

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044571**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.07

(21) Номер заявки
201991033

(22) Дата подачи заявки
2017.10.24

(51) Int. Cl. **A61K 39/108** (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/65 (2017.01)
A61K 47/64 (2017.01)

(54) СОСТАВЫ ГЛИКОКОНЬЮГАТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЕхРЕС

(31) 16195256.9

(32) 2016.10.24

(33) EP

(43) 2019.09.30

(86) PCT/EP2017/077123

(87) WO 2018/077853 2018.05.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЯНССЕН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Лабовитиади Ольга, Тоннис Ваутер
Франк, Доро Франческо, Адриансен
Яник (NL)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,
Соколов Р.А. (RU)**

(56) VAN DEN DOBBELSTEEN GERMIE P.J.M.
ET AL.: "Immunogenicity and safety of a tetravalent E.
coli O-antigen bioconjugate vaccine in animal
models", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM,
NL, vol. 34, no. 35, 6 July 2016 (2016-07-06),
pages 4152-4160, XP029644969, ISSN: 0264-410X,
DOI: 10.1016/J.VACCINE.2016.06.067, abstract,
page 4153, right-hand column, paragraph 2
WO-A1-2015124769

Sanofi Pasteur: "Typhoid VI polysaccharide
vaccine Typhim VI", March 2014 (2014-03),
pages 1-26, XP002768741, Retrieved from the
Internet: URL: [http://vaccines.procon.org/sourcefiles/
Typhim-Vi-Package-Insert-2014.pdf](http://vaccines.procon.org/sourcefiles/Typhim-Vi-Package-Insert-2014.pdf) [retrieved on
2017-03-29], page 1, lines 14-17
WO-A1-2012078482
WO-A1-2017035181

(57) Описаны композиции и способы, вызывающие иммунный ответ против внекишечной патогенной Escherichia coli (ЕхРЕС). В частности, описаны поливалентные вакцины, содержащие E. coli антиген-полисахарид, ковалентно связанный с экзотоксином А Pseudomonas aeruginosa (EPA) белка-носителя, которые могут выдерживать многочисленные стрессы, вызванные внешними условиями.

B1

044571

044571 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится к композициям, вызывающим иммунный ответ против внекишечной патогенной *Escherichia coli* (ExPEC). В частности, варианты осуществления этого изобретения относятся к поливалентным вакцинам, содержащим конъюгаты полисахаридных антигенов *E. Coli*, ковалентно связанных с белком-носителем, которые могут выдерживать многочисленные стрессы, вызванные внешними условиями.

Предпосылки изобретения

Внекишечная патогенная *E. coli* (ExPEC) представляет собой наиболее распространенный грамотрицательный патоген у людей и может вызывать различные инфекции вне желудочно-кишечного тракта, которые приводят к разнообразным и серьезным заболеваниям, оканчивающимся значительными осложнениями и смертностью. Увеличивающаяся множественная лекарственная устойчивость среди штаммов ExPEC препятствует лечению и приводит к растущему числу случаев госпитализации и смертей и увеличению затрат, связанных с ExPEC инфекциями, в здравоохранении.

В связи с этим остро стоит вопрос о необходимости вакцины против ExPEC. O-антиген - компонент поверхностного липополисахарида - был идентифицирован в качестве перспективной мишени для вакцин, и используется в качестве антигена в гликоконъюгатной вакцине, в настоящее время находящейся в стадии разработки (см., например, Poolman and Wacker, 2016, *J. Infect. Dis.* 213: 6-13).

Гликоконъюгатные вакцины против ExPEC, в настоящее время находящиеся в стадии разработки, содержат O-гликаны, относящиеся к разным серотипам ExPEC, каждый из которых соединен с белком-носителем, таким как внеклеточный белок *A Pseudomonas aeruginosa* (EPA) (см., например, WO 2015/124769 и WO 2017/035181). Такие вакцины, содержащие O-гликаны *E. coli* серотипов O25B, O1A, O2 и O6A, находятся, например, в фазе 2 исследования (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02546960).

Данными изобретателями было обнаружено, что несмотря на то, что существующий состав вакцин против ExPEC (25 mM Tris pH 7,4, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl) пригоден для кратковременного хранения при 2-8°C и имеет приемлемый срок годности после вскрытия упаковки, он не устойчив при замораживании/размораживании и плохо переносит стресс, вызванный перемешиванием. Непреднамеренное замораживание, случайный нагрев и встряхивание (например, в ходе хранения или транспортировки) имеют разрушительное действие на целостность продукта составов против ExPEC. В случае фармацевтических продуктов, предназначенных для использования в больших популяциях, таких как гликоконъюгатная вакцина против ExPEC, желательнее, чтобы состав можно было замораживать партиями при низких температурах, а после размораживания и перед использованием можно было хранить при приблизительно 2-8°C (т.е. когда лекарственная субстанция заморожена для длительного хранения в большом объеме, но лекарственный продукт в ходе применения хранится при приблизительно 2-8°C, и, таким образом, продукт обязательно проходит по меньшей мере один цикл замораживания/размораживания). Кроме того, предпочтительно, чтобы состав был совместим с различными материалами так, чтобы продукт (например, гликоконъюгат) можно было хранить в различных формах (например, мешках, бутылках, флаконах, предварительно заполненных шприцах и/или применяемых приспособлениях).

В этой области техники существует потребность в составах вакцин против ExPEC, которые могли бы выдерживать многочисленные стрессы, связанные с внешними условиями (например, замораживание/размораживание, встряхивание, повышенные температуры, воздействие света, воздействие металлов окислителей и т.п.), и которые характеризовались бы более продолжительными стабильностью и сроком хранения композиций, и предпочтительно при обращении с ними были бы совместимы с многочисленными материалами (например, контейнером). Любые варианты разложения в результате стрессов, вызванных внешними условиями, могут вести к пониженной биологической активности, и могут потенциально приводить к образованию побочных продуктов или производных компонентов состава, таким образом приводя к повышению токсичности и/или измененной иммуногенности вакцины против ExPEC. Таким образом, необходим специализированный подход к нахождению устойчивого состава гликоконъюгатных вакцин, обеспечивающего стабильность в разнообразных условиях. Для этого необходимо выбрать тип буфера, pH и специальные формообразующие для составления особым образом и методично оптимизировать таким образом, чтобы обеспечивалась химическая, физическая и биологическая стабильности гликоконъюгатных вакцин. С учетом всех этих изменяющихся факторов, нахождение оптимальных условий составления гликоконъюгатных вакцин против ExPEC связано с преодолением многочисленных препятствий, и композицию хорошего состава невозможно предсказать.

Соответственно, в этой области техники существует потребность в составах гликоконъюгатных вакцин против ExPEC, которые бы позволили композициям вакцин выдерживать многочисленные стрессы, связанные с внешними условиями, и имели бы улучшенную стабильность и более продолжительный срок хранения. Целью настоящего изобретения является получение таких составов.

Краткое описание изобретения

Предложено два новых состава гликоконъюгатных вакцин против ExPEC, которые позволяют получать композиции вакцин с усовершенствованным стабилизирующим действием при замораживании/размораживании, стрессе при встряхивании, тепловом стрессе, вызванном металлом окислительным стрессе, причем дополнительно эти составы при обращении с ними совместимы с различными материа-

лами (например, контейнером). Эти усовершенствованные составы можно применять в ходе хранения или транспортировки как лекарственного продукта, так и лекарственной субстанции, когда (непреднамеренно) могут происходить замораживание или сильное встряхивание, которые могут иметь разрушительное действие на целостность продукта, а вследствие этого - и на его эффективность. Кроме того, новые составы обеспечивают гликоконъюгатным вакцинам против ExPEC улучшенную стабильность при тепловом стрессе и по этой причине могут иметь широкое коммерческое применение, относящееся к хранению лекарственного продукта и лекарственной субстанции, обращению с ними и транспортировке, в широком интервале температур и разнообразных условиях.

В данном документе предложены композиции, содержащие по меньшей мере один *E. coli* O антиген-полисахарид, где по меньшей мере один O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; от 3% до 8 вес/об.% сорбита; от 5 до 15 мМ метионина; от 5 до 20 мМ калий/натрий фосфатного буфера с pH от 6,5 до 7,5; и от 0,01% до 0,2% (вес/об.) ПАВ. В предпочтительных вариантах осуществления концентрация сорбита составляет от 4% до 6% (вес/об.). В предпочтительных вариантах осуществления концентрация метионина составляет от 8 до 12 мМ. В предпочтительных вариантах осуществления концентрация калий/натрий фосфатного буфера составляет от 8 до 15 мМ. Предпочтительно, чтобы композиция представляла собой поливалентную иммуногенную композицию, содержащую *E. coli* O25B антиген-полисахарид, *E. coli* O1A антиген-полисахарид, *E. coli* O2 антиген-полисахарид, и *E. coli* O6A антиген-полисахарид, где каждый O антиген-полисахарид независимо ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; от 4% до 6 вес/об.% сорбита; от 8 до 12 мМ метионина; от 8 до 15 мМ калий/натрий фосфатного буфера с pH от 6,5 до 7,5; и от 0,01% до 0,2 вес/об.% ПАВ.

В данном документе также предложены композиции, содержащие по меньшей мере один *E. Coli* O антиген-полисахарид, где по меньшей мере один O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; от 3% до 12 вес/об.% сахарозы; от 0,1 до 1,5 мМ EDTA; от 5 до 20 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH от 6,5 до 7,5; и от 0,01% до 0,2 вес/об.% ПАВ. В предпочтительных вариантах осуществления концентрация сахарозы составляет от 3% до 10 вес/об.%. В предпочтительных вариантах осуществления концентрация калий/натрий фосфатного буфера составляет от 8 до 15 мМ. Предпочтительно, чтобы композиция представляла собой поливалентную иммуногенную композицию, содержащую *E. coli* O25B антиген-полисахарид, *E. coli* O1A антиген-полисахарид *E. coli* O2 антиген-полисахарид и *E. coli* O6A антиген-полисахарид, где каждый антиген-полисахарид независимо ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; от 3% до 10 вес/об.% сахарозы; от 0,1 до 1,5 мМ EDTA; от 8 до 15 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH от 6,5 до 7,5; и от 0,01% до 0,2 вес/об.% ПАВ.

В некоторых вариантах осуществления *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A антигены-полисахариды находятся в весовом соотношении 1:1:1:1 или 2:1:1:1.

В определенных вариантах осуществления концентрация сорбита составляет 5 вес/об.%.

В определенных вариантах осуществления концентрация сахарозы составляет 8 вес/об.%.

В предпочтительных вариантах осуществления концентрация метионина составляет 10 мМ.

В определенных вариантах осуществления концентрация EDTA составляет 1 мМ.

В определенном варианте осуществления концентрация калий/натрий фосфатного буфера составляет 10 мМ, а значение pH калий/натрий фосфатного буфера составляет 7,0.

В определенных вариантах осуществления концентрация ПАВ составляет 0,02 вес/об.%. В предпочтительных вариантах осуществления ПАВ состоит из гидрофильной головной части (ОН-группы) и длинной гидрофобной хвостовой части (углеродной цепи, которая может содержать приблизительно 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 130 или более атомов углерода в углеродной цепи). В предпочтительных вариантах осуществления ПАВ представляет собой неионогенный ПАВ. В определенных вариантах осуществления ПАВ выбирают из группы, состоящей из F-68, PS20, PS40, PS60 и PS80. В определенных вариантах осуществления ПАВ представляет собой PS80.

В определенных вариантах осуществления предложены композиции, состоящие по сути из *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида и *E. coli* O6A антигена-полисахарида, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 5 вес/об.% сорбита; 10 мМ метионина; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80. Также предложены композиции, состоящие из *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида и *E. coli* O6A антигена-полисахарида, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 5 вес/об.% сорбита; 10 мМ метионина; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80.

В определенных вариантах осуществления предложены композиции, состоящие по сути из *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида, *E. coli* O6A антигена-полисахарида и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 других *E. coli* O антигенов-полисахаридов, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 5 вес/об.% сорбита; 10 мМ метионина; 10 мМ ка-

лий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80. Также предложены композиции, состоящие из *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида, *E. coli* O6A антигена-полисахарида и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 других *E. coli* O антигенов-полисахаридов, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 5 вес/об.% сорбита; 10 мМ метионина; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80.

В определенных вариантах осуществления предложены композиции, состоящие по сути из *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида и *E. coli* O6A антигена-полисахарида, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 8 вес/об.% сахарозы; 1 мМ EDTA; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80. Также предложены композиции, состоящие из *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида и *E. coli* O6A антигена-полисахарида, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 8 вес/об.% сахарозы; 1 мМ EDTA; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80.

