

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044822**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.04

(21) Номер заявки
202091440

(22) Дата подачи заявки
2019.02.04

(51) Int. Cl. *A61K 39/09* (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 47/64 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

**(54) ПОЛИВАЛЕНТНАЯ ПРОТИВОПНЕВМОКОККОВАЯ ПОЛИСАХАРИДНО-БЕЛКОВАЯ
КОНЬЮГИРОВАННАЯ КОМПОЗИЦИЯ**

(31) 62/626,482; 10-2018-0045246

(32) 2018.02.05; 2018.04.18

(33) US; KR

(43) 2020.11.16

(86) PCT/US2019/016506

(87) WO 2019/152921 2019.08.08

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**САНОФИ ПАСТЕР ИНК. (US); СК
БИОСАЙЕНС КО., ЛТД. (KR)**

(72) Изобретатель:
**Ан Гёнджун, Хам Донсу, Ким Хун,
Ким Сонхён, Син Джинхван (KR),
Хопфер Роберт, Кенсингер Ричард Д.,
Чжо Мо (US), Талага Филипп (FR)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2017085586
US-A1-20120052088
WO-A1-2017067962
US-A1-20110117123
WO-A1-2018027123

(57) Предложены поливалентные противопневмококковые конъюгированные композиции со смешанным носителем, содержащие 21 различных конъюгат пневмококковых капсульных полисахаридов-белков, причем каждый из конъюгатов включает капсульный полисахарид от отличающегося серотипа *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный либо со столбнячным анатоксином (ТТ), либо с CRM₁₉₇, причем серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F, причем капсульные полисахариды двух серотипов из серотипов 1, 3 и 5 конъюгированы с ТТ, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM₁₉₇. Предложены также способы производства поливалентных противопневмококковых конъюгированных композиций со смешанным носителем и способы их применения для профилактики у субъекта инфекции или заболевания *Streptococcus pneumoniae*.

B1

044822

044822

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается приоритет, и она основана на дате подачи предварительной заявки на патент США номер 62/626482, поданной 5 февраля 2018 г., и Корейской заявки на патент номер 10-2018-0045246, поданной 18 апреля 2018 г., полное описание которых включено в данном документе посредством ссылки.

Область техники

Данная заявка относится, в целом, к поливалентным противопневмококковым конъюгированным композициям со смешанным носителем, содержащим их вакцинам и способам применения этих композиций и вакцин для профилактики у субъекта инфекции или заболевания *Streptococcus pneumoniae*.

Уровень техники

Пневмококки (*Streptococcus pneumoniae*) представляют собой грамположительные, копьевидные, факультативно анаэробные бактерии с более 90 известными серотипами. Было установлено, что большинство серотипов *S. pneumoniae* вызывают заболевание, среди них 23 наиболее распространенные серотипа обуславливают приблизительно 90% инвазивных заболеваний по всему миру. Серотипы классифицируют на основе серологического ответа на капсульные полисахариды, наиболее важного фактора вирулентности для пневмококков. Капсульные полисахариды являются независимыми от Т-клеток антигенами, которые индуцируют выработку антител в отсутствие Т-хелперных клеток. Независимые от Т-клеток антигены, как правило, индуцируют антитела с низкой аффинностью и кратковременными иммунными ответами с незначительной иммунологической памятью или совсем без нее.

Первоначальные противопневмококковые вакцины включали комбинации капсульных полисахаридов от различных серотипов. Эти вакцины могут наделять иммунитетом против *S. pneumoniae* пациентов с развитой или здоровой иммунной системой, однако они не эффективны у младенцев, у которых отсутствует развитая иммунная система, и у пожилых людей, у которых часто нарушена иммунная функция. Для улучшения иммунного ответа на противопневмококковые вакцины, особенно у младенцев и пожилых людей, которые подвергаются повышенному риску развития инфекции *S. pneumoniae*, капсульные полисахариды конъюгировали с подходящими белками-носителями для создания противопневмококковых конъюгированных вакцин. Конъюгация с подходящим белком-носителем изменяет капсульный полисахарид с независимого от Т-клеток антигена на зависимый от Т-клеток антиген. По существу, иммунный ответ против конъюгированного капсульного полисахарида вовлекает Т-хелперные клетки, которые помогают индуцировать более сильный и быстрый иммунный ответ при повторном контакте с капсульным полисахаридом.

Существует по крайней мере два подхода к разработке противопневмококковых конъюгированных вакцин: подход с одним носителем и подход со смешанным носителем. Иммуногенность конъюгатов различных капсульных полисахаридов может отличаться в зависимости от пневмококкового серотипа и используемого белка-носителя. При подходе с одним носителем капсульные полисахариды от различных серотипов конъюгируют с одним белковым носителем. Ряд вакцин ПРЕВНАР компании Pfizer является примером подхода с использованием одного носителя, при котором различные капсульные полисахариды конъюгируют с белковым носителем CRM₁₉₇, нетоксичным вариантом дифтерийного анатоксина, имеющим одну аминокислотную замену глутаминовой кислоты на глицин. В 2000 году была впервые одобрена 7-валентная ПРЕВНАР-вакцина (ПРЕВНАР), и она содержит капсульные полисахариды из семи наиболее распространенных серотипов: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F. В 13-валентной вакцине, ПРЕВНАР 13, добавлены серотипы 1, 5, 7F, 3, 6A и 19A к белковому носителю CRM₁₉₇. Белковый носитель, CRM₁₉₇, -один носитель, применяемый в вакцине ПРЕВНАР, никогда не применялся как часть системы со смешанным носителем в противопневмококковой конъюгированной вакцине.

Второй подход для противопневмококковых вакцин представляет собой подход со смешанным носителем. В подходе со смешанным носителем, вместо использования одного белкового носителя, применяют два или больше белковых носителей с капсульными полисахаридами от специфических серотипов, конъюгированных с первым белковым носителем, и капсульными полисахаридами от других серотипов, конъюгированных с по меньшей мере вторым отличающимся белковым носителем. Например, GlaxoSmithKline разработал SYNFLORIX, 10-валентную (серотипы 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F и 23F), со смешанным носителем, противопневмококковую конъюгированную вакцину, в которой использованы в качестве белковых носителей белок D *H influenzae*, столбнячный анатоксин и дифтерийный анатоксин. В SYNFLORIX, серотипы 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 и 23F конъюгированы с белком D; серотип 18C конъюгирован со столбнячным анатоксином и серотип 19F конъюгирован с дифтерийным анатоксином [2]. Из 11-валентного предшественника SYNFLORIX был удален серотип 3, в частности, по причине того, что он не показал специфической эффективности по серотипу в исследовании с острым воспалением среднего уха [1]. Другая группа, Aventis Pasteur, разработала 11-валентную (серотипы 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F и 23F), со смешанным носителем, противопневмококковую конъюгированную вакцину с использованием в качестве белковых носителей дифтерийного анатоксина и столбнячного анатоксина [3]. Капсульные полисахариды от серотипов 3, 9V, 14 и 18C могут вызывать более выраженный ответ, когда они конъюгированы с дифтерийным анатоксином, чем когда они конъюгированы со столбнячным анатоксином [6]. Таким образом, серотипы 3, 6B, 14 и 18C конъюгировали с дифтерийным анатоксином, а серо-

типы 1, 4, 5, 7F, 9V, 19F и 23F конъюгированы со столбнячным анатоксином. Разработка этой противопневмококковой вакцины со смешанным носителем была прекращена, отчасти, по техническим причинам и из-за возможности получения сниженного ответа при введении с бесклеточными вакцинами против коклюша [3]. Недавно сообщали, что серотип 5, а также 1, имели один из самых низких наблюдаемых титров ОРА (опсонофагоцитирующих антител) из всех серотипов ПРЕВНАР 13, в котором наблюдалась связанная корреляция между титром IgG и активностью ОРА [4]. Также было высказано предположение, что для серотипа 3 для защиты потребуется гораздо более высокая концентрация IgG в сыворотке [5].

Сущность изобретения

В данной заявке предложены новые и улучшенные поливалентные противопневмококковые конъюгированные композиции со смешанным носителем и содержащие их вакцины. В одном аспекте изобретения в данной заявке предложена поливалентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем, содержащая 21 различных конъюгат пневмококковых капсульных полисахаридов-белков, причем каждый конъюгат пневмококкового капсульного полисахарида-белка содержит белковый носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом от различных серотипов *Streptococcus pneumoniae*, при этом серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, причем белковый носитель представляет собой CRM₁₉₇ или столбнячный анатоксин, при этом два из капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM₁₉₇, и причем два капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5.

В некоторых вариантах осуществления 21-валентной противопневмококковой конъюгированной композиции со смешанным носителем капсульные полисахариды от серотипов 1 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от серотипов 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇.

В другом варианте осуществления 21-валентной противопневмококковой конъюгированной композиции со смешанным носителем капсульные полисахариды от серотипов 1 и 3 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от серотипов 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇.

В другом варианте осуществления 21-валентной противопневмококковой конъюгированной композиции со смешанным носителем капсульные полисахариды от серотипов 3 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от серотипов 1, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇.

В некоторых вариантах осуществления изобретения поливалентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем дополнительно содержит адъювант, такой как адъювант на основе алюминия, включая, но не ограничиваясь, фосфатом алюминия, сульфатом алюминия и гидроксидом алюминия.

Другой аспект изобретения относится к применению 21-валентной противопневмококковой конъюгированной композиции со смешанным носителем в качестве вакцины.

Еще один аспект изобретения относится к вакцине, содержащей 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Еще один аспект относится к способу профилактики инфекции или заболевания *Streptococcus pneumoniae* у такого субъекта, как человек, при этом способ включает введение субъекту профилактически эффективного количества 21-валентных противопневмококковых конъюгированных композиций со смешанным носителем или содержащей их вакцины.

В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект является человеком в возрасте по меньшей мере 50 лет и заболевание представляет собой пневмонию или инвазивное пневмококковое заболевание (IPD).

В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект является человеком в возрасте по меньшей мере 6 недель и заболевание представляет собой пневмонию, инвазивное пневмококковое заболевание (IPD) или острое воспаление среднего уха (АОМ). В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект-человек находится в возрасте от 6 недель до 5 лет. В других вариантах осуществления изобретения субъект-человек находится в возрасте от 2 до 15 месяцев или от 6 до 17 лет.

В некоторых вариантах осуществления изобретения 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем или вакцину вводят внутримышечной инъекцией.

В некоторых вариантах осуществления изобретения 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем или вакцину вводят как часть серии иммунизации.

Еще один аспект относится к иммуногенному конъюгату серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae*, который содержит: капсульный сахарид серотипа 9N от *Streptococcus pneumoniae*; и белок-носитель, связанный с капсульным сахаридом, причем белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇. В некоторых вариантах осуществления поливалентных противопневмококковых конъюгированных композиций и вакцин с

конъюгатом иммуногенного серотипа 9N и со смешанным носителем (и способах с ними/их применениях), сахарид серотипа 9N может быть связан с CRM₁₉₇ с образованием конъюгата в состоянии, в котором он активирован с получением степени окисления 2-19 или 5-10 и молекулярной массы 200-700 кДа. В некоторых вариантах осуществления поливалентных противопневмококковых конъюгированных композиций и вакцин с конъюгатом иммуногенного серотипа 9N и со смешанным носителем (и способах с ними/их применениях), конъюгат иммуногенного серотипа 9N может иметь молекулярную массу 500-4000 кДа. В некоторых вариантах осуществления поливалентных противопневмококковых конъюгированных композиций и вакцин с конъюгатом иммуногенного серотипа 9N и со смешанным носителем (и способах с ними/их применениях), соотношение капсульного сахара серотипа 9N и белка-носителя в конъюгате иммуногенного серотипа 9N составляет 0,1-5 (мас./мас). В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение составляет 0,5-2,5.

В некоторых вариантах осуществления поливалентных противопневмококковых конъюгированных композиций и вакцин с конъюгатом иммуногенного серотипа 9N и со смешанным носителем (и способах с ними/их применениях), 15-60% конъюгата иммуногенного серотипа 9N может иметь на колонке CL-4B значение K_d равное 0,3 или ниже.

В некоторых вариантах осуществления поливалентных противопневмококковых конъюгированных композиций и вакцин с конъюгатом иммуногенного серотипа 9N и со смешанным носителем (и способах с ними/их применениях), конъюгат иммуногенного серотипа 9N может быть приготовлен с полисахаридом серотипа 9N, который активирован для получения степени окисления 2-19. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат иммуногенного серотипа 9N может быть приготовлен с полисахаридом серотипа 9N, который активирован для получения степени окисления 5-10.

В некоторых вариантах осуществления поливалентных противопневмококковых конъюгированных композиций и вакцин с конъюгатом иммуногенного серотипа 9N и со смешанным носителем (и способах с ними/их применениях), если сахарид серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae* конъюгирован с CRM₁₉₇ путем добавления 0,02-0,19 мкг периодата на 1 мкг сахара, то конъюгат может иметь молекулярную массу 500-4000 кДа, молекулярно-массовое распределение 15-60% ($K_d \leq 0,3$) и соотношение сахара/белка 0,5-2,5. В еще одном аспекте в настоящем описании также предложен способ приготовления иммуногенного конъюгата серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae*, при этом способ включает:

- (a) лизирование бактериальной клетки, продуцирующей капсульный полисахарид серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae*, обработкой ее ферментами;
- (b) очистку капсульного сахара серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae* от лизированной клетки;
- (c) активацию капсульного полисахарида серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae* проведением реакции с окисляющим агентом с получением степени окисления 2-19 или 5-10 и
- (d) образование конъюгата капсульного сахара серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae*, связанного с CRM₁₉₇ путем смешивания активированного сахара с CRM₁₉₇.

В некоторых вариантах осуществления изобретения CRM₁₉₇, смешанный на стадии (d), может реагировать с восстанавливающим агентом с образованием конъюгата с активированным капсульным полисахаридом серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae*. В некоторых вариантах осуществления изобретения на стадии (c) 0,02-0,19 мкг периодата может реагировать с 1 мкг капсульного полисахарида серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae* при 20-25°C в течение 15-20 часов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения капсульный полисахарид серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae*, прореагировавший с окисляющим агентом на стадии (c), может иметь молекулярную массу 400-900 кДа. В некоторых вариантах осуществления изобретения активированный капсульный полисахарид серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae*, смешанный с CRM₁₉₇ на стадии (d), может иметь молекулярную массу 200-700 кДа. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуногенный конъюгат серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae* может иметь молекулярную массу 500-4000 кДа. В некоторых вариантах осуществления изобретения первоначальное исходное соотношение CRM₁₉₇ и активированного капсульного сахара серотипа 9N (носитель CRM₁₉₇:сахарид) может составлять 0,5-2,5:1. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 15-60% иммуногенного конъюгата могут иметь значение K_d 0,3 или ниже, измеренное на колонке CL-4B.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полисахарид серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae* по настоящему описанию конъюгирован с CRM₁₉₇ путем добавления 0,02-0,19 мкг периодата на 1 мкг сахара, иммуногенный конъюгат имеет молекулярную массу 500-4000 кДа, молекулярно-массовое распределение 15-60% ($K_d \times 0,3$), как измерено на колонке CL-4B, и соотношение CRM₁₉₇/полисахарида 0,5-2,5.

Вышеизложенные и другие объекты, особенности и преимущества 21-валентных противопневмококковых конъюгированных композиций со смешанным носителем станут более очевидны из следующего подробного описания.

Определения

Для того, чтобы настоящее раскрытие было более понятным, сначала определены ниже некоторые термины. Дополнительные определения следующих терминов и других терминов могут быть изложены в

описании.

При использовании в данном описании и прилагаемой формуле изобретения существительных в единственном числе включает в себя ссылки на множественное число, если контекстом явно не указано иное.

Так, например, ссылка на "способ" включает в себя один или более способов и/или стадий типа, описанного в данном документе, и/или которые станут очевидны специалистам в данной области после прочтения этого раскрытия и т.д.

