

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044892**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.10.10**

(51) Int. Cl. **A61K 39/02 (2006.01)**

(21) Номер заявки  
**202091439**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.02.04**

---

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

---

(31) **62/626,509; 10-2018-0045246**

(56) **US-A1-20140322263  
US-A1-20030099672**

(32) **2018.02.05; 2018.04.18**

(33) **US; KR**

(43) **2020.11.26**

MARTENS et al. "Serotype-specific mortality from invasive Streptococcus pneumoniae disease revisited", BMC Infectious Diseases, 30 June 2004, Vol. 4, page 21 (30 June 2004), abstract, Table 2

(86) **PCT/US2019/016511**

(87) **WO 2019/152925 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)**

---

(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 CRM<sub>197</sub>, 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 из серотипов 1, 3 и 5, и один или оба из серотипов 15В и 22F конъюгированы с ТТ, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. 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**

**044892**

**044892**

**B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

В заявке на данное изобретение испрашивается приоритет, и она основана на дате подачи предварительной заявки на патент США номер 62/626,509, поданной 5 февраля 2018 г., и Корейской заявки на патент номер 10-2018-0045246, поданной 18 апреля 2018 г., полное описание которых включено в данный документ посредством ссылки.

#### Область техники

Изобретение 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 распространенных 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 CRM<sub>197</sub>, нетоксичным вариантом дифтерийного анатоксина, имеющим одну аминокислотную замену глутаминовой кислоты на глицин. В 2000 году была впервые одобрена 7-валентная ПРЕВНАР-вакцина (ПРЕВНАР), содержащая капсульные полисахариды из семи наиболее распространенных серотипов: 4, 6В, 9V, 14, 18С, 19F и 23F. В 13-валентной вакцине, ПРЕВНАР 13, добавлены серотипы 1, 5, 7F, 3, 6А и 19А к белковому носителю CRM<sub>197</sub>. Белковый носитель, CRM<sub>197</sub>, - 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 по меньшей мере со вторым отличающимся белковым носителем. Например, GlaxoSmithKline разработал SYNFLORIX, 10-валентную (серотипы 1, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 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, 6В, 7F, 9V, 14 и 23F конъюгированы с белком D; серотип 18С 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, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 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 18С могут вызывать более выраженный ответ, когда они конъюгированы с дифтерийным анатоксином, чем когда они конъюгированы со столбнячным анатоксином [6]. Таким образом, серотипы 3, 6В, 14 и 18С конъюгировали с дифтерийным ана-

токсином, а серотипы 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 данном изобретении предложены новые и улучшенные поливалентные противопневмококковые конъюгированные композиции со смешанным носителем и содержащие их вакцины. В одном аспекте изобретения 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 CRM<sub>197</sub> или столбнячный анатоксин, при этом четыре из капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>, и причем два из четырех капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5, а остальные капсульные полисахариды представляют собой серотипы 15B и 22F.

В одном варианте осуществления 21-валентной противопневмококковой конъюгированной композиции со смешанным носителем капсульные полисахариды от серотипов 1, 5, 15B и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от серотипов 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F и 33F конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

В другом варианте осуществления 21-валентной противопневмококковой конъюгированной композиции со смешанным носителем капсульные полисахариды от серотипов 1, 3, 15B и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от серотипов 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F и 33F конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

В другом варианте осуществления 21-валентной противопневмококковой конъюгированной композиции со смешанным носителем капсульные полисахариды от серотипов 3, 5, 15B и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от серотипов 1, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F и 33F конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

В другом аспекте изобретения в данном документе 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 CRM<sub>197</sub> или столбнячный анатоксин, при этом три из капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>, и причем три капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 5, 15B и 22F. В некоторых вариантах осуществления два из трех капсульных полисахаридов, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5, а оставшийся капсульный полисахарид, конъюгированный со столбнячным анатоксином, является полисахаридом серотипа 15B или 22F.

