ЛПС Н. alvei 2, 23, 37, 38, 981 и 1208.

Другие свойства в соответствии с настоящим изобретением описаны более подробно 40 в следующих примерах и подтверждены экспериментальными результатами, приведенными на прилагаемых чертежах. На Фиг.1 показаны полисахаридные структуры PD1t-PD1-[Hep]-Kdo, PD2t- PD2-[Hep]-Kdo, PD3t-PD3-[Hep]-Kdo, выделенные из ЛПС Н. alvei 1200, 1203, 1205, соответственно. На Фигуре 2 показано взаимодействие человеческого фиколина-3 (Н) с липополисахаридом из выбранных штаммов Н. alvei 45 в дот-блот-анализе. ЛПС представлены в следующем порядке: (1) ЛПС Н. alvei 1, (2) ЛПС 1M, (3) ЛПС 2, (4) ЛПС 17, (5) ЛПС 23, (6) ЛПС 31, (7) ЛПС 32, (8) ЛПС 37, (9) ЛПС 38, (10) ЛПС 39, (11) ЛПС 399, (12) ЛПС 481, (13) ЛПС 600, (14) ЛПС 537, (15) ЛПС 744, (16) ЛПС 974, (17) ЛПС 981, (18) ЛПС 1187, (19) ЛПС 1188, (20) ЛПС 1190,

(21) ЛПС 1191, (22) ЛПС 1192, (23) ЛПС 1195, (24) ЛПС 1196, (25) ЛПС 1198, (26) ЛПС 1200, (27) ЛПС 1203, (28) ЛПС 1204, (29) ЛПС 1205, (30) ЛПС 1206, (31) ЛПС 1207, (32) ЛПС 1208, (33) ЛПС 1209, (34) ЛПС 1210, (35) ЛПС 1211, (36) ЛПС 1212, (37) ЛПС 1213, (38) ЛПС 1214, (39) ЛПС 1215, (40) ЛПС 1218, (41) ЛПС 1220, (42) ЛПС 1221, (43) ЛПС 1222, (44) ЛПС 1224, (45) ЛПС 114-60, (46) К. pneumoniae 03. На Фиг.3 представлено взаимодействие человеческого фиколина-3 (Н) с разделенными с помощью электрофореза (ДСН-ПААГ) ЛПС, изолированными из выбранных штаммов *H. alvei*, в анализе методом Вестерн-блот. Слева: ЛПС 23, 1200, 1203, 1205, 1192. На Фиг.4 показано: (А) связывание человеческого фиколина-3 (Н) липополисахаридами из выбранных штаммов *H. alvei* в ИФА (ЛПС 23, 1200, 981, 1203); (В) активация комплексов фиколин Н/MASP-2 липополисахаридами из выбранных штаммов *H. alvei* в ИФА (ЛПС 23, 1200, 981, 1203). На Фиг.5 показано связывание рекомбинантного фиколина Н с бактериями *H. alvei* 1200 в анализе методом проточной цитометрии. На Фиг.6 показано: (А) связывание рекомбинантного фиколина Не/-, *alvei* 1200 в ИФА; (В) связывание рекомбинантного фиколина Н с *H. alvei* 1200-BSA в ИФА. На Фиг.7 показано связывание сывороточного фиколина-3 (Н), фиколина-2 (L), фиколина-1 (M), маннан-связывающего лектина (МСЛ) и иммуноглобулина с бычьим сывороточным альбумином, его ацетилированными производными, липополисахаридом *H. alvei* 1200 и полисахаридом *H. alvei* 1200, конъюгированным с БСА, в буфере B1 (Munthe-Fog, Hummelshoj et al., 2009) и гипертоническом буфере B2 (Petersen, Thiel et al., 2001). Сыворотку крови человека разбавляли 1: 50. На Фиг.8 приведены конкретные значения концентраций фиколина-3 (Н) у взрослых здоровых доноров. Черный отрезок соответствует срединному значению (17622 нг/мл). Предметом в соответствии с настоящим изобретением является лиганд для фиколина-3 (Н) - высокомолекулярный полисахарид, выделенный из липополисахарида *H. alvei* 1200, конъюгированный с бычьим альбумином. На Фиг.9 представлены отдельные значения активности комплексов фиколин Н/MASP-2 у взрослых здоровых доноров. Черный отрезок соответствует срединному значению (847 мЕ/мл). Предметом в соответствии с настоящим изобретением является лиганд для фиколина-3 (Н) - высокомолекулярный полисахарид, выделенный из липополисахарида *H. alvei* 1200, конъюгированный с бычьим альбумином. На Фиг.10 показана корреляция между концентрацией фиколина -3 (Н) и активности его комплекса с MASP-2 (активация элемента C4) у здоровых взрослых людей. Показана линия тренда. Лигандом фиколина-3 (Н) является высокомолекулярный полисахарид, выделенный из липополисахарида *H. alvei* 1200, конъюгированный с бычьим альбумином. R=0,683, p<0,0002.

Примеры, описанные ниже, приведены только для иллюстрации, и они никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

ПРИМЕР 1. Связывание человеческого фиколина-3 (Н) с ЛПС *H. alvei* в дот-блот-анализе. Липополисахариды, выделенные от 45 различных штаммов *H. alvei* (1 мг/мл), переносили на мембрану из ПВДФ в объеме 3×5 мкл. Мембрану инкубировали по очереди с нормальной человеческой сывороткой (источник фиколина-3), мышиными моноклональными антителами, направленными против фиколина-3 (Н) (клон 4Н5, HM2089, HyCult Biotechnology) и меченными пероксидазой хрена кроличьими противомышиными Ig антителами (ПХ) (DAKO). Было показано, что человеческий фиколин-3 связывается со следующими ЛПС, выделенными из *H. alvei*: 2, 23, 37, 38, 981, 1200, 1203, 1205, 1208 (Фиг.2).

ПРИМЕР 2. Связывание человеческого фиколина-3 (Н) с ЛПС из *H. alvei* в иммуноблот-анализе. Изучаемые липополисахариды (ЛПС 23, 1200, 1203, 1205) разделяли в 15% полиакриламидном геле и затем переносили на мембрану из ПВДФ.

Мембрану инкубировали по очереди с нормальной человеческой сывороткой (источник фиколина-3), мышьями моноклональными антителами, направленными против фиколина-3 (Н) (клон 4Н5, HM2089, HyCult Biotechnology) и меченными пероксидазой хрина кроличьими противомышьями Ig антителами (ПХ) (DAKO). Анализ с помощью 5 ДСН-ПААГ/Вестерн-блота (Фиг.3) показал, что за реакцию ответственны высокомолекулярные фракции указанных выше липополисахаридов, О-специфические полисахариды.

ПРИМЕР 3. Обнаружение методом ИФА связывания фиколина-3 и зависимой от комплексов фиколин-3/МАБР-2 активации С4 элемента системы комплемента с помощью 10 липополисахаридов *H. alvei*. С помощью ИФА было показано, что ЛПС *H. alvei* 23, 981, 1200 и 1203 не только связываются с фиколином-3, но также активируют С4 элемент 15 комплемента через комплексы такого лектина с протеазами MASP антитело-независимым способом (Фиг.4В). Липополисахариды наносили на микротитровальные планшеты MaxiSorp U96 (Nunc). После стадии блокировки анализируемую сыворотку 20 крови человека (источник фиколина-3) добавляли в буфер с высокой концентрацией NaCl (Petersen et al., 2001), чтобы исключить активацию комплемента по классическому пути (зависимому от комплекса антиген-антитело). После инкубации в течение 18 ч при 4°C связывание фиколина-3 (Н) с ЛПС выявляли с применением специфичных 25 моноклональных антител, направленных против фиколина-3 (Н) (клон 4Н5, HM2089, HyCult Biotechnology) и меченых пероксидазой хрина кроличьих противомышьяных антител (Фиг.4А). Как альтернатива, в качестве источника фактора С4 к индуцированным комплексам фиколин-3/ЛПС добавляли соответствующим образом 30 разбавленную сыворотку. После инкубации в течение 2 часов при 37°C связавшийся продукт активации С4 выявляли с применением кроличьих противочеловеческих антител 35 к С4 (Sigma) и меченых ПХ козьих противокроличьих иммуноглобулинов (Dako) (Фиг.4В).

ПРИМЕР 4. Оценка связывания рекомбинантного Н-фиколина 3 (Н) с клетками *H. alvei* 1200 с помощью проточной цитометрии. Бактериальные клетки *H. alvei* 1200, инактивированные и фиксированные формальдегидом, инкубировали с рекомбинантным 30 фиколином-3 (Н), затем связавшийся белок выявляли с применением селективных мышьях моноклональных антител, а затем с помощью FITC-конъюгированных антител, специфичным к мышьям иммуноглобулинам (Фиг.5В). Реакционную способность оценивали с помощью проточного цитометра Cytomics FC 500 MPL Beckman-Coulter. В качестве контроля использовали бактерии *H. alvei* PCM 1209, содержащие 35 ЛПС, не связывающийся с фиколином-3 (Н) (Фиг.5В). С помощью проточной цитометрии было также обнаружено, что рекомбинантный фиколин-3 (Н) связывается с поверхностными структурами клетками штамма *H. alvei* 1200 (Фиг.5 В), но не с *H. alvei* 1209 (данные не приведены).