Вводить: Как используется в данном документе, "введение" композиции субъекту означает дать, применить или привести композицию в контакт с субъектом. Введение может осуществляться любым из ряда способов, например местным, пероральным, подкожным, внутримышечным, внутривенным, интратекальным и внутрикожным.

Приблизительно: Как используется в данном документе, термин "приблизительно" или "около", как применено к одному или более интересующих значений, относится к значению, которое близко к указанному номинальному значению. В некоторых вариантах осуществления термин "приблизительно" или "около" относится к диапазону значений, которые попадают в пределы 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любую сторону (больше или меньше) от указанного номинального значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышало бы 100% от возможного значения).

Конъюгат:

Как используется в данном документе и понятно из соответствующего контекста, термины "конъюгат(ы)" или "гликоконъюгат(ы)" относятся к полисахариду *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированному с белком-носителем с использованием любой ковалентной или нековалентной стратегии биоконъюгации.

Степень окисления:

Как используется в данном документе, термин "степень окисления" (DO - "degree of oxidation") относится к количеству повторяющихся единиц Сахаров на альдегидную группу, полученную когда очищенный или отобранный по размеру сахарид активирован с помощью окисляющего агента. Степень окисления сахара может быть определена с использованием рутинных методов, известных обычным специалистам в данной области.

Вспомогательное вещество:

Как используется в данном документе, термин "вспомогательное вещество" относится к нетерапевтическому агенту, который можно включать в композицию, например для обеспечения или придания желаемой консистенции или стабилизирующего эффекта.

Смешанный носитель:

Как используется в данном документе, противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем относится к противопневмококковой конъюгированной композиции, содержащей более одного типа белкового носителя.

21-валентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем: Как используется в данном документе, термин "21-валентная(ые) противопневмококковая(ые) конъюгированная(ые) композиция(и) со смешанным носителем" относится к композиции содержащей или состоящей из 21 различного конъюгата пневмококковых капсульных полисахаридов-белков, причем каждый конъюгат пневмококкового капсульного полисахарида-белка содержит белковый носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом от различных серотипов *Streptococcus pneumoniae*, при этом серотипы *Streptococcus pneumoniae* представлены 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, причем белковый носитель представляет собой CRM₁₉₇ или столбнячный анатоксин, при этом два из капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM₁₉₇, и причем два капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсульные полисахариды от серотипов 1 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от остальных серотипов конъюгированы с CRM₁₉₇. В некоторых вариантах осуществления капсульные полисахариды от серотипов 1 и 3 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от остальных серотипов конъюгированы с CRM₁₉₇. В одном варианте осуществления капсульные полисахариды от серотипов 3 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM₁₉₇.

Молекулярная масса:

Если не указано иное, при использовании в данном документе термин "молекулярная масса" капсульного сахара или конъюгата капсульного сахара-белка-носителя относится к средней молекулярной массе, рассчитанной эксклюзионной хроматографией (SEC) в комбинации с анализом многоугольного рассеяния лазерного излучения (MALLS).

Поливалентный:

Как используется в данном документе, термин "поливалентный" относится к противопневмококковой конъюгированной композиции, содержащей пневмококковый капсульный полисахарид от более чем

одного серотипа *Streptococcus pneumoniae*.

Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество:

Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, используемые в данном раскрытии, являются традиционными. В книге Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th издание (1975), описаны композиции и лекарственные формы, подходящие для фармацевтической доставки одной или более терапевтических композиций, включая вакцины, и дополнительные фармацевтические агенты. К подходящим фармацевтическим вспомогательным веществам относятся, например, крахмал, глюкоза, лактоза, сахароза, желатин, солод, рис, мука, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, вода, этанол и тому подобное. В целом, природа наполнителя будет зависеть от конкретного способа введения, который предполагается применять. Например, парентеральные лекарственные формы обычно содержат инъекционные жидкости, которые включают в качестве носителя фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как воду, физиологический солевой раствор, сбалансированные солевые растворы, буферы, водную декстрозу, глицерин и т.п. Для твердых композиций (например, порошок, пилюля, таблетка или капсульные формы) к обычным нетоксичным твердым вспомогательным веществам могут относиться, например, фармацевтические сорта маннита, лактозы, крахмала или стеарата магния. В дополнение к биологически нейтральным носителям фармацевтические композиции, которые предполагают применять, могут содержать небольшие количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как увлажняющие или эмульгирующие агенты, поверхностно-активный агент, консерванты, а также буферные pH агенты и т. п., например ацетат натрия или сорбитан монолаурат.

Профилактически эффективное количество:

Как определено в настоящем документе, термин "профилактически эффективное количество" или "профилактически эффективная доза" относится к количеству или дозе, требуемым для того, чтобы вызвать иммунный ответ, достаточный для задержки наступления и/или снижения частоты и/или тяжести одного или более симптомов, вызванных инфекцией *Streptococcus pneumoniae*.

Профилактика:

Термин "профилактика", используемый в данном документе, означает предотвращение проявления болезни, задержку ее проявления и/или снижение частоты и/или тяжести одного или более симптомов определенного заболевания, нарушения или состояния (например, инфекции *Streptococcus pneumoniae*). В некоторых вариантах осуществления изобретения профилактику оценивают на популяционной основе таким образом, что считается, что агент обеспечивает профилактику в отношении конкретного заболевания, нарушения или состояния, если наблюдается статистически значимое снижение развития, частоты и/или интенсивности одного или более симптомов заболевания, нарушения или состояния в популяции, подверженной этому заболеванию, нарушению или состоянию.

Субъект:

Как используется в данном документе, термин "субъект" означает любое млекопитающее, включая мышью, кроликов и людей. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект представляет собой взрослого, подростка или ребенка. В некоторых вариантах осуществления изобретения применяют термины "индивид" или "пациент" и они предназначены быть взаимозаменяемыми с "субъектом".

Подробное описание сущности изобретения

Следующее описание раскрытого(ых) варианта(ов) осуществления и примеров является просто иллюстративным по своей природе и никоим образом не предназначено для ограничения изобретения, его применения или использований.

В данной заявке предложены новые и улучшенные поливалентные противопневмококковые конъюгированные композиции со смешанным носителем и содержащие их вакцины. Поскольку белковый носитель, CRM₁₉₇, ранее использовался в противопневмококковых конъюгированных вакцинах с одним -9kbfх носителем, в данной заявке описано применение CRM₁₉₇ в противопневмококковой конъюгированной вакцине со смешанным носителем. В частности, в данной заявке описано комбинированное применение CRM₁₉₇ и столбнячного анатоксина в качестве белков-носителей для специфических пневмококковых серотипов в поливалентных противопневмококковых конъюгированных композициях и вакцинах. Как обсуждалось выше, иммуногенность конъюгатов различных капсульных полисахаридов может отличаться в зависимости от пневмококкового серотипа и используемого белка-носителя. В данном приложении описывается успешная конъюгация серотипа 3 со столбнячным анатоксином в составе вакцины со смешанным носителем, несмотря на прежние положения о том, что серотип 3 был более иммуногенным при конъюгации с дифтерийным анатоксином, а не со столбнячным анатоксином [6]. В заявке также описана успешная конъюгация серотипов 1 и 5 со столбнячным анатоксином в составе вакцины со смешанным носителем. В ней также раскрывается неожиданное открытие, что выработка антител на серотип 3, конъюгированный со столбнячным анатоксином в поливалентной, например 21-валентной, противопневмококковой конъюгированной композиции со смешанным носителем была примерно в 4-5 раз выше, чем при конъюгировании серотипа 3 с CRM₁₉₇ в 13-валентной противопневмококковой конъюгированной композиции с одним носителем (ПРЕВНАР 13).

Кроме того, данное неожиданное открытие не ограничивалось серотипом 3, но также наблюдалось для других серотипов, конъюгированных со столбнячным анатоксином в поливалентной противопневмококковой конъюгированной композиции со смешанным носителем. Как показано в примерах, конъюгация серотипов 1 и 5 или 3 и 5 со столбнячным анатоксином со смешанным носителем, противопневмококковая конъюгированная композиция с остальными серотипами, конъюгированными с CRM₁₉₇ (например, PCV21(1/5)-ТТ и PCV21(3/5)-ТТ), неизменно индуцировала значительно усиленные ответы антител на серотипы, конъюгированные со столбнячным анатоксином, по сравнению с выработкой антител (ответ IgG или титры МОРА) против тех же серотипов, конъюгированных с CRM₁₉₇ в противопневмококковой конъюгированной композиции (ПРЕВНАР 13) с одним носителем. Описанная в данной заявке 21-валентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем также включает пневмококковые серотипы, не охваченные в настоящее время тремя противопневмококковыми конъюгированными вакцинами, доступными в настоящее время на мировом рынке: ПРЕВНАР (в некоторых странах называется Превенар), СИНФЛОРИКС и ПРЕВНАР 13. Встречаемость заболеваний, вызванных неохваченными в настоящее время пневмококковыми серотипами, растет, что отчасти связано с развитием резистентности к антибактериальным препаратам, увеличением количества пациентов с ослабленным иммунитетом и отсутствием иммунного давления. Например, ни одна из доступных в настоящее время противопневмококковых конъюгированных вакцин не содержит серотип 9N. Кроме того, ни одна из доступных в настоящее время противопневмококковых конъюгированных вакцин не содержит серотипы 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F. В настоящем описании продемонстрировано успешный вариант реализации серотипов 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F в противопневмококковой конъюгированной вакцине со смешанным носителем (столбнячный анатоксин и CRM₁₉₇), а также то, что серотип 9N индуцировал выработку антител, которая была около от 40 до 50 раз выше, чем выработка антител от ПРЕВНАР 13.

Пневмококковый полисахаридный серотип 9N

Полисахарид серотипа 9N можно получать непосредственно от бактерий с помощью процедуры выделения, известной обычным специалистам в данной области (включая, но не ограничиваясь методами, раскрытыми в публикации заявки на патент США № 2006/0228380). Кроме того, сахарид можно продуцировать с использованием протоколов синтеза.

Штамм серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae* можно получать из коллекций стандартизированных культур (например, Лаборатория референтных стрептококков (*Streptococcal Reference Laboratory*) Центров контроля и профилактики заболеваний (г. Атланта, штат Джорджия)) или клинических образцов. Бактериальную клетку обычно выращивают в такой среде, как соевая среда. После ферментации бактериальной клетки, продуцирующей капсульный полисахарид серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae*, бактериальную клетку лизируют для получения клеточного лизата. Полисахарид серотипа 9N можно выделять из клеточного лизата с использованием известных в данной области методик очистки, включая центрифугирование, глубинную фильтрацию, осаждение, ультрафильтрацию, обработку активированным углем, диафильтрацию и/или колоночную хроматографию (включая, но не ограничиваясь методами, раскрытыми в публикации заявки на патент США № 2006/0228380). Очищенный капсульный полисахарид серотипа 9N можно применять для приготовления иммуногенного конъюгата. Капсульный полисахарид серотипа 9N, полученный очисткой полисахарида серотипа 9N из лизата *Streptococcus pneumoniae*, и необязательно отобранный по размеру очищенный полисахарид можно характеризовать по различным параметрам, включая, например, молекулярную массу (ММ) капсульного полисахарида серотипа 9N. В некоторых вариантах осуществления изобретения очищенный полисахарид, очищенный от серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae* перед конъюгацией может иметь молекулярную массу 5-5000 кДа. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсульный полисахарид серотипа 9N перед конъюгацией может иметь молекулярную массу 50-1000 кДа. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсульный полисахарид серотипа 9N перед конъюгацией может иметь молекулярную массу 70-900 кДа. В некоторых вариантах осуществления изобретения капсульный полисахарид серотипа 9N перед конъюгацией может иметь молекулярную массу 100-800 кДа. В некоторых вариантах осуществления изобретения очищенный капсульный полисахарид серотипа 9N можно активировать перед конъюгацией, чтобы получить молекулярную массу 50-800 кДа, 80-780 кДа, 100-770 кДа, 120-760 кДа, 140-750 кДа, 150-740 кДа, 160-730 кДа, 170-735 кДа, 180-720 кДа, 190-710 кДа, 200-700 кДа, 220-690 кДа, 240-680 кДа, 260-670 кДа, 270-660 кДа или сходные диапазоны молекулярных масс. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов предполагается в качестве варианта осуществления изобретения по настоящему описанию. Активированный полисахарид серотипа 9N можно характеризовать по степени окисления и молекулярной массе. В некоторых вариантах осуществления изобретения активированный полисахарид серотипа 9N может иметь степень окисления 0,5-25; 0,6-23; 0,8-21; 1-20,8; 1,1-20,5; 1,2-20,3; 1,3-20; 1,4-19,5; 1,5-19,3; 1,6-19,2; 1,7-19,1; 2-19, 3-18, 4-15 или 5-10.

Полисахарид может становиться немного меньшим по размеру во время обычной процедуры очистки. Кроме того, как описано в настоящем описании, полисахарид можно подвергать отбору по размеру перед конъюгацией. Упомянутый выше диапазон молекулярных масс относится к такому очищенному полисахариду после конечной стадии отбора по размеру (например, после очистки, гидролиза и актива-

ции) перед конъюгацией.

Поливалентные противопневмококковые конъюгированные композиции со смешанным носителем и способы их получения

В данном раскрытии предложена поливалентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем, содержащая или состоящая из 21 различного конъюгата пневмококковых капсульных полисахаридов-белков, причем каждый конъюгат пневмококкового капсульного полисахарида-белка содержит белковый носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом от различных серотипов *Streptococcus pneumoniae*, при этом серотипы *Streptococcus pneumoniae* представляют собой 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, причем белковый носитель представляет собой CRM₁₉₇ или столбнячный анатоксин, при этом два из капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM₁₉₇, и причем два капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5.

В некоторых вариантах осуществления капсульные полисахариды от серотипов 1 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от остальных серотипов конъюгированы с CRM₁₉₇. В одном варианте осуществления капсульные полисахариды от серотипов 1 и 3 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM₁₉₇. В одном варианте осуществления капсульные полисахариды от серотипов 3 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM₁₉₇.

В вакцине на основе конъюгата полисахарид-белок, белок-носитель конъюгирован с полисахаридным антигеном, главным образом, чтобы способствовать иммунному ответу (например, выработке антител) на полисахаридный антиген. Белки-носители предпочтительно являются белками, которые нетоксичны. Белки-носители должны быть поддающимся конъюгации с пневмококковым полисахаридом с использованием стандартных процедур конъюгации, как более подробно обсуждается ниже. Белки-носители, применяемые в 21-валентных противопневмококковых конъюгированных композициях со смешанным носителем, представляют собой столбнячный анатоксин (ТТ) и CRM₁₉₇, каждый из которых использовался в составе противопневмококковых конъюгированных вакцин, но никогда в одной и той же вакцине со смешанным носителем.

CRM₁₉₇ представляет собой нетоксичный вариант (т. е., анатоксин) дифтерийного токсина, который сохраняет иммунологические свойства дифтерийного токсина дикого типа. CRM₁₉₇ отличается от дифтерийного токсина дикого типа по одному основанию в структурном гене, что приводит к образованию одной аминокислотной замены глутаминовой кислоты на глицин. CRM₁₉₇, как правило, выделяют из культур штамма C7 (β197) *Corynebacterium diphtheria*, выращенных на среде на основе аминокислот казеина и дрожжевого экстракта. CRM₁₉₇ можно очищать посредством ультрафильтрации, осаждением сульфатом аммония и ионообменной хроматографией. В альтернативном варианте, CRM₁₉₇ можно получать рекомбинантным способом в соответствии с патентом США № 5614382, который тем самым включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. CRM₁₉₇ использовали в составе противопневмококковых конъюгированных вакцин, но никогда как компонент вакцины со смешанным носителем.