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, фосфат алюминия, сульфат алюминия и гидроксид 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 профилактического 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 CRM<sub>197</sub>. В некоторых вариантах осуществления поливалентных противопневмококковых конъюгированных композиций и вакцин с конъюгатом иммуногенного серотипа 9N и со смешанным носителем (и способами с ними/их применениях), сахарид серотипа 9N может быть связан с CRM<sub>197</sub> 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 способами 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 способами с ними/их применениях), соотношение капсульного сахараида 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 способами с ними/их применениях), 15-60% конъюгата иммуногенного серотипа 9N может иметь на колонке CL-4B значение K<sub>d</sub>, 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 способами 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 способами с ними/их применениях), если сахарид серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae* конъюгирован с CRM<sub>197</sub> 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<sub>d</sub> ≤ 0,3) и соотношение сахараида/белка 0,5-2,5. В еще одном аспекте в настоящем описании также предложен способ приготовления иммуногенного конъюгата серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae*, способ включает:

- (a) лизирование бактериальной клетки, продуцирующей капсульный полисахарид серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae*, обработкой ее ферментами;
- (b) очистку капсульного сахараида 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 сахараида серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae*, связанного с CRM<sub>197</sub> путем смешивания активированного сахараида с CRM<sub>197</sub>.

В некоторых вариантах осуществления изобретения CRM<sub>197</sub>, 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 ч.

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 CRM<sub>197</sub> 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 начальное исходное соотношение CRM<sub>197</sub> к активированному

капсульному сахариду серотипа 9N (носитель CRM<sub>197</sub>: сахарид) может составлять 0,5-2,5:1. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 15-60% иммуногенного конъюгата может иметь значение  $K_d$ , равное 0,3 или ниже, как измерено в колонке CL-4B.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полисахарид серотипа 9N *Streptococcus pneumoniae* по настоящему описанию конъюгирован с CRM<sub>197</sub> 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% ( $K_d \leq 0,3$ ), как измерено на колонке CL-4B, и соотношение CRM<sub>197</sub>/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 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, термин "конъюгат(ы)" или "гликоконъюгат(ы)" относится 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") 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.

Поливалентный: Как используется в данном документе, термин "поливалентный" относится к противопневмококковой конъюгированной композиции, содержащей пневмококковый капсульный полисахарид более чем от одного серотипа *Streptococcus pneumoniae*.

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 CRM<sub>197</sub> или столбнячный анатоксин, 1) при этом три из капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>, и причем три капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5, а оставшийся полисахарид имеет серотип 15B или 22F; или 2) при этом четыре из капсульных поли-

сахаридов конъюгированы столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>, и при этом два из четырех капсульных полисахаридов, конъюгированных со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5, а оставшиеся два капсульных полисахарида имеют серотипы 15B и 22F. В некоторых вариантах осуществления капсульные полисахариды от серотипов 1, 5, 15B и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. В некоторых вариантах осуществления капсульные полисахариды от серотипов 1, 3, 15B и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от остальных серотипов конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. В еще другом варианте осуществления капсульные полисахариды от серотипов 3, 5, 15B и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

**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 многоуглового рассеяния лазерного излучения (MALLS).

**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, 15-е изд. (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 т.п. 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, требуемому 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 мышей, 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 данном документе предложены новые и улучшенные поливалентные противопневмококковые конъюгированные композиции со смешанным носителем и содержащие их вакцины. Поскольку белковый носитель, CRM<sub>197</sub>, ранее использовался в противопневмококковых конъюгированных вакцинах с одним носителем, в данном документе описано применение CRM<sub>197</sub> в противопневмококковой конъюгированной вакцине со смешанным носителем. В частности, в данной документе описано комбинированное применение CRM<sub>197</sub> 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, 5, 15B и 22F 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 CRM<sub>197</sub> 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. Например, 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 CRM<sub>197</sub> (например, PCV21(1/5/15B/22F)-ТТ и PCV21(3/5/15B/22F)-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 CRM<sub>197</sub> в противопневмококковой конъюгированной композиции (ПРЕВНАР 13) с одним носителем.

Столбнячный анатоксин значительно больше по размеру, чем CRM<sub>197</sub>. Следовательно, конъюгирование трех или четырех серотипов 1, 3, 5, 15B и 22F со столбнячным анатоксином в составе вакцины со смешанным носителем приводит к снижению отношению полисахарида к носителю ("PS/C") для тех серотипов, конъюгированных со столбнячным анатоксином по сравнению с соотношением PS/C тех же серотипов, конъюгированных с одним носителем, который меньше, чем столбнячный анатоксин, такой как CRM<sub>197</sub>. Таким образом, подход со смешанным носителем, описанный в данной заявке, может быть использован для понижения отношений PS/C для одного или более серотипов 1, 3, 5, 15B или 22F. Описанная в данном документе 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), СИНФЛЮРИКС 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 продемонстрирован успешный вариант реализации серотипов 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F в противопневмококковой конъюгированной вакцине со смешанным носителем (столбнячный анатоксин и CRM<sub>197</sub>), 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, методы, раскрытые 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, методы, раскрытые 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 документе, 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 активации) 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 CRM<sub>197</sub> или столбнячный анатоксин, при этом 3-4 из капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>, и причем 3-4 капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 5, 15B и 22F. В определенном варианте осуществления три капсульных полисахарида конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. В определенном варианте осуществления четыре капсульных полисахарида конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