ПРИМЕР 5. Получение с помощью химического расщепления и структурный анализ 40 полисахарида PS1, изолированного из ЛПС *H. alvei* 1200. Получение липополисахарида из штамма *H. alvei* 1200 описано Дагом с соавторами (Dag, Niedziela et al., 2004). Бактерии выращивали в жидкой среде Дэвиса при 37°C. Через 48 ч роста бактерии инактивировали добавлением 0,5% фенола и центрифугировали с использованием проточной лабораторной центрифуги СЕРА со скоростью 39000 об/мин и промывали 3 л воды. 45 Полученную бактериальную массу ресуспендировали в воде и лиофилизировали. Лиофилизованные бактерии тщательно ресуспендировали в воде (2 г/25 мл) с последующим добавлением равного объема 90% фенола. Полученной таким образом раствор липополисахаридов в 45% феноле экстрагировали при температуре 65°C в

течение 15 мин по методу Вестфала и Янна (Westphal i Jann, 1965). Собранные и объединенные водные фазы затем подвергали диализу против дистиллированной воды. ЛПС отделяли от нуклеиновых кислот с помощью тройного ультрацентрифугирования (105000 xg, 6 часов). Очищенные ЛПС (200 мг) подвергали мягкому кислотному гидролизу с 1,5% уксусной кислотой при 100°C в течение 45 мин. Раствор центрифугировали для отделения осадка липида A, присущего в водном растворе, от поли- и олигосахаридов (13000 g, 20 мин). Надосадочную жидкость, содержащую растворенные поли- и олигосахариды, сублимировали, а затем фракционировали с помощью гель-проникающей хроматографии на приборе Bio-Gel P-10, отделяя O-специфические цепи от коротких цепей полисахаридов и коровых олигосахаридов. Колонку уравновешивали с помощью буфера 0,05 М пиридин/уксусная кислота/вода (10/4/986) при pH 5,6. Собирали фракции объемом 1,2 мл (100 капель), непрерывно регистрируя разницу рефракционного индекса для элюента с колонки и контрольного буфера с помощью рефрактометра (Knauer, Germany). Изолированные таким образом фракции 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 подвергали начальному структурному анализу с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF и/или ESI-MS в режиме определения отрицательных ионов. На основе полученных масс-спектров фракции 1, 2, 3, 4 и 5 были выбраны в качестве полисахаридных фракций, содержащих в своей структуре O-специфический полисахарид. Спектры масс-спектрометрии MALDI-TOF (режим определения отрицательных ионов, матрица: 2,4,6-тригидроксиацетофенон), зарегистрированные для фракции 5, содержали молекулярные ионы масс, соответствующих полисахариду PS1, построенному из структуры PD1t-PD1-[Нер] Kdo (Фиг.1). Основной ион при m/z 2452,08 [M-H]⁻ соответствовал структуре, построенной из двух повторяющихся звеньев O-специфических цепей, соединенных с дисахаридом Нер-Kdo, и дополнительно замещенным одной O-ацетильной группой (Фиг.1а), первый повторяющийся блок которого лишен концевой группы α-D-GlcP. Расчетная моноизотопная масса описанной структуры составила 2452,79 Да. Ион при m/z 2494,08 соответствовал описанной структуре, содержащей две O-ацетильные группы. Кроме того, для обоих вышеупомянутых ионов наблюдали варианты структуры [M-H₂O-H]⁻ (m/z 2474,05, 2434,09) и [M+Na-H]⁻ (m/z 2516,06, 2474,07). Анализ спектров MALDI-TOF выявил присутствие в исследуемой фракции популяции молекул, лишенный обеих концевых групп D-GlcP и одной или двух O-ацетильных групп. Для компонентов фракции 5 с помощью ¹H, ¹³C- и ¹H, ³¹P-ЯМР-анализа были установлены последовательности остатков сахара в этом полисахариде и аномерные конфигурации связей. Проводили серии одно- и двумерных экспериментов (COSY, TOCSY, HSQC-DEPT, HMQC, HMBC, NOESY, ROESY). Зарегистрированные спектры позволили описать спиновые системы сахарных остатков, составляющих полисахарид фракции 5, результаты анализа представлены в Таблице 1. Интерпретация спектров, полученных в экспериментах HMBC, NOESY и ROESY, проведенных согласно правилам, известным специалистам в данной области, позволили установить последовательности благодаря выявлению связей между остатками с помощью связности ³J_{H,C} и ЯЭО для аномерных протонов и углеродов. Полисахариды, присутствующие во фракции 5, образованы из двух повторяющихся блоков O-специфического полисахарида (Фиг.1), связанных с дисахаридом →7)-L-глицеро-D-манно-Нер-(1→8)-Kdo. Описанная связь образована из α-(1→7) гликозидной связи между первым остатком GlcNAc (остаток C) первого повторяющегося блока O-специфической цепи и углеродом C-7 из Kdo (остаток A)

дисахарида (высокое значение химического сдвига для атома С-7, Таблица 1). Структура этого полисахарида представлена на Фиг.1. Наличие О-ацетильных групп в положении С-3 остатков Е' и е является причиной гетерогенности полисахарида, наблюдаемой в масс-спектрах. Кроме того, первый повторяющийся блок лишен концевого остатка α -D-Glcp-(1 \rightarrow)(Фиг.1).

Наконец, фракция 5 представляет собой смесь полисахаридов, состоящую из двух повторяющихся блоков О-специфического полисахарида H. alvei PCM 1200 ЛПС, имеющих следующую общую формулу: PD1t-(PD1) N-[Hep] Kdo (где n=1), и структура которого показана на Фиг.1а, а символ «-[Hep]Kdo» обозначает структуру \rightarrow 7) - [L-глицеро-D-манно-Нер-(1 \rightarrow 8)-]-Kdo. Аналогичный анализ был проведен для фракции 4. Фракция 4 представляет собой смесь полисахаридов, состоящих из трех повторяющихся звеньев О-специфического полисахарида ЛПС H. alvei PCM 1200, имеющих следующую общую формулу: PD1t-(PD1) N-[Hep] Kdo (где n=2). Масс-спектр, который был зарегистрирован для фракции 4 с помощью MALDI-TOF MS, показал кластер мажорных [MH] $^{+}$ ионов при m/z 3607,8 и m/z 3565,7. Ион при m/z 3607,8 [MH] $^{+}$ соответствует структуре, построенной из трех повторяющихся блоков О-специфичного полисахарида, соединенного с дисахаридом Нер-Kdo и дополнительно замещенного одной О-ацетильной группой (Фиг.1а), одно из повторяющихся звеньев которого не содержит концевой группы α -D-Glcp. Расчетная моноизотопная масса такой указанной выше структуры составляет 3608,17 Да. Ион [M-H] при m/z 3565,7 соответствует описанной структуре с одной О-ацетильной группой. Кроме того, для таких описанных выше ионов также были зарегистрированы ионы типа [M+Na-H] $^{+}$ (m/z 3629,8, 3587,7) и [M-H₂O-H] $^{+}$ (m/z 3591, 3547,7). Анализ масс-спектров MALDI-TOF также показал, что изученная фракция содержала менее обильную популяцию молекул, лишенных двух концевых фрагментов α -D-Glcp, а также одной или двух О-ацетильных групп.

Нам не удалось получить спектры MALDI-TOF для фракций 3, 2 и 1, содержащих более 25 остатков сахара. Однако, согласно результатам анализа MALDI-TOF MS и ЯМР для фракции 4 и 5, можно предположить, что эти фракции содержат полисахариды, построенные из более чем 4 повторяющихся блоков О-специфичной цепи, замещающих дисахарид Нер-Kdo, имеющий общую формулу PD1-(PD1)_n-[Нер]-Kdo (n \geq 2), где “-[Нер]-KDO” представляет собой структуру \rightarrow 7)-[L-глицеро-D-манно-Нер-(1 \rightarrow 8)-]-Kdo.

ПРИМЕР 6. Получение восстановленного полисахарида PS1. Полисахаридную фракцию PS1 (22 мг) растворяли в 1 мл H₂O и восстанавливали с помощью NaBH₄ (10 мг) в течение 16 ч при температуре 37°C. Раствор подкисляли концентрированной CH₃COOH. Продукт очищали с помощью гель-проникающей хроматографии на колонке Bio-Gel P-2, уравновешенной буфером 0,05 М пиридин/уксусная кислота/вода (10:4:986) при pH 5,6. Собирали фракции объемом 1,2 мл (100 капель), непрерывно регистрируя разницу рефракционного индекса для элюента с колонки и контрольного буфера с помощью рефрактометра (Knauer, Germany). Фракцию, содержащую восстановленный полисахарид, лиофилизировали.

ПРИМЕР 7. Получение конъюгата PS1-BSA. Восстановленный полисахарид PS1 (22 мг) растворяли в H₂O (2 мл), и подводили pH раствора до значения 4,75. Затем добавляли 1-этил-3-(диметиламинопропил)-карбодиимида гидрохлорид (50 мг) к непрерывно перемешиваемому раствору PS1 и поддерживали pH 4,75 путем добавления 1 M HCl (Lonngren и Goldstein, 1978). После этого реакцию проводили в течение 1 ч, а затем добавляли 0,4 мл водного раствора БСА (5 мг/мл). Реакционную смесь инкубировали

в течение 4 ч при комнатной температуре, а затем нейтрализовали 1 М K₂HPO₄. Продукт очищали с помощью гель-проникающей хроматографии, выполненные на сепадексе G-100, уравновешенной 5% этанолом в воде. Фракции объемом 1,2 мл собирали, непрерывно регистрируя разницу рефракционного индекса для элюента с колонки и контрольного буфера с помощью рефрактометра (Knauer, Germany). Полученные фракции проверяли на наличие белка с помощью дот-блота. Фракции, содержащие конъюгаты, концентрировали с использованием фильтра Amicon-ultra 15 до объема 1 мл. Половину продукта лиофилизировали, а половину хранили в 0,1% азиде натрия.

ПРИМЕР 8. Химическая иммобилизация восстановленного полисахарида PS1 на сепарозе 4В и его применение для очистки фиколина-3 из сыворотки крови человека. Активацию сепарозы 4В с бромцианом (BrCN) проводили в соответствии с методом, описанным Куатрекасасом и соавторами (Cuatrecasas, 1970). Активированную бромцианом сепарозу 4В связывали с диаминогексаном. После промывки водой гель (сепароза-NH₂) ресуспенсировали в 0,1 М NaHCO₃ (рН 9,0). После этого сепарозу-NH₂ конъюгировали с активированным ДХЭ PS_{восст}, 1200. Реакцию проводили в течение 16 ч, при pH 7,5 и температуре 80°C. Такой гель можно применять для очистки фиколина-3 из сыворотки крови человека и других жидкостей организма.

ПРИМЕР 9. Исследование методом ИФА связывания фиколина-3 (Н) с липополисахаридом Н. alvei 1200 и конъюгатом PS1200-BSA. На микротитровальные планшеты MaxiSorp U96 (NUNC) наносили липополисахарид 1200 (Фиг.6А) или конъюгат PS1200-BSA (Фиг.6В). После этапа блокировки анализируемый раствор с увеличивающимися концентрациями рекомбинантного фиколина-3 (Н) добавляли к буферу с высокой концентрацией NaCl (Petersen et al., 2001), чтобы исключить активацию комплемента по классическому пути (зависимому от комплекса антиген-антитело). После инкубации в течение 18 ч при 4°C связывание фиколина-3 (Н) с ЛПС выявляли с помощью специфичных моноклональных антител, направленных против фиколина-3 (Н) (клон 4Н5, HyCult Biotechnology), и меченых пероксидазой хрена кроличьих противомышиных антител. Рекомбинантный фиколин-3 (Н) связывается не только с родными ЛПС, но и с конъюгатом PS1200-BSA (О-специфический полисахарид, полисахаридный продукт гидролиза ЛПС 1200, конъюгированный с БСА). Оба эти антигена связываются как с нативным фиколином-3 (Н) из сыворотки крови человека, так и с рекомбинантным белком. (Фиг.6А, 6В).