В определенных вариантах осуществления предложены композиции, состоящие по сути из *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида, *E. coli* O6A антигена-полисахарида и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 других *E. coli* O антигенов-полисахаридов, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 8 вес/об.% сахарозы; 1 мМ EDTA; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80. Также предложены композиции, состоящие из *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида, *E. coli* O6A антигена-полисахарида и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 других *E. coli* O антигенов-полисахаридов, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 8 вес/об.% сахарозы; 1 мМ EDTA; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80.

Также в данном документе предложены способы получения композиций, которые здесь раскрыты. В определенных вариантах осуществления предложены способы получения композиций, включающие в себя внесение по меньшей мере одного *E. coli* O антигена, ковалентно связанного с EPA носителем, воды, солей для буферного раствора (т.е. (ди)гидрофосфата натрия и (ди)гидрофосфата калия [т.е. Na_2HPO_4 и KH_2PO_4 или NaH_2PO_4 и K_2HPO_4]), регулятора тоничности (т.е. сорбита или сахарозы), антиоксиданта (т.е. метионина, если регулятором тоничности является сорбит; EDTA, если регулятором тоничности является сахароза) и ПАВ (например, PS80) в емкость, доведение pH до требуемого значения pH (т.е. от 6,5 до 7,5, например, 7,0) и перемешивание этих ингредиентов, и таким образом получение жидкого состава согласно данному изобретению. В предпочтительном варианте осуществления способы получения композиций включают в себя внесение *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида и *E. coli* O6A антигена-полисахарида, где каждый антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A of *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; воды; калия фосфата; натрия фосфата; сорбита; метионина; и PS80 в емкость, доведение pH до 6,5-7,5 (например, 7,0), и смешивание каждого ингредиента таким образом, чтобы конечная концентрация калий/натрий фосфатного буфера составляла 5-20 мМ (например, 10 мМ) при pH, равном 6,5-7,5 (например, 7,0), конечная концентрация сорбита составляла 3-8% (например, 5%) (вес/об.), конечная концентрация метионина составляла 5-15 мМ (например, 10 мМ), и конечная концентрация PS80 составляла 0,01-0,08% (например, 0,02%) (вес/об.). В предпочтительном варианте осуществления способы получения композиций включают в себя внесение *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида и *E. coli* O6A антигена-полисахарида, где каждый антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A of *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; воды; фосфата калия; фосфата натрия; сахарозы; EDTA; и PS80 в емкость, смешивание каждого ингредиента и доведение pH до 6,5-7,5 (например, 7,0) таким образом, чтобы конечная концентрация сахарозы составляла 3-12% (например, 8%) (вес/об.), конечная концентрация EDTA составляла 0,1-1,5 мМ (например, 1 мМ), конечная концентрация калий/натрий фосфатного буфера составляла 5-20 мМ (например, 10 мМ) при pH, равном 6,5-7,5 (например, 7,0), и PS80 составляет 0,01-0,08% (например, 0,02%) (вес/об.).

В определенных вариантах осуществления данные композиции предложены в виде жидких композиций. Под жидкой композицией подразумевается, что она находится в жидком состоянии при температуре 2-8°C и предпочтительно хранится при 2-8°C.

В определенных вариантах осуществления данные композиции могут храниться и сохраняют стабильность при 2-8°C, при 25°C или при 40°C. В предпочтительном варианте осуществления композиция хранится и сохраняет стабильность при 2-8°C. В определенных вариантах осуществления композиция сохраняет стабильность при 2-8°C в течение не менее чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 или более месяцев. В определенных вариантах осуществления композиция сохраняет стабильность при 25°C в течение не менее чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более месяцев. В определенных вариантах осуществле-

ния композиция сохраняет стабильность при 40°C в течение не менее чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более недель.

В определенных вариантах осуществления данные композиции предложены в виде замороженного состава. Под замороженным составом понимают композицию, которая находится в твердом состоянии при хранении при температуре приблизительно -18° или ниже, например, при приблизительно -20°C, -40°C, -60°C, -70°C, -80°C или любой температуре в этом интервале или ниже. В определенных вариантах осуществления данные композиции могут храниться и сохраняют стабильность при -40°C или -60°C в зависимости от регулятора тоничности, присутствующего в композиции. В определенных вариантах осуществления данные композиции могут храниться и сохраняют стабильность при -70°C. В определенных вариантах осуществления композиция содержит сахарозу и сохраняет стабильность при -40°C в течение не менее чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 или более месяцев. В определенных вариантах осуществления композиция содержит сорбит и сохраняет стабильность при -60°C в течение не менее чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 или более месяцев. В определенных вариантах осуществления композиция содержит сорбит или сахарозу и сохраняет стабильность при -70°C в течение не менее чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более лет.

В предпочтительных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению не содержат хлорид натрия.

В определенных вариантах осуществления концентрация каждого О-антигена-полисахарида в композиции составляет от приблизительно 1 до 200 мкг/мл, например, от приблизительно 2 до 100 мкг/мл, например, от приблизительно 4 до 50 мкг/мл. В определенных вариантах осуществления соотношение полисахарид:белок-носитель составляет от приблизительно 1:10 до приблизительно 1:2, например, от приблизительно 1:5 до 1:2 для каждого О-антигена-полисахарида в композиции.

Краткое описание фигур

Вышеизложенное краткое описание, а также нижеследующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения будут более понятны при их рассмотрении в сочетании с прилагаемыми графическими материалами. Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, показанными на графических материалах.

В графических материалах:

на фиг. 1А-1С показано, что PS20, PS80 и F68, но не сорбит, были способны предотвратить вызываемую замораживанием/размораживанием агрегацию ЕхРЕС гликоконъюгата в условиях испытания: PS20, PS80, F68 и сорбит добавляли к ЕхРЕС гликоконъюгатному составу и подвергали воздействию стресса, вызываемого замораживанием/размораживанием,

на фиг. 1А показан метод интегрирования хроматограммы эксклюзионной хроматографии-высокоэффективной жидкостной хроматографии (ЭХ-ВЭЖХ);

на фиг. 1В показана хроматограмма ЭХ-ВЭЖХ, демонстрирующая результаты эксперимента до и после замораживания/размораживания; и

на фиг. 1С показана диаграмма величины пика примеси 1 в процентах от суммарного интегрального значения пиков;

на фиг. 2 показан график сравнения процентных значений ЭХ-ВЭЖХ хроматографического пика примеси 1 составов 26 и 28 со старым ЕхРЕС гликоконъюгатным составом, после длительного температурного воздействия при 40°C в течение периода 12 недель: были исследованы оба положения флакона, а именно, вертикальное (↓) и перевернутое (↑), Составы 26 и 28 продемонстрировали увеличившуюся стабильность по сравнению с ЕхРЕС гликоконъюгатным составом при воздействии теплового стресса (40°C); и

на фиг. 3 показаны графики, демонстрирующие поведение пика примеси 1 составов 26 и 28 в сравнении со старым ЕхРЕС гликоконъюгатным составом при воздействии трех разных концентраций вольфрамовой вытяжки (НW, MW, LW) и хранившихся при 40°C в течение 4 недель.

на фиг. 4 показаны хроматограммы ЭХ-ВЭЖХ, демонстрирующие результаты эксперимента до и после стресса, вызванного встряхиванием (Т0 - контрольный образец, т.е. без стресса, вызванного встряхиванием) для составов 26 и 26 в сравнении со старым составом при контакте с материалами пластиков ПЭТГ и ПК.

Подробное описание изобретения

Различные публикации, статьи и патенты цитируются или описываются в разделе "Предпосылки изобретения" и на протяжении всего описания; при этом каждый из этих литературных источников включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которое было включено в настоящее описание, предназначено для обеспечения контекста настоящего изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что любые или все из этих материалов являются частью предшествующего уровня техники относительно любых раскрытых или заявленных изобретений.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимает средний специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В иных случаях определенные термины, используемые в данном документе, имеют значения, изложенные в описании.

Следует отметить, что используемые в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или границы интервала концентраций, описанные в данном документе, во всех случаях следует понимать как модифицированные термином "приблизительно". Таким образом, числовое значение обычно включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает в себя все значения от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Таким же образом интервал концентраций от 1% до 10 вес/об.% включает в себя значения от 0,9 вес/об.% до 11 вес/об.%. В данном контексте применение числового интервала однозначно включает в себя все возможные подинтервалы, все числовые значения в этом интервале, включая целые числа в таких интервалах и дробные значения, если в контексте явно не указано иное.

В данном контексте подразумевается, что термины "содержит", "содержащий", "включает", "включающий", "имеет", "имеющий" или любые другие их формы означают, что они охватывают означенное целое число или группу целых чисел, но не исключают любые другие целые числа или группу целых чисел, и предназначены быть неисключительными или допускающими поправки. Например, композиция, смесь, процесс, метод, изделие или устройство, содержащие перечень элементов не обязательно ограничиваются только этими элементами, но и могут включать другие элементы, явно не указанные или являющиеся неотъемлемой частью такой композиции, смеси, процесса метода, изделия или устройства. Кроме того, если явно не указано иное, "или" относится к включающему или, а не исключающему или. Например, условию А или В отвечает любое из следующего: А истинно (или в наличии) и В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует) и В истинно (или в наличии), и оба А и В истинны (или в наличии).

В данном контексте термин "состоит из" или варианты, такие как "состоят из" или "состоящий(ие) из" во всем описании или формуле изобретения, указывают на включение любого из приведенных элементов или группы элементов, но дополнительные элементы или группа элементов не могут быть добавлены к указанному способу, структуре или композиции.

В данном контексте термин "по сути состоит из" или варианты, такие как "по сути состоят из" или "по сути состоящий(ие) из" во всем описании или формуле изобретения, указывают на включение любого из приведенных элементов или группы элементов и необязательное включение любых приведенных элементов или группы элементов, которые существенным образом не меняют основы новых признаков указанного способа, структуры или композиции.

Термины "приблизительно", "приблизительно", "как правило", "в основном" и подобные им, используемые в данном контексте в отношении размера или свойства компонента предпочтительного изобретения, следует рассматривать как указывающие на то, что описываемый размер/свойство не представляет собой жесткое ограничение или параметр и не исключает небольшие отклонения от него, которые функционально являются такими же или сходными, как это и будет понятно среднему специалисту в данном уровне техники. Как минимум, ссылки на такие числовые параметры будут включать варианты, которые при использовании математических и промышленных подходов, принятых в области техники (например, округление, ошибки измерения или другие систематические ошибки, допуски при производстве и т.п.), не будут изменять последнюю значащую цифру.

В данном контексте термины "О полисахарид", "О-антиген", "О антиген", "О-антиген-полисахарид", "О-полисахаридный антиген" и сокращение "OPS" - все они относятся к О антигену грамотрицательных бактерий, который является компонентом липополисахарида (ЛПС) и специфичен для каждого серотипа или серо(под)типа грамотрицательных бактерий. О антиген, как правило, содержит повторяющиеся единицы (ПЕ) из двух-семи остатков сахаров. В данном контексте ПЕ принимается равной биологической единице повтора (БЕП). БЕП описывает ПЕ О-антигена в том виде, в котором она синтезируется *in vivo*.

В данном контексте все термины "конъюгат" и "гликоконъюгат" относятся к продукту конъюгации, содержащему О антиген *E. coli*, ковалентно связанный с белком-носителем (например, экзотоксином *A Pseudomonas aeruginosa* (ЕРА)). Конъюгат может быть биоконъюгатом, который представляет собой продукт конъюгации, полученный в клетке-хозяине, где механизм клетки-хозяина производит О антиген и белок-носитель и связывает О антиген с белком-носителем, например, с помощью N-связей. Конъюгат также можно получать другими способами, например, с помощью химического связывания белка и остатка сахара антигена.

О антигены *E. coli* в вариантах осуществления данного изобретения включают О1А, О2, О6А и О25В, раскрытые в WO 2015/124769 и WO 2017/035181. Каждая из этих ссылок включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Другие О антигены *E. coli* также можно использовать, например, в дополнение к конкретным О1А, О2, О6А и/или О25В антигенам, и они могут, например, вклю-

чать, без ограничения, O антигены из их серотипов или подсеротипов E. coli O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O25, O73, O75 и O153.