Столбнячный анатоксин получают и используют во всем мире для широкомасштабной иммунизации против столбняка (или тризма), вызванного *Clostridium tetani*. Столбнячный анатоксин также применяют как самостоятельно, так и в комбинации с противодифтерийными и/или противокклюшными вакцинами. Исходный белок, столбнячный токсин, обычно получают в культурах *Clostridium tetani*. Столбнячный токсин представляет собой белок массой около 150 кДа и состоит из двух субъединиц (около 100 кДа и около 50 кДа), связанных дисульфидной связью. Токсин, как правило, лишают токсичных свойств с помощью формальдегида, и он может быть очищен из культуральных фильтратов с использованием таких известных способов, как осаждение сульфатом аммония (см., например, [7], [8]) или хроматографических методик, как описано, например, в WO 1996/025425. Столбнячный токсин также можно инактивировать рекомбинантными генетическими средствами.

Столбнячный анатоксин также применяли как белок-носитель в других вакцинах, включая противопневмококковые конъюгированные вакцины. Но использование столбнячного токсина в противопневмококковой конъюгированной вакцине со смешанным носителем в комбинации с CRM₁₉₇ представляет собой новый подход. В известном уровне техники отвергается идея конъюгирования серотипа 3 со столбнячным анатоксином в противопневмококковой конъюгированной вакцине со смешанным носителем, поскольку показано, что серотип 3 более иммуногенен, когда конъюгирован с дифтерийным анатоксином по сравнению со столбнячным анатоксином [6].

Пневмококковые капсульные полисахариды, применяемые в композициях и вакцинах, описанных в данном документе, включающие в себя капсульные полисахариды от серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, могут быть получены из *Streptococcus pneumoniae* с использованием любой доступной методики, включая стандартные методики, известные среднему специалисту в данной области техники, включая, например, описанные в WO 2006/110381, WO 2008/118752, WO 2006/110352, и публ. заявок на патенты США № 2006/0228380, 2006/0228381,

2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, 2008/0102498 и 2008/0286838, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Например, каждый серотип пневмококкового капсульного полисахарида можно выращивать в культуральной среде (например, соевой среде). Клетки лизируют, и отдельные полисахариды можно очищать от лизата посредством центрифугирования, осаждения, ультрафильтрации и/или колоночной хроматографии. Кроме того, пневмококковый капсульный полисахарид можно получать с использованием протоколов синтеза.

Капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* содержит повторяющиеся олигосахаридные звенья, которые могут содержать до 8 остатков Сахаров. Капсульный сахаридный антиген может представлять собой полноразмерный полисахарид, или он может быть уменьшен по размеру (например, на одно олигосахаридное звено или короче, чем сахаридная цепь нативной длины из повторяющихся олигосахаридных звеньев). Размер капсульных полисахаридов можно уменьшать различными способами, известными в данной области техники, такими как обработка с кислотным гидролизом, обработка пероксидом водорода, изменение размеров гомогенизатором высокого давления, с последующей обработкой пероксидом водорода для получения олигосахаридных фрагментов или микрофлюидизацией.

Пневмококковый конъюгат каждого из серотипов можно получать конъюгированием капсульного полисахарида из каждого серотипа с белком-носителем. Из различных пневмококковых конъюгатов можно готовить лекарственную форму в виде композиции, включая дозированную форму однократного применения. Для приготовления конъюгата полисахарида-белка, капсульный полисахарид, полученный из каждого пневмококкового серотипа, можно химически активировать таким образом, чтобы капсульный полисахарид мог вступать в реакцию с белком-носителем. Сразу после активирования, каждый капсульный полисахарид можно отдельно конъюгировать с белком-носителем с образованием гликоконъюгата. Химическую активацию полисахарида и последующую конъюгацию с белком-носителем можно достигать традиционными способами.

Например, вицинальные гидроксильные группы на конце капсульного полисахарида можно окислять до альдегидных групп такими окисляющими агентами, как перйодаты (включая перйодат натрия, перйодат калия или перйодную кислоту), как описано, например, в пат. США № 4365170, 4673574 и 4902506, который тем самым включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Перйодат случайным образом окисляет вицинальные гидроксильные группы углевода с образованием реакционноспособной альдегидной группы и вызывает расщепление связи С-С. Термин "перйодат" включает как перйодат, так и перйодную кислоту. Данный термин также включает в себя как метаперйодат (IO_4^-), так и ортоперйодат (IO_6^{3-}). Термин "перйодат" также включает в себя различные соли перйодата, включая перйодат натрия и перйодат калия. В некоторых вариантах осуществления изобретения полисахарид можно окислять в присутствии метаперйодата натрия.

В некоторых вариантах осуществления изобретения перйодат можно применять в количестве около 0,03-0,17 мкг на 1 мкг полисахарида. В некоторых вариантах осуществления изобретения перйодат можно применять в количестве около 0,025-0,18 мкг или около 0,02-0,19 мкг на 1 мкг полисахарида. При желании сахарид можно активировать в пределах вышеуказанного диапазона. За пределами данного диапазона может получиться неудовлетворительный результат.

Полисахариды также можно активировать с помощью 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторбората (CDAP) с образованием цианатного сложного эфира. Активированный полисахарид затем соединяют непосредственно или посредством спейсерной или линкерной группы с аминогруппой на белке-носителе.

Например, спейсер может представлять собой цистамин или цистеамин для получения тиолированного полисахарида, который может соединяться с носителем посредством простой тиоэфирной связи, получаемой после реакции с активированным малеимидом белком-носителем (например, с использованием N-[γ-малеимидобутирилокси]сукцинимидного сложного эфира (GMBS)) или галогенацетилированным белком-носителем (например, с использованием йодацетимида, N-сукцинимидил бромацетата (SBA; SIB), N-сукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоата (SIAB), сульфосукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоата (сульфо-SIAB), N-сукцинимидил йодацетата (SIA) или сукцинимидил 3-[бромацетамидо]пропионата (SBAP)). Предпочтительно, цианатный сложный эфир (необязательно, полученный методами химии COAP) соединяют с гександиамином или дигидразидом адипиновой кислоты (АОН), и аминокпроизводное сахара конъюгируют с белком-носителем с использованием метода химии карбодиимидов (например, EDAC или EDC) посредством карбоксильной группы на белковом носителе. Такие конъюгаты описаны, например, в WO 93/15760, WO 95/08348 и WO 96/129094, все из которых тем самым включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Конъюгации активированных капсульных полисахаридов и белка-носителя можно достигать, например, путем восстановительного аминирования, как описано, например, в публ. заявок на патенты США. Такие конъюгаты описаны, например, в публ. № 2006/0228380, 2007/0231340, 2007/0184071 и 2007/0184072, WO 2006/110381, WO 2008/079653 и WO 2008/143709, все из которых тем самым включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Например, активированные капсульные полисахариды и белок-носитель могут вступать в реакцию с восстанавливающим агентом с образованием конъюгата. Подходящие восстанавливающие агенты включают борогидриды, такие как циано-

рогидрид натрия, боран-пиридин, триацетоксидорогидрид натрия, натрий или борогидрид, или борогидридная ионообменная смола. В конце реакции восстановления в конъюгатах могут оставаться непрореагировавшие альдегидные группы. Непрореагировавшие альдегидные группы можно блокировать с использованием подходящего блокирующего агента, такого как борогидрид натрия (NaBH_4). В одном варианте осуществления изобретения реакцию восстановления выполняют в водном растворителе. В другом варианте осуществления изобретения реакцию восстановления выполняют в апротонном растворителе. В одном варианте осуществления изобретения реакцию восстановления выполняют в растворителе ДМСО (диметилсульфоксиде) или в ДМФ (диметилформамиде). Другие возможные восстанавливающие агенты включают, но не ограничиваются ими, амин-бораны, такие как пиридин-боран, 2-пиколин-боран, 2,6-диборан-метанол, диметиламин-боран, $t\text{-BuMeiPrN-BH}_3$, бензиламин- BH_3 или 5-этил-2-метилпиридин-боран (РЕМВ).

Активированные капсульные полисахариды можно конъюгировать непосредственно с белком-носителем или опосредованно путем применения спейсера или линкера, такого как бифункциональный линкер. Линкер необязательно представляет собой гетеробифункциональный или гомобифункциональный, содержащий, например, реакционноспособную аминогруппу и реакционноспособную группу карбоновой кислоты, 2 реакционноспособные аминогруппы или две реакционноспособные группы карбоновой кислоты. В других подходящих методиках для конъюгации применяют карбодиимиды, гидразиды, активные сложные эфиры, норборан, *p*-нитробензойную кислоту, *N*-гидроксисукцинимид, *S*--NHS, EDC, TSTU, как описано, например, в публикации международной заявки на патент № WO 98/42721, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Конъюгация может вовлекать карбонильный линкер, который может образоваться путем реакции свободной гидроксильной группы сахара с 1,1'-карбонилдиимидазол (CDI) (см. Bethell et al. (1979) *J. Biol. Chem.* 254:2572-2574; Hearn et al. (1981) *J. Chromatogr.* 218:509-518) с последующей реакцией с белком с образованием карбаматной связи. Этот процесс может включать восстановление аномерной концевой группы в первичную гидроксильную группу, необязательную защиту/снятие защиты первичной гидроксильной группы, реакцию первичной гидроксильной группы с CDI с образованием промежуточного продукта CDI карбамата и соединения промежуточного продукта CDI карбамата с аминогруппой на белке.

Соотношение полисахарида и белка-носителя для противопневмококковых конъюгированных вакцин, как правило, находится в диапазоне 0,3-3,0 (мас./мас), но может варьировать от серотипа. Соотношение может определяться либо независимым измерением количеств присутствующих белка и полисахарида, или методами, которые дают прямое соотношение, известными в данной области техники. Методы, включающие ^1H ЯМР спектроскопию или ЭХ-ВЭЖХ-УФ/КР с двойным отслеживанием (например показатель преломления и УФ, на общее содержание вещества и белка, соответственно), могут определять профиль соотношения сахара/белка по распределению размеров конъюгатов, а также методом ЭХ-ВЭЖХ-MALLS или MALDI-ВР-МС.

Таким образом полученные конъюгаты полисахаридов-белков можно очищать и обогащать различными способами. Эти способы включают концентрирование/диафильтрацию, колоночную хроматографию и глубинное фильтрование. Очищенные конъюгаты полисахаридов-белков комбинируют для получения препарата 21-валентной противопневмококковой конъюгированной композиции со смешанным носителем, которую можно применять в качестве вакцины.

Приготовление лекарственной формы вакцинной композиции может выполняться с использованием признанных в данной области способов. Вакцинную композицию готовят в виде препарата, который должен быть совместимым с предполагаемым путем введения. Конъюгаты отдельных пневмококковых капсульных полисахаридов-белков могут входить в состав препарата вместе с физиологически приемлемым носителем для получения композиции. Примеры таких носителей включают, воду, забуференный солевой раствор, полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и раствор декстрозы, но не ограничиваются ими.

В некоторых вариантах осуществления изобретения 21-валентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем дополнительно содержит адъювант. Как используется в данном документе, "адъювант" относится к веществу или носителю, который неспецифически усиливает иммунный ответ на антиген. Адъюванты могут включать в себя суспензию минеральных веществ (алюмокалиевые квасцы, соли алюминия, такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия, гидроксифосфат сульфат алюминия и т. д.) на которых адсорбирован антиген; или эмульсию вода-в-масле, в которой раствор антигена эмульгирован в минеральном масле (например, неполном адъюванте Фрейнда), иногда с включением убитых микобактерий (полный адъювант Фрейнда) для дополнительного усиления антигенности. Иммуностимулирующие олигонуклеотиды (такие как включающие мотив CpG) также можно применять как адъюванты (например, см. патенты США № 6194388; 6207646; 6214806; 6218371; 6239116; 6339068; 6406705 и 6429199). Адъюванты также включают биологические молекулы, такие как липиды и костимулирующие молекулы. Типовые биологические адъюванты включают AS04 [9], IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L и 41 BBL. В некоторых вариантах осуществления изобретения адъювант представляет собой адъювант на основе алюминия. Как правило, одна доза 0,5 мл вакцины готовится в виде препарата, который содержит

около от 0,1 мг до 2,5 мг адьюванта на основе алюминия. В других вариантах осуществления одна доза 0,5 мл вакцины готовится в виде препарата, который содержит между от 0,1 до 2 мг, от 0,1 до 1 мг, от 0,1 до 0,5 мг, от 0,1 до 0,2 мг, от 0,125 до 2,5 мг, от 0,125 до 0,5 мг, от 0,125 до 0,2 или от 0,125 до 0,25 мг адьюванта на основе алюминия. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна доза 0,5 мл вакцины готовится в виде препарата, который содержит от около 0,125 до около 0,250 мг адьюванта на основе алюминия. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна доза 0,5 мл вакцины готовится в виде препарата, который содержит около 0,125 мг адьюванта на основе алюминия. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна доза 0,5 мл вакцины готовится в виде препарата, который содержит около 0,250 мг адьюванта на основе алюминия.

В конкретных вариантах реализации изобретения адьювант выбирают из группы, состоящей из фосфата алюминия, сульфата алюминия и гидроксида алюминия.

В конкретных вариантах реализации изобретения адьювант представляет собой фосфат алюминия. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция предназначена для применения в виде вакцины против инфекции *Streptococcus pneumoniae*.

Определение характеристик конъюгатов пневмококковых капсульных полисахаридов-белковых носителей

В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат полисахарида-белкового носителя может иметь молекулярную массу 100-10 000 кДа. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат имеет молекулярную массу 200-9000 кДа. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат имеет молекулярную массу 300-8000 кДа. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат имеет молекулярную массу 400-7000 кДа. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат имеет молекулярную массу 500-6000 кДа. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат имеет молекулярную массу 600-5000 кДа. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат имеет молекулярную массу 500-4000 кДа. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов предполагается в качестве варианта осуществления изобретения по настоящему описанию. Если молекулярная масса находится в пределах указанного выше диапазона, конъюгат может быть стабильно получен с высоким выходом. Можно также снизить долю свободного полисахарида. Кроме того, можно получать повышенную иммуногенность в пределах указанного выше диапазона молекулярных масс. После очищения отдельных конъюгатов полисахаридов-белков, их составляют для приготовления лекарственной формы иммуногенной композиции по настоящему описанию.

Конъюгаты сахаридов-белков серотипов по настоящему описанию можно характеризовать по соотношению полисахарида и белкового носителя (количество полисахарида/количество белкового носителя, мас./мас.).

В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение (мас./мас.) полисахарида к белковому носителю в конъюгате полисахарид-белковый носитель для каждого серотипа составляет 0,5-2,5; 0,4-2,3; 0,3-2,1; 0,24-2; 0,2-1,8; 0,18-1,6; 0,16-1,4; 0,14-1,2; 0,12-1 или 0,1-1 (например; около 0,7; около 0,8; около 0,9; около 1,0; около 1,1; около 1,2; около 1,3; около 1,4; около 1,5; около 1,6; около 1,7; около 1,8; около 1,9; около 2,0; около 2,1; около 2,2; около 2,3; около 2,4 или около 2,5).