ПРИМЕР 10. Связывание сывороточного фиколина-3 (Н), фиколина-2 (L), фиколина-1 (M), маннан-связывающего лектина (МСЛ) и иммуноглобулинов с бычьим сывороточным альбумином, его ацетилированной формой и липополисахаридом Н. alvei 1200, а также с полисахаридом, выделенным из Н. alvei 1200, конъюгированным с БСА.

Сравнение связывания сывороточного фиколина-3 (Н), фиколина-2 (L), фиколина-1 (M), маннан-связывающего лектина (МСЛ) и нативных иммуноглобулинов с ацетилированным БСА, липополисахаридом и конъюгатом PS1200-BSA (полисахарид, выделенный из Н. alvei 1200, конъюгированный с БСА, PS1-BSA) и немодифицированным БСА проводили в двух различных буферах: в буфере, рекомендованном Мунте-Фог с соавторами (Munthe-Fog, Hummelshoj et al., 2009), содержащем Hepes, обозначенном как B1 (25 mM Hepes, 155 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0,1% БСА, pH 7,4), и в гипертоническом буфере согласно Петерсену с соавторами (Petersen, Thiel et al., 2001) (B2: 20 mM Трис-HCl, 1 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 0,05% Triton X100, 0,1% БСА, pH 7,4) (Фиг.7). Было показано значительно более сильное связывание фиколина-3 (Н) с ЛПС и PS-BSA Н. alvei 1200,

по сравнению с ацетилированным альбумином, и отсутствием значимого связывания с другими исследованными элементами сыворотки, что подтверждает высокую специфичность реакции.

ПРИМЕР 11. Сравнение результатов измерений концентрации фиколина-3 (Н) у

взрослых здоровых доноров с помощью ИФА с применением лиганда PS1200-BSA и метода ИФА типа «сэндвич». В четырех образцах сыворотки, полученных от здоровых взрослых добровольцев, измеряли концентрацию фиколина-3 (Н) методом ИФА, используя в качестве стандарта рекомбинантные формы фиколина-3, лигандом которых является PS1200-BSA (полисахарид Н. alvei 1200, конъюгированный с БСА). Были получены следующие значения: 28030 нг/мл; 16926 нг/мл и 9973 нг/мл. При использовании ИФА типа «сэндвич», описанного в литературе (Munthe-Fog, Hummelshoj et al., 2009), были получены следующие результаты: 32700 нг/мл, 19500 нг/мл и 12000 нг/мл, соответственно (авторы выражают благодарность за любезное содействие профессору Йенсу С.Йенсениусу, Университет г.Орхус, Дания). Полученные результаты соответствуют ожидаемым, и значения несколько выше за счет измерения общей концентрации фиколина-3 (Н), тогда как предлагаемый метод с использованием конъюгата PS1200-BSA позволяет измерять только биологически активный.

ПРИМЕР 12. Определение концентрации фиколина-3 в сыворотке крови здоровых взрослых доноров с помощью ИФА с применением лиганда BSA-PS1200. Отдельные

значения концентрации фиколина-3 определяли методом ИФА в сыворотке крови, полученной от 25 здоровых взрослых доноров. На планшеты (MaxiSorp U96) наносили конъюгат PS1200-BSA (полисахарид Н. alvei 1200, конъюгированный с БСА). После этапа блокировки добавляли анализируемую сыворотку, разбавленную 1:200 в буфере B2 (20 mM Трис-HCl, 1 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 0,05% Triton X-100, 0,1% БСА, pH 7,4).

Связанный белок обнаруживали с помощью моноклональных антител против фиколина-3 (Н) (клон 4Н5) и меченых пероксидазой хрена противомышечных антител. В качестве эталона использовали сыворотку крови человека с заданной (по отношению к рекомбинантному белку) концентрацией фиколина-3 (Н). Результаты отдельных измерений концентрации фиколина-3 (Н) показаны на Фиг. 8. Средняя концентрация составила 19251 нг/мл (срединное значение: 17622 нг/мл, диапазон: 8751-34675 нг/мл).

ПРИМЕР 13. Определение активности комплексов фиколин-3/МАЗР-2 у здоровых взрослых доноров с помощью ИФА с применением лиганда PS1200-BSA. На планшеты MaxiSorp U96 наносили PS-BSA H alvei 1200, и использовали их для определения способности комплексов фиколин-3/МАЗР-2 активировать экзогенный компонент С.

В качестве эталона использовали сыворотку с известной концентрацией фиколина-3. Активность комплексов фиколин-3/МАЗР-2 в сыворотке крови принимали за 1000 мЕ/мл. Средняя активность комплексов фиколин-3/МАЗР-2 среди 25 проанализированных сывороток составила 822 мЕ/мл (срединное значение: 847 мЕ/мл, диапазон: 421-1309 мЕ/мл). Результаты отдельных измерений активности комплексов фиколина-3/МАЗР-2 показаны на Фиг.9. В анализируемой сыворотке наблюдалась статистически значимая корреляция между концентрацией фиколина-3 и активностью его комплексов с МАЗР-2 (коэффициент корреляции Пирсона R=0,683, p<0,0002) (Фиг.10).

Таблица 1

45 Значения химического сдвига для ¹H и ¹³C (δ_{C} , δ_{H}) компонентов фракции 5, изолированной из ЛПС Н. alvei PCM 1200

Остатки	$J_{\text{H1,C1}}$	Химический сдвиг [м.д.]						
		H1/C1	H2/C-2	H3/C3 (H3ax, H3eq)	H4/C4 (δр)	H5/C5	H6a, 6b/C6	H7a, 7b/C7

	A	\rightarrow 7,8)- α -Kdop-(2 \rightarrow	-	-/174	-/96,7	(1,80, 2,05)/34,2	4,05/65,9	4,14/66,2	4,03/ 69,0 ^a	4,10/75,7 ^a	3,51, 3,74/ 64,4
5	B	L-глицеро- α -D-манно-Нерр-(1 \rightarrow ^a)	173 Гц	4,77/99,3	3,89/69,9	3,82/70,8	3,83/66,2	3,59/71,4	3,98/69,3	3,58, 3,66/ 63,7 ^a	
	C/[c]	\rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow)	177 Гц	5,05/97,3	4,03/52,3	3,95/79,4 [3,86/82,5]	3,65/67,7	4,20/71,2	3,85, 3,78/ 60,1		
	D	\rightarrow 2,3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow)	168 Гц	4,58/100,7	3,87/75,1	4,27/78,6	4,10 ^b /67,7	3,70 ^c /74,9	3,77-3,70 ^d /60,8		
	D'	\rightarrow 2,3)-D-Galp-(1 \rightarrow)	168 Гц	4,57/100,8	3,91/75,1	4,29/78,6	4,10 ^b /67,7	3,70 ^c /74,9	3,77-3,70 ^d /60,9		
	d	\rightarrow 2,3,4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow)	166 Гц	4,66/100,2	3,97/74,6	4,36/77,5	4,19/76,9	3,75 ^a /75,0	n/60,2		
10	E	β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow)	166 Гц	4,91/100,4	3,76/55,5	3,51 ^a /75,0	3,45/70,0	3,43/76,2	3,73, 3,91/ 60,9		
	E'	β -D-GlcNAc3OAc-(1 \rightarrow)	165 Гц	5,03/99,7	3,84/54,0	4,93/77,2	3,59/68,0	3,51/76,1	3,72, 3,93/ 60,9		
	e	β -D-GlcNAc3OAc-(1 \rightarrow)	165 Гц	5,05/99,7	3,87/53,9	4,98/76,7	3,67/67,7	3,53/76,1	3,76, 3,91/ 60,9		
	f	β -D-GlcP-(1 \rightarrow)	173 Гц	5,00/100,3	3,51/72,1	3,76/72,4	3,48/69,5	3,94 ^d /72,2	3,84, 3,95 ^d /60,1		
	G	\rightarrow 1)-Gro-(3-P \rightarrow)	-	3,70, 3,99/ 70,8 ^e	4,07/69,5 ^f	4,01, 3,93/ 66,5	(0,76)				
20	g	\rightarrow 1)-Gro-(3-P \rightarrow)	-	3,70, 3,99/ 70,8 ^e	4,07/69,5 ^f	4,04, 3,98/ 66,5	(0,19)				
	H	\rightarrow 3)- β -D-Quip4NAc-(1 \rightarrow)	164 Гц	4,45/102,8	3,41/72,5	3,68/77,4	3,71/56,7	3,51/71,2	1,16/16,5		
	h	β -D-Quip4NAc-(1 \rightarrow)	164 Гц	4,44/102,8	3,36/73,8	3,50/73,5	3,57/56,7	3,56/71,2	1,20/16,9		

^a Спектры ^1H , ^{13}C - ЯМР были получены с помощью спектрометра Bruker Avance II 600 МГц при 303К. Остатки, обозначенные заглавными буквами, относятся к первому повторяющемуся блоку с восстанавливавшего конца О-специфичного полисахарида. Остатки, обозначенные строчными буквами, относятся к компонентам второго повторяющегося блока. Внутренний стандарт: ацетон (δ_{H} 2,225, δ_{C} 31,05); n - значения химического сдвига не определены, a) Предлагаемое распределение соответствует эталону (Dag, Niedziela et al., 2004); b, c, d, e, f) - неразличимые сигналы.

Таблица 2

Выбранные межостаточные значения ЯЭО и связность ^3J между аномерными протонами и атомами углерода, наблюдаемые для фракции 5, изолированной из ЛПС H. alvei 1200

Остаток		Атом	Связность		Интерпретация сигнала	
		$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ (м.д.)	δ_{C}	δ_{H}		
30	B	L-глицеро- α -D-манно-Нерр-(1 \rightarrow ^a)	4,77/99,3	64,2		C-8 из A
				71,4		C-5 из B
				70,9		C-3 из B
35	C	\rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow)	5,05/97,3	77,2	3,68*	C-3, H-3 из H
	D	\rightarrow 2,3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow)	4,58/100,7	82,3	3,71 3,86	H-5 из D' C-3, H-3 из c
	D'	\rightarrow 2,3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow)	4,57/100,8	82,3	3,71 3,86	H-5 из D C-3, H-3 из c
40	d	\rightarrow 2,3,4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow)	4,66/100,2	79,3	3,94* 3,74	C-3, H-3 из C H-5 из d
	E	β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow)	4,91/100,4	75,1	3,87/3,91	C-2, H-2 из D/D'
	E''	β -D-GlcNAc3OAc-(1 \rightarrow)	5,03/99,7	75,2	3,87/3,91	C-2, H-2 из D/D'
45	f	α -D-GlcP-(1 \rightarrow)	5,00/100,3	73,0	4,19	C-3 из f H-4 из d
	G	\rightarrow 1)-Gro-(3-P \rightarrow ^b)	H-3a, b/C-3 4,01, 3,93/66,5 δ_{p} : 0,76		4,28	H-3 из D,D'
	g	\rightarrow 1)-Gro-(3-P \rightarrow ^b)	H-3a, b/C-3 4,04, 3,98/66,5 δ_{p} : 0,19		4,35	H-3 из d
	H	\rightarrow 3)- β -D-Quip4NAc-(1 \rightarrow)	4,45/102,8	70,9	3,69, 4,00	C-1, H-a,b из G
	h	β -D-Quip4NAc-(1 \rightarrow)	4,44/102,8	70,9	3,69, 4,00	C-1, H-a,b из g

^a Спектры ^1H , ^{13}C -ЯМР были получены с помощью спектрометра Bruker Avance II 600 МГц при 303К. Остатки, обозначенные

заглавными буквами,

относятся к первому повторяющемуся блоку с восстановливающим конца О-специфичного полисахарида. Остатки, обозначенные строчными буквами, относятся к компонентам второго повторяющегося блока.

a) Значения, обозначенные звездочками, соответствуют только связности ЯЭО.

b) Корреляции ^1H , ^{31}P -HMQC, показывающие связь между фосфатными группами и соответствующим атомом для остатков G и g.