В данном контексте термин "лекарственная субстанция" относится к нерасфасованному готовому продукту отдельного гликоконъюгата (E. coli O антигену-полисахариду, ковалентно связанному с ЕРА белка-носителя, например, E.coli O25B O антиген, ковалентно связанный с ЕРА), концентрация которого выше, чем у конечного продукта, который будут вводить субъекту. Лекарственную субстанцию можно получать после завершения процесса ниже по потоку после очистки гликоконъюгата. Лекарственную субстанцию можно, например, хранить в более концентрированной форме в буфере состава данного изобретения, например, в замороженном состоянии, например, при -70°C .

В данном контексте термин "лекарственный продукт" относится к составу гликоконъюгатов в их конечной форме, предназначенной для введения субъекту. Лекарственный продукт содержит все гликоконъюгаты (E.coli O антигены-полисахариды, связанные с ЕРА белка-носителя, в случае поливалентной вакцины, например, O25B, O1A, O2 и O6A каждый по отдельности связан с ЕРА белка-носителя в случае четырехвалентной вакцины, и, необязательно, больше O антигенов E.coli, связанных с ЕРА белка-носителя, если валентность вакцины повышается). Лекарственный продукт обычно можно приготовить смешиванием лекарственных субстанций соответствующих гликоконъюгатов и разведением буфером, используемым в составе, если это необходимо, таким образом, чтобы получить целевую дозу вакцины. Лекарственный продукт согласно данному изобретению можно хранить при $2-8^{\circ}\text{C}$, и при этом сохраняется его стабильность при этой температуре в течение по меньшей мере 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 или более месяцев.

Термин "приблизительно" при использовании в отношении числа, относится к любому числу со значением ± 1 , ± 5 или $\pm 10\%$ указанного числа.

Если O антиген ковалентно связан с белком-носителем, эффективное количество или дозировку O антигена определяют из расчета только на фрагмент O антигена-полисахарида в конъюгате.

Заболевания, связанные с инфекциями ExPEC или EхPEC, включают, без ограничения, инфекции мочевыводящих путей, послеоперационные инфекции, бактериемию, инфекцию брюшного или тазового отдела, пневмонию, внутрибольничную пневмонию, остеомиелит, целлюлит, пиелонефрит, раневую инфекцию, менингит, менингит новорожденных, перитонит, воспаление желчных путей, инфекции мягких тканей, межмышечный абсцесс, гнойный артрит и сепсис.

В данном контексте термин "в комбинации" при упоминании введения двух и более терапий субъекту относится к применению более чем одной терапии. Использование термина "в комбинации" не накладывает ограничение на порядок введения этих терапий субъекту. Например, первую терапию (например, описанную здесь композицию) можно вводить субъекту до, одновременно с или после введения второй терапии (например, описанной здесь композиции или другой терапии, например, лечения антибиотиком).

В данном контексте термин "субъект" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, и может включать животных, отличных от приматов (например, свинью, лошадь, козу, овцу, кошку, собаку, кролика, крысу или мышшь), и приматов (например, обезьяну, шимпанзе или человека). В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой животное, отличное от человека. В другом варианте осуществления субъект представляет собой человека. Термины "субъект" и "пациент" могут использоваться взаимозаменяемо. Композиции согласно данному изобретению пригодны для введения субъекту и могут использоваться для формирования иммунного ответа на ExPEC O-антигены, заключающиеся в композиции.

В данном контексте "иммунологический ответ" или "иммунный ответ" на антиген или композицию относится к развитию у субъекта гуморального и/или клеточного иммунного ответа на антиген или на антиген, присутствующий в композиции.

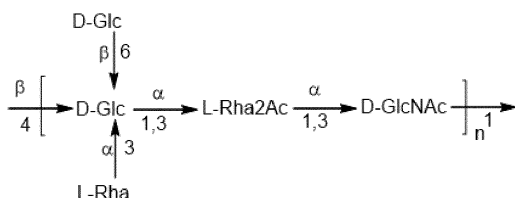
Композиции, содержащие E. coli O антигены-полисахариды

В одном своем общем аспекте изобретение относится к поливалентной вакцине, содержащей серотипы O-антигена, которые встречаются в основном среди клинических изолятов E. coli, которые можно использовать для предоставления активной иммунизации для предотвращения заболевания, вызванного ExPEC, имеющего O-антиген серотипа, содержащегося в вакцине. В одном варианте осуществления изобретение относится к композиции, содержащей по меньшей мере один E. coli O антиген-полисахарид. В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать E. coli O25B антиген-полисахарид. В других вариантах осуществления композиция содержит E.coli O1A, O2 и/или O6A антиген-полисахарид. В предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит E.coli O1A, O2, O6A и O25B антигены-полисахариды, раскрытые в WO 2015/124769 и WO 2017/035181. Каждая из этих ссылок включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления в композиции присутствуют другие или дополнительные E.coli O антигены-полисахариды. Такие E.coli O антигены-полисахариды могут включать, без ограничения, O антигены из (под)серотипов E. coli O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O25, O73, O75 и O153. В зависимости от потребности композиции могут включать более одного дополнительного E. coli O антигена, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более дополнительных E. coli O антигенов, чтобы обеспечить защиту

от многочисленных серотипов *E. coli*.

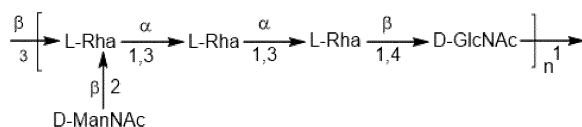
В некоторых вариантах осуществления композиции и способы могут относиться к *E. coli* O25B антигену и одному или нескольким дополнительным *E. coli* O антигенам. Примеры *E. coli* O антигенов могут включать, без ограничения, *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A антигены.

В данном контексте "E. coli O25B антиген" относится к O антигену, специфичному для серотипа *E. coli* O25B. В одном варианте осуществления *E. coli* O25B антиген включает в себя структуру с формулой O25B':



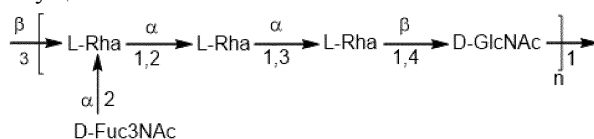
где n в формуле O25B' является целым числом от 1 до 30, 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20. В одном варианте осуществления данного изобретения n в формуле O25B' является целым числом от 10 до 20.

В данном контексте "E. coli O1A антиген" относится к O антигену, специфичному для серотипа *E. coli* O1A. В одном варианте осуществления *E. coli* O1A антиген включает в себя структуру с формулой O1A':



где n в формуле O1A' является целым числом от 1 до 30, 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20. В одном варианте осуществления n в формуле O1A' является целым числом от 7 до 15.

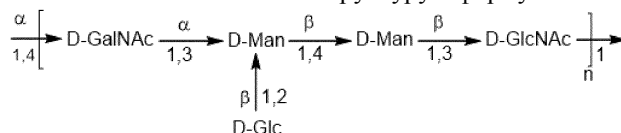
В данном контексте "E. coli O2 антиген" относится к O антигену, специфичному для серотипа *E. coli* O2. В одном варианте осуществления *E. coli* O2 антиген включает в себя структуру с формулой O2':



где n в формуле O2' является целым числом от 1 до 30, 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20. В одном варианте осуществления n в формуле O2' является целым числом от 8 до 16.

В данном контексте "E. coli O6 антиген" относится к O антигену, специфичному для серотипа *E. coli* O6. В одном варианте осуществления *E. coli* O6 антиген включает в себя *E. coli* O6A.

В данном контексте "E. coli O6A антиген", также обозначаемый как "E. coli O6K2 антигена" или "E. coli O6Glc антигена", относится к O антигену, специфичному для серотипа *E. coli* O6A. В одном варианте осуществления *E. coli* O6A антиген включает в себя структуру с формулой O6A':



где связь β 1, 2 также называется β 2-связью, n в формуле O6A' является целым числом от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 10 до 30, от 15 до 30, от 20 до 30, от 25 до 30, от 5 до 25, от 10 до 25, от 15 до 25, от 20 до 25, от 10 до 20 или от 15 до 20. В одном варианте осуществления n в формуле O6A' является целым числом от 8 до 18.

E. coli O антигены-полисахариды в композициях данного изобретения ковалентно связаны (иногда это обозначено термином "конъюгированы") с белком-носителем, причем белком-носителем данного изобретения является экзотоксин *A. P. aeruginosa*, предпочтительно его обезвреженным вариантом (ЕРА; см., например, Ihssen, et al. (2010) *Microbial cell factories* 9, 61; WO 2015/124769). Сочетание белка-носителя и O антигена-полисахарида обозначается термином гликоконъюгат. Как правило, O антиген из каждого серотипа *E. coli* в композиции ковалентно связан с отдельным белком-носителем, т.е. если композиция содержит четыре O антигена-полисахарида, то каждый из них отдельно и независимо связан с ЕРА белка-носителя, и таким образом композиция содержит четыре разных гликоконъюгата. Одним путем изготовления гликоконъюгатов является биоконъюгация, при которой механизм клетки-хозяина производит O антиген и белок-носитель и связывает O антиген с белком-носителем, например, с помо-

стью N-связей (получение биоконъюгатов *E. coli* O антигена O25B, O1A, O2 и O6A полисахаридов с ЕРА белка-носителя см., например, в WO 2015/124769). Для ЕРА в литературе были описаны различные обезвреженные варианты белка, и их можно использовать в качестве белков-носителей. Обезвреженный (или нетоксичный) ЕРА обозначает любой экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa*, который не обладает активностью рибозилирования АДФ. Активность рибозилирования ЕРА дикого типа расположена приблизительно между аминокислотами 400 и 613 в последовательности ЕРА, и, например, удаление аминокислоты глутаминовой кислоты в положении 553 из ЕРА дикого типа или замена гистидина в положении 426 тирозином в ЕРА дикого типа обезвреживает молекулу ЕРА. Можно подвергать модификации другие аминокислоты среди аминокислот 400-613 в ЕРА дикого типа, например, с помощью удаления, вставки или замены аминокислотных остатков, чтобы убрать активность рибозилирования АДФ и благодаря этому - токсичность, как это известно специалисту в данной области. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения ЕРА белка-носителя представляет собой обезвреженный вариант. В некоторых неограничивающих и иллюстративных вариантах осуществления ЕРА белка-носителя может содержать аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO: 1 (представляет собой вариант осуществления обезвреженного ЕРА), или аминокислотную последовательность, которая не менее чем на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентична SEQ ID NO: 1, или на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот отличается от SEQ ID NO: 1, любые из них необязательно, дополнительно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более вставленных рекомбинантно консенсусных последовательностей гликозилирования, как описано ниже. В конкретных вариантах осуществления введение сайтов гликозилирования выполняют путем вставки консенсусных последовательностей гликозилирования (например, Asn-X-Ser(Thr), где X может быть любой аминокислотой кроме Pro; или, предпочтительно, Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбирают из природных аминокислот, за исключением Pro (SEQ ID NO: 2) (см., например, WO 2006/119987 и WO 2015/124769)) в любом месте первичной структуры ЕРА белка. В предпочтительных вариантах осуществления ЕРА белка-носителя содержит один или несколько вставленных рекомбинантно N-связанных консенсусных сайтов гликозилирования, имеющих аминокислотную последовательность Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), где X и Z независимо выбирают из природных аминокислот, за исключением Pro (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления ЕРА белка-носителя содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или более таких вставленных консенсусных последовательностей. В других вариантах осуществления ЕРА не содержит таких вставленных рекомбинантно N-связанных консенсусных сайтов гликозилирования, например, если гликоконъюгат получают с использованием классической химии конъюгирования (см., например, US 5,370,872; Cruz et al., 1990, *Infection and Immunity* 58: 373-377).

В некоторых вариантах осуществления О-антигена *E. coli* ковалентно связаны с белком-носителем в весовом соотношении полисахарида к белку, составляющем от приблизительно 1:20 до 20:1, предпочтительно - от 1:10 до 10:1, например, от 1:10 до 3:1. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления биоконъюгатов соотношение полисахарид/белок находится в пределах от приблизительно 0,1 до 0,5 (т.е. полисахарид:белок равно от приблизительно 1:10 до 1:2, например, приблизительно 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10 или любому промежуточному значению) для каждого биоконъюгата в зависимости от серотипа О-антигена.