В одном аспекте данного раскрытия 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* 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 CRM<sub>197</sub> или столбнячный анатоксин, при этом четыре из капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>, и при этом два из четырех капсульных полисахаридов, конъюгированных со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5, а оставшиеся два капсульных полисахарида имеют серотипы 15B и 22F.

В одном варианте осуществления капсульные полисахариды от серотипов 1, 5, 15B и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. В другом варианте осуществления капсульные полисахариды от серотипов 1, 3, 15B и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. В еще другом варианте осуществления капсульные полисахариды от серотипов 3, 5, 15B и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

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 (TT) и CRM<sub>197</sub>, каждый из которых использовался в составе противопневмококковых конъюгированных вакцин, но никогда в одной и той же вакцине со смешанным носителем.

CRM<sub>197</sub> представляет собой нетоксичный вариант (т.е. анатоксин) дифтерийного токсина, который сохраняет иммунологические свойства дифтерийного токсина дикого типа. CRM<sub>197</sub> отличается от дифтерийного токсина дикого типа по одному основанию в структурном гене, что приводит к образованию одной аминокислотной замены глутаминовой кислоты на глицин. CRM<sub>197</sub>, как правило, выделяют из культур штамма C7 (β197) *Corynebacterium diphtheria*, выращенных на среде на основе аминокислот казеина и дрожжевого экстракта. CRM<sub>197</sub> можно очищать посредством ультрафильтрации, осаждением сульфатом аммония и ионообменной хроматографией. В альтернативном варианте, CRM<sub>197</sub> можно получать рекомбинантным способом в соответствии с патентом США № 5,614,382, который тем самым включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. CRM<sub>197</sub> 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 противококлюшными 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 CRM<sub>197</sub> 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 периодаты (включая периодат натрия, периодат калия или периодную кислоту), как описано, например, в пат. США № 4,365,170, 4,673,574 и 4,902,506, которые тем самым включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Периодат случайным образом окисляет вицинальные гидроксильные группы углевода с образованием реакционноспособной альдегидной группы и вызывает расщепле-

ние связи С-С. Термин "периодат" включает как периодат, так и периодную кислоту. Данный термин также включает в себя как метапериодат ( $\text{IO}_4^-$ ), так и ортопериодат ( $\text{IO}_6^{5-}$ ). Термин "периодат" также включает в себя различные соли периодата, включая периодат натрия и периодат калия. В некоторых вариантах осуществления изобретения полисахарид можно окислять в присутствии метапериодата натрия.

В некоторых вариантах осуществления изобретения периодат можно применять в количестве около 0,03-0,17 мкг на 1 мкг полисахарида. В некоторых вариантах осуществления изобретения периодат 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-[у-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 СОАР) 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 заявок на патенты США № 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 цианоборогидрид натрия, боран-пиридин, триацетоксиборогидрид натрия, натрия 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 ( $\text{NaBH}_4$ ). 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-BuMeiPrN-BH<sub>3</sub>, бензиламин-BH<sub>3</sub> или 5-этил-2-метилпиридин-боран (PEMB).

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, п-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'-карбонилдиимидазолом (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 соединение промежуточного продукта CDI карбамата с аминогруппой на белке.

Соотношение полисахарида и белка-носителя для противопневмококковых конъюгированных вак-

цин, 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  $^1\text{H}$  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 № 6,194,388; 6,207,646; 6,214,806; 6,218,371; 6,239,116; 6,339,068; 6,406,705 и 6,429,199). Адъюванты также включают биологические молекулы, такие как липиды и костимулирующие молекулы. Типовые биологические адъюванты включают AS04 [9], IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , 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 до 2,5 мг адъюванта 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 мг или от 0,125 до 0,25 мг адъюванта 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 0,250 мг адъюванта на основе алюминия. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна доза 0,5 мл вакцины готовится в виде препарата, который содержит около 0,125 мг адъюванта на основе алюминия. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна доза 0,5 мл вакцины готовится в виде препарата, который содержит около 0,250 мг адъюванта на основе алюминия.