Список литературы

Aderem, A. and R.J.Ulevitch (2000). "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response." *Nature* 406:787.

Andersen, T., L.Munthe-Fog, P Garred and S.Jacobsen (2009). "Serum levels of фиколин-3

¹⁰ (Hakata antigen) in patients with systemic lupus erythematosus." *J Rheumatol* 36(4):757-9.

Atkinson, A.P, M.Cedzynski, J.Szemraj, A. St Swierzko, L.Bak-Romaniszyn, M.Banasik, K.Zeman, M.Matsushita, M.L.Turner and D.C.Kilpatrick (2004). "L-фиколин in children with recurrent respiratory infections." *Clin Exp Immunol* 138(3):517-20.

Cedzynski, M., A.P.Atkinson, A. St Swierzko, S.L.McDonald, A.Szala, K.Zeman, K.Buczylko,

¹⁵ L.Bak-Romaniszyn, M.Wiszniewska, M.Matsushita, J.Szemraj, M.Banasik, M.L.Turner and D.C.Kilpatrick (2009). "L-фиколин (фиколин-2) insufficiency is associated with combined allergic and infectious respiratory disease in children." *Mol Immunol* 47(2-3):415-9.

²⁰ Cedzynski, M., L.Nuytinck, A.PAtkinson, A. St Swierzko, K.Zeman, J.Szemraj, A.Szala, M.L. Turner and D.C.Kilpatrick (2007). "Extremes of L-фиколин concentration in children with recurrent infections are associated with single nucleotide polymorphisms in the FCN2 gene." *Clin Exp Immunol* 150(1):99-104.

Cuatrecasas, P.J. (1970). "Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of Agarose and polyacrylamide Beads." *Journal of Biological Chemistry* 245:3059-3065.

²⁵ Dag, S., T.Niedziela, M.Dzieciatkowska, J.Lukasiewicz, W.Jachymek, C.Lugowski and L.Kenne (2004). "The O-acetylation patterns in the O-antigens of *Hafnia alvei* strains PCM 1200 and 1203, serologically closely related to PCM 1205." *Carbohydr Res* 339(15):2521-7.

Degn, S.E., A.G.Hansen, R.Steffensen, C.Jacobsen, J.C.Jensenius and S.Thiel (2009). "MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation." *J Immunol* 183(11):7371-8.

³⁰ Fukutomi, T., B.Ando, S.Sakamoto, H.Sakai and H.Nawata (1996). "Thermolabile beta-2 macroglycoprotein (Hakata antigen) in liver disease: biochemical and immunohistochemical study." *Clin Chim Acta* 255(2):93-106.

³⁵ Gamian, A., E.Romanowska, U.Dabrowski and J.Dabrowski (1991). "Structure of the O-specific, sialic acid containing polysaccharide chain and its linkage to the core region in lipopolysaccharide from *Hafnia alvei* strain 2 as elucidated by chemical methods, gas-liquid chromatography/mass spectrometry, and ^1H NMR spectroscopy." *Biochemistry*. 30(20):5032-8.

Garlatti, V., L.Martin, M.Lacroix, E.Gout, G.J.Arraud, N.M.Thielens and C.Gaboriaud "Structural Insights into the Recognition Properties of Human ФиколинЭ." *Journal of Innate Immunity* 2(1):17-23.

⁴⁰ Garred, P, C.Honore, Y.J.Ma, S.Rorvig, J.Cowland, N.Borregaard and T.HummelshAj (2010). "The Genetics of ФиколинЗ." *Journal of Innate Immunity* 2(1):3-16.

Garred, P, C.Honore, Y.J.Ma, L.Munthe-Fog and T.Hummelshoj (2009). "MBL2, FCN1, FCN2 and FCN3-The genes behind the initiation of the lectin pathway of complement." *Mol Immunol* 46(14):2737-44.

⁴⁵ Gout, E., V.Garlatti, D.F.Smith, M.M.Lacroix, C.Dumestre-Perard, T.Lunardi, L.Martin, J.Y.Cesbron, G.J.Arraud, C.Gaboriaud and N.M.Thielens (2010). "Carbohydrate recognition properties of human фиколинЭ: Glycan array screening reveals the sialic acid binding specificity of M-фиколин." *J Biol Chem*. 285(9):6612-22

Herpers, B.L., B.A. de Jong, B.Dekker, P.C.Aerts, H. van Dijk, G. T. Rijkers and H. van Velzen-Blad (2009). "Hemolytic assay for the measurement of functional human mannose-binding lectin: a modification to avoid interference from classical pathway activation." *J Immunol Methods* 343 (1):61-3.

⁵ Hoist, O., A.J.Ulmer, H.Brade, H.Flad and E.Rietschel (1996). "Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins." *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 16:83-104.

Inoshita, H., M.Matsushita, S.Koide, G.Kusaba, M.Ishii, K.Onda, M.J.Gi, M.Nakata, I.Ohsawa, S.Horikoshi, H.Ohi and Y.Tomino (2009). "A novel measurement method for activation of the lectin complement pathway via both mannose-binding lectin (MBL) and L-фіколін." *Journal of Immunological Methods* 349(1-2):9-17.

¹⁰ Jachymek, W., J.Czaja, T.Niedziela, C.Lugowski and L.Kenne (1999). "Structural studies of the O-specific polysaccharide of *Hafnia alvei* strain PCM 1207 lipopolysaccharide." *European Journal of Biochemistry* 266(1):53-61.

¹⁵ Jachymek, W., C.Petersson, A.Helander, L.Kenne, C.Lugowski and T.Niedziela (1995). "Structural studies of the O-specific chain and a core hexasaccharide of *Hafnia alvei* strain 1192 lipopolysaccharide." *Carbohydrate Research* 269(1):125-38.

Katzenellenbogen, E., N.A.Kocharova, G.V.Zatonsky, M.Bogulska, D.Witkowska, A.S.Shashkov, Y.A.Knirel and E.Romanowska (1999). "Structure of the O-specific polysaccharide of *Hafnia alvei* 23 having an oligosaccharide-phosphate repeating unit." *Journal of Carbohydrate Chemistry* 18(5):545-558.

²⁰ Katzenellenbogen, E., E.Romanowska, N.A.Kocharova, Y.A.Knirel, A.S.Shashkov and N.K.Kochetkov (1992). "The structure of a glycerol teichoic acid-like O-specific polysaccharide of *Hafnia alvei* 1205." *Carbohydr Res.* 231:249-60.

²⁵ Kilpatrick, D.C, T.Fujita and M.Matsushita (1999). "P35, an opsonic lectin of the фіколін family, in human blood from neonates, normal adults, and recurrent miscarriage patients." *Immunol Lett* 67(2):109-12.

Lacroix, M., C.Dumestre-Perard, G.Schoehn, G.Houen, J.Y.Cesbron, G.J.Arlaud and N.M.Thielens (2009). "Residue Lys57 in the collagen-like region of human L-фіколін and its counterpart Lys47 in H-фіколін play a key role in the interaction with the mannan-binding lectin-associated serine proteases and the collectin receptor calreticulin." *J Immunol* 182(1):456-65.

³⁰ Liu, Y., Y.Endo, D.Iwaki, M.Nakata, M.Matsushita, I.Wada, K.Inoue, M.Munakata and T.Fujita (2005). "Human M-фіколін is a secretory protein that activates the lectin complement pathway." *J Immunol* 175(5):3150-6.

³⁵ Lonngren, J. and I.J.Goldstein (1978). Carbohydrate antigens: coupling melibionic acid to bovine serum albumin using water-soluble carbodiimide. *Methods in Enzymology* V. Ginsburg. New York, San Francisco, London, Academic Press. 50:160-162.

⁴⁰ Lukasiewicz, J., T.Niedziela, W.Jachymek, L.Kenne and C.Lugowski (2009). "Two Kdo-heptose regions identified in *Hafnia alvei* 32 lipopolysaccharide: the complete core structure and serological screening of different *Hafnia* O serotypes." *J Bacteriol.* 191(2) 533-44. Epub 2008 Nov 14.

Matsushita, M. (2007). The фіколін family: an overwiev. Collagen-related lectins in innate immunity. D. Kilpatrick. Kerala, Trivandrum, Research Signpost:17-32.

⁴⁵ Matsushita, M. (2010). "Фіколінэ: complement-activating lectins involved in innate immunity." *Journal of Innate Immunity* 2(1):24-32.

Matsushita, M., M.Kuraya, N.Hamasaki, M.Tsujimura, H.Shiraki and T.Fujita (2002). "Activation of the lectin complement pathway by H-фіколін (Hakata antigen)." *J Immunol* 168 (7):3502-6.