В некоторых неограничивающих вариантах осуществления концентрация *E. coli* О антигенов-полисахаридов в композиции может составлять от приблизительно 1 до 200 мкг/мл для каждого О антигена-полисахарида, например, от приблизительно 2 до 100 мкг/мл, например, от приблизительно 4 до 50 мкг/мл, например, от приблизительно 4 до 48 мкг/мл, например, от приблизительно 8 до 48 мкг/мл, например, от приблизительно 4 до 32 мкг/мл, например, от приблизительно 8 до 32 мкг/мл, например, 8, 16, 20 или 32 мкг/мл или равно любому другому значению в этом промежутке. Предпочтительно, чтобы в композиции из по меньшей мере двух *E. coli* О антигенов-полисахаридов каждый О антиген-полисахарид присутствовал в весовых соотношениях от 1:1 до 1:2 или любом промежуточном их значении для каждой комбинации О антигенов-полисахаридов в композиции.

В некоторых неограничивающих вариантах осуществления О-антигены-полисахариды присутствуют в композиции при концентрации всех О-антигенов-полисахаридов, составляющей от приблизительно 4 до 1000 мкг/мл, например, от приблизительно 10 до 500 мкг/мл, например, от приблизительно 20 до 250 мкг/мл, например, от приблизительно 24 до 120 мкг/мл.

В некоторых неограничивающих вариантах осуществления О-антигены-полисахариды присутствуют в композиции при концентрации всех О-антигенов-полисахаридов, составляющей от приблизительно 40 до 2000 мкг/мл, например, от приблизительно 100 до 1500 мкг/мл, например, от приблизительно 200 до 1200 мкг/мл, например, от приблизительно 250 до 600 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит O25B, O1A, O2 и O6A антигены-полисахариды в весовом соотношении, равном 1:1:1:1, при этом каждый О антиген-полисахарид ковалентно связан с ЕРА белка-носителя. В другом варианте осуществления композиция содержит *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A антигены-полисахариды в весовом соотношении, равном 2:1:1:1, при этом каждый О антиген-полисахарид ковалентно связан с ЕРА белка-носителя. В каждом таком варианте осуществле-

ния концентрация O25B антигена-полисахарида может, в качестве неограничивающего примера, составлять 8, 16 или 32 мкг/мл.

Композиции, описанные в данном документе, полезны в лечении и предотвращении инфекций у субъектов (например, субъектов-людей) с EхPEC. В некоторых вариантах осуществления в дополнение к содержащимся в композиции E. coli O антигенам-полисахаридам, ковалентно связанным с ЕРА белка-носителя, описываемые в данном документе композиции содержат фармацевтически приемлемый носитель. В данном контексте "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата, или перечисленный в U.S. Pharmacopeia или в другой общепризнанной фармакопее для применения к животным или, более конкретно, к людям. Термин "носитель", используемый в контексте фармацевтически приемлемого носителя, относится к разбавителю, вспомогательному средству, формообразующему или носителю, с которым вводят фармацевтическую композицию. Вода в композиции данного изобретения предпочтительно представляет собой воду для инъекций.

Предложенная в данном документе композиция содержит ПАВ. ПАВ, которые используются в данном документе, представляют собой органические амфифильные соединения, что означает, что они содержат как гидрофобные группы (их хвостовые части), так и гидрофильные группы (их головные части). В предпочтительных вариантах осуществления ПАВ состоит из гидрофильной головной части (содержащей ОН-группы) и длинной гидрофобной хвостовой части (углеродной цепи, которая может содержать приблизительно 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 130 или более атомов углерода в углеродной цепи). Предпочтительными ПАВ согласно данному изобретению являются неионогенные ПАВ. Примеры ПАВ, пригодных для композиций данного изобретения, включают, без ограничения, полисорбат 20 (PS20), полисорбат 40 (PS40), полисорбат 60 (PS60), полисорбат 80 (PS80) и Pluronic® F-68 (F-68). В предпочтительном варианте осуществления ПАВ представляет собой PS80. В некоторых вариантах осуществления концентрация ПАВ в композиции составляет от 0,01% (вес/объем (вес/об.)) до 0,2 вес/об.%. В некоторых вариантах осуществления концентрация ПАВ в композиции равна 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09%, 0,1%, 0,11%, 0,12%, 0,13%, 0,14%, 0,15%, 0,16%, 0,17%, 0,18%, 0,19%, 0,2% или любому промежуточному значению. В вариантах осуществления, где ПАВ представляет собой F-68, концентрация предпочтительно составляет от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,2%. В вариантах осуществления, где ПАВ представляет собой PS20, PS40, PS60, или PS80, концентрация предпочтительно составляет от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,08%, например, приблизительно 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08% или равна любому промежуточному значению.

Предложенные в данном документе композиции дополнительно содержат буфер с определенным рН. Согласно настоящему изобретению композиция содержит калий/натрий фосфатный буфер. Пределы концентраций такого буфера могут быть, например, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ, от приблизительно 8 мМ до приблизительно 15 мМ, от приблизительно 8 мМ до приблизительно 13 мМ, от приблизительно 9 мМ до приблизительно 11 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация буфера равна 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 11 мМ, 12 мМ, 13 мМ, 14 мМ, 15 мМ или любому промежуточному значению. В некоторых вариантах осуществления концентрация буфера составляет от приблизительно 8 мМ до приблизительно 15 мМ. В предпочтительном варианте осуществления концентрация буфера в композиции равна 10 мМ. Пределы рН для таких буферов могут составлять от приблизительно рН 6,5 до приблизительно рН 7,5, от приблизительно рН 6,6 до приблизительно рН 7,4, от приблизительно рН 6,7 до приблизительно рН 7,3, от приблизительно рН 6,8 до приблизительно рН 7,2, от приблизительно рН 6,9 до приблизительно рН 7,1. В определенных вариантах осуществления рН может быть равным 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 или любому другому промежуточному значению. В предпочтительном варианте осуществления рН буфера составляет 7,0. В предпочтительном варианте осуществления композиция содержит калий/натрий фосфатный буфер с концентрацией 10 мМ и при рН, равном 7,0.

Растворы калий/натрий фосфатного буфера могут, например, содержать калий из K_2HPO_4 (двухосновный) или KH_2P_4 (одноосновный) и натрий из Na_2HPO_4 (двухосновный) или NaH_2PO_4 (одноосновный). В некоторых вариантах осуществления калий/натрий фосфатный буфер содержит одноосновный фосфат калия (KH_2P_4) и двухосновный фосфат натрия (Na_2HPO_4). В некоторых вариантах осуществления калий/натрий фосфатный буфер содержит двухосновный фосфат калия (K_2HPO_4) и одноосновный фосфат натрия (NaH_2PO_4). Мольное соотношение одноосновных фосфатных частиц и двухосновных фосфатных частиц ($[H_2PO_4]/[HPO_4]^{2-}$), вне зависимости от противоиона, изменяется в пределах от 5,13 до 0,52.

Предложенная здесь композиция может дополнительно содержать регулятор тоничности (иногда называемый стабилизатором). Регуляторы тоничности, используемые в композиции данного изобретения, представляют собой либо сахарозу, либо сорбит, в зависимости от других наполнителей, как определено в данном документе. В определенных вариантах осуществления композиция содержит сахарозу. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит сахарозу, концентрация которой находится в пределах от приблизительно 3% до приблизительно 12 вес/об.%, от приблизительно 3% до приблизительно 11 вес/об.%, от приблизительно 3% до приблизительно 10 вес/об.%, от приблизительно 4% до приблизительно 10 вес/об.%, от приблизительно 5% до приблизительно 9 вес/об.%, от приблизительно

6% до приблизительно 9 вес/об.%. В определенных вариантах осуществления концентрация сахарозы может быть равна 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12% или любому другому промежуточному значению. В предпочтительном варианте осуществления композиция содержит сахарозу, концентрация которой составляет от приблизительно 3% до приблизительно 10%. В предпочтительном варианте осуществления композиция содержит сахарозу, концентрация которой равна 8%. В других предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит сорбит. В предпочтительном варианте осуществления композиция содержит сорбит, концентрация которого составляет от приблизительно 3% до приблизительно 8 вес/об.%, от приблизительно 3% до приблизительно 7 вес/об.%, от приблизительно 4% до приблизительно 6 вес/об.%. В предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит сорбит, концентрация которого составляет от приблизительно 4% до приблизительно 6 вес/об.%. В определенных вариантах осуществления композиция содержит сорбит, концентрация которого равна 3%, 4%, 5%, 6%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8% или любому другому промежуточному значению. В предпочтительном варианте осуществления композиция содержит сорбит, концентрация которого равна 5%.

Предложенная в данном документе композиция дополнительно содержит антиоксидант. Антиоксидант, используемый в композициях данного изобретения, представляет собой EDTA или метионин в зависимости от других наполнителей, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления композиция содержит EDTA. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит EDTA, концентрация которого составляет от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 1,5 мМ, от приблизительно 0,2 мМ до приблизительно 1,4 мМ, от приблизительно 0,5 мМ до приблизительно 1,3 мМ, от приблизительно 0,7 мМ до приблизительно 1,2 мМ, от приблизительно 0,8 мМ до приблизительно 1,2 мМ, от приблизительно 0,9 мМ до приблизительно 1,1 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация EDTA в композиции равна 0,1 мМ, 0,2 мМ, 0,3 мМ, 0,4 мМ, 0,5 мМ, 0,6 мМ, 0,7 мМ, 0,8 мМ, 0,9 мМ, 1,0 мМ, 1,1 мМ, 1,2 мМ, 1,3 мМ, 1,4 мМ, 1,5 мМ или любому промежуточному значению. В предпочтительном варианте осуществления композиция содержит EDTA, концентрация которого равна 1,0 мМ. Композиция данного изобретения, содержащая EDTA, также содержит сахарозу. В других вариантах осуществления композиция содержит метионин. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит метионин, концентрация которого составляет от приблизительно 5 мМ до приблизительно 15 мМ, от приблизительно 6 мМ до приблизительно 14 мМ, от приблизительно 7 мМ до приблизительно 13 мМ, от приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ, от приблизительно 9 мМ до приблизительно 11 мМ. В предпочтительном варианте осуществления композиция содержит метионин, концентрация которого составляет от приблизительно 8% до приблизительно 12%. В некоторых вариантах осуществления концентрация метионина равна 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 11 мМ, 12 мМ, 13 мМ, 14 мМ, 15 мМ или любому промежуточному значению. В предпочтительном варианте осуществления композиция содержит метионин, концентрация которого равна 10 мМ. Композиция данного изобретения, содержащая метионин, также содержит сорбит.

Предложены композиции, содержащие *E. coli* O25B антиген-полисахарид, *E. coli* O1A антиген-полисахарид, *E. coli* O2 антиген-полисахарид и *E. coli* O6A антиген-полисахарид, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 5 вес/об.% сорбита; 10 мМ метионина; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80. Также предложены композиции, состоящие в основном из *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида и *E. coli* O6A антигена-полисахарида, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 5 вес/об.% сорбита; 10 мМ метионина; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80. Также предложены композиции, состоящие из *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида и *E. coli* O6A антигена-полисахарида, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 5 вес/об.% сорбита; 10 мМ метионина; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80. Также предложены композиции, содержащие *E. coli* O25B антиген-полисахарид, *E. coli* O1A антиген-полисахарид, *E. coli* O2 антиген-полисахарид, *E. coli* O6A антиген-полисахарид и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 других *E. coli* O антигенов-полисахаридов, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 5 вес/об.% сорбита; 10 мМ метионина; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80. Также предложены композиции, состоящие в основном из *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида, *E. coli* O6A антигена-полисахарида и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 других *E. coli* O антигенов-полисахаридов, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 5 вес/об.% сорбита; 10 мМ метионина; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80. Также предложены композиции, состоящие из *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида, *E. coli* O6A антигена-полисахарида и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 других *E. coli* O антигенов-полисахаридов, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 5 вес/об.% сорбита;

10 мМ метионина; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80.

Предложены композиции, содержащие *E. coli* O25B антиген-полисахарид, *E. coli* O1A антиген-полисахарид, *E. coli* O2 антиген-полисахарид и *E. coli* O6A антиген-полисахарид, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 8 вес/об.% сахарозы; 1 мМ EDTA; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80. Также предложены композиции, состоящие в основном из *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида и *E. coli* O6A антигена-полисахарида, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 8 вес/об.% сахарозы; 1 мМ EDTA; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80. Также предложены композиции, состоящие из *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида и *E. coli* O6A антигена-полисахарида, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 8 вес/об.% сахарозы; 1 мМ EDTA; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80. Также предложены композиции, содержащие *E. coli* O25B антиген-полисахарид, *E. coli* O1A антиген-полисахарид, *E. coli* O2 антиген-полисахарид, *E. coli* O6A антиген-полисахарид и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 других *E. coli* O антигенов-полисахаридов, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 8 вес/об.% сахарозы; 1 мМ EDTA; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80. Также предложены композиции, в основном состоящие из *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида, *E. coli* O6A антигена-полисахарида и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 других *E. coli* O антигенов-полисахаридов, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 8 вес/об.% сахарозы; 1 мМ EDTA; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80. Также предложены композиции, состоящие из *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида, *E. coli* O6A антигена-полисахарида и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 других *E. coli* O антигенов-полисахаридов, где каждый O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; 8 вес/об.% сахарозы; 1 мМ EDTA; 10 мМ калий/натрий фосфатного буфера при pH 7,0; и 0,02% PS80.