Если соотношение полисахарида и белкового носителя находится в пределах указанного выше диапазона, конъюгат может быть стабильно получен с высоким выходом. Можно также снизить долю свободного полисахарида. Кроме того, можно получать повышенную иммуногенность, и конъюгат может сохранять стабильность без влияния других серотипов в пределах указанного выше диапазона. Конъюгаты и иммуногенные композиции по настоящему описанию могут содержать свободный полисахарид, который нековалентно конъюгирован с белковым носителем, но тем не менее присутствует в композиции конъюгатов полисахаридов-белковых носителей. Свободный полисахарид может быть нековалентно ассоциирован с конъюгатом полисахарида-белкового носителя (т. е., нековалентно связан, адсорбирован с конъюгатом полисахарида-белкового носителя или захвачен в него или им). В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат полисахарида-белкового носителя содержит менее около 60%, около 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20% или 15% свободного полисахарида каждого серотипа, на основе общего количества полисахарида каждого серотипа. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат каждого серотипа полисахарида-белкового носителя содержит менее около 60% свободного полисахарида каждого серотипа, на основе общего количества полисахарида каждого серотипа. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат каждого серотипа полисахарида-белкового носителя содержит менее около 50% свободного полисахарида каждого серотипа, на основе общего количества полисахарида каждого серотипа. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат каждого серотипа полисахарида-белкового носителя содержит менее около 40% свободного полисахарида каждого серотипа, на основе общего количества полисахарида каждого серотипа. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат каждого серотипа полисахарида-белкового носителя содержит менее около 30% свободного полисахарида каждого серотипа, на основе общего количества полисахарида каждого серотипа. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат каждого серотипа полисахарида-белкового носителя содержит менее около 25% свободного полисахарида каждого серотипа, на основе общего количества полисахарида каждого серотипа. В некоторых вариантах осуществ-

ствления изобретения конъюгат каждого серотипа полисахарида-белкового носителя содержит менее около 20% свободного полисахарида каждого серотипа, на основе общего количества полисахарида каждого серотипа. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат каждого серотипа полисахарида-белкового носителя содержит менее около 15% свободного полисахарида каждого серотипа, на основе общего количества полисахарида каждого серотипа. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат каждого серотипа полисахарида-белкового носителя содержит менее около 10% свободного полисахарида каждого серотипа, на основе общего количества полисахарида каждого серотипа. Конъюгат каждого серотипа полисахарида-белкового носитель может также характеризоваться по распределению его молекул по размерам (K_d). Для определения относительного распределения молекул конъюгата по размерам можно применять носитель эксклюзионной хроматографии (CL-4В; поперечно-сшитые гранулы агарозы, 4%). Эксклюзионную хроматографию (ЭХ) применяют в самотечной колонке для определения профиля распределение размеров молекул конъюгата по размерам. Крупные молекулы исключаются из пор носителя и элюируются быстрее, чем малые молекулы. Для сбора элюата колонки используют сборщик фракций. Фракции проверяют анализом на содержание сахаридов колориметрическим методом. Для определения K_d колонку калибруют, чтобы установить фракцию, в которой молекулы полностью исключаются (V_0 ; $K_d=0$), и фракцию, представляющую максимальное удерживание (V_i ; $K_d=1$). Фракция, в которой достигается установленный атрибут образца (V_e), соотносится с K_d по уравнению $K_d = (V_e - V_0)/(V_i - V_0)$.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 15% конъюгата каждого серотипа полисахарида-белкового носителя может иметь на колонке CL-4В значение K_d равное 0,3 или ниже. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 20% конъюгата каждого серотипа полисахарида-белкового носителя может иметь на колонке CL-4В значение K_d равное 0,3 или ниже. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90% конъюгата каждого серотипа полисахарида-белкового носителя может иметь на колонке CL-4В значение K_d равное 0,3 или ниже. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 60% конъюгата каждого серотипа полисахарида-белкового носителя может иметь на колонке CL-4В значение K_d равное 0,3 или ниже. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50-80% конъюгата каждого серотипа полисахарида-белкового носителя может иметь на колонке CL-4В значение K_d равное 0,3 или ниже. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 65-80% конъюгата каждого серотипа полисахарида-белкового носителя может иметь на колонке CL-4В значение K_d равное 0,3 или ниже. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 15-60% конъюгата каждого серотипа полисахарида-белкового носителя может иметь на колонке CL-4В значение K_d равное 0,3 или ниже.

Профилактические способы и применения

В еще одном аспекте раскрытия предложена вакцина, содержащая 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество содержит по меньшей мере буфер, такой как сукцинатный буфер, соль, такую как хлорид натрия, и/или поверхностно-активный агент, такой как сложный эфир полиоксипропиленсорбитана (например, полисорбат 80). В некоторых вариантах осуществления два полисахарида, выбранные из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5, конъюгируют со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды среди 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгируют с CRM₁₉₇ (21-валентная).

В одном варианте осуществления капсульные полисахариды от серотипов 1 и 5 конъюгируют со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от серотипов 3, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгируют с CRM₁₉₇ (21-валентная).

В другом варианте осуществления капсульные полисахариды от серотипов 1 и 3 конъюгируют со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от серотипов 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгируют с CRM₁₉₇ (21-валентная).

В другом варианте осуществления капсульные полисахариды от серотипов 3 и 5 конъюгируют со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от серотипов 1, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгируют с CRM₁₉₇ (21-валентная).

В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцина вызывает защитный иммунный ответ у субъекта-человека против заболевания, обусловленного инфекцией *Streptococcus pneumoniae*. В соответствии с дополнительным аспектом в данном раскрытии предложен способ профилактики инфекции или заболевания *Streptococcus pneumoniae*, способ включает введение субъекту-человеку профилактически эффективного количества 21-валентной противопневмококковой конъюгированной композиции со смешанным носителем или ее содержащей вакцины. 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем или ее содержащую вакцину можно вводить любым путем, включая, например, системный или мукозальный путь, как описано более подробно ниже. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект-человек является пожилым человеком, и заболевание представляет собой пневмонию или инвазивное пневмококковое заболевание (IPD). В некоторых вариантах осуществления изобретения пожилой субъект находится в возрасте по меньшей мере 50 лет. В дру-

гих вариантах осуществления пожилой субъект находится в возрасте по меньшей мере 55 лет. В еще других вариантах осуществления пожилой субъект находится в возрасте по меньшей мере 60 лет. В других вариантах осуществления изобретения субъект-человек является ребенком, и заболевание представляет собой пневмонию, инвазивное пневмококковое заболевание (IPD) или острое воспаление среднего уха (АОМ). В некоторых вариантах осуществления изобретения ребенок находится в возрасте 0-2 года. В других вариантах осуществления изобретения ребенок находится в возрасте от 2 до 15 месяцев. В еще одном варианте осуществления изобретения субъект-человек в возрасте от 6 недель до 17 лет является ребенком, и заболевание представляет собой пневмонию, инвазивное пневмококковое заболевание (IPD) или острое воспаление среднего уха (АОМ). В определенных вариантах осуществления изобретения субъект-человек находится в возрасте от 6 недель до 5 лет. В других вариантах осуществления изобретения субъект-человек находится в возрасте от 5 до 17 лет.

Количество конъюгата в каждой дозе вакцины или профилактически эффективное количество поливалентной противопневмококковой конъюгированной композиции со смешанным носителем можно выбирать как количество, которое обеспечивает профилактику без существенных неблагоприятных эффектов. Такое количество может варьировать в зависимости от пневмококкового серотипа. В целом, каждая доза может включать в себя от около 0,1 мкг до около 100 мкг полисахарида, конкретно около от 0,1 до 10 мкг, и более конкретно от около 1 мкг до около 5 мкг. Оптимальные количества компонентов для конкретной вакцины могут устанавливаться стандартными исследованиями, включающими наблюдение за соответствующими иммунными реакциями у субъекта. Например, количество для вакцинации субъекта-человека можно определять экстраполяцией результатов исследований на животных. Кроме того, дозу можно определять эмпирически.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцина или 21-валентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем может представлять собой одну дозу 0,5 мл, приготовленную в виде препарата, который содержит от около 1 мкг до около 5 мкг каждого капсульного полисахарида; от около 1 мкг до около 30 мкг ТТ; от около 20 мкг до около 85 мкг CRM₁₉₇; и необязательно от около 0,1 мг до около 0,5 мг адьюванта из элементарного алюминия. В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцина или 21-валентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем может представлять собой одну дозу 0,5 мл, приготовленную в виде препарата, который содержит от около 2 мкг до около 2,5 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением серотипа 6В и необязательно серотипа 3; которые присутствуют в количестве от около 4 мкг до около 5 мкг; от около 2 мкг до около 25 мкг ТТ; от около 40 мкг до около 75 мкг CRM₁₉₇; и необязательно от около 0,1 мг до около 0,25 мг адьюванта из элементарного алюминия.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцина или 21-валентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем может представлять собой одну дозу 0,5 мл, приготовленную в виде препарата, который содержит около 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением серотипа 6В; который присутствует в количестве около 4,4 мкг. В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцина или 21-валентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем может представлять собой одну дозу 0,5 мл, приготовленную в виде препарата, который содержит от около 2 мкг до около 2,5 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением до шести капсульных полисахаридов, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 9В, 19А и 19F; каждый из которых присутствует в количестве от около 4 мкг до около 5 мкг. В одном варианте осуществления изобретения до шести капсульных полисахаридов, присутствующих в количестве от около 4 мкг до около 5 мкг, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 4, 6В, 9В, 19А и 19F. В других вариантах осуществления изобретения вакцина или 21-валентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем может представлять собой одну дозу 0,5 мл, приготовленную в виде препарата, который содержит около 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением до шести капсульных полисахаридов, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 9В, 19А и 19F; каждый из которых присутствует в количестве около 4,4 мкг. В одном варианте осуществления изобретения до шести капсульных полисахаридов, присутствующих в количестве около 4,4 мкг, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 4, 6В, 9В, 19А и 19F.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцина или 21-валентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем может представлять собой одну дозу 0,5 мл, приготовленную в виде препарата, который содержит от около 2 мкг до около 2,5 мкг капсульных полисахаридов серотипов 1, 5, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 22F, 23F и 33F, и от около 4 мкг до около 5 мкг капсульных полисахаридов серотипов 3, 4, 6В, 9В, 19А и 19F. В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцина или 21-валентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем может представлять собой одну дозу 0,5 мл, приготовленную в виде препарата, который содержит от около 2 до около 2,5 мкг капсульных полисахаридов серотипов 1, 4, 5, 6А, 7F, 8, 9В, 9N, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F, и от около 4 мкг до около 5 мкг капсульных полисахаридов серотипов 3 и 6В. В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцина или 21-валентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем может представлять собой одну дозу 0,5 мл, приготовленную в виде препарата, который содержит от

около 2 до около 2,5 мкг капсульных полисахаридов серотипов 1, 4, 5, 6А, 7F, 8, 9V, 9N, 10А, 11А, 12F, 14, 15B, 18C, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F, и от около 4 мкг до около 5 мкг капсульных полисахаридов серотипа 6В, и от около 8 мкг до около 9 мкг капсульных полисахаридов серотипа 3, и более предпочтительно около 8,8 мкг капсульного полисахарида серотипа 3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения 21-валентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем или содержащая ее вакцина дополнительно содержит в качестве вспомогательных веществ буфер из хлорида натрия и сукцината натрия.

В некоторых вариантах осуществления изобретения 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем могут готовить в виде жидкой лекарственной формы, в которой каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 1 и 3 конъюгированы с ТТ, а капсульные полисахариды от серотипов 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15B, 18C, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇ (21-валентная). Каждую дозу 0,5 мл можно готовить в виде жидкой лекарственной формы, содержащей: около 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением серотипа 6В в количестве около 4,4 мкг; от около 2 мкг до около 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 1 и 3) и от около 40 мкг до около 75 мкг белка-носителя CRM₁₉₇; от около 0,125 мг до около 0,250 мг элементарного алюминия (от около 0,5 до около 1,2 мг фосфата алюминия) в качестве адьюванта; и буфер из хлорида натрия и сукцината натрия, в качестве вспомогательных веществ. В некоторых вариантах осуществления изобретения 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем могут готовить в виде жидкой лекарственной формы, в которой каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 1 и 5 конъюгированы с ТТ, а капсульные полисахариды от серотипов 3, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15B, 18C, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇ (21-валентная). В одном варианте осуществления изобретения каждую дозу 0,5 мл можно готовить в виде жидкой лекарственной формы, содержащей: около 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением серотипа 6В в количестве около 4,4 мкг и серотипа 3 в количестве около 2,2-8,8 мкг; от около 2 мкг до около 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 1 и 5) и от около 40 мкг до около 75 мкг белка-носителя CRM₁₉₇; от около 0,125 мг до около 0,250 мг адьюванта элементарного алюминия (от около 0,5 до около 1,2 мг фосфата алюминия); и буфер из хлорида натрия и сукцината натрия, в качестве вспомогательных веществ. В некоторых вариантах осуществления изобретения серотип 3 присутствует в количестве около 2,2 мкг. В других вариантах осуществления серотип 3 присутствует в количестве около 4,4 мкг. В других вариантах осуществления серотип 3 присутствует в количестве около 8,8 мкг. В еще одном варианте осуществления изобретения каждую дозу 0,5 мл можно готовить в виде жидкой лекарственной формы, содержащей: около 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением до шести капсульных серотипов, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 9V, 19А и 19F в количестве около 4,4 мкг; от около 2 мкг до около 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 1 и 5) и от около 40 мкг до около 75 мкг белка-носителя CRM₁₉₇; от около 0,125 мг до около 0,250 мг адьюванта элементарного алюминия (от около 0,5 до около 1,2 мг фосфата алюминия); и буфер из хлорида натрия и сукцината натрия, в качестве вспомогательных веществ. В одном варианте осуществления изобретения до шести капсульных полисахаридов в количестве около 4,4 мкг выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 4, 6В, 9V, 19А и 19F. В другом варианте осуществления изобретения каждую дозу 0,5 мл можно готовить в виде жидкой лекарственной формы, содержащей: около 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением серотипов 3, 4, 6В, 9V, 19А и 19F в количестве около 4,4 мкг; от около 2 мкг до около 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 1 и 5) и от около 40 мкг до около 75 мкг белка-носителя CRM₁₉₇; от около 0,125 мг до около 0,250 мг адьюванта элементарного алюминия (от около 0,5 до около 1,2 мг фосфата алюминия); и буфер из хлорида натрия и сукцината натрия, в качестве вспомогательных веществ. В другом варианте осуществления изобретения каждую дозу 0,5 мл можно готовить в виде жидкой лекарственной формы, содержащей: около 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением серотипов 3 и 4 в количестве около 4,4 мкг; от около 2 мкг до около 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 1 и 5) и от около 40 мкг до около 75 мкг белка-носителя CRM₁₉₇; от около 0,125 мг до около 0,250 мг адьюванта элементарного алюминия (от около 0,5 до около 1,2 мг фосфата алюминия); и буфер из хлорида натрия и сукцината натрия, в качестве вспомогательных веществ.

В некоторых вариантах осуществления изобретения 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем могут готовить в виде жидкой лекарственной формы, в которой каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 3 и 5 конъюгированы с ТТ, а капсульные полисахариды от серотипов 1, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15B, 18C, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇ (21-валентная). Каждую дозу 0,5 мл можно готовить в виде жидкой лекарственной формы, содержащей около 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением 6В в количестве около 4,4 мкг; от около 2 мкг до около 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 3 и 5) и от около 40 мкг до около 75 мкг белка-носителя CRM₁₉₇; около от 0,125 мг до 0,250 мг адьюванта элементарного алюминия (около от 0,5 до 1,2 мг фосфата алюминия); и буфер из хлорида натрия и сукцината натрия, в качестве вспомогательных веществ.