- Munthe-Fog, L, T.Hummelshoj, C.Honore, H.O.Madsen, H.Permin and P.Garred (2009). "Immunodeficiency associated with FCN3 mutation and фиколин-3 deficiency." *N Engl J Med* 360(25):2637-44.
- Niedziela, T., C.Petersson, A.Helander, W.Jachymek, L.Kenne and C.Lugowski (1996).
- ⁵ "Structural studies of the O-specific polysaccharide of *Hafnia alvei* strain 1209 lipopolysaccharide." *European Journal of Biochemistry* 237(3):635-41.
- Petersen, S.V., S.Thiel, L.Jensen, R.Steffensen and J.C.Jensenius (2001). "An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation." *J Immunol Methods*. 257(1-2):107-16.
- ¹⁰ Petersson, C, W.Jachymek, L.Kenne, T.Niedziela and C.Lugowski (1997). "Structural studies of the O-specific chain of *Hafnia alvei* strain PCM 1190 lipopolysaccharide." *Carbohydrate Research* 298(3):219-27.
- Rietschel, E.T., H.Brade, O.Hoist, L.Brade and e. al. (1996). Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Pathology of Septic Shock*. E.T.Rietschel and H.Wagner. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag: 40-81.
- ¹⁵ Runza, V.L., W.Schwaeble and D.N.Mannel (2008). "Фиколин: novel pattern recognition molecules of the innate immune response." *Immunobiology* 213(3-4):297-306.
- Schlapbach, L.J., C.Aebi, A.G.Hansen, A.Hirt, J.C.Jensenius and R.A.Ammann (2009). "H-²⁰ фиколин serum concentration and susceptibility to fever and neutropenia in paediatric cancer patients." *Clin Exp Immunol* 157(1):83-9.
- Sugimoto, R., Y.Yae, M.Akaiwa, S.Kitajima, Y.Shibata, H.Sato, J.Hirata, K.Okochi, K.Izuhara and N.Hamasaki (1998). "Cloning and characterization of the Hakata antigen, a member of the фиколин/opsonin p35 lectin family." *J Biol Chem* 273(33):20721-7.
- ²⁵ Svendsen, C.B., T.Hummelshoj, L.Munthe-Fog, N.Milman, P.Garred, I.A.Laursen, M.Christiansen and K.A.Krogfelt (2008). "Фиколин and Mannose-Binding Lectin in Danish patients with sarcoidosis." *Respir Med* 102(9):1237-42.
- Swierzko, A.S., A.P.Atkinson, M.Cedzynski, S.L MacDonald, A.Szala, I.Domzalska-Popadiuk, M.Borkowska-Klos, A.Jopek, J.Szczapa, M.Matsushita, J.Szemraj, M.L.Turner and D.C.Kilpatrick ³⁰ (2009). "Two factors of the lectin pathway of complement, L-фиколин and mannan-binding lectin, and their associations with prematurity, low birthweight and infections in a large cohort of Polish neonates." *Mol Immunol* 46(4):551-8.
- Thiel, S. (2007). "Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, фиколин and associated proteins." *Mol Immunol* 44(16): 3875-88.
- ³⁵ Tsujimura, M., T.Miyazaki, E.Kojima, Y.Sagara, H.Shiraki, K.Okochi and Y.Maeda (2002). "Serum concentration of Hakata antigen, a member of the фиколин, is linked with inhibition of *Aerococcus viridans* growth." *Clin Chim Acta* 325(1-2):139-46.
- Wang, C.C, K.W.Yim, T.C.Poon, K.W.Choy, C.Y.Chu, W.T.Lui, T.K.Lau, M.S.Rogers and ⁴⁰ T.N.Leung (2007). "Innate immune response by фиколин binding in apoptotic placenta is associated with the clinical syndrome of preeclampsia." *Clin Chem* 53(1):42-52.
- Westphal, O. and K.Jann (1965). "Bacterial lipopolysaccharides: Extraction with phenol-water and further applications of the procedure." *Methods Carbohvdr. Chem.* 5:83-89.
- Wittenborn, T., S.Thiel, L.Jensen, H.J.Nielsen and J.C.Jensenius (2010). "Characteristics and ⁴⁵ biological variations of M-фиколин, a pattern recognition molecule, in plasma." *J Innate Immun* 2(2):167-80.
- Yae, Y., S.Inaba, H.Sato, K.Okochi, F.Tokunaga and S.Iwanaga (1991). "Isolation and characterization of a thermolabile beta-2 macroglycoprotein ('thermolabile substance' or 'Hakata

antigen') detected by precipitating (auto) antibody in sera of patients with systemic lupus erythematosus." Biochim Biophys Acta 1078(3):369-76.

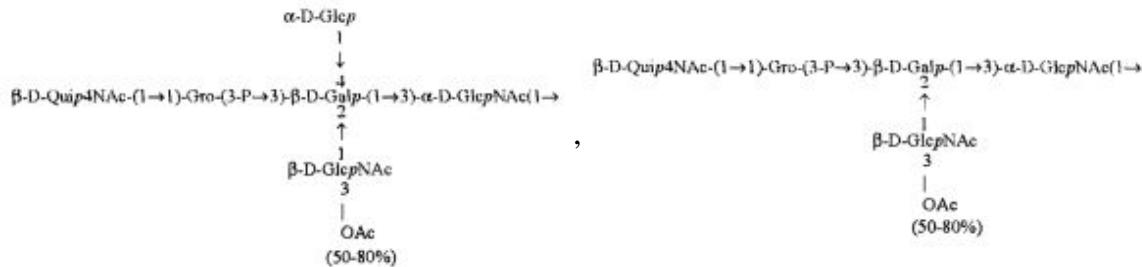
Формула изобретения

5 1. Полисахарид, обладающий сродством к фиколину-3, или его производное, характеризующийся тем, что он содержит олигосахаридный повторяющийся блок общей формулы:

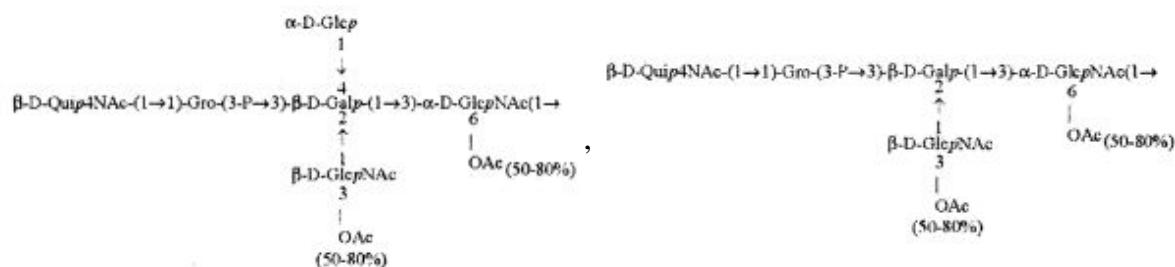


где n является целым числом от 0 до 100, предпочтительно менее 50, PD_t обозначает:

10 - повторяющийся олигосахаридный блок PD1_t , имеющий формулу:

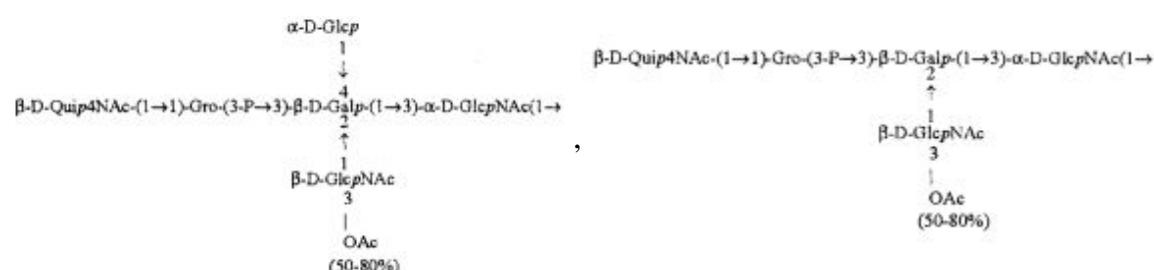


- повторяющийся олигосахаридный блок PD2_t , имеющий формулу:



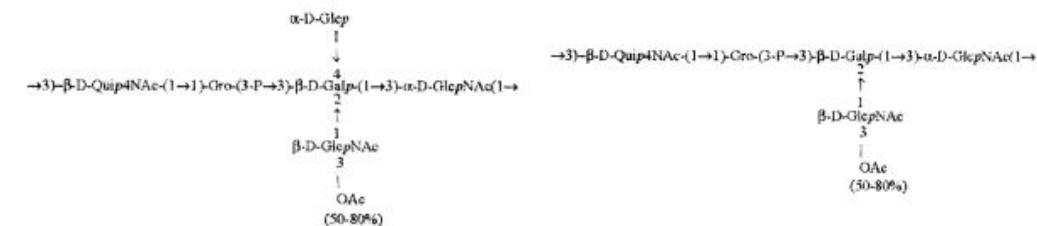
или

- повторяющийся олигосахаридный блок PD3_t , имеющий формулу:

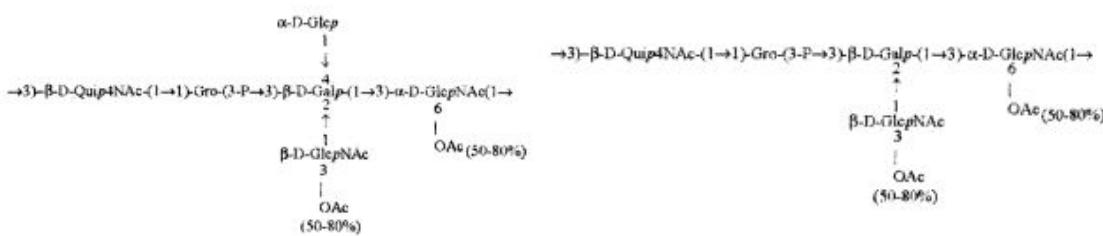


PD обозначает:

- повторяющийся олигосахаридный блок PD1_t , имеющий формулу:

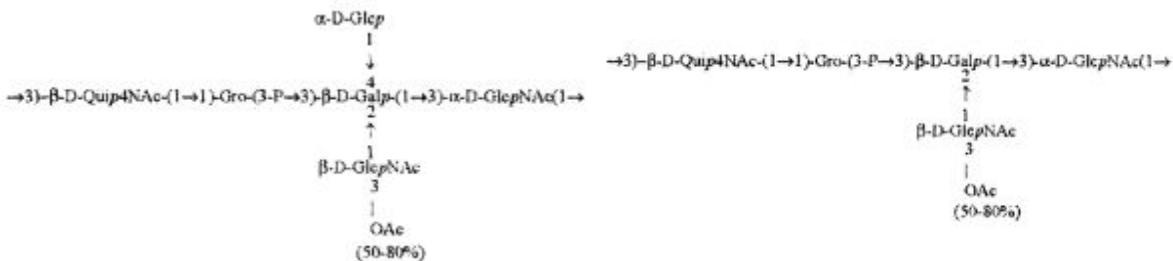


45 - повторяющийся олигосахаридный блок PD2_t , имеющий формулу:

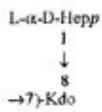


или

- повторяющийся олигосахаридный блок PD3, имеющий формулу:



- [Нер]-Kdo обозначает повторяющийся олигосахаридный блок, имеющий формулу:



2. Полисахарид по п. 1, характеризующийся тем, что он содержит олигосахаридные блоки, выбранные из блоков общей формулы:

PD1_n-(PD1)_n-[Hep]-Kdo, PD2_n-(PD2)_n-[Hep]-Kdo, или PD3_n-(PD3)_n-[Hep]-Kdo.