Композиции, описанные в данном документе, могут необязательно содержать консервант, такой как производное ртути тиомерсал, феноксиэтанол или парабены. В конкретном варианте осуществления фармацевтические композиции, описанные в данном изобретении, содержат от 0,001% до 0,01% тиомерсала. В других вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в данном изобретении, не содержат консервант.

В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе (например, иммуногенные композиции), содержат вспомогательное средство или вводятся в сочетании с ним. Вспомогательное средство для введения в сочетании с композицией, описанной в данном документе, можно вводить до введения, одновременно с введением или после введения указанной композиции. В некоторых вариантах осуществления термин "вспомогательное средство" или "адъювант" относится к соединению, которое при введении в сочетании с или в качестве составной части описанной в данном документе композиции повышает, усиливает и/или закрепляет иммунный ответ на биоконъюгат, но при введении одного только вспомогательного средства иммунный ответ на биоконъюгат не формируется. Вспомогательные средства усиливают иммунный ответ несколькими механизмами, включая, например, вовлечение лимфоцитов, стимулирование В- и/или Т-клеток, и стимуляцию макрофагов. В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, не содержат вспомогательное средство помимо биоконъюгатов и формообразующих, и/или его не вводят в сочетании со вспомогательным средством помимо биоконъюгатов и формообразующих (в случае, если биоконъюгаты и формообразующие имеют присущие им свойства адъювантов, это не будет учтено, и дополнительное инородное вспомогательное средство не будет добавлено в этих вариантах осуществления).

Конкретные примеры вспомогательных средств (адъювантов) включают, без ограничения, соли алюминия (квасцы) (такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия и сульфат алюминия), 3 де-О-ацилированный монофосфориллипид А (МФЛ) (см. патент Великобритании GB2220211), MF59 (Novartis), AS03 (GlaxoSmithKline), AS04 (GlaxoSmithKline), имидазопиридиновые соединения (см. WO 2007/109812), имидазохиноксалиновые соединения (см. WO 2007/109813) и сапонины, такие как QS21 (см. Kensil et al., in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); патент США № 5057540). Другие вспомогательные средства представляют собой эмульсии типа масло-в-воде (такие как сквален или арахисовое масло), необязательно в комбинации с иммуностимуляторами, такими как монофосфориллипид А (см. Stoute et al., 1997, N. Engl. J. Med. 336, 86-91). Другое вспомогательное средство представляет собой CpG (Bioworld Today, Nov. 15, 1998).

В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, составляют так, чтобы они были пригодны для определенного пути введения субъекту. Например, составы, описанные в данном документе, могут быть составлены, например, для внутримышечного, подкожного, парен-

терального, перорального, интраназального, внутрикожного, трансдермального, колоректального, внутрибрюшинного, интратрахеального, местного, ректального или легочного введения. В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, полезны для введения путем внутримышечной инъекции. В других вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, можно вводить внутрикожно. В других вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, можно вводить через кожу.

В другом аспекте в данном документе также предложены композиции лекарственной субстанции, содержащей по меньшей мере один из четырех конъюгатов, подробно описанных в данном документе (т.е. представляющие собой О-антиген из *E.coli* серотипов O25B, O1A, O2, или O6A), в составах, описанных в данном документе. Такие композиции, содержащие только один или набор из менее чем четырех конъюгатов, могут быть полезными, например, в случае хранения нерасфасованной партии антигенов, например, в виде лекарственной субстанции, перед смешиванием в конечный лекарственный продукт, и иметь такие же полезные свойства стабильности, которые описаны для композиций лекарственного продукта, содержащего все четыре конъюгата.

Способы/применения

Композиции данного изобретения можно применять, например, в способе, вызывающем иммунный ответ против ExPEC у субъекта, нуждающегося в этом. Предпочтительно, чтобы иммунный ответ был эффективным для предотвращения или лечения заболевания, связанного с ExPEC, у субъекта, нуждающегося в этом. Способ включает в себя введение субъекту композиции согласно данному изобретению.

В некоторых вариантах осуществления предложенные здесь композиции можно хранить в емкостях. Пригодные для этого емкости могут включать, без ограничения, мешки, флаконы, шприцы, бутылки и пробирки. В некоторых вариантах осуществления флаконы с пробками, предназначенными для прокалывания шприцем, содержат любые композиции, описанные в данном документе. Емкости, предложенные в данном документе, могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло (например, боросиликатное стекло), металл или пластик (например, поликарбонатов). В некоторых вариантах осуществления емкость представляет собой флакон из боросиликатного стекла типа I. В других вариантах осуществления емкость представляет собой стеклянный шприц либо с люэровским наконечником, либо с несъемной иглой. В других вариантах осуществления емкость представляет собой шприц из пластмассового материала, такого как поликарбонат (ПК) или полиэтилентерефталатгликоль (ПЭТФ), причем для этого материала было продемонстрировано, что он совместим с лекарственной субстанцией согласно данному изобретению. Флаконы могут необязательно содержать резиновые пробки, например, из (хлор/бром)бутиловой резины с покрытием из фторполимерной пленки (например, Flurotec [этилентетрафторэтилен (EFTE)] или Teflon [фторированный этиленпропилен (FEP)]). Можно использовать и другие материалы и типы емкостей, а совместимость с составами данного изобретения может быть определена специалистом в данной области на основании настоящего изобретения.

В определенных вариантах осуществления лекарственную субстанцию хранят в поликарбонатных емкостях, например, бутылках. В определенных вариантах осуществления лекарственную субстанцию хранят в полиэтилентерефталатгликольных емкостях, например, бутылках. В определенных вариантах осуществления лекарственный продукт хранят в стеклянных емкостях, например, флаконах.

Предложенные в данном документе составы улучшают стабильность гликоконъюгатов в композициях. Под стабильностью в общем случае подразумевают то, что композиция сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность при хранении. Предпочтительно, композиция в основном сохраняет свою физическую и химическую стабильность и свою биологическую активность при хранении. Специалисты в данной области могут определять физическую стабильность, химическую стабильность и биологическую активность, используя способы, раскрываемые в данном документе, и методы, известные в данной области техники. В данном изобретении композицию считают "стабильной" (а соответствующий состав считают "стабилизирующим"), если наблюдается изменение пика примеси в размере 5% или менее при эксклюзионной хроматографии ВЭЖХ (указывающее на агрегацию гликоконъюгата) по сравнению с нулевой временной точкой, как описано в примерах в данном документе. Например, у существующей композиции вакцины против ExPEC (в 25 mM Tris pH 7,4, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl) наблюдается более чем 5% увеличение пика примеси после 8 недель при 40°C, и поэтому она нестабильна на 8 неделе при этой температуре, в то время как композиции данного изобретения демонстрируют увеличение пика примеси менее 5% после 12 недель при 40°C и поэтому являются стабильными в течение не менее чем 12 недель при этой температуре. Композиции данного изобретения сохраняются в стеклянной емкости при 2-8°C в течение не менее чем 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 или более месяцев. Композиции данного изобретения сохраняются в пластмассовых емкостях в течение не менее чем 7 дней при 25°C, позволяя работать с ExPEC гликоконъюгатным продуктом в этих условиях.

В определенных вариантах осуществления данные композиции предложены в виде жидких композиций. Под жидкой композицией подразумевается, что она находится в жидком состоянии при температуре 2-8°C и предпочтительно хранится при 2-8°C. В альтернативном случае жидкую композицию хранят при 25°C или при 40°C, например, с целью ускоренного испытания стабильности в условия тепलो-

го стресса.

В определенных вариантах осуществления данные композиции могут храниться и сохраняют стабильность при 2-8°C, при 25°C или при 40°C. В предпочтительном варианте осуществления композиция хранится и сохраняет стабильность при 2-8°C. В определенных вариантах осуществления композиция сохраняет стабильность при 2-8°C в течение не менее чем приблизительно 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 или более месяцев. В определенных вариантах осуществления композиция сохраняет стабильность при 25°C в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более месяцев. В определенных вариантах осуществления композиция сохраняет стабильность при 40°C в течение не менее чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более недель.

В определенных вариантах осуществления данные композиции предложены в виде замороженной композиции. Под замороженной композицией подразумевается композиция, которая находится в твердом состоянии при хранении при температуре приблизительно -18° или ниже, например, при приблизительно -20°C, -40°C, -60°C, -70°C, -80°C или любой температуре в этом интервале или ниже. В определенных вариантах осуществления данные композиции могут храниться и сохраняют стабильность при -40°C или -60°C в зависимости от регулятора тоничности, присутствующего в композиции. В определенных вариантах осуществления данные композиции могут храниться и сохраняют стабильность при -70°C. В определенных вариантах осуществления композиция содержит сахарозу и сохраняет стабильность при -40°C в течение не менее чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 или более месяцев. В определенных вариантах осуществления композиция содержит сорбит и сохраняет стабильность при -60°C в течение не менее чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 или более месяцев. В определенных вариантах осуществления композиция содержит сорбит или сахарозу и сохраняет стабильность при -70°C в течение не менее чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более лет. Композиции настоящего изобретения разработаны так, чтобы они были более стабильны, чем старые составы композиций, описанные ранее. Стабильность композиции можно определять способами, описанными в данном документе и методами, известными в области техники. При использовании этих способов композиции настоящего изобретения будут более стабильными в течение установленного периода времени при заданной температуре по сравнению с композициями старого состава в течение такого же периода времени и при той же температуре.

Также в данном документе предложены способы получения композиций, которые здесь раскрыты. В определенных вариантах осуществления предложены способы получения композиций, включающие в себя внесение по меньшей мере одного *E. coli* O антигена, ковалентно связанного с EPA носителем, воды, солей для буферного раствора (т.е. (ди)гидрофосфата натрия и (ди)гидрофосфата калия [т.е. Na_2HPO_4 и KH_2P_4 или NaH_2PO_4 и K_2HPO_4]), регулятора тоничности (т.е. сорбита или сахарозы), антиоксиданта (т.е. метионина, если регулятором тоничности является сорбит; EDTA, если регулятором тоничности является сахароза) и ПАВ (например, PS80) в емкость, доведение pH до требуемого значения pH (т.е. от 6,5 до 7,5, например, 7,0) и перемешивание этих ингредиентов, и таким образом получение жидкого состава согласно данному изобретению. В предпочтительном варианте осуществления способы получения композиций включают в себя внесение *E. coli* O25B антигена-полисахарида, *E. coli* O1A антигена-полисахарида, *E. coli* O2 антигена-полисахарида и *E. coli* O6A антигена-полисахарида, где каждый антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A of *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; воды; калия фосфата; натрия фосфата; сорбита; метионина; и PS80 в емкость, доведение pH до 7,0, и смешивание каждого ингредиента таким образом, чтобы конечная концентрация калий/натрий фосфатного буфера составляла 10 мМ при pH, равном 7,0, конечная концентрация сорбита составляла 3-8% (например, 5%) (вес/об.), сорбит составлял 5 вес/об.%, метионин составлял 10 мМ, и PS80 составлял 0,02 вес/об.%. Одним неограничивающим, иллюстративным путем получения состава согласно данному изобретению является следующий: к приблизительно 3,5 л воды добавляют: 3,3696 г KH_2P_4 ($M_w=136,09$ г/моль), 2,1635 г Na_2HPO_4 ($M_w=141,96$ г/моль), 200 г сорбита, 5,9684 г метионина ($M_w=149,21$ г/моль), 8 мл 10%-ного (вес/об.) исходного раствора PS80, что дает pH приблизительно 6,73, который затем доводят до целевого pH 7,0, используя 500 мкл 10 N NaOH, и объем доводят добавлением воды до 4 л. Состав, содержащий сахарозу и EDTA вместо сорбита и метионина, можно получать аналогичным образом, понятным специалисту в данной области, обладающему обычными навыками и информацией, предоставленной в данном документе. Одним возможным путем приготовления композиции согласно данному изобретению является замена буфера, например, с использованием проточной фильтрации вдоль потока, фильтрации, диализа, эксклюзионной хроматографии и т.п., для замены состава, приготовленного, как описано выше, на любой буфер, в котором находится гликоконъюгат ExPECt, например, в ходе или после стадии очистки гликоконъюгата ExPEC. Такая стадия замены буфера является обычной для специалиста в данной области при использовании информации, предоставленной в данном документе.