В некоторых вариантах осуществления изобретения жидкой лекарственной формой можно напол-

нять шприцы с однократной дозой без консерванта. После встряхивания жидкая лекарственная форма становится вакциной, которая является гомогенной белой суспензией, готовой для внутримышечного введения. 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем можно вводить в виде однократной инъекции или как часть серии иммунизаций. Например, 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем можно вводить 2, 3, 4 или более раз в соответствующим образом распределенные интервалы, такие как 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месячные интервалы, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем вводят ребенку 4 раза в пределах первых 15 месяцев после рождения, включая, например, в возрасте около 2, 3, 4 и 12-15 месяцев; в возрасте около 3, 4, 5 и 12-15 месяцев; или в возрасте около 2, 4, 6 и 12-15 месяцев. Эту первую дозу можно вводить уже в возрасте 6 недель. В другом варианте осуществления изобретения 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем вводят ребенку 3 раза в пределах первых 15 месяцев после рождения, включая, например, около 2, 4 и 11-12 месяцев. Поливалентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем также может включать в себя один или более белков из *Streptococcus pneumoniae*. Например белки *Streptococcus pneumoniae*, подходящие для включения, охватывают установленные в международной заявке на патент WO 02/083855, а также описанные в международной заявке на патент WO 02/053761. 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем можно вводить субъекту посредством одного или более путей введения, известных среднему специалисту в данной области, такого как парентеральный, трансдермальный или трансмукозальный, интраназальный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутрикожный, внутривенный или подкожный путь, и может быть соответственно приготовлена в виде препарата. 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем можно готовить в виде препарата, который должен быть совместимым с предполагаемым путем введения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем можно вводить в виде жидкой лекарственной формы путем внутримышечной, внутрибрюшинной, подкожной, внутривенной, внутриартериальной или трансдермальной инъекции, или респираторно-мукозальной инъекцией. 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем можно готовить в жидкой форме или лиофилизированной форме. В некоторых вариантах осуществления изобретения инъекционные композиции готовят в обычных формах, либо в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для получения раствора или суспензии в жидкости, перед инъекцией, либо в виде эмульсий. В некоторых вариантах осуществления изобретения растворы и суспензии для инъекций готовят из стерильных порошков или гранул. Общие рекомендации по приготовлению лекарственной формы и производству фармацевтических средств для введения этими путями можно найти, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995; включенной в данный документ посредством ссылки. В настоящее время пероральный или назальный спрей или аэрозольный путь (например, ингаляцией) наиболее часто используются для доставки терапевтических агентов в легкие и дыхательную систему. В некоторых вариантах осуществления изобретения 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем вводят, используя устройство, которое доставляет отмеренную дозировку композиции. Подходящие устройства для применения при доставке внутрикожных фармацевтических композиций, описанных в данном документе включают устройства с короткими иглами, такие как описанные в патенте США № 4886499, патенте США № 5190521, патенте США № 5328483, патенте США № 5527288, патенте США № 4270537, патенте США № 5015235, патенте США № 5141496, патенте США № 5417662 (все из которых включены в данный документ посредством ссылки). Внутрикожные композиции также можно вводить устройствами, которые ограничивают эффективное проникновение длины иглы в кожу, например описанные в WO 1999/34850, включенной в данный документ путем ссылки, их функциональными эквивалентами. Пригодны также устройства для струйной инъекции, которые доставляют жидкие вакцины в кожу посредством струйного жидкостного инжектора или посредством иглы, которая прокалывает роговой слой кожи и создает струю, достигающую кожи. Устройства для струйной инъекции описаны, например, в патенте США № 5480381, патенте США № 5599302, патенте США № 5334144, патенте США № 5993412, патенте США № 5649912, патенте США № 5569189, патенте США № 5704911, патенте США № 5383851, патенте США № 5893397, патенте США № 5466220, патенте США № 5339163, патенте США № 5312335, патенте США № 5503627, патенте США № 5064413, патенте США № 5520639, патенте США № 4596556, патенте США № 4790824, патенте США № 4941880, патенте США № 4940460, WO1997/37705 и WO1997/13537 (все из которых включены в данный документ посредством ссылки). Пригодны также баллистические устройства доставки порошка/частиц, в которых применяется сжатый газ для ускорения вакцины в порошковой форме с целью проникновения через внешние слои кожи в эпидермис. Кроме того, можно использовать обычные шприцы в классическом способе Манто (Mantoux) внутрикожного введения.

Препараты для парентерального введения включают в себя стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примеры неводных растворителей включают пропиленгликоль, полиэти-

ленгликоль, такие масла, как оливковое масло, и такие инъекционные органические сложный эфиры, как этилолеат. Примеры масла включают в себя масло растительного или животного происхождения, арахисовое масло, соевое масло, оливковое масло, подсолнечное масло, масло из печени рыб, синтетическое масло, такое как судовое масло, и липиды, полученные из молока или яиц. Водный носитель включает воду, спиртово/водный раствор, эмульсии или суспензии, включая солевой раствор и забуференные среды. К парентеральным носителям относятся раствор хлорида натрия, декстрозный раствор Рингера, декстроза и хлорид натрия, лактатный раствор Рингера или нелетучие масла. К внутривенным носителям относятся растворы для восполнения жидкости и питательных веществ, растворы для восполнения электролитов (например такие, которые основаны на декстрозном растворе Рингера) и т.п. Могут также присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы и т.п.

21-Валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем можно готовить в форме флакона с единичной дозой, флакона с многократной дозой или предварительно наполненного шприца. Фармацевтически приемлемый носитель для жидкой лекарственной формы включает водный или неводный растворитель, суспензию, эмульсию или масло. Композиция может быть изотонической, гипертонической или гипотонической. Однако желательно, чтобы композиция для инфузии или инъекции была в основном изотонической. Поскольку изотоничность или гипертоничность может давать преимущество для хранения композиции. Если композиция является гипертонической, то ее можно разбавлять перед введением. Регулирующий тоничность агент может быть ионным регулирующим тоничность агентом, таким как соль, или неионным регулирующим тоничность агентом, таким как углевод. Регулирующий тоничность агент включает, но не ограничивается ими, хлорид натрия, хлорид кальция, хлорид калия и хлорид магния. Неионный регулирующий тоничность агент включает, но не ограничивается ими, сорбит и глицерин. Предпочтительно включен по меньшей мере в один фармацевтически приемлемый буфер. Например, если композиция представляет собой инфузию или инъекцию, то предпочтительно она должна готовиться в буфере с буферной емкостью при от pH 4 до pH 10, такой как от pH 5 до pH 9, или от pH 6 до pH 8. Буфер может быть выбран из соответствующих Фармакопее США (USP). Например, буфер можно выбирать из группы, состоящей из одноосновной кислоты, такой как уксусная кислота, бензойная кислота, глюконовая кислота, глицериновая кислота и молочная кислота; двухосновной кислоты, такой как аконитовая кислота, адипиновая кислота, аскорбиновая кислота, угольная кислота, глутаминовая кислота, яблочная кислота, янтарная кислота и винная кислота; многоосновной кислоты, такой как лимонная кислота и фосфорная кислота; и такого основания как аммиак, диэтаноламин, глицин, триэтаноламин и ТРИС. 21-Валентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем может содержать поверхностно-активный агент. Примеры поверхностно-активного агента включают в себя, но не ограничиваются ими, сложный эфир полиоксиэтиленсорбитана (обычно называемый Tween), в частности полисорбат 20 и полисорбат 80; сополимеры (такие как DOWFAX) этиленоксида (EO), пропиленоксида (PO), бутиленоксида (BO); октоксинолы с различными повторами этокси(окси-1,2-этандиольной) группы, в частности октоксинол-9 (Triton-100); этилфеноксиполизитоксизетанол (IGEPAL CA-630/NP-40); фосфолипид, такой как лецитин; нонилфенол этоксилат, такой как из серии TERGITOL NP; лаурил, цетил, стеарил, олеил жирных спиртопроизводных эфиров полиоксиэтилена (сурфактант Brij), в частности монолаурил эфира триэтиленгликоля (Brij 30); сорбитановый эфир, известный как SPAN, в частности триолеат сорбитана (Span 85) и монолаурат сорбитана.

Можно применять смеси поверхностно-активных агентов, таких как Tween 80/Span 85. Пригодна также комбинация сложного эфира полиоксиэтиленсорбитана, такого как Tween 80, и октоксинаола, такого как Triton X-100. Преимуществом обладает комбинация Laureth 9 и Tween и/или октоксинаола. Предпочтительно включенное в состав количество сложного эфира полиоксиэтиленсорбитана (такой как Tween 80) может составлять от 0,01 до 1% (мас./об.), от 0,01 до 0,1% (мас./об.), от 0,01 до 0,05% (мас./об.) или около 0,02%; включенное в состав количество октилфеноксиполизитоксизетанола или нонилфеноксиполизитоксизетанола (такого как Triton X-100) может составлять от 0,001 до 0,1% (мас./об.), в частности от 0,005 до 0,02%; и включенное в состав количество полиоксиэтиленового эфира (такого как Laureth 9) может составлять от 0,1 до 20% (мас./об.), возможно от 0,1 до 10%, в частности от 0,1 до 1% или около 0,5%.

В некоторых вариантах осуществления изобретения 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем можно доставлять посредством системы с контролем высвобождения. Например, для введения можно использовать внутривенную инфузию, трандермальный пластырь, липосому или другие способы. В одном аспекте можно применять такие макромолекулы, как микросферы, или имплант.

Представленное выше описание в целом описывает настоящее изобретение. Более полное понимание может быть получено путем обращения к следующим конкретным примерам. Эти примеры описаны целиком с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения объема данного изобретения.

Примеры

Пример 1. Получение капсульных полисахаридов *S. pneumoniae*

Культивирование *S. pneumoniae* и очистку капсульных полисахаридов проводили, как известно любому специалисту в данной области. Серотипы *S. pneumoniae* получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC) (серотип 1: ATCC № 6301; серотип 3: ATCC № 6303; серотип 4: ATCC № 6304; серотип 5: ATCC № 6305; серотип 6А: ATCC № 6306; серотип 6В: ATCC № 6326; серотип 7F: ATCC № 10351; серотип 9N: ATCC № 6309; серотип 9V: ATCC № 10368; серотип 14: ATCC № 6314; серотип 18С: ATCC № 10356; серотип 19А: ATCC № 10357; серотип 19F: ATCC № 6319; серотип 23F: ATCC № 6323). Использовали внутрилабораторные штаммы для серотипов 8, 10А, 11А, 12F, 15В, 22F и 33F, но можно применять любой общедоступный штамм. Характеристики *S. pneumoniae* определяли по капсулам и подвижности, грамположительной окраске, кофейноидной форме диплококков и альфа-гемолузу в среде кровяного агара.

Серотипы идентифицировали тестом Quelling с использованием специфических антисывороток (патент США № 5847112).

Получение банков клеток

С целью размножения штаммов и удаления компонентов животного происхождения были получены несколько поколений посевных культур (поколения F1, F2 и F3). Были получены две дополнительные поколения посевных культур. Первую дополнительную генерацию культивировали из флакона F3, а последующую генерацию культивировали из флакона первой дополнительной генерации. Флаконы с посевными культурами хранили замороженными (ниже -70°C) с синтетическим глицерином в качестве криоконсерванта. Для получения банка клеток все культуры выращивали в соевой среде. Перед заморозкой клетки концентрировали путем центрифугирования, удаления истощенной среды, и осажденные клетки ресуспендировали в свежей среде, содержащей криоконсервант (такой как синтетический глицерин).

Культивирование и сбор

Культуры из рабочего банка клеток инокулировали в посевные бутылки, содержащие соевую среду, и культивировали. После достижения целевой оптической плотности (поглощения) посевную бутылку использовали для инокуляции ферментера, содержащего соевую среду. Культивирование прекращали, когда значение оптической плотности начинало сохраняться постоянным. После прекращения культивирования добавляли дезоксихолат натрия для лизиса клеток. Охлаждали полученное содержимое ферментера и инициировали осаждение белков. Затем смесь центрифугировали для удаления осажденных белков и клеточного дебриса.

Очистка

Раствор, полученный в результате центрифугирования, фильтровали через глубинный фильтр для удаления белков и клеточного дебриса, которые не осели при центрифугировании. Фильтрат концентрировали на мембране для ММ 100 кДа и концентрат подвергали диафильтрации с 10 объемами буфера 25 мМ фосфата натрия (рН 7,2) для получения образца. Образец фильтровали для сбора супернатанта, из которого осаждали и фильтровали полисахариды. Фильтрат концентрировали на мембране для ММ 30 кДа и концентрат подвергали диафильтрации с использованием около 10 объемов трижды дистиллированной воды. После выполнения диафильтрации оставшийся раствор фильтровали через фильтр на 0,2 мкм. Испытание по контролю в процессе производства выполняли на фильтрате (внешний вид, остаточные белки, остаточные нуклеиновые кислоты, эндотоксины, значения молекулярных масс и общее количество полисахаридов). Концентрат стерильно фильтровали и хранили при -20°C .

Пример 2. Получение конъюгата капсульного полисахарида *S. pneumoniae* и белка-носителя

Полисахариды различных серотипов активировали, следуя различными путями, и затем конъюгировали белок-носитель CRM₁₉₇ или ТТ. Конкретно, конъюгаты получали путем конъюгирования каждого из капсульного полисахарида всех серотипов с CRM₁₉₇ и путем конъюгирования каждого из капсульных полисахаридов серотипов 1, 3 и 5 с ТТ. В зависимости от размера нативного серотипа процесс активации может включать в себя снижение размера каждого капсульного полисахарида до целевой молекулярной массы, химическую активацию и замену буфера посредством ультрафильтрации. Конъюгаты очищали с использованием ультрафильтрации и, в конечном итоге, фильтровали через фильтр 0,2 мкм. Параметры процесса, такие как рН, температура, концентрация и длительность были следующими.

(1) Процесс активации

Стадия 1. Гидролиз

Восстановительное аминирование - известный метод для конъюгирования полимеров, в которых между группой ($-\text{NH}_2$) первичного амина белка и альдегидом сахара формируется амидная связь. Альдегидные группы добавляют к пневмококковому капсульному полисахариду для создания условий для конъюгации с белком-носителем. Вицинальную диольную структуру моносахарида можно окислить перйодатом натрия (NaIO_4) с целью образования альдегидных групп. Капсульные полисахариды от серотипов 1, 3, 4, 6А, 8, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 22F и 33F обрабатывали следующим образом.

В случае серотипа 1 к раствору капсульного полисахарида добавляли гидроксид натрия (до конечной концентрации основания 0,05 М), и инкубировали раствор при $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от около 21°C до около 25°C и к нему добавляли хлористоводородную кислоту

до конечного значения pH $6,0 \pm 0,1$, тем самым останавливая гидролиз.

В случае серотипов 3, 8, 11А и 15В к раствору капсульного полисахарида добавляли хлористоводородную кислоту (до конечной концентрации кислоты $0,01$ М) и инкубировали раствор при $60 \pm 2^\circ\text{C}$. Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от около 21°C до около 25°C и к нему добавляли $0,1$ М фосфат натрия до конечного значения pH $6,0 \pm 0,1$, тем самым останавливая гидролиз. В случае серотипа 4 к раствору капсульного полисахарида добавляли хлористоводородную кислоту (до конечной концентрации кислоты $0,1$ М) и инкубировали раствор при $45 \pm 2^\circ\text{C}$. Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от около 21°C до около 25°C и к нему добавляли 1 М фосфат натрия до конечного значения pH $6,0 \pm 0,1$, тем самым останавливая гидролиз.

В случае серотипа 6А к раствору капсульного полисахарида добавляли ледяную уксусную кислоту (до конечной концентрации кислоты $0,1$ М) и инкубировали раствор при $60 \pm 2^\circ\text{C}$. Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от около 21°C до около 25°C и к нему добавляли 1 М гидроксид натрия до конечного значения pH $6,0 \pm 0,1$, тем самым останавливая гидролиз.

В случае серотипа 12F к раствору капсульного полисахарида добавляли хлористоводородную кислоту (до конечной концентрации кислоты $0,01$ М), и инкубировали раствор при $70 \pm 2^\circ\text{C}$. Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от около 21°C до около 25°C , и к нему добавляли $0,1$ М фосфат натрия до конечного значения pH раствора $6,0 \pm 0,1$, тем самым останавливая гидролиз.

В случае серотипов 14 и 18С к раствору капсульного полисахарида добавляли ледяную уксусную кислоту (до конечной концентрации кислоты $0,2$ М) и инкубировали раствор при $94 \pm 2^\circ\text{C}$. Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от около 21°C до около 25°C и к нему добавляли 1 М фосфат натрия таким образом, чтобы конечное значение pH раствора составляло $6,0 \pm 0,1$, тем самым останавливая гидролиз. В случае серотипов 22F и 33F к раствору капсульного полисахарида добавляли хлористоводородную кислоту (до конечной концентрации кислоты $0,01$ М) и инкубировали раствор при $60 \pm 2^\circ\text{C}$. Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от около 21°C до около 25°C и к нему добавляли $0,1$ М фосфат натрия до конечного значения pH $6,0 \pm 0,1$, тем самым останавливая гидролиз.