3. Полисахарид по п. 1, характеризующийся тем, что полисахарид представляет собой восстановленный полисахарид общей формулы $\text{PDt}-(\text{PD})_n-\text{[Hep]}-\text{Kdo}$, в котором остаток Kdo присутствует на восстанавливющем конце в виде линейного полиспирта, дезокси-1-карбокси-3-дезоксиоктитола, с карбоксильной группой и дезокси-группой у первого и третьего атома углерода, соответственно.

4. Производное полисахарида по пп. 1-3, характеризующееся тем, что оно представляет собой конъюгат полисахарида с известным белком-носителем или хроматографическим носителем, где белок-носитель представляет собой сывороточный альбумин позвоночных, овальбумин, а хроматографический носитель представляет собой модифицированную агарозу, целлюлозу или полиакриламид.

5. Способ получения полисахаридов, обладающих сродством к фиколину-3 или их производных, характеризующийся тем, что:

а) выделяют бактериальный липополисахарид, предпочтительно из штамма *H. alvei*, при этом на этапе (а) осуществляют культивирование штамма *H. alvei*, и такой штамм *H. alvei* выбран из: штамма *H. alvei* 981, депонированного в Польской коллекции микроорганизмов под номером B/00030, штамма *H. alvei* 1200, депонированного в Польской коллекции микроорганизмов под номером B/00031, штамма *H. alvei* 1203, депонированного в Польской коллекции микроорганизмов под номером B/00032, штамма *H. alvei* 1205, депонированного в Польской коллекции микроорганизмов под номером B/00033, или штамма *H. alvei* 1208, депонированного в Польской коллекции микроорганизмов под номером B/00034,

б) полученный липополисахарид расщепляют и отделяют полисахаридную фракцию.

в) выделяют полисахаридную фракцию, содержащую полисахариды, образованные из повторяющихся блоков с молекулярной массой в диапазоне от 2400 до 26000 кДа,

г) как альтернатива, полученные полисахариды восстанавливают, в частности в

присутствии NaBH₄, и предпочтительно конъюгируют с известным белком-носителем или хроматографической средой.

6. Способ по п. 5, характеризующийся тем, что экстрагирование липополисахарида из бактериальной массы осуществляют на этапе (а) в течение 15 минут при температуре 5 65°C в водном растворе фенола, предпочтительно растворе фенола в концентрации 45%, с последующим восстановлением липополисахарида из отделенной водной фазы.

7. Способ по п. 5, характеризующийся тем, что отделенный полисахарид гидролизуют на этапе (б) в 1-1,5% растворе уксусной кислоты, от 15 до 60 мин при температуре 100°C.

8. Способ по п. 5, характеризующийся тем, что полисахаридную фракцию разделяют 10 с помощью хроматографии на стадии (в) для отделения О-специфических цепей от более коротких цепей полисахаридов и коровых олигосахаридов, при этом хроматографию предпочтительно проводят на колонке, заполненной полиакриламидным гелем, таким как коммерчески доступный Bio-Gel P-10, уравновешенной буфером, содержащим 0,05 М пиридин/уксусная кислота/вода в соотношении 10/4/986 при pH 5,6.

15 9. Способ по п. 5, характеризующийся тем, что полученные полисахариды восстанавливают и конъюгируют с белком-носителем на этапе (г), при этом такой белок-носитель может, в частности, представлять собой бычий сывороточный альбумин или хроматографическую среду, и особенно предпочтительным является модифицированная агароза.

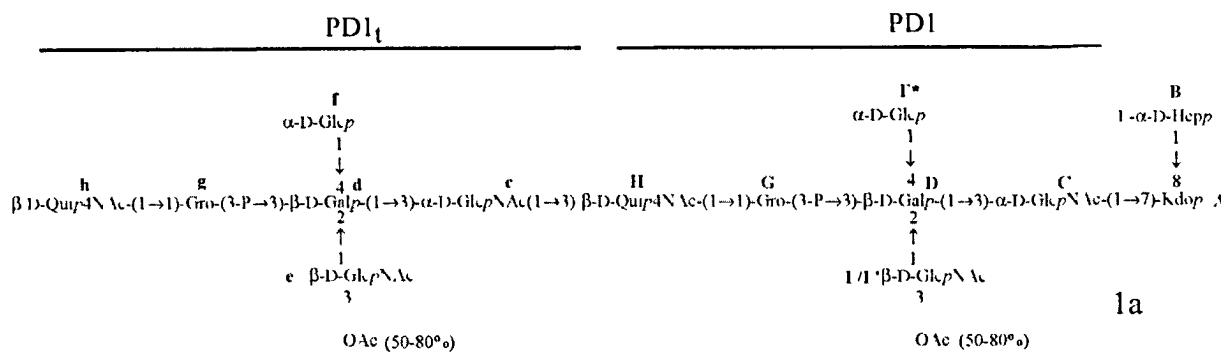
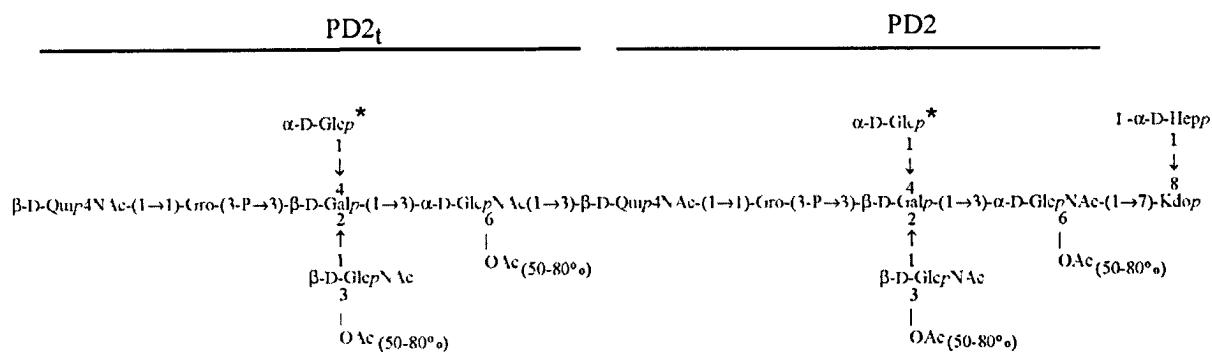
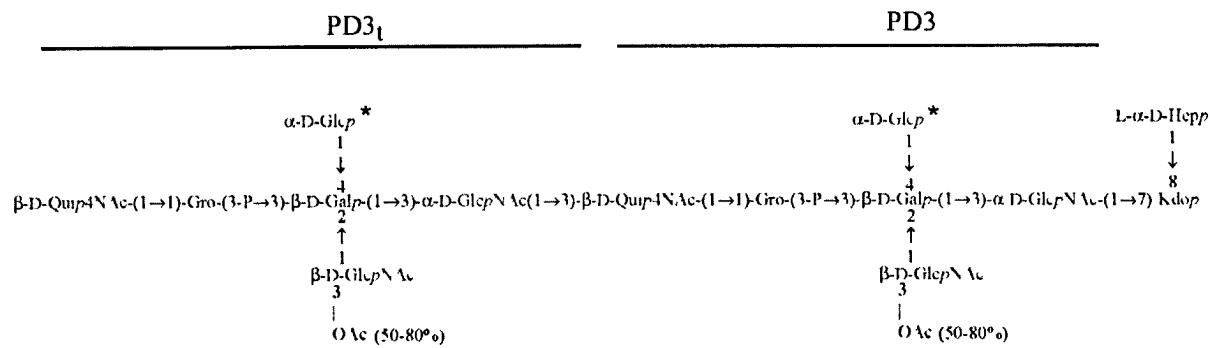
20 10. Применение бактериального липополисахарида или полисахарида, содержащегося в нем, или их производных в качестве лиганда для фиколина-3, в частности для очистки или детекции фиколина-3 или его производных, характеризующееся тем, что применяемый ЛПС получен от штамма, выбранного из штамма H. alvei 981, депонированного в Польской коллекции микроорганизмов под номером B/00030, 25 штамма H. alvei 1200, депонированного в Польской коллекции микроорганизмов под номером B/00031, штамма H. alvei 1203, депонированного в Польской коллекции микроорганизмов под номером B/00032, штамма H. alvei 1205, депонированного в Польской коллекции микроорганизмов под номером B/00033, или штамма H. alvei 1208, депонированного в Польской коллекции микроорганизмов под номером B/00034.

30 11. Применение по п. 10, характеризующееся тем, что полисахарид или его производное, как они определены в пп. 1-4, применяют или получают с помощью способа, описанного в пп. 5-9.

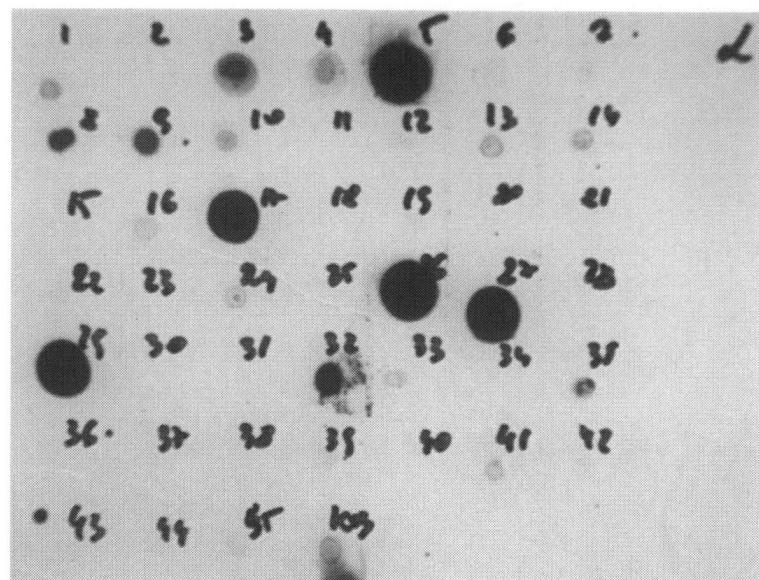
12. Применение по п. 10, характеризующееся тем, что производное фиколина-3 представляет собой комплекс фиколина-3 с сывороточными или полученными из плазмы 35 сериновыми протеазами, MASP.

13. Применение по п. 10, характеризующееся тем, что детекцию проводят с целью определения активности и/или уровня фиколина-3 или его производного в сыворотке крови и других жидкостях организма.