Следующие примеры изобретения дополнительно иллюстрируют характер данного изобретения. Следует понимать, что следующие примеры не ограничивают данное изобретение, объем которого определяется приложенной формулой изобретения.

Варианты осуществления

Вариант осуществления 1 представляет собой иммуногенную композицию, содержащую *E. coli* O25B антиген-полисахарид, *E. coli* O1A антиген-полисахарид, *E. coli* O2 антиген-полисахарид, и *E. coli* O6A антиген-полисахарид, предпочтительно - все четыре *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A антигена-полисахарида, где каждый антиген-полисахарид независимо ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; от 3% до 8% (предпочтительно - от 4% до 6%) (вес/об.) сорбита; от 5 до 15 мМ (предпочтительно - от 8 до 12 мМ) метионина; от 5 до 20 мМ (предпочтительно - от 8 до 15 мМ) калий/натрий фосфатного буфера с рН от 6,5 до 7,5; и от 0,01% до 0,2 вес/об.% ПАВ.

Вариант осуществления 2 представляет собой иммуногенную композицию варианта осуществления 1, где *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A антигены-полисахариды находятся в весовом соотношении 1:1:1:1 или 2:1:1:1.

Вариант осуществления 3 представляет собой иммуногенную композицию варианта осуществления 1 или 2, где концентрация сорбита составляет 5 вес/об.%.

Вариант осуществления 4 представляет собой иммуногенную композицию вариантов осуществления 1-3, где концентрация метионина составляет 10 мМ.

Вариант осуществления 5 представляет собой иммуногенную композицию любого из вариантов осуществления 1-4, где концентрация калий/натрий фосфатного буфера составляет 10 мМ, и рН калий/натрий фосфатного буфера равен 7,0.

Вариант осуществления 5 представляет собой иммуногенную композицию любого из вариантов осуществления 1-5, где ПАВ содержит гидрофильную головную часть и гидрофобную хвостовую часть, где ПАВ предпочтительно выбирают из группы, состоящей из F-68, PS20 и PS80.

Вариант осуществления 7 представляет собой иммуногенную композицию варианта осуществления 6, где ПАВ представляет собой PS80.

Вариант осуществления 8 представляет собой иммуногенную композицию варианта осуществления 7, где концентрация ПАВ составляет 0,02 вес/об.%.

Вариант осуществления 7 представляет собой иммуногенную композицию, содержащую:

E. coli O25B антиген-полисахарид, *E. coli* O1A антиген-полисахарид, *E. coli* O2 антиген-полисахарид и *E. coli* O6A антиген-полисахарид, где каждый антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя;

5 вес/об.% сорбита;

10 мМ метионина;

6,19 мМ KH_2P_4 и 3,81 мМ Na_2HPO_4 буфера с рН равным 7,0; и

0,02 вес/об.% PS80.

Вариант осуществления 10 представляет собой иммуногенную композицию, содержащую *E. coli* O25B антиген-полисахарид, *E. coli* O1A антиген-полисахарид, *E. coli* O2 антиген-полисахарид, и *E. coli* O6A антиген-полисахарид, предпочтительно - все четыре *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A антигена-полисахарида, где каждый антиген-полисахарид независимо ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя; от 3% до 12% (предпочтительно - от 3% до 10%) (вес/об.) сахарозы; от 0,1 до 1,5 мМ EDTA; от 5 до 20 мМ (предпочтительно - от 8 до 15 мМ) калий/натрий фосфатного буфера с рН от 6,5 до 7,5; и от 0,01% до 0,2 вес/об.% ПАВ.

Вариант осуществления 11 представляет собой иммуногенную композицию варианта осуществления 10, где *E. coli* O25B, O1A, O2 и O6A антигены-полисахариды находятся в весовом соотношении 1:1:1:1 или 2:1:1:1.

Вариант осуществления 12 представляет собой иммуногенную композицию варианта осуществления 10 или 11, где концентрация сахарозы составляет 8 вес/об.%.

Вариант осуществления 13 представляет собой иммуногенную композицию вариантов осуществления 10-12, где концентрация EDTA составляет 1 мМ.

Вариант осуществления 14 представляет собой иммуногенную композицию любого из вариантов осуществления 10-13, где концентрация калий/натрий фосфатного буфера составляет 10 мМ, и рН калий/натрий фосфатного буфера равен 7,0.

Вариант осуществления 15 представляет собой иммуногенную композицию любого из вариантов осуществления 10-14, где ПАВ содержит гидрофильную головную часть и гидрофобную хвостовую часть, где ПАВ предпочтительно выбирают из группы, состоящей из F-68, PS20 и PS80.

Вариант осуществления 16 представляет собой иммуногенную композицию варианта осуществления 15, где ПАВ представляет собой PS80.

Вариант осуществления 17 представляет собой иммуногенную композицию варианта осуществления 16, где концентрация ПАВ составляет 0,02 вес/об.%.

Вариант осуществления 18 представляет собой иммуногенную композицию, содержащую:

E. coli O25B антиген-полисахарид, *E. coli* O1A антиген-полисахарид, *E. coli* O2 антиген-полисахарид, *E. coli* O6A антиген-полисахарид, где каждый антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя;

8 вес/об.% сахарозы;

1 мМ EDTA;

10 мМ калий/натрий фосфатного (например, 6,19 мМ KH_2P_4 и 3,81 мМ Na_2HPO_4) буфера с рН, равным 7,0; и

0,02 вес/об.% PS80.

Вариант осуществления 19 представляет собой иммуногенную композицию любого одного из вариантов осуществления 1-18, где концентрация каждого О-антигена-полисахарида находится в пределах от приблизительно 1 до 200 мкг/мл, предпочтительно в пределах от 1 до 100 мкг/мл, более предпочтительно в пределах от 2 до 50 мкг/мл, например, в пределах от приблизительно 4 мкг/мл до 32 мкг/мл.

Вариант осуществления 20 представляет собой иммуногенную композицию любого одного из вариантов осуществления 1-19, где соотношение полисахарид:белок-носитель (вес:вес) составляет от приблизительно 1:10 до приблизительно 1:2, например, от приблизительно 1:5 до приблизительно 1:2 для каждого О-антигена-полисахарида.

Вариант осуществления 21 представляет собой иммуногенную композицию любого одного из вариантов осуществления 1-20 в жидкой форме, пригодной для введения путем инъекции или вливания.

Вариант осуществления 22 представляет собой иммуногенную композицию любого одного из вариантов осуществления 1-21, вызывающую иммунный ответ у нуждающегося в этом субъекта.

Вариант осуществления 23 представляет собой применение иммуногенной композиции любого одного из вариантов осуществления 1-21 для производства лекарственного средства, вызывающего иммунный ответ у нуждающегося в этом субъекта.

Вариант осуществления 24 представляет собой композицию любого одного из вариантов осуществления 1-21 в стеклянной емкости.

Вариант осуществления 25 представляет собой композицию любого одного из вариантов осуществления 1-21 в поликарбонатной емкости.

Вариант осуществления 26 представляет собой композицию любого одного из вариантов осуществления 1-21 в полиэтилентерефталатгликолевой емкости.

Вариант осуществления 27 представляет собой композицию любого одного из вариантов осуществления 1-21 во флаконе.

Вариант осуществления 28 представляет собой композицию любого одного из вариантов осуществления 1-21 в шприце.

Вариант осуществления 29 представляет собой композицию любого одного из вариантов осуществления 1-21 или 24-28, которая сохраняет стабильность в течение не менее чем 6 месяцев, предпочтительно - не менее чем 12 месяцев, более предпочтительно - не менее чем 18 месяцев, более предпочтительно - не менее чем 24 месяца, более предпочтительно - не менее чем 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 или более месяцев хранения при температуре 2-8°C.

Вариант осуществления 30 представляет собой способ поддержания стабильного состояния жидкой иммуногенной композиции, содержащей *E. coli* О антиген, ковалентно связанный с ЕРА белка-носителя, включающий в себя хранение композиции любого одного из вариантов осуществления 1-21 или 24-29 при температуре 2-8°C в течение не менее чем 6 месяцев, предпочтительно - не менее чем 12 месяцев, более предпочтительно - не менее чем 18 месяцев, более предпочтительно - не менее чем 24 месяца, более предпочтительно - не менее чем 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 или более месяцев.

Примеры

Пример 1. Внесение ПАВ предотвращает вызываемую замораживанием/размораживанием агрегацию ЕхРЕС гликоконъюгата

Чтобы определить, какую комбинацию формообразующих можно добавить к *E. coli* O25B, O1A, O2, O6A антигенам-сахаридам, каждый из которых независимо ковалентно связан с отдельным (т.е. всего четыре отдельных гликоконъюгата) экзотоксином А *Pseudomonas aeruginosa* (ЕРА), здесь и далее называемым ЕхРЕС гликоконъюгатами, чтобы способствовать стабилизации при замораживании/размораживании, встряхивании, тепловом стрессе, вызванном металлом окислительном стрессе, в исходный состав ЕхРЕС гликоконъюгата вводили разные формообразующие (ЕхРЕС гликоконъюгат, 25 мМ Tris, рН 7,4, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl) (здесь и далее называемый "старым" составом, который представляет собой используемый в настоящее время в фазе 2 клинических испытаний состав ЕхРЕС гликоконъюгата, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02546960), и полученный состав исследовали соответствующими методами в отношении повышения стабилизации.

В старом составе (иногда называемом здесь "контрольным") ЕхРЕС гликоконъюгат образует агрегаты при стрессе, вызванном замораживанием/размораживанием. Агрегация ЕхРЕС гликоконъюгата наблюдается по пику примеси на кривой эксклюзионной хроматографии-высокоэффективной жидкостной хроматографии (ЭХ-ВЭЖХ) (см., например, фиг. 1А и 1В), в которой пик примеси 1 является показателем нестабильности под воздействием стресса.

Сначала в состав ЕхРЕС гликоконъюгата добавляли криопротектор (например, сорбит) и полученный состав исследовали с целью определения возможного повышения стабильности при воздействии стресса, вызванного замораживанием/размораживанием. Было найдено, что введение сорбита не предохраняет ЕхРЕС гликоконъюгат от агрегации при замораживании/размораживании согласно данным ЭХ-

ВЭЖХ (фиг. 1В).

Однако неожиданно введение ПАВ (например, F-68 [также известного как полоксамер 188 или Plu-gonic F-68], PS20 или PS80) в состав ExPEC гликоконъюгата повысило стабильность ExPEC гликоконъюгата при воздействии стресса, вызванного замораживанием/размораживанием. В частности, ПАВ предотвратил агрегацию ExPEC гликоконъюгата при воздействии стресса, вызванного замораживанием/размораживанием. Добавление 0,01% PS-80, 0,01% PS 20 или 0,1% F-68 (все вес/об.) к ExPEC гликоконъюгату предотвратило вызываемую замораживанием/размораживанием агрегацию, как это было измерено с помощью ЭХ-ВЭЖХ (фиг. 1В и фиг. 1С). Каждое подвергнутое испытанию ПАВ (все ПАВ были неионогенными) состояло из гидрофильной головной части (содержащей ОН-группы) и длинной гидрофобной хвостовой части (углеродной цепи, которая может содержать приблизительно 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 130 или более атомов углерода в углеродной цепи). Не прибегая к теоретизированию, было сделано предположение, что эти физические свойства позволяют исследованным ПАВ предотвращать вызываемую замораживанием/размораживанием агрегацию ExPEC гликоконъюгата. В последующей разработке PS80 использовали в качестве формообразующего для предотвращения вызываемой замораживанием/размораживанием агрегации, поскольку именно это ПАВ обладает дополнительными преимуществами в отношении легкости применения на поздних стадиях разработки ExPEC гликоконъюгата.

Пример 2: Оценка состава в отношении буфера, значения pH и регулятора тоничности

После того, как было показано, что ПАВ могут предотвращать вызываемую замораживанием/размораживанием агрегацию ExPEC гликоконъюгата, был произведен поиск подходящих буфера, pH и регулятора тоничности для этого состава. В последующем эксперименте было исследовано несколько составов с разными комбинациями буфера-pH в присутствии NaCl (150 мМ) или 5% сорбита (вес/об.) в качестве регулятора тоничности, причем все составы содержали PS80 (0,01 вес/об.%. Старый состав (25 мМ Tris, pH 7,4, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl) использовали в качестве контроля. Исследовали несколько концентраций ExPEC гликоконъюгата (например, 16 или 8 мкг/мл для каждого полисахарида), но эффекта на стабильность исследованных составов от применения разной концентрации нами не наблюдалось (данные не показаны).