Каждый из полученных капсульных полисахаридов разбавляли в воде для инъекций (WFI), добавляли ацетат натрия и фосфат натрия до конечной концентрации около $1,0$ мг/мл и около $2,0$ мг/мл.

Стадия 2. Реакция с периодатом

Определяли молярный эквивалент периодата натрия для активации каждого пневмококкового сахара на основе молярной массы повторяющегося звена. При тщательном перемешивании давали реакции окисления возможность протекать в течение от 16 до 20 ч при температуре от 21 до 25°C для всех серотипов, за исключением 1, 7F и 19F, для которых температура составляла 10°C и меньше. Для поддержания постоянного и стабильного продуцирования конъюгатов в процессе конъюгации для каждого серотипа установлен целевой диапазон уровней степени окисления (Do). Предпочтительно целевой диапазон для уровней Do для каждого серотипа показан в табл. 1 и 2.

Таблица 1. Диапазон Do для всех серотипов, которые необходимо конъюгировать с CRM₁₉₇

Серотип	Диапазон Do	Серотип	Диапазон Do
Серотип 1	от 4 до 10	Серотип 11А	от 1 до 15
Серотип 3	от 2 до 8	Серотип 12F	от 1 до 9
Серотип 4	от 1 до 5	Серотип 14	от 6 до 13
Серотип 5	от 2 до 6	Серотип 15В	от 1 до 17
Серотип 6А	от 5 до 15	Серотип 18С	от 6 до 14
Серотип 6В	от 7 до 13	Серотип 19А	от 7 до 13
Серотип 7F	от 2 до 8	Серотип 19F	от 6 до 12
Серотип 8	от 1 до 17	Серотип 22F	от 1 до 16
Серотип 9N	от 5 до 10	Серотип 23F	от 6 до 14
Серотип 9	от 4 до 9	Серотип 33F	от 1 до 15
Серотип 10А	от 1 до 12		

Таблица 2. Диапазон Do для серотипов 1, 3 и 5, которые необходимо конъюгировать с ТТ

Серотип	Диапазон Do
Серотип 1 (1-ТТ)	от 1 до 15
Серотип 3 (3-ТТ)	от 2 до 14
Серотип 5 (5-ТТ)	от 1 до 15

Стадия 3. Ультрафильтрация

Окисленный сахарид концентрировали и подвергали диафильтрации с использованием WFI на ультрафильтре с отсечением молекулярной массы (MWCO) 100 кДа (ультрафильтр на 30 кДа для серотипа 1 и ультрафильтр на 5 кДа для серотипа 18С). Диафильтрацию проводили с использованием 0,9% раствора хлорида натрия для серотипа 1, 0,01 М буфера ацетата натрия (рН 4,5) для серотипов 7F и 23F и 0,01 М буфера фосфата натрия (рН 6,0) для серотипа 19F. Пермеат отбрасывали, а ретенат фильтровали через фильтр на 0,2 мкм.

Стадия 4. Лиофилизация

Для капсульных полисахаридов серотипов 3, 4, 5, 8, 9N, 9V, 10A, 14, 15B, 22F и 33F, которые необходимо конъюгировать с белком-носителем путем использования водного растворителя, смешанный раствор полисахаридов и белка-носителя готовили без добавления дополнительной сахарозы, лиофилизовали и затем хранили при $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Для капсульных полисахаридов серотипов 1 и 18С, которые необходимо конъюгировать с белком-носителем путем использования водного растворителя, независимо готовили полисахариды и белок-носитель без добавления дополнительной сахарозы, лиофилизовали и затем хранили при $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Для капсульных полисахаридов серотипов 6A, 6B, 7F, 19A, 19F и 23F, которые необходимо конъюгировать с белком-носителем путем использования растворителя ДМСО, к активированным полисахаридам добавляли предварительно определенное количество сахарозы до достижения конечной концентрации сахарозы $5\% \pm 3\%$ (мас./об.) и независимо готовили образцы, лиофилизовали, а затем хранили при $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Для капсульного полисахарида серотипа 11A, к активированному полисахариду добавляли предварительно определенное количество сахарозы до достижения конечной концентрации сахарозы $20\% \pm 5\%$ (мас./об.), и независимо готовили полисахариды и белок-носитель, лиофилизовали, а затем хранили при $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Для капсульного полисахарида серотипа 12F, к активированному полисахариду добавляли предварительно определенное количество сахарозы до достижения конечной концентрации сахарозы $10\% \pm 5\%$ (мас./об.), и независимо готовили полисахариды и белок-носитель, лиофилизовали, а затем хранили при $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

(2) Процесс конъюгации

Конъюгацию в водной среде проводили для серотипов 1, 3, 4, 5, 8, 9N, 9V, 10A, 14, 15B, 18С, 22F и 33F, и конъюгацию в ДМСО проводили для серотипов 6A, 6B, 7F, 11A, 12F, 19A, 19F и 23F. Каждый из капсульных полисахаридов конъюгировали с белком-носителем в соотношении от 0,2 до 2:1.

Стадия 1. Растворение

Конъюгация в водной среде

Для серотипов 1, 3, 4, 5, 8, 9N, 9V, 10A, 14, 15B, 18С, 22F и 33F, лиофилизированный образец оттаивали и доводили до комнатной температуры. Растворяли лиофилизированный образец до реакционной концентрации путем использования буферного раствора фосфата натрия при $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ в соотношении, установленном для каждого серотипа.

Конъюгация в среде диметилсульфоксида (ДМСО)

Для серотипов 6A, 6B, 7F, 11A, 12F, 19A, 19F и 23F, лиофилизированный образец оттаивали, довели до комнатной температуры и растворяли в ДМСО.

Стадия 2. Реакция конъюгации

Конъюгация в водной среде

Для серотипов 3-ТТ, 4, 5, 5-ТТ, 8, 9N, 9V, 10A, 14, 15B, 18С, 22F и 33F реакцию конъюгации инициировали добавлением раствора цианоборогидрида натрия (100 мг/мл) к от 1,0 до 1,4 моль цианоборогидрида натрия на моль сахара. Однако для серотипов 1, 1-ТТ и 3 реакцию инициировали добавлением раствора цианоборогидрида натрия к 0,5 моль цианоборогидрида натрия на моль сахара.

Реакционную смесь инкубировали при от 23 до 37°C в течение от 44 до 106 ч. Температуру и продолжительность реакции корректировали по серотипу. Затем температуру снижали до $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ и добавляли в реактор 0,9% хлорид натрия. Добавляли раствор борогидрида натрия (100 мг/мл) до достижения от 1,8 до 2,2 мол. экв. борогидрида натрия на моль сахара. Смесь инкубировали при $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение от 3 до 6 ч. Эта процедура уменьшала наличие любых непрореагировавших альдегидов на сахарах. Затем

смесь разбавляли 0,9% хлористым натрием и разбавленную конъюгационную смесь фильтровали с использованием предварительного фильтра на 0,8 или 0,45 мкм.

Конъюгация в среде ДМСО

Для капсульных полисахаридов серотипов 6А, 6В, 7F, 11А, 12F, 19А, 19F и 23F реакцию конъюгации инициировали добавлением раствора цианоборогидрида натрия (100 мг/мл) в соотношении от 0,8 до 1,2 мол. экв. цианоборогидрида натрия на один моль активированного сахара. В реакционную смесь добавляли WFI до целевой концентрации 1% (об./об.) и инкубировали смесь в течение от 12 до 26 ч при $23\pm 2^\circ\text{C}$. К реакционной смеси добавляли 100 мг/мл раствора борогидрида натрия (обычно от 1,8 до 2,2 мол. экв. борогидрида натрия на моль активированного сахара) и WFI (целевая концентрация 5% об./об.) и инкубировали смесь в течение от 3 до 6 ч при $23\pm 2^\circ\text{C}$. Эта процедура уменьшала наличие любых непрореагировавших альдегидов на сахарах. Затем реакционную смесь разбавляли 0,9% хлористым натрием, и разбавленную конъюгационную смесь фильтровали с использованием предварительного фильтра на 0,8 или 0,45 мкм.

Стадия 3. Ультрафильтрация

Разбавленную конъюгационную смесь концентрировали и подвергали диафильтрации на ультрафильтрационном фильтре с MWCO 100 кДа или ультрафильтрационном фильтре с MWCO 300 кДа с минимум 15 объемами 0,9% хлорида натрия или буфера. Кроме того, состав и pH буфера, используемого в этом процессе, варьировался в зависимости от каждого из серотипов.

Стадия 4. Стерильная фильтрация

Ретентат после ультрафильтрации стерильно фильтровали (0,2 мкм) и на отфильтрованных конъюгатах выполняли контроли в процессе производства (внешний вид, свободный белок, свободный сахарид, распределение молекул по размерам, стерильность, содержание сахара, содержание белка, pH, эндотоксин, остаточный цианид, остаточный ДМСО, идентичность сахара, идентичность ТТ и идентичность CRM₁₉₇). Готовый концентрат охлаждали и хранили при от 2 до 8°C .

Пример 3. Приготовление препарата поливалентной противопневмококковой конъюгированной вакцины

Желаемые объемы готовых нерасфасованных концентратов, полученных из примера 2, рассчитывали на основе объема партии и концентраций нерасфасованных сахаридов. После добавления к предварительно маркированной емкости для препарата 0,85% хлорида натрия (физиологический солевой раствор), полисорбата 80 и сукцинатного буфера в нее добавляли нерасфасованные концентраты. Затем препарат тщательно перемешивали и стерильно фильтровали через мембрану на 0,2 мкм. Приготовленный нерасфасованный препарат осторожно перемешивали до и после добавления полупродукта фосфата алюминия. При необходимости проверяли pH и корректировали его. Приготовленный нерасфасованный продукт хранили при от 2 до 8°C . Приготовили следующие неограничивающие препараты поливалентных противопневмококковых конъюгированных вакцин и назвали их PCV21(1/5)-ТТ и PCV21(3/5)-ТТ: PCV21(1/5)-ТТ включал конъюгаты-полисахариды, полученные конъюгированием каждого полисахарида серотипов 1 и 5 с ТТ и каждого полисахарида серотипов 3, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F с CRM₁₉₇; и PCV21(3/5)-ТТ включал конъюгаты-полисахариды, полученные конъюгированием каждого полисахарида серотипов 3 и 5 с ТТ и каждого полисахарида серотипов 1, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F с CRM₁₉₇.

Композиция PCV21(1/5)-ТТ в общей дозе 0,5 мл включала 2,2 мкг каждого полисахарида, за исключением серотипа 6В при 4,4 мкг; от 2 до 25 мкг ТТ (для серотипов 1 и 5) и от 40 до 75 мкг CRM₁₉₇; 0,125 мг адьюванта элементарного алюминия (0,5 мг фосфата алюминия); 4,25 мг хлорида натрия; около 295 мкг сукцинатного буферного раствора и около 100 мкг полисорбата 80 в общей дозе 0,5 мл. В некоторых экспериментах в композиции PCV21(1/5)-ТТ количество полисахарида серотипа 3 увеличили до 4,4 мкг или 8,8 мкг. В некоторых экспериментах в композиции PCV21(1/5)-ТТ количество полисахарида каждого из серотипов 3, 4, 6В, 9V, 19А и 19F увеличили до 4,4 мкг.

Композиция PCV21(3/5)-ТТ в общей дозе 0,5 мл включала от 2 до 25 мкг ТТ (для серотипов 3 и 5) и от 40 до 75 мкг CRM₁₉₇, соответственно, при этом остальные компоненты и их содержания идентичны таковым для PCV21(1/5)-ТТ. В некоторых композициях количество элементарного алюминия в дозе 0,5 мл увеличили до 0,250 мг.

Пример 4. Иммуногенность поливалентной противопневмококковой конъюгированной вакцины

Поливалентные противопневмококковые вакцины, PCV21(1/5)-ТТ и PCV21(3/5)-ТТ, со смешанным носителем, приготовленные в примере 3, исследовали на способность индуцировать иммуногенный ответ у кроликов. Оценку иммуногенности проводили методом антигенспецифического твердофазного ИФА на концентрации IgG в сыворотке крови и опсонофагоцитарным анализом (ОПА) на функциональность антител.

Новозеландских белых кроликов на неделе 0 и неделе 2 иммунизировали внутримышечно дозой на 5% выше запланированной клинической дозы каждого полисахарида для человека (2,31 мкг каждого полисахарида, за исключением 6В при 4,62 мкг) в препарате, или дозой человека (2,2 мкг каждого полисахарида, за исключением 6В при 4,4 мкг). Сыворотку отбирали каждые 2 недели после иммунизации. Обе

концентрации показали одинаковые результаты.

4-1. PCV21(3/5)-ТТ

Измерение специфических к серотипам концентраций IgG

Капсульные полисахариды (PnP) для каждого серотипа наносили на 96-луночный планшет по от 0,5 мкг/лунку до 1 мкг/лунку. У каждого субъекта отбирали образец эквивалентного количества сыворотки и объединяли по группам. Объединенную сыворотку последовательно разбавляли в 2,5 раз буфером для разбавления антител, содержащим Tween 20 и полисахарид клеточной стенки пневмококков (CWPS), полученного из Датского государственного института сывороток (5 мкг/мл), и затем проводили реакцию при комнатной температуре в течение 30 мин. Планшет промывали 5 раз промывочным буфером, а затем к покрытым лункам планшета добавляли предварительно адсорбированную и разбавленную сыворотку объемом 50 мкл, после чего инкубировали при комнатной температуре в течение от 2 до 18 ч. Лунки планшета промывали тем же образом и затем к каждой лунке добавляли конъюгаты антител козла против IgG кролика со щелочной фосфатазой, после чего инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Планшеты промывали, как описано выше и к каждой лунке добавляли буфера с 1 мг/мл п-нитрофениламина в качестве субстрата и затем проводили реакцию при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакцию гасили добавлением 50 мкл 3 М NaOH и измеряли абсорбцию на 405 нм и 690 нм. В качестве сравнительного примера той же процедуре можно подвергать коммерчески доступную 13-валентную вакцину (ПРЕВНАР13). Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3. Концентрация IgG (Ед/мл) для 21 серотипа через 2 недели после вторичной иммунизации

Серотип	ПРЕВНАР13	PCV21(3/5)-ТТ	PCV21(3/5)-ТТ
		0,125 мг Al	0,250 мг Al
1	16770,4	15320,6	38499,1
3	6603,4	30132,8	32029,7
4	27969,9	51034,4	71638,3
5	5758,6	15627,5	11044,7
6A	9493,7	14205,8	30453,5
6B	8690,6	15023,6	11633,1
7F	60819,7	53696,7	48511,1
8	594,8	58391,9	62852,2
9N	5186,2	208401,8	259323,2
9V	30043,9	38143,9	48677,2
10A	169,8	36437,6	55124,5
11A	184,5	36771,1	45762,9
12F	130,0	22278,5	14475,3
14	21906,0	37577,9	64409,8
15B	843,5	22065,2	25248,8
18C	91500,7	88824,7	137638,5
19A	16470,7	13070,9	11387,0
19F	13956,4	40516,9	84553,8
22F	139,7	51649,9	62072,7
23F	12089,4	5772,9	15565,5
33F	143,2	35602,4	46272,8

При конъюгировании капсульных полисахаридов серотипов 3 и 5 с ТТ концентрация IgG, специфических к серотипам, значительно возросла по сравнению с концентрацией, полученной при их конъюгировании с CRM₁₉₇. Кролики, иммунизированные PCV21(3/5)-ТТ, также продемонстрировали значительное увеличение концентрации IgG против дополнительных восьми серотипов, отсутствующих в ПРЕВНАР13 (т.е. 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F). Серотип 9N, в частности, при введении с 0,125 мг и 0,250 мг алюминия дал неожиданно 40-кратное и 50-кратное увеличение, соответственно, по сывороточной концентрации специфических IgG относительно ПРЕВНАР13. Дополнительно, ряд других капсульных полисахаридов серотипов в PCV21(3/5)-ТТ показал значительно более высокий уровень сывороточной концентрации специфических IgG, чем ПРЕВНАР13.