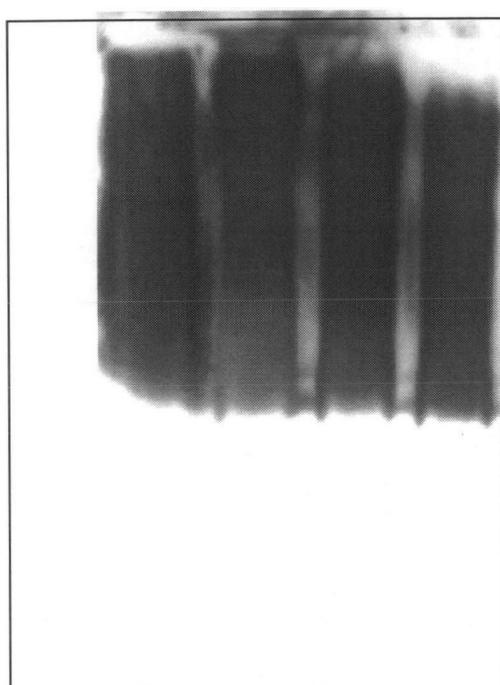
14. Применение по п. 10, характеризующееся тем, что очистку проводят с целью 40 получения сыворотки или плазмы, лишенной фиколина-3.

H. alvei PCM 1200:*H. alvei* PCM 1203:*H. alvei* PCM 1205:

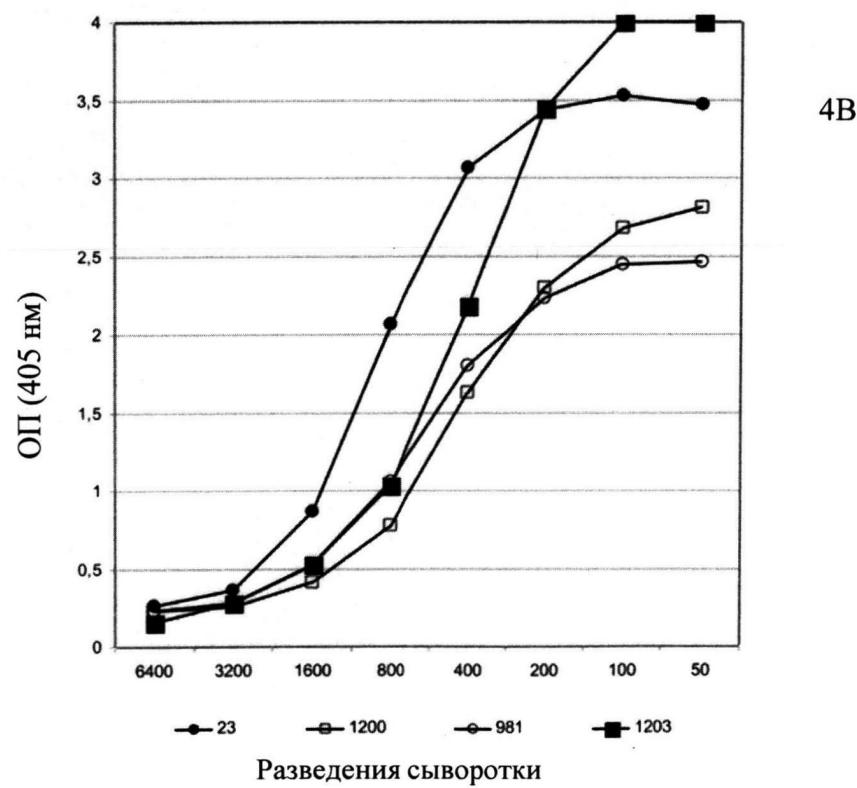
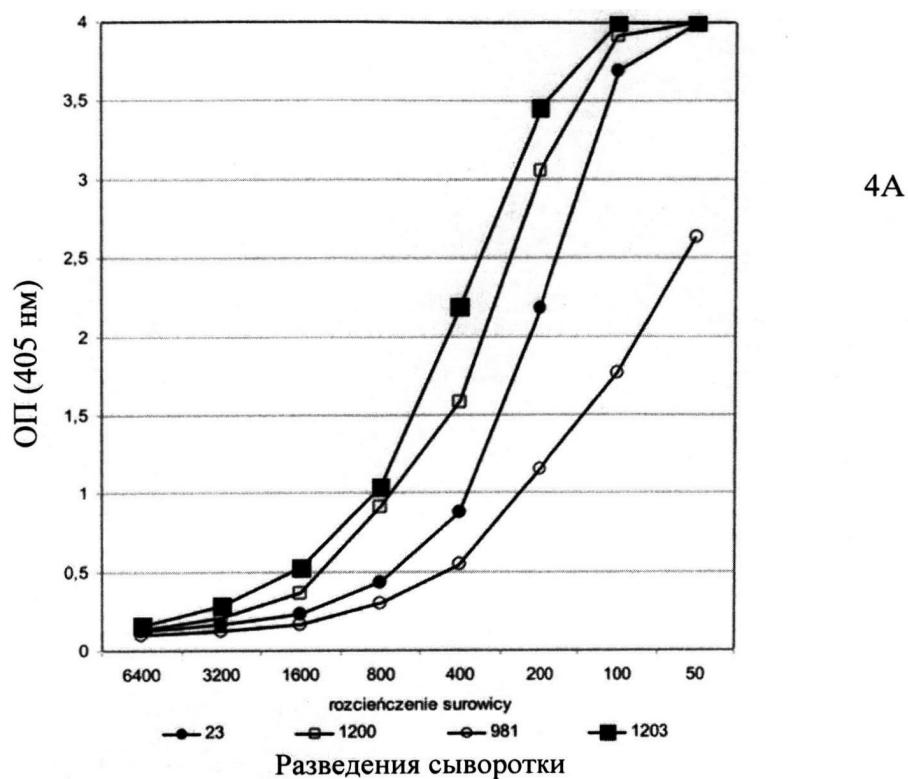
Фиг. 1