Эти составы подвергали действию нескольких стрессов, включая замораживание/размораживание, встряхивание, воздействие света и тепловой стресс при различных температурах (например, 2-8°C, 25°C и 40°C) (табл. 1).

Таблица 1: Стрессовые условия, которым подвергали составленные заново составы ExPEC гликоконъюгатов.

Стресс	Условия	Временные точки
Температура	5°C	0, 4, 8, 12 неделя
	25°C	2, 4, 8 недель
	40°C	1, 2, 4 неделя
Взбалтывание	Вихревая мешалка (1000 об/мин при температуре окружающей среды)	4 часа
Замораживание/размораживание	-70°C до температуры окружающей среды	5 последовательных циклов
Светочувствительность	Световая экспозиция (ICN Q1B вариант 2)	200 Вт/м ² УФ-А свет (~6 часов) + 1200 люкс-ч видимый свет (~40 часов)

Таблица 2: Аналитический набор для анализа составленных заново составов ExPEC гликоконъюгатов

Метод анализа	Цель
Визуальный осмотр	Внешний вид и прозрачность
pH	Кислотность и основность образцов
Осмоляльность	Осмоляльность
ЭХ-ВЭЖХ	Чистота, агрегаты, продукты расщепления
Хроматография с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ)	Чистота, химические преобразования
Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ)	Чистота, химические преобразования
Динамическое рассеяние света (ДРС)	Невидимые частицы
FlowCAM	Невидимые частицы

С использованием набора аналитических методов, описанных в табл. 2, было показано, что составы, содержащие гистидин при pH 7 или фосфат калия при pH 7 были более стабильными по сравнению с другими комбинациями буфер-pH (данные не показаны). Также, при крайних значениях pH (т.е., pH 5,0 и

pH 8,0) наблюдается более высокий уровень агрегации ЕхРЕС гликоконъюгата. Кроме того, было отмечено, что составы, содержащие сорбит в качестве регулятора тоничности, неожиданно оказались более стабилизирующими, чем составы, содержащие NaCl в качестве регулятора тоничности. Действительно, было отмечено, что составы, содержащие NaCl, не способны стабилизировать ЕхРЕС гликоконъюгат против агрегации в ходе хранения при 40°C. При использовании сорбита в качестве регулятора тоничности, агрегация ЕхРЕС гликоконъюгата не происходила, что свидетельствует о неожиданном стабилизирующем эффекте сорбита. Кроме того, агрегация при крайних значениях pH (т.е., pH 5,0 и pH 8,0) снижается в содержащих сорбит составах по сравнению с составами, содержащими NaCl. Это показывает, что сорбит делает составы более устойчивыми и способен обеспечить ЕхРЕС гликоконъюгату стабилизирующий эффект, даже если в ходе производства происходят изменения pH.

Пример 3: Оценка стабильности состава

Дополнительные составы были разработаны для того, чтобы определить наилучшие составы-кандидаты в отношении стабильности ЕхРЕС гликоконъюгата. В случае буферов и pH проводили оценку гистидина при pH равном 6,5 и 7,0, а вместо одного только фосфата калия исследовали калий/натрий фосфатный буфер ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) при pH 6,5 и 7,0. Сочетание калия и натрия было выбрано на основании первоначальных результатов, оно лучше работает на местном уровне в отношении буферной pH емкости при замораживании/размораживании. При приготовлении буферной системы использовали избыток калия над натрием (например, для 10 мМ фосфатного буфера с pH 7,0, мы использовали 6,19 мМ K_2HPO_4 и 3,81 мМ Na_2HPO_4). В качестве регуляторов тоничности исследовали сахарозу (8 вес/об.%) и сорбит (5 вес/об.%). Кроме того, оценивали эффект от введения антиоксиданта EDTA (1 мМ) или метионина (10 мМ). Также было исследовано, имеет ли отсутствие NaCl или наличие сорбита защитный эффект, наблюдаемый в примере 2, путем включения состава, который содержал их комбинацию (каждый в половинной концентрации по сравнению со случаем, когда эти компоненты использовались по отдельности, как в примере 2). Все составы содержали PS80 с концентрацией 0,02 вес/об.%.

Различные составы подвергали действию таких же условий стресса, что и в примере 2. На основании комбинирования данных о стабильности осуществляли стадию отбора, где эффективность каждого состава оценивали и исключали на основании следующих критериев: (а) появление дополнительного пика примеси на хроматограмме ОФ-ВЭЖХ по меньшей мере в двух временных точках из трех для каждой температуры; (б) пик примеси 1 был виден/увеличен на хроматограмме ЭХ-ВЭЖХ по меньшей мере в двух временных точках из трех для каждой температуры; (с) появление дополнительного пика примеси на хроматограмме ЭХ-ВЭЖХ после воздействия стресса (например, замораживания/размораживания, встряхивания, воздействия света); и (д) пик примеси 1 был виден/увеличен на хроматограмме ЭХ-ВЭЖХ после воздействия стресса (например, замораживания/размораживания, встряхивания, воздействия света). Было обнаружено, что два определенных состава, названных в данном документе составами 26 и 28, были способны позволить ЕхРЕС гликоконъюгату выдерживать каждое из условий исследуемых стрессов.

Состав 26 содержал 10 мМ Na/K фосфатного буфера pH 7,0, 5 вес/об.% сорбита, 10 мМ метионина, 0,02 вес/об.% PS-80 и ЕхРЕС гликоконъюгат.

Состав 28 содержал 10 мМ Na/K фосфатного буфера pH 7,0, 8% сахарозы, 1 мМ EDTA, 0,02% PS-80 и ЕхРЕС гликоконъюгат.

Неожиданно, определенные комбинации регулятора тоничности и антиоксиданта имели значение, поскольку составы, содержащие либо (i) сорбит с метионином, либо (ii) сахарозу с EDTA, были значительно более эффективными, чем (а) составы, в которых сорбит объединяли с EDTA, а также чем (б) составы, в которых сахарозу объединяли с метионином, и (с) составы без антиоксиданта. Также неожиданно оказалось, что составы ЕхРЕС гликоконъюгата предпочтительно не должны содержать хлорид натрия. Составы 26 и 28 могут варьироваться в определенных пределах, и при этом по-прежнему стабилизировать ЕхРЕС гликоконъюгат. В табл. 3 приведены применимые пределы для pH и концентраций формообразующих для составов 26 и 28.

Таблица 3: Пределы pH и концентраций формообразующих для составов ЕхРЕС гликоконъюгатов

Формообразующее	Пределы	
pH	6,5	7,5
K/Na фосфат (мМ)	5	20
Сорбит (%) (вес/об.)	3	8
Сахароза (%) (вес/об.)	3	12
Метионин (мМ)	5	15
EDTA (мМ)	0,1	1,5
Поверхностно-активное вещество (%) : F-68	0,05	0,2
	0,01	0,08
	0,01	0,08

PS20		
PS80		

Составы 26 и 28 дополнительно тестировали в исследовании конформации для сравнения со старым ExPEC гликоконъюгатным составом (ExPEC гликоконъюгат, 25 mM Tris, pH 7,4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl). Были исследованы оба положения флакона - вертикальное и перевернутое - с целью определения влияния контакта с пробкой конечной емкости. Составы 26 и 28 состоят из формообразующих, которые не представляют собой какую-либо опасность в предложенных концентрациях, используются в лицензированных вакцинах и/или находятся в списке разрешенных формообразующих для парентерального введения. Комбинация этих формообразующих для составов 26 и 28 и значения pH буферного раствора вносят свой вклад в усовершенствованный стабилизирующий эффект ExPEC гликоконъюгата по сравнению со старым ExPEC гликоконъюгатным составом. Предложенная комбинация этих формообразующих для составов 26 и 28 оказалась способной сохранять лекарственные субстанции (ДС) и лекарственный продукт (ЛП) гликоконъюгатных вакцин против ExPEC при замораживании/размораживании и тепловом стрессе (например, фиг. 2), при этом соответствуя требованиям к ожидаемой стабильности при хранении при 2-8°C и 25°C (данные не показаны). Концентрация полисахарида, исследованная для ЛП, составляла 20 мкг/мл для каждого штамма (в сумме 80 мкг/мл), а суммарная концентрация белка составляла 300 мкг/мл. В случае ЛС серотипов O25B (т.е. содержащих E. coli O25B антиген-полисахарид, ковалентно связанный с экзотоксином ЕРА белка-носителя) исследуемая концентрация полисахарида была 200 мкг/мл, и исследуемая концентрация белка была 830 мкг/мл. Такие композиции были стабильны в ходе периода времени.

Таким образом, лекарственный продукт в составах 26 и 28 продемонстрировал стабильность в течение не менее чем 6 месяцев при 2-8°C, не менее чем шесть месяцев при 25°C, и исследование стабильности продолжается.

Пример 4: Оценка составов в условиях вызванного металлом окислительного стресса

Составы 26 и 28 дополнительно исследовали с точки зрения стабилизирующего эффекта на ExPEC гликоконъюгат в присутствии вольфрама в качестве модели вызванного металлом окисления продукта. Остаточные количества вольфрама обычно присутствуют на кончике стеклянных предварительно заполненных шприцев (ПЗШ), что является результатом процесса формирования кончика с использованием вольфрамовой иглы. Осаждение остаточных количеств вольфрама в ПЗШ зависит от процесса производства и может изменяться от производителя к производителю в пределах 250-1250 нанogramm/упаковку. Вольфрам связывают с агрегацией белка в ПЗШ (Jiang et al., J. Pharmaceutical Sci. 98(12):4695-710 (2009); Seidl et al., Pharmaceutical Res. 29:1454-67 (2012)). Так, стабильность составов 26 и 28 и старого состава исследовали при воздействии вольфрама при различных концентрациях, при этом наблюдая за окислительным стрессом и склонностью к агрегации ExPEC гликоконъюгата. В этом исследовании тестировали три уровня содержания вольфрама (высокий (HW), средний (MW) и низкий (LW)) по всему интервалу уровней содержания остаточных количеств вольфрама в ПЗШ, поступающих в настоящее время в продажу. Условия стресса, применявшиеся к составам, сведены в табл. 4.

Таблица 4: Условия стресса, применяемые к вольфрамсодержащим составам

Стресс	Условия	Временные точки
Температура	40°C	0, 1, 2 и 4 недели
Взбалтывание	Вихревая мешалка (200 об/мин при температуре окружающей среды)	24 часа

Было показано, что составы 26 и 28 содержат наименьшее количество агрегатов ExPEC гликоконъюгатов в ходе периода времени, что было установлено с помощью анализа ЭХ-ВЭЖХ (характеризующий стабильность пик примесей 1). Величины пиков примесей в момент времени 4 недели достигли 3,1% по сравнению с 1,0% в момент времени T-0, даже при воздействии наиболее высоких уровней содержания вольфрама (в среднем 0,5% роста в неделю, фиг. 3).

Таким образом, в изобретении предложены два разных усовершенствованных жидких состава для гликоконъюгатной вакцины против ExPEC. Первая, наиболее предпочтительная композиция содержит ExPEC гликоконъюгат, сорбит, метионин, K/Na-фосфатный буфер с pH 7 и ПАВ. Вторая предпочтительная композиция содержит ExPEC гликоконъюгат, сахарозу, EDTA, K/Na-фосфатный буфер с pH 7 и ПАВ. Преимущество этих композиций над ранее описанной композицией состоит в том, что при хранении при 2-8°C, гликоконъюгатная вакцина против ExPEC демонстрирует улучшенный профиль стабильности в новых составах данного изобретения, в которых предотвращается агрегация и образование продуктов разложения, как следует из анализов, характеризующих стабильность (ЭХ-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ). Стабилизирующий эффект обоих изобретенных составов еще более очевиден при воздействии таких стрессов, как замораживание/размораживание, тепло (40°C) и окисляющее действие металлов при анализе с использованием вышеуказанных аналитических методик. Эти признаки позволяют использовать многие варианты хранения и транспортировки, как ЛС, так и ЛП гликоконъюгатной вакцины против ExPEC. Кроме того, улучшенные свойства выносливости стресса, вызванного окисляющим действием

металлов, также относятся к долговременному хранению ExPEC вакцины в альтернативных системах первичной упаковки (например, предварительно заполненный шприц и/или приспособления для применения).

Пример 5: Исследование совместимости состава с пластмассовыми материалами.