Тестирование функциональной иммуногенности (МОРА)

Функции антител оценивали путем тестирования сыворотки в анализе МОРА. Штамм *S. pneumoniae* МОРА, хранившийся при температуре -70°C или ниже, разбавляли до соответствующей конечной кратности разбавления, так что концентрация каждого штамма составляла около 50 000 КОЕ/мл. У каждого субъекта отбирали образец эквивалентного количества сыворотки, объединяли по группам и разбавляли 2-кратной серией таким образом, чтобы в чашке с U-образным дном оставалось по 20 мкл сыворотки. После разбавления образца 10 мкл штамма, приготовленного для каждого серотипа, смешивали с

разбавленным образцом, и смесь оставляли для реакции при комнатной температуре в течение 30 мин, чтобы *S. pneumoniae* и антитело хорошо перемешались. Добавляли смесь предварительно дифференцированных клеток HL-60 и проводили реакцию в CO₂-инкубаторе (37°C) в течение 45 мин. Температуру снижали, чтобы остановить фагоцитоз, и помещали 10 мкл реакционного раствора на чашку с агаром, предварительно высушенную в течение от 30 до 60 мин, а затем давали возможность впитываться на чашке в течение 20 мин до высыхания. К приготовленному наслаиваемому агару добавляли маточный раствор ТТС 25 мг/мл и к нему добавляли антитело, подходящее для соответствующего штамма. Смесь тщательно перемешивали и затем на чашку добавляли около 25 мл смеси и давали затвердеть в течение около 30 мин. Полностью затвердевшую чашку инкубировали в CO₂-инкубаторе (37°C) в течение от 12 до 18 ч, после чего подсчитывали колонии. Титр МОРА выражали в виде коэффициента разбавления, при котором наблюдали 50% гибели. В качестве сравнительного примера той же процедуре можно подвергать коммерчески доступную 13-валентную вакцину (ПРЕВНАР13). Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4. Титры МОРА для 21 серотипа через 2 недели после вторичной иммунизации

Серотип	ПРЕВНАР13	PCV21(3/5)-ТТ 0,125 мг АИ	PCV21(3/5)-ТТ 0,250 мг АИ
1	94	72	244
3	829	740	3515
4	2428	2698	2675
5	1169	4154	2735
6A	4925	4567	4761
6B	5693	4959	6629
7F	2731	2095	2103
8	Не тестировалось	710	731
9N	Не тестировалось	4660	1371
9V	271	280	254
10A	Не тестировалось	952	935
11A	Не тестировалось	743	1053
12F	Не тестировалось	846	737
14	1917	2119	2170
15B	Не тестировалось	713	849
18C	5347	2620	4546
19A	5760	2464	2253
19F	2059	2071	2137
22F	Не тестировалось	6022	7783
23F	1975	1487	1566
33F	Не тестировалось	824	1924

При конъюгировании серотипов 3 и 5 с ТТ функциональные титры МОРА значительно возросли по сравнению с титрами МОРА, полученными при их конъюгировании с CRM₁₉₇. Кролики, иммунизированные PCV21 (3/5)-ТТ, также продемонстрировали значительные увеличения функциональных титров МОРА против каждого из дополнительных восьми серотипов, отсутствующих в ПРЕВНАР13 (т.е. 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F).

4-2. PCV21(1/5)-ТТ

Концентрация IgG, специфических для серотипов, и титр функциональной иммуногенности измеряли таким же образом, как и в 4-1, и результаты показаны ниже. Были протестированы три различных варианта осуществления PCV21(1/5)-ТТ: один с 2,2 мкг капсульного полисахарида от серотипа 3 (3-CRM₁₉₇ 2,2), один с 4,4 мкг капсульного полисахарида от серотипа 3 (3-CRM₁₉₇ 4,4) и один с 8,8 мкг капсульного полисахарида от серотипа 3 (3-CRM₁₉₇ 8,8).

Измерение специфических к серотипам концентраций IgG

Таблица 5. Концентрация IgG (Ед/мл) для 21 серотипа через 2 недели после вторичной иммунизации

Серотип	ПРЕВНАР13	PCV21(1/5)-ТТ 3-CRM ₁₉₇ 2,2	PCV21(1/5)-ТТ 3-CRM ₁₉₇ 4,4	PCV21(1/5)-ТТ 3-CRM ₁₉₇ 8,8
1	5105,5	33530,6	96552,2	44714,9
3	6303,0	7827,2	14676,2	13239,6
4	46727,3	58893,8	54382,8	39691,0
5	6873,9	14918,4	18743,2	11499,5
6A	32561,4	11493,2	13053,0	12494,6
6B	25398,7	11856,7	10013,2	4455,6
7F	27560,5	25799,0	70917,5	56448,2
8	521,0	70060,4	86634,8	63337,9
9N	5198,2	169584,3	240858,5	187203,6
9V	62169,3	42445,1	64084,4	34876,4
10A	166,4	25682,8	44186,9	15827,4
11A	195,3	34050,4	42558,8	33264,2
12F	154,4	27629,4	38459,7	25874,3
14	17765,9	23787,4	29262,4	24116,4
15B	436,0	22060,6	21777,0	22573,1
18C	103154,7	119672,1	141889,4	75549,1
19A	19191,1	4690,5	5516,9	3407,3
19F	16349,2	31789,8	24370,0	18846,2
22F	130,0	40963,1	49475,5	36246,2
23F	15166,5	6312,7	7499,9	5431,5
33F	146,1	39803,9	38378,5	26837,2

При конъюгировании капсульных полисахаридов серотипов 1 и 5 с ТТ концентрация IgG, специфических для серотипов, значительно возросла по сравнению с концентрацией, полученной при их конъюгировании с CRM₁₉₇. Кролики, иммунизированные PCV21(1/5)-ТТ, также продемонстрировали значительное увеличение концентрации IgG против дополнительных восьми серотипов, отсутствующих в ПРЕВНАР13 (т.е. 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F). Снова серотип 9N неожиданно показал значительное увеличение (примерно от 32- до 46-кратное) по сравнению с ПРЕВНАР13. Дополнительно, ряд других капсульных полисахаридов серотипов в PCV21(1/5)-ТТ показал значительно более высокий уровень сывороточной концентрации специфических IgG, чем ПРЕВНАР13. Было также замечено, что удвоение количества антигена серотипа 3 с 2,2 мкг до 4,4 мкг неожиданно увеличило сывороточную концентрацию специфических IgG для серотипов 1, 3, 5, 6A, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 22F и 23F, с более чем 2-кратным увеличением для серотипов 1 и 7F. Тестирование функциональной иммуногенности (МОРА)

Таблица 6. Титры МОРА для 21 серотипа через 2 недели после вторичной иммунизации

Серотип	ПРЕВНАР13	PCV21(1/5)-ТТ 3-CRM ₁₉₇ 2,2	PCV21(1/5)-ТТ 3-CRM ₁₉₇ 4,4	PCV21(1/5)-ТТ 3-CRM ₁₉₇ 8,8
1	99	198	916	241
3	479	565	1072	929
4	2560	3201	2571	2012
5	1046	3717	5430	2025
6A	5624	2708	5249	2415

6B	5451	3903	4143	2452
7F	2355	2521	2576	2125
8	Не тестировалось	525	719	630
9N	54	790	1680	885
9V	282	251	307	183
10A	Не тестировалось	684	1065	760
11A	Не тестировалось	887	1751	747
12F	Не тестировалось	856	1016	824
14	1052	1221	1929	1513
15B	59	1042	823	732
18C	6257	4440	4663	2821
19A	2962	828	1362	686
19F	968	1971	1835	1453
22F	Не тестировалось	3576	5599	7193
23F	1854	769	1358	1050
33F	Не тестировалось	932	1982	808

При конъюгировании серотипов 1 и 5 с ТТ функциональные титры МОРА значительно возросли по сравнению с титрами МОРА, полученными при их конъюгировании с CRM₁₉₇. Кролики, иммунизированные PCV21(1/5)-ТТ, также продемонстрировали значительные увеличения функциональных титров МОРА против каждого из дополнительных восьми серотипов, отсутствующих в ПРЕВНАР13 (т.е. 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F). Дополнительно, несколько других серотипов показали значительно более высокий уровень функциональных титров МОРА, чем в ПРЕВНАР13. Было также замечено, что удвоение количества антигена серотипа 3 с 2,2 мкг до 4,4 мкг неожиданно увеличило сывороточную концентрацию специфических IgG для каждого серотипа за исключением 4, 15B и 19F, с более чем 4,5-кратным увеличением для серотипа 1. 4-3. PCV21(1/5)-ТТ

Эксперименты 4-2 повторили с вариантом осуществления PCV21(1/5)-ТТ, содержащим 2,2 мкг капсульного полисахарида от серотипа 3 (3-CRM₁₉₇ 2,2), вариантом осуществления PCV21(1/5)-ТТ, содержащим 4,4 мкг капсульного полисахарида от серотипа 3 (3-CRM₁₉₇ 4,4), и вариантом осуществления PCV21(1/5)-ТТ, содержащим 4,4 мкг капсульного полисахарида от серотипов 3, 4, 6B, 9V, 19A и 19F (мульти-CRM₁₉₇ 4,4). Концентрация IgG, специфических для серотипов, и титр функциональной иммуногенности измеряли таким же образом, как и в 4-1, и результаты показаны ниже.

Измерение специфических к серотипам концентраций IgG

Таблица 7. Концентрация IgG (Ед/мл) для 21 серотипа через 2 недели после вторичной иммунизации

Серотип	ПРЕВНАР13	PCV21(1/5)-ТТ	PCV21(1/5)-ТТ 3-	PCV21(1/5)-ТТ
		3-CRM ₁₉₇ 2,2	CRM ₁₉₇ 4,4	Мульти-CRM ₁₉₇ 4,4
1	14208,3	34503,1	49226,1	40684,4
3	6575,6	6634,1	13769,4	10841,3
4	16600,3	33352,0	43605,9	34387,8
5	5079,3	10847,5	20866,2	13405,1
6A	8965,5	2607,1	13781,5	9194,9
6B	5105,2	1233,5	9225,5	2428,9
7F	59993,0	27961,7	57039,5	33913,6
8	274,7	56735,3	72822,9	65528,5
9N	3824,7	140424,7	181325,9	142736,9
9V	39503,5	29139,3	61759,9	48711,5
10A	130,0	8017,0	14061,8	15832,8
11A	163,9	33051,7	51222,1	39311,8
12F	130,0	18160,9	22634,9	14877,6
14	12312,4	12868,7	15953,4	8538,5
15B	280,6	14339,7	22347,7	22692,0
18C	62963,5	56059,2	141911,5	70910,8
19A	9807,5	1185,7	4233,4	2649,2
19F	9838,7	9825,8	21175,9	10889,9
22F	130,0	20120,0	37833,7	21807,5
23F	5835,1	2084,1	4016,2	3152,3
33F	141,4	22732,6	19748,9	19179,6

Как в 4-2, при конъюгировании капсульных полисахаридов серотипов 1 и 5 с ТТ концентрация IgG, специфических к серотипам, значительно возросла по сравнению с концентрацией, полученной при их конъюгировании с CRM₁₉₇. Кролики, иммунизированные PCV21(1/5)-ТТ, также продемонстрировали значительное увеличение концентрации IgG против дополнительных восьми серотипов, отсутствующих в ПРЕВНАР13 (т.е. 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F), и капсульный полисахарид серотипа 4 показал значительно более высокий уровень сывороточной концентрации специфических IgG, чем в ПРЕВНАР13. Было также замечено, что удвоение количества антигена серотипа 3 с 2,2 мкг до 4,4 мкг неожиданно увеличило сывороточную концентрацию специфических IgG для всех трех серотипов. Можно также было использовать более высокую дозу множества серотипов, как продемонстрировано вариантом осуществления PCV21(1/5)-ТТ, в котором количество серотипов 3, 4, 6B, 9V, 19A и 19F было увеличено с 2,2 мкг до 4,4 мкг (мульти-CRM₁₉₇ 4,4).

Тестирование функциональной иммуногенности (МОРА)

Таблица 8. Титры МОРА для 21 серотипа через 2 недели после вторичной иммунизации

Серотип	ПРЕВНАР13	PCV21(1/5)-ТТ	PCV21(1/5)-ТТ	PCV21(1/5)-ТТ
		3-CRM ₁₉₇ 2,2	3-CRM ₁₉₇ 4,4	Мульти-CRM ₁₉₇ 4,4
1	109	236	276	255
3	740	514	836	768

4	2272	2522	2216	2376
5	3638	12393	18293	2559
6A	4949	2187	3607	2401
6B	4915	767	5196	1555
7F	2414	2014	2227	1781
8	Не тестировалось	582	694	690
9N	84	937	1252	983
9V	295	474	419	290
10A	Не тестировалось	566	737	674
11A	Не тестировалось	801	1666	1878
12F	Не тестировалось	600	1008	1298
14	1659	1503	1200	959
15B	79	902	1459	1794
18C	2933	2594	4095	2968
19A	3910	957	1244	751
19F	1570	908	2175	1453
22F	Не тестировалось	2268	7833	3516
23F	1956	677	786	709
33F	Не тестировалось	1021	1115	736

Как в 4-2, при конъюгировании серотипов 1 и 5 с ТТ функциональная иммуногенность улучшилась по сравнению с иммуногенностью, полученной при их конъюгировании с CRM₁₉₇. Кролики, иммунизированные PCV21(1/5)-ТТ, также продемонстрировали значительные увеличения функциональных титров МОРА против каждого из дополнительных восьми серотипов, конъюгированных с CRM₁₉₇, отсутствующих в ПРЕВНАР13 (т.е. 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F). Можно также было использовать более высокую дозу множества серотипов, как продемонстрировано для PCV21(1/5)-ТТ мульти-CRM₁₉₇ 4,4, в котором количество серотипов 3, 4, 6B, 9V, 19A и 19F было увеличено с 2,2 мкг до 4,4 мкг.

4-4. PCV21(1/5)-ТТ

Эксперименты 4-2 повторили с вариантом осуществления PCV21(1/5)-ТТ, содержащим 4,4 мкг капсульного полисахарида от серотипов 3 и 4 (3,4-CRM₁₉₇ 4,4). Концентрация IgG, специфических для серотипов, и титр функциональной иммуногенности измеряли таким же образом, как и в 4-1, и результаты показаны ниже. Измерение специфических к серотипам концентраций IgG

Таблица 9. Концентрация IgG (Ед/мл) для 21 серотипа через 2 недели после вторичной иммунизации для 3,4-CRM₁₉₇ 4,4

Серотип	Превнар13	PCV21 (1,5-ТТ) 3,4-CRM ₁₉₇ 4,4
1	2512,6	11687,9
3	6160,3	16537,5
4	13018,1	23834,9
5	7738,6	35815,1
6А	13701,1	6476,3
6В	2290,0	881,1
7F	22885,1	25523,5
8	170,1	19027,5
9N	971,4	35064,1
9V	13803,2	18139,3
10А	130,0	7028,4
11А	165,6	10215,7
12F	130,0	3770,0
14	3333,0	4977,4
15В	203,2	8956,5
18С	28120,5	21748,1
19А	18587,6	6785,8
19F	29732,6	34497,2
22F	130,0	21193,6
23F	3962,9	1791,5
33F	130,0	13194,5

При конъюгировании капсульных полисахаридов серотипов 1 и 5 с ТТ концентрация IgG, специфических для серотипов, значительно возросла по сравнению с концентрацией, полученной при их конъюгировании с CRM₁₉₇. Кролики, иммунизированные PCV21(1/5)-ТТ, также продемонстрировали значительное увеличение концентрации IgG против дополнительных восьми серотипов, отсутствующих в ПРЕВНАР13 (т.е. 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15В, 22F и 33F). Было также замечено, что удвоение количества антигена серотипа 3 и серотипа 4 с 2,2 мкг до 4,4 мкг показало значительно более высокий уровень сывороточной концентрации специфических IgG, чем в ПРЕВНАР13. Можно также было использовать более высокую дозу множества серотипов, как продемонстрировано вариантом осуществления PCV21(1/5)-ТТ, в котором количество серотипов 3 и 4 было увеличено с 2,2 мкг до 4,4 мкг (3,4-CRM₁₉₇ 4,4).