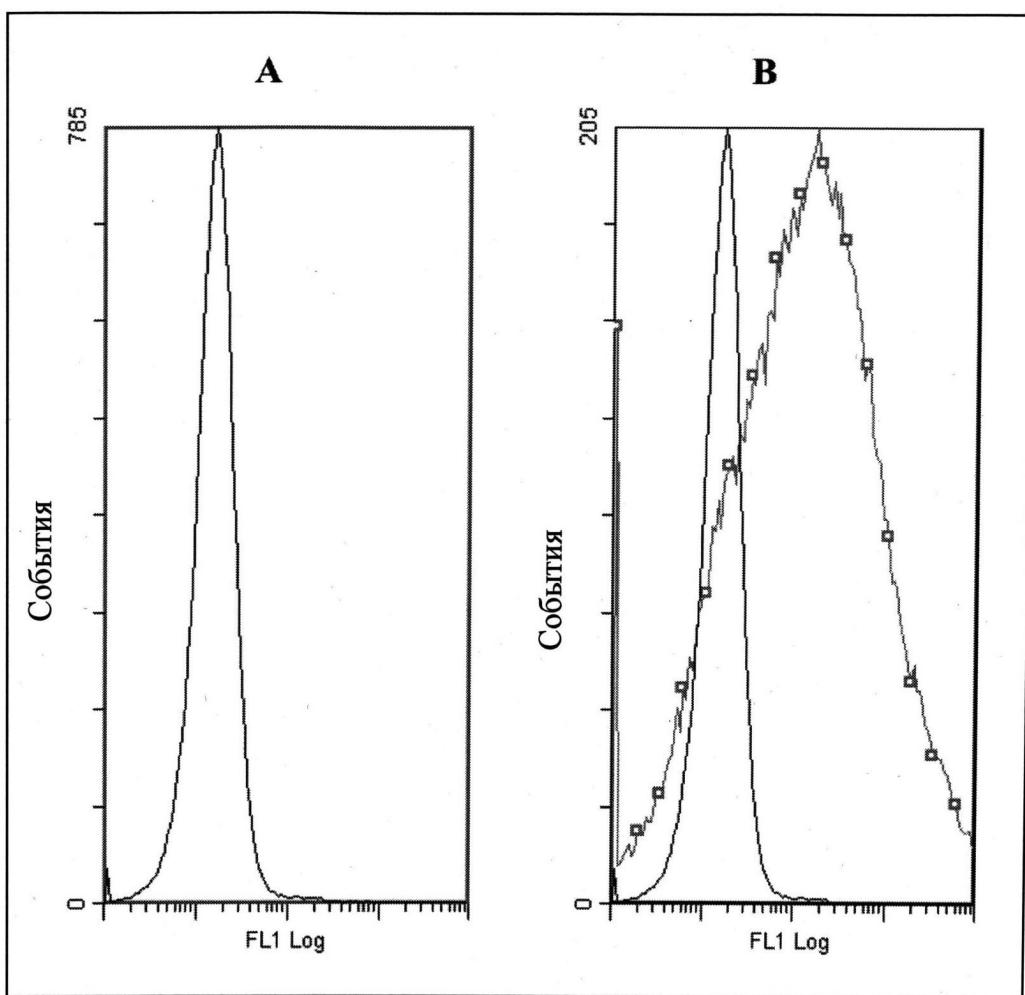
Фиг. 2



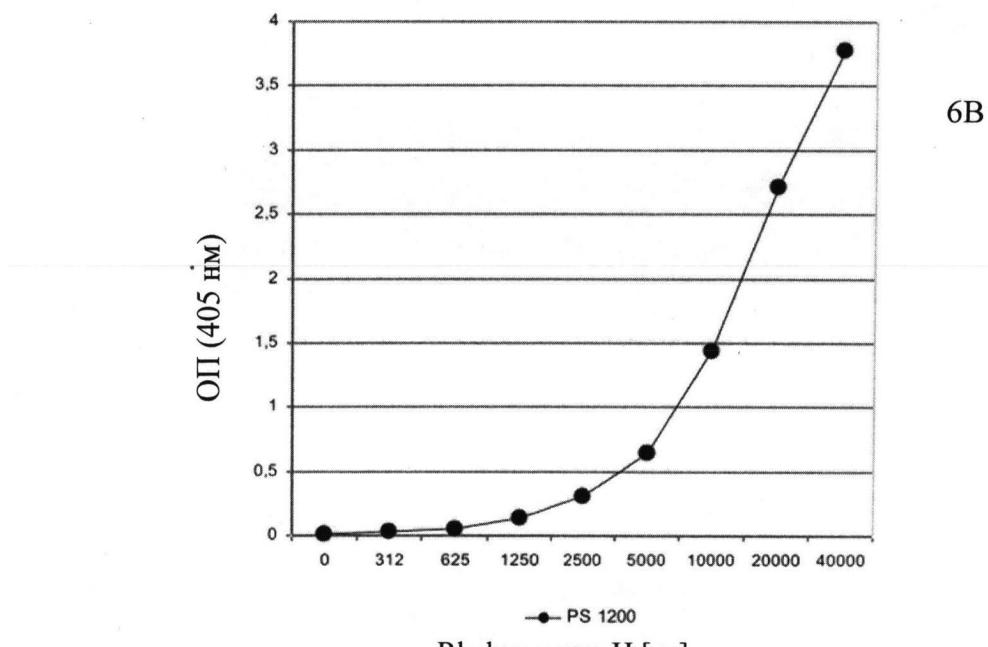
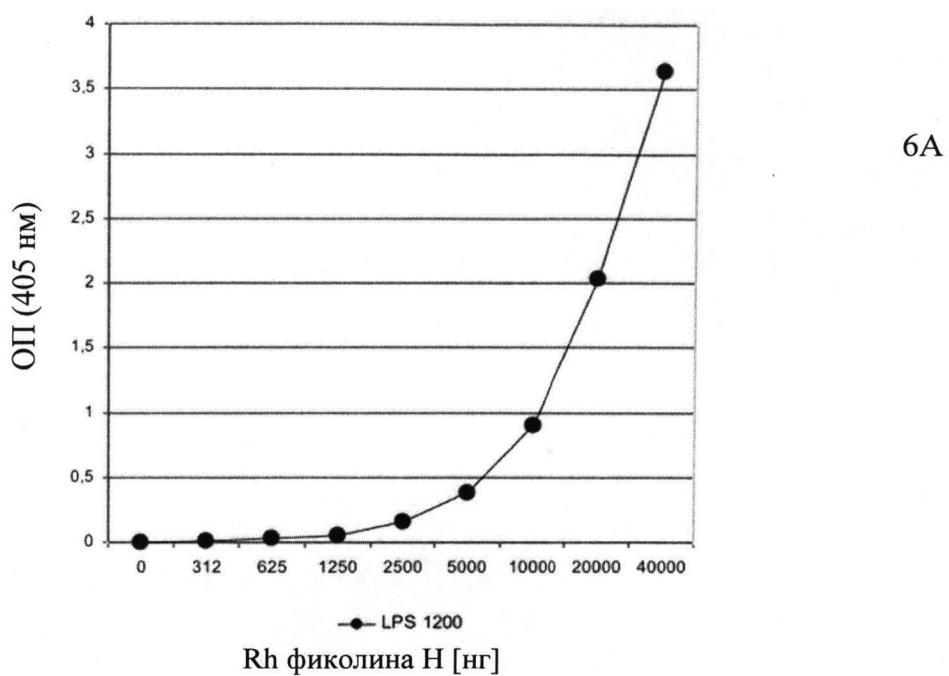
Фиг. 3



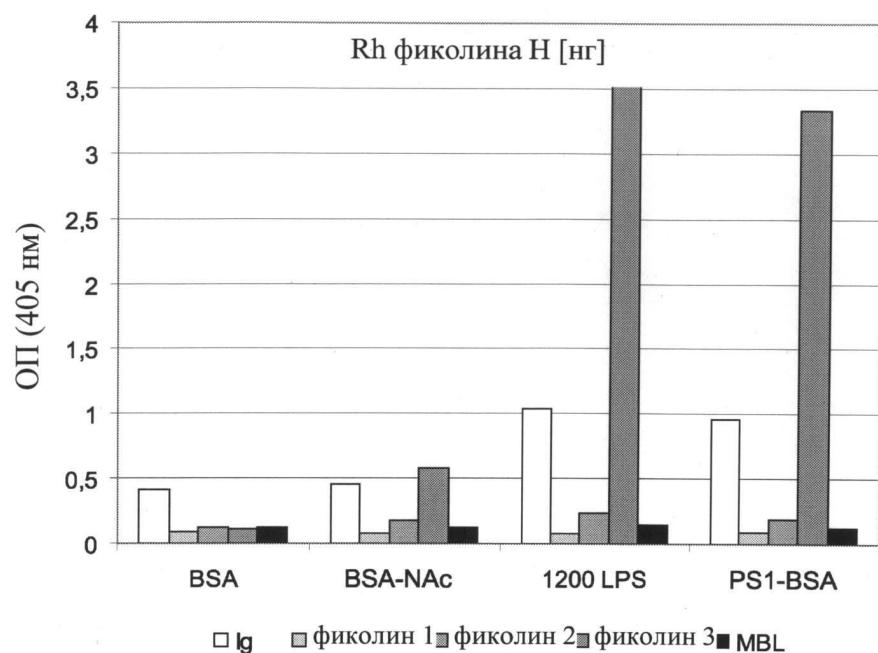
Фиг. 4



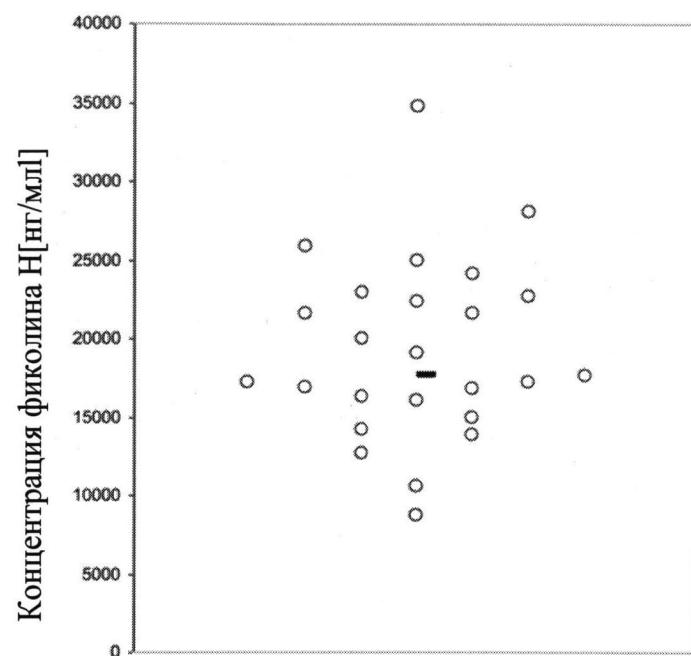
Фиг. 5



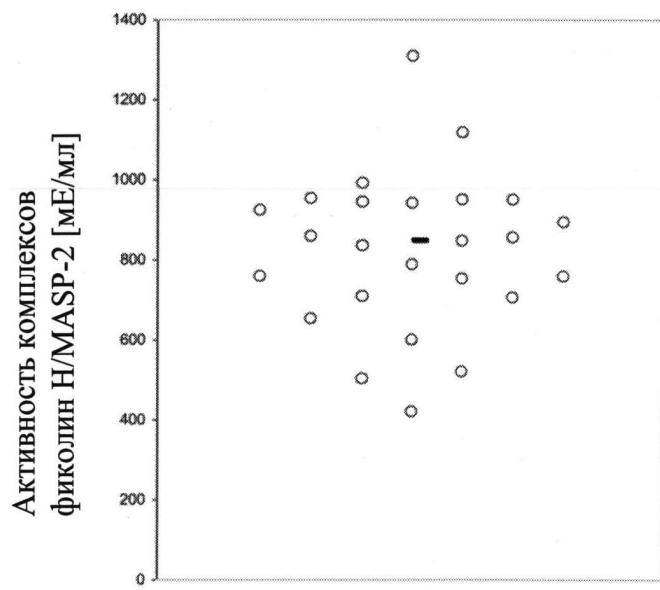
Фиг. 6



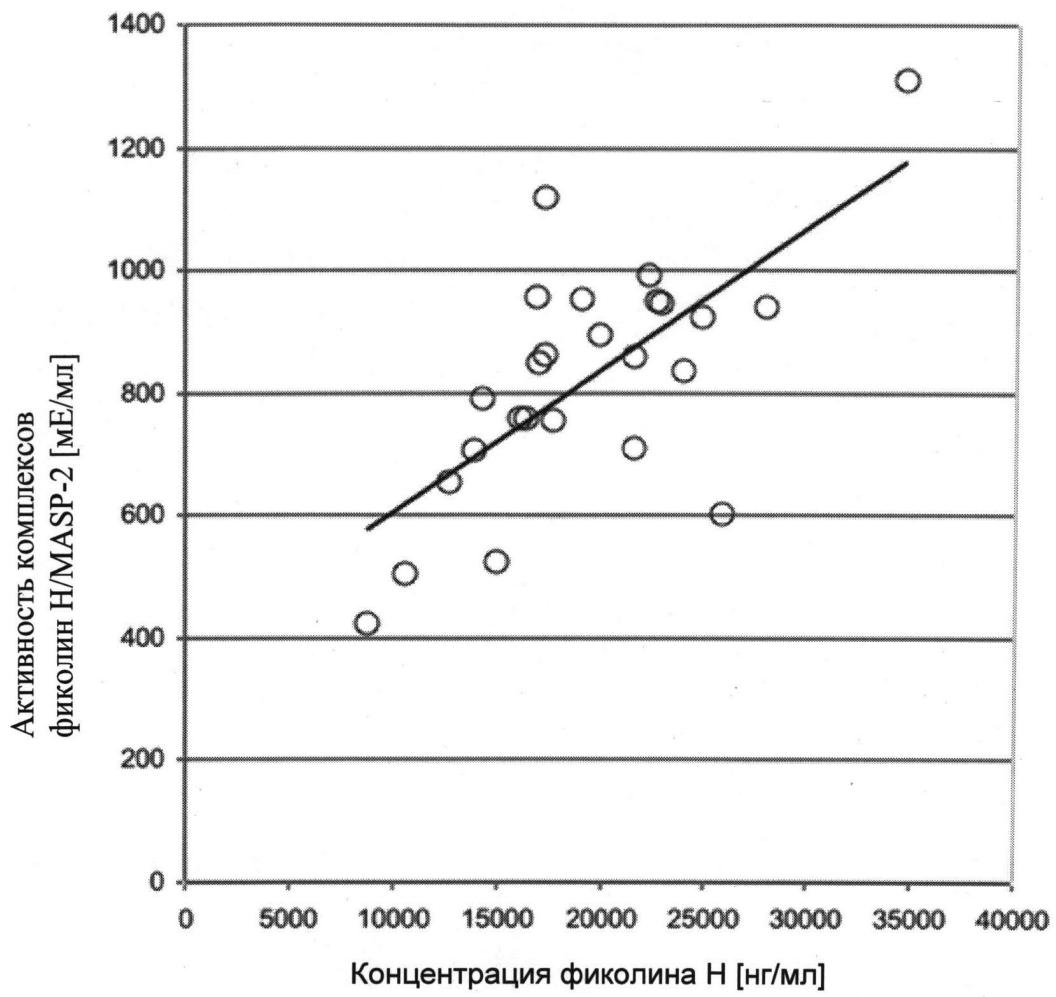
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10