Составы 26 и 28 дополнительно исследовали с точки зрения стабилизирующего эффекта на лекарственную субстанцию ExPEC гликоконъюгата (O25B конъюгат, исследуемая концентрация полисахарида была 227-242 мкг/мл и белка - 952-1048 мкг/мл) при контакте с различными пластмассовыми материалами, такими как поликарбонат (ПК) и полиэтилентерефталатгликоль (ПЭТФ).

Пластмассовые материалы ассоциируются с разрушением белка, например, при стерилизации пластмассового материала облучением. Составы исследовали с точки зрения стабильности в условиях стресса, вызванного интенсивным перемешиванием (24 ч при 200 об/мин при комнатной температуре) в емкостях из ПЭТФ и ПК. Старые составы полностью разлагались в этих условиях в емкости из ПЭТФ. В отличие от этого, как было показано с помощью анализа ЭХ-ВЭЖХ (см. фиг. 4, с использованием пика примесей 1 в качестве показателя нестабильности), составы 26 и 28 остаются стабильными в тех же условиях в исследуемых емкостях из ПЭТФ и ПК. Кроме того, установлена стабильность лекарственной субстанции в этих составах в ходе хранения в течении семи дней в емкостях из ПК и ПЭТФ при 25°C (данные не показаны).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая:
 - по меньшей мере один E. coli O антиген-полисахарид, где по меньшей мере один O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя;
 - от 3% до 8 вес/об.% сорбита;
 - от 5 до 15 мМ метионина;
 - от 5 до 20 мМ калий/натрий фосфатного буфера с pH от 6,5 до 7,5; и
 - от 0,01% до 0,2 вес/об.% ПАВ.
 - 2. Иммуногенная композиция по п.1, содержащая E. coli O25B антиген-полисахарид, E. coli O1A антиген-полисахарид, E. coli O2 антиген-полисахарид и E. coli O6A антиген-полисахарид, где каждый антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя.
 - 3. Иммуногенная композиция по п.1 или 2, где концентрация сорбита составляет 5 вес/об.%.
 - 4. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-3, где концентрация метионина составляет 10 мМ.
 - 5. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-4, где концентрация калий/натрий фосфатного буфера составляет 10 мМ, и pH калий/натрий фосфатного буфера равен 7,0.
 - 6. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-5, где ПАВ представляет собой неионогенный ПАВ, где ПАВ предпочтительно выбран из группы, состоящей из F-68, PS20 и PS80.
 - 7. Иммуногенная композиция по п.6, где ПАВ представляет собой PS80, где концентрация PS80 предпочтительно составляет 0,02 вес/об.%.
 - 8. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-7, содержащая:
 - E. coli O25B антиген-полисахарид, E. coli O1A антиген-полисахарид, E. coli O2 антиген-полисахарид и E. coli O6A антиген-полисахарид, где каждый антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя;
 - 5 вес/об.% сорбита;
 - 10 мМ метионина;
 - 10 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ буфера с pH, равным 7,0;
 - 0,02 вес/об.% PS80; и
 - воду.
 - 9. Иммуногенная композиция, содержащая:
 - по меньшей мере один E. coli O антиген-полисахарид, где по меньшей мере один O антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя;
 - от 3% до 12 вес/об.% сахарозы;
 - от 0,1 до 1,5 мМ EDTA;
 - от 5 до 20 мМ калий/натрий фосфатного буфера с pH от 6,5 до 7,5; и
 - от 0,01% до 0,2 вес/об.% ПАВ.
 - 10. Иммуногенная композиция по п.9, содержащая E. coli O25B антиген-полисахарид, E. coli O1A антиген-полисахарид, E. coli O2 антиген-полисахарид и E. coli O6A антиген-полисахарид, где каждый антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином A *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) белка-носителя.
 - 11. Иммуногенная композиция по п.9 или 10, где концентрация сахарозы составляет 8 вес/об.%.
 - 12. Иммуногенная композиция по любому из пп.9-11, где концентрация EDTA составляет 1 мМ.
 - 13. Иммуногенная композиция по любому из пп.9-12, где концентрация калий/натрий фосфатного буфера составляет 10 мМ, и pH калий/натрий фосфатного буфера равен 7,0.
 - 14. Иммуногенная композиция по любому из пп.9-13, где ПАВ представляет собой неионогенный

ПАВ, где ПАВ предпочтительно выбран из группы, состоящей из F-68, PS20 и PS80.

15. Иммуногенная композиция по п.14, где ПАВ представляет собой PS80, где концентрация PS80 предпочтительно составляет 0,02 вес/об.%.
 16. Иммуногенная композиция по любому из пп.9-15, содержащая:

E. coli O25В антиген-полисахарид, *E. coli* O1А антиген-полисахарид, *E. coli* O2 антиген-полисахарид, *E. coli* O6А антиген-полисахарид, где каждый антиген-полисахарид ковалентно связан с экзотоксином *A Pseudomonas aeruginosa* (ЕРА) белка-носителя;

8 вес/об.% сахарозы;

1 мМ EDTA;

10 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ буфера с рН, равным 7,0;

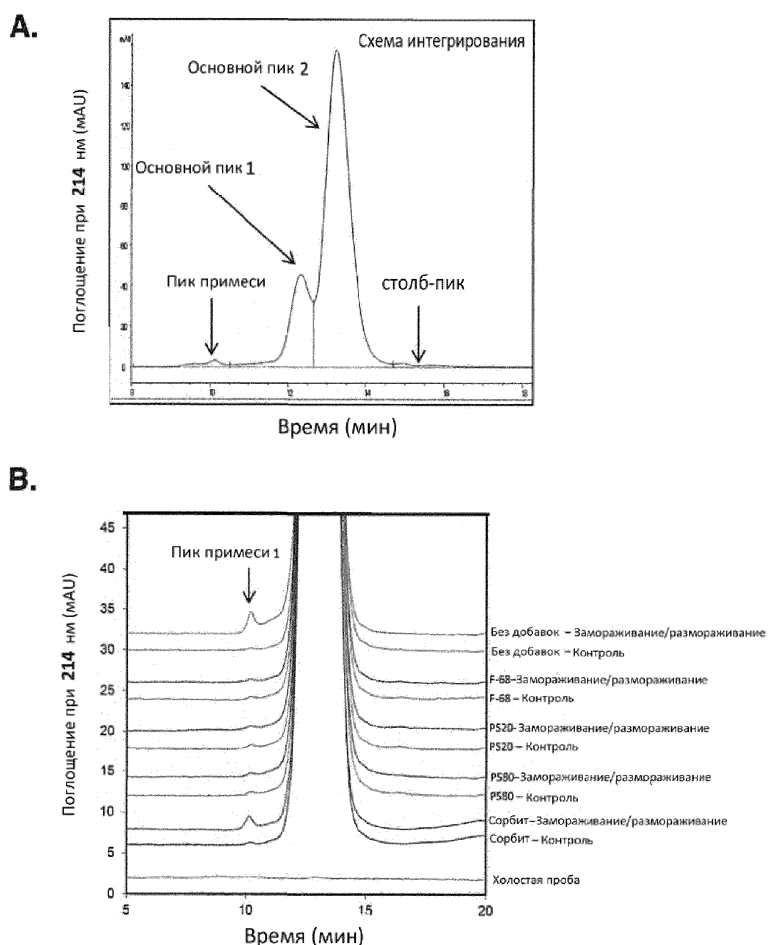
0,02 вес/об.% PS80; и

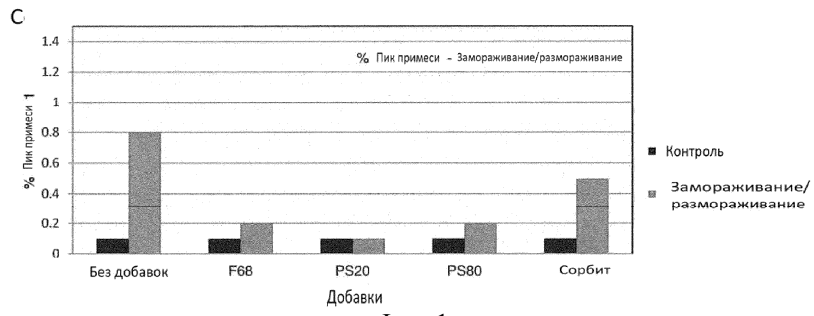
воду.

17. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-16, где концентрация каждого О-антигена-полисахарида составляет от 1 до 200 мкг/мл, например, от 2 до 100 мкг/мл, например, от 8 до 48 мкг/мл и где соотношение полисахарид:белок-носитель предпочтительно составляет от 1:10 до 1:2, например, предпочтительно, от 1:5 до 1:2 для каждого О-антигена-полисахарида.

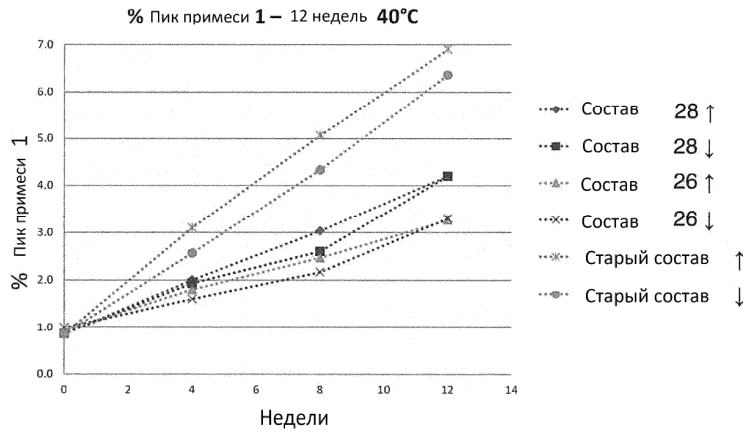
18. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-17, в которой суммарная концентрация содержащегося в ней О-антигена-полисахарида составляет от 4 до 100 мкг/мл, например, от 10 до 500 мкг/мл, например, от 20 до 250 мкг/мл, например, от 24 до 120 мкг/мл, а суммарная концентрация ЕРА белка-носителя находится в пределах от 40 до 2000 мкг/мл, например, от 100 до 150 мкг/мл, например, от 200 до 120 мкг/мл, например, от 250 до 600 мкг/мл.

19. Способ поддержания стабильного состояния жидкой иммуногенной композиции, содержащей *E. coli* О антиген, ковалентно связанный с ЕРА белка-носителя, включающий хранение композиции по любому из пп.1-18 при температуре 2-8°C в течение по меньшей мере 6 месяцев.

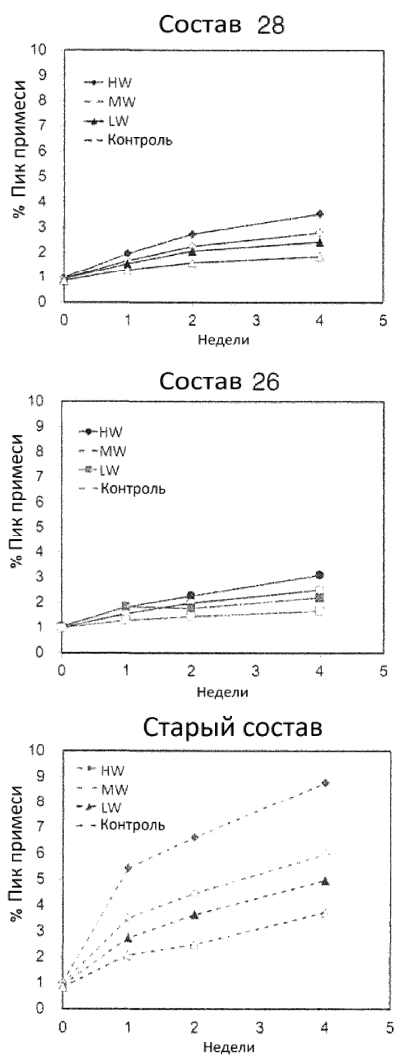




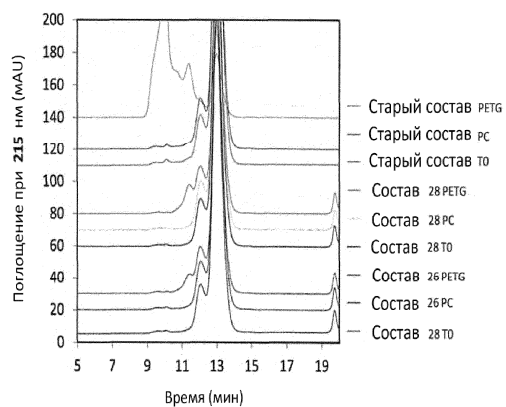
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4