Тестирование функциональной иммуногенности (МОРА)

Таблица 10. Титры МОРА для 21 серотипа через 2 недели после вторичной иммунизации

Серотип	Превнар13	PCV21 (1,5-ТТ) 3,4-CRM ₁₉₇ 4,4
1	54	455
3	393	968

4	2072	3331
5	306	1621
6A	2355	1315
6B	1614	1410
7F	952	981
8	5	986
9N	52	2072
9V	324	479
10A	2	427
11A	4	1103
12F	2	266
14	539	969
15B	5	255
18C	1996	1392
19A	1870	774
19F	1516	1352
22F	2	1796
23F	928	496
33F	2	292

При конъюгировании серотипов 1 и 5 с ТТ функциональная иммуногенность улучшилась по сравнению с иммуногенностью, полученной при их конъюгировании с CRM₁₉₇. Кролики, иммунизированные PCV21(1/5)-ТТ, также продемонстрировали значительные увеличения функциональных титров МОРА против каждого из дополнительных восьми серотипов, конъюгированных с CRM₁₉₇, отсутствующих в ПРЕВНАР13 (т.е. 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F). Можно также было использовать более высокую дозу множества серотипов, как продемонстрировано PCV21(1/5)-ТТ 3,4-CRM₁₉₇ 4,4, в котором количество серотипов 3 и 4 было увеличено с 2,2 мкг до 4,4 мкг.

Пример 5. Дополнительные сведения о получении конъюгата сахара-белка серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae* Получение банка клеток

Серотип 9N *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6309) получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Для размножения штамма и удаления компонентов животного происхождения посевную культуру культивировали в течение нескольких генераций. Флакон с посевной культурой хранили в холодильнике (< -70°C) вместе с синтетическим глицерином в качестве криопротектора. Для получения банка клеток клеточную культуру размножали в соевой среде. Перед заморозкой клетки концентрировали путем центрифугирования и, после удаления истощенной среды, осажденные клетки ресуспендировали в свежей среде, содержащей криопротектор (такой как синтетический глицерин).

Ферментация

Культуру из банка клеток инокулировали в посевную бутылку, содержащую соевую среду. До достижения удовлетворительных условий роста культуру инкубировали при постоянной температуре без перемешивания. Используя посевную бутылку, культуру инокулировали в посевной ферментер, содержащий соевую среду, с регулируемой температурой, pH и скоростью перемешивания. Ферментацию прекращали после остановки роста или достижения рабочей емкости ферментера. После завершения ферментации путем добавления дезактиватора клеточный дебрис удаляли с использованием комбинации непрерывного проточного центрифугирования и фильтрации.

Очистка

Процесс очистки пневмококковых полисахаридов состоял из многослойной фильтрации, многократного концентрирования/диафильтрации и фильтрации/элюирования.

Активация

Конечную концентрацию полисахаридов корректировали до около 2,0 г/л путем последовательного добавления WFI рассчитанного количества. Если необходимо, pH реакции корректировали до приблизительно 6,0. После корректирования pH температуру реакции устанавливали на 21-25°C. Для инициирования окисления на 1 мг сахара добавляли около 0,024-0,189 мг перйодата натрия. Реакцию окисления проводили в течение 16-20 ч при 21-25°C.

Активированный полисахарид концентрировали и фильтровали с использованием ультрафильтрационной мембраны с MWCO 100 кДа. Проводили диафильтрацию с WFI 10-кратного объема от объема диафильтрации. Затем очищенный активированный полисахарид хранили при температуре 2-8°C.

Определяли характеристики очищенного активированного сахара по (i) концентрации сахара, определяемой колориметрическим анализом, (ii) концентрации альдегида, определяемой колориметриче-

ским анализом, (iii) степени окисления и (iv) молекулярной массе, измеряемой ЭХ-MALLS.

Применяют ЭХ-MALLS для определения молекулярной массы полисахарида и конъюгатов полисахаридов-белков. Для разделения полисахаридов на основе гидродинамического объема используют ЭХ. Для определения молекулярной массы применяют детектор показателя преломления (RI - англ.: refractive index) и детектор многоуглового рассеяния лазерного излучения (MALLS - англ.: multi-angle laser light scattering). Когда свет реагирует с веществом, он рассеивается. Количество рассеянного света связано с концентрацией, квадратом dn/dc (удельное увеличение показателя преломления) и молярной массой вещества.

Молекулярную массу рассчитывают на основе сигнала рассеянного света от детектора MALLS и концентрационного сигнала от детектора RI.

Степень окисления (DO) активированного полисахарида определяют в виде значения молей повторяющихся звеньев Сахаров, деленного на моли альдегида. Моли повторяющихся звеньев Сахаров определяют различными колориметрическими методиками, например с использованием анализа с антроном.

И, моли альдегида определяют колориметрическим анализом Парка-Джонсона.

Используя описанные выше методики определили, что активированный капсультный полисахарид серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae*, полученный описанным выше способом, имеет степень окисления 2-19, обычно 5-10, и молекулярную массу около 200-700 кДа.

Конъюгация

Активированный полисахарид смешивали с белком-носителем CRM₁₉₇ в соотношении 0,5-2 г CRM₁₉₇ на 1 г активированного полисахарида. Затем объединенную смесь лиофилизировали. Лиофилизированную смесь активированного полисахарида и CRM₁₉₇ хранили при температуре -20°C.

Лиофилизированную смесь активированного полисахарида и CRM₁₉₇ растворяли в 0,1 М растворе фосфата натрия, а затем в достаточной степени перемешивали. Конечная концентрация полисахаридов в реакционном растворе составляла около 10-20 г/л. После инициирования конъюгации путем добавления к реакционной смеси 1,0-1,2 мол. экв. цианоборогидрида натрия (NaBH₃CN) реакцию проводили при 35-39°C в течение 44-52 ч. Реакцию конъюгации завершили добавлением 0,9% раствора хлорида натрия того же объема, что и конъюгационный реакционный раствор, а затем добавлением 1,8-2,2 мол. экв. борогидрида натрия (NaBH₄) для блокирования неореагировавшего альдегида. Реакцию блокирования проводили при 21-25°C в течение 3-6 ч.

Раствор конъюгатов разбавляли 0,9% раствором хлорида натрия для концентрирования и диафильтрации с использованием мембраны с MWCO 100 кДа. Разбавленный раствор конъюгатов фильтровали через фильтр на 0,8-0,45 мкм и очищали концентрированием и диафильтрацией. Проводили диафильтрацию с использованием мембраны с MWCO 100 кДа, применяя 0,9% раствор хлорида натрия объемом в 15-40 раз больше объема диафильтрации. После завершения диафильтрации оставшийся раствор фильтровали через фильтр на 0,2 мкм. Раствор конъюгатов разбавляли до концентрации меньше примерно 0,55 мг/мл, стерильно отфильтровывали и затем хранили при 2-8°C.

Определяли характеристики очищенного конъюгата серотипа 9N, в частности, по (i) концентрации белка, определяемой колориметрическим анализом (Лоури), (ii) концентрации альдегида, определяемой колориметрическим анализом, (iii) соотношению сахарид-белок, (iv) распределению молекул по размерам методом эксклюзионной хроматографии (CL-4B) и (v) молекулярной массе, измеряемой ЭХ-MALLS. Наблюдали изменение характеристик конъюгата серотипа 9N при варьировании степени окисления (DO). Результат приведен в табл. 11.

Таблица 11

Номер конъюгат	1	2	3	4	5	6
Молекулярная масса активированного полисахарида, кДа	582	619	459	563	490	427
DO	18,2	9,4	7,4	6,7	4,3	2,3
Исходное соотношение (P:S)	0,8:1					
Концентрация полисахарида в конъюгационном реакционном растворе, г/л	20,0					
% выхода конъюгата	53	43	39	32	33	39
Соотношение сахарид-белок	2,1	1,5	1,3	1,1	1,0	0,78
% свободного сахара	44	28	22	20	21	31
% молекулярно-массовое распределение	52	49	50	55	44	31
Молекулярная масса конъюгата, кДа	860	1 110	1 912	1 168	1 189	1 160

Наблюдали изменение характеристик конъюгата серотипа 9N при варьировании соотношения смешивания активированного полисахарида и CRM₁₉₇ во время конъюгации. Результат приведен в табл. 12.

Таблица 12

Номер конъюгат	7	8	9	10	11
Молекулярная масса активированного полисахарида, кДа	287				
DO	5,6				
Исходное соотношение (P:S)	2:1	1,5:1	1:1	0,67:1	0,5:1
Концентрация полисахарида в конъюгационном реакционном растворе, г/л	20,0				
% выхода конъюгата	25	50	43	41	66
Соотношение сахарид-белок	0,71	0,85	1,0	1,2	1,8
% свободного сахара	5	6	15	27	62
% молекулярно-массовое распределение	52	58	50	40	22
Молекулярная масса конъюгата, кДа	3 720	3 713	1 327	1 016	545

Наблюдали изменение характеристик конъюгата серотипа 9N при варьировании концентрации полисахаридов в конъюгационном реакционном растворе. Результат приведен в табл.13.

Таблица 13

Номер конъюгат	12	13	14	15	16
Молекулярная масса активированного полисахарида, кДа	560				
DO	6,1				
Исходное соотношение (P:S)	0,8:1				
Концентрация полисахарида в конъюгационном реакционном растворе, г/л	10,0	12,5	15,0	17,5	20,0
% выхода конъюгата	20	31	28	40	42
Соотношение сахарид-белок	1,0	1,0	0,93	0,99	0,97
% свободного сахара	32	30	22	21	18
% молекулярно-массовое распределение	17	27	40	47	54
Молекулярная масса конъюгата, кДа	560	546	845	932	1 438

Пример 6. Анализ иммуногенности

Готовили моновалентную конъюгированную композицию, содержащую конъюгат сахара-белка серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с CRM₁₉₇.

Иммуногенность моновалентных иммуногенных композиций табл. 11-13 анализировали методом твердофазной ИФА. Определяли сывороточную концентрацию серотип-специфических IgG.

Пять самок новозеландских белых кроликов весом 2,5-3,5 кг иммунизировали предложенной клинической дозой для человека (конъюгат 2,2 мкг; + 0,25 мг/мл алюминия в виде AlPO₄) на 0 неделе посредством внутримышечного пути введения. Кроликов снова иммунизировали на неделе 2 с помощью конъюгированной вакцины в той же дозе и отбирали образцы крови на неделе 4. Для образцов сыворотки на неделе 0 и неделе 4 проводили серотип-специфический твердофазный ИФА.

Результат анализа показан в табл. 14. У кроликов, иммунизированных моновалентной конъюгированной композицией (конъюгат номер 8), наблюдалось значительное увеличение общего титра IgG для серотипа 9N. У кроликов, иммунизированных другими конъюгатами, также наблюдалось значительное увеличение общего титра IgG.

В табл. 14 показан результат измерения концентрации IgG после иммунизации кроликов конъюгатом номер 8 из табл. 12.

Таблица 14

Серотип	Концентрация IgG (Ед/мл)	
	Предварительная иммунизация	Последующая иммунизация
9N	130,0	656 345,3

Поскольку в данном описании описаны один или более типовых вариантов осуществления, среднему специалисту в данной области будет понятно, что в него могут быть внесены различные изменения по форме и в деталях без отступления от сути и объема идеи изобретения, как это определено следующей формулой изобретения.

Литература

В настоящей заявке цитируются следующие ссылки, и они дают общую информацию, касающуюся технической области, а также предоставляют описания анализов и другие подробности, обсуждаемые в этой заявке. Следующие ссылки включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

- [1] Prymula et al., *The Lancet*, 367:740-48 (2006).
- [2] Vesikari et al., *PIDJ*, 28(4):S66-76 (2009).
- [3] Dagan et al., *Infection & Immunity*, 5383-91 (2004).
- [4] Juergens et al., *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(9):1277-1281 (2014).
- [5] Andrews et al., *The Lancet*, 14:839-846 (2014).
- [6] Nurkka et al., *Vaccine*, 20:194-201 (2001).
- [7] Levin and Stone, *J. Immunol.*, 67:235-242 (1951).
- [8] W.H.O. Manual for the Production and Control of Vaccines: Tetanus Toxoid, 1977 (BLG/UNDP/77.2 Rev.1.)
- [9] Didierlaurent et al., *J. Immunol.*, 183:6186-6197 (2009).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Поливалентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем, содержащая 21 различных конъюгат пневмококковых капсульных полисахаридов-белков, причем каждый конъюгат пневмококкового капсульного полисахарида-белка содержит белковый носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом от различных серотипов *Streptococcus pneumoniae*, при этом серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11 A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, причем белковый носитель представляет собой CRM₁₉₇ или столбнячный анатоксин, и

при этом два из капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM₁₉₇, причем два капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5.

2. Поливалентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем по п.1, в которой капсульные полисахариды от серотипов 1 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от серотипов 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇.

3. Поливалентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем по п.1, в которой капсульные полисахариды от серотипов 1 и 3 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от серотипов 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇.

4. Поливалентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем по п.1, в которой капсульные полисахариды от серотипов 3 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от серотипов 1, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇.

5. Поливалентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая адъювант.

6. Поливалентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем по п.5, в которой адъювант представляет собой адъювант на основе алюминия.

7. Поливалентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем по п.6, в которой адъювант выбран из группы, состоящей из фосфата алюминия, сульфата алюминия и гидроксида алюминия.

8. Поливалентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем по п.7, в которой адъювант представляет собой фосфат алюминия.

9. Поливалентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем по любому из предшествующих пунктов, в которой

капсульный полисахарид от серотипа 9N конъюгирован с CRM₁₉₇ в состоянии, в котором капсульный полисахарид от серотипа 9N активирован с получением степени окисления 2-19 или 5-10 и молекулярной массы 200-700 кДа;

конъюгат, образованный между капсульным полисахаридом от серотипа 9N и CRM₁₉₇, имеет молекулярную массу равную 500-4000 кДа;

соотношение (мас./мас.) капсульного полисахарида от серотипа 9N и CRM₁₉₇ в конъюгате, образованном между капсульным полисахаридом от серотипа 9N и CRM₁₉₇, составляет 0,5-2,5; и/или

15-60% конъюгата, образованного между капсульным полисахаридом от серотипа 9N и CRM₁₉₇, имеет значение K_d, равное 0,3 или ниже на колонке CL-4B.

10. Применение поливалентной противопневмококковой конъюгированной композиции со смешанным носителем по любому одному из предшествующих пунктов для профилактики у субъекта инфекции или заболевания *Streptococcus pneumoniae*.

11. Применение по п.10, в котором субъект является человеком.

12. Вакцина, содержащая поливалентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем по любому из пп.1-9 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

13. Способ профилактики у субъекта инфекции или заболевания *Streptococcus pneumoniae*, включающий введение субъекту профилактически эффективного количества поливалентной противопневмококковой конъюгированной композиции со смешанным носителем по любому из пп.1-9 или вакцины по п.12.

14. Способ по п.13, в котором субъект является человеком в возрасте по меньшей мере 50 лет и заболевание представляет собой пневмонию или инвазивное пневмококковое заболевание (IPD).

15. Способ по п.13, в котором субъект является человеком в возрасте по меньшей мере 6 недель и заболевание представляет собой пневмонию, инвазивное пневмококковое заболевание (IPD) или острое воспаление среднего уха (АОМ).

16. Способ по п.15, в котором субъект находится в возрасте от 6 недель до 5 лет, от 2 до 15 месяцев или от 6 до 17 лет.

17. Способ по п.13, в котором субъект является человеком.

18. Способ по любому из пп.13-17, в котором поливалентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем или вакцину вводят путем внутримышечной инъекции.

19. Способ по любому из пп.13-18, в котором поливалентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем или вакцину вводят как часть серии иммунизаций.