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

В конкретных вариантах реализации изобретения адъювант 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 мо-

лекулярных 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 осуществления 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 носителя 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-4B; поперечно-сшитые гранулы агарозы, 4%). Эксклюзионную хроматографию (ЭХ) применяют в самотечной колонке для определения профиля распределения 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-4B 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-4B 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-4B 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-4B 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-4B значение  $K_d$ , равное 0,3 или ниже. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 65-80% конъюгата каждого серотипа полисахари-

да-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 сахараида-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 полиоксиэтиленсорбитана (например, полисорбат 80). В некоторых вариантах осуществления изобретения три или четыре капсульных полисахарида от специфических серотипов, как упомянуто выше, конъюгированы со столбнячным анатоксином столбняка, а остальные капсульные полисахариды находятся среди 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM<sub>197</sub> (21-валентная).

В одном варианте осуществления капсульные полисахариды от серотипов 1, 5, 15В и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от серотипов 3, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 23F и 33F конъюгированы с CRM<sub>197</sub> (21-валентная). В другом варианте осуществления капсульные полисахариды от серотипов 1, 3, 15В и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от серотипов 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 23F и 33F конъюгируют с CRM<sub>197</sub> (21-валентная). В еще одном варианте осуществления капсульные полисахариды от серотипов 3, 5, 15В и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от серотипов 1, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 23F и 33F конъюгированы с CRM<sub>197</sub> (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 других 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 до около 100 мкг полисахарида, конкретно около от 0,1 до 10 мкг и более конкретно от около 1 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 до около 5 мкг каждого капсульного полисахарида; от около 1 до около 30 мкг ТТ; от около 20 до около 85 мкг CRM<sub>197</sub>; и необязательно от около 0,1 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 до около 2,5 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением серотипа 6В и необязательно серотипа 3; которые присутствуют в количестве от около 4 до около 5 мкг; от около 2 до около 25 мкг ТТ; от около 40 до около 75 мкг CRM<sub>197</sub> и необязательно от около 0,1 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 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, 9V, 19А и 19F; каждый из которых присутствует в количестве от около 4 до около 5 мкг. В одном варианте осуществления изобретения до шести капсульных полисахаридов, присутствующих в количестве от около 4 до около 5 мкг, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 4, 6В, 9V, 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, 9V, 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, 9V, 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 4, 5, 6А, 7F, 8, 9V, 9N, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 22F, 23F и 33F и от около 4 до около 5 мкг капсульных полисахаридов серотипов 1, 3, 6В, 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, 5, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 22F, 23F и 33F и от около 4 до около 5 мкг капсульных полисахаридов серотипов 3, 4, 6В, 9V, 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, 9V, 9N, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F и от около 4 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, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F, и от около 4 до около 5 мкг капсульных полисахаридов серотипа 6В, и от около 8 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, 5, 15В и 22F конъюгирован с ТТ, а капсульные полисахариды от серотипов 3, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 23F и 33F конъюгированы с CRM<sub>197</sub> (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 до около 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 1, 5, 15В и 22F) и от около 40 до около 75 мкг белка-носителя CRM<sub>197</sub>; около от 0,125 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 21-валентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем могут готовить в виде жидкой лекарственной формы, в которой каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 3, 5, 15В и 22F конъюгирован с ТТ, а капсульные полисахариды от серотипов 1, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 23F и 33F конъюгированы с CRM<sub>197</sub> (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; от около 2 до около 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 3, 5, 15В и 22F) и от около 40 до около 70 мкг белка-носителя CRM<sub>197</sub>; от около 0,125 до около 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 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, 6В, 9V, 19А и 19F в количестве около 4,4 мкг; от около 2 до около 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 3, 5, 15В и 22F) и от около 40 до около 70 мкг белка-носителя CRM<sub>197</sub>; от около 0,125 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 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 еще 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 1, 3, 6В, 19А и 19F в количестве около 4,4 мкг; от около 2 до около 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 3, 5, 15В и 22F) и от около 40 до около 70 мкг белка-носителя CRM<sub>197</sub>; от около 0,125 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 1, 3, 15В и 22F конъюгирован с ТТ, а капсульные полисахариды от серотипов 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 23F и 33F конъюгированы с CRM<sub>197</sub> (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; от около 2 до около 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 1, 3, 15В и 22F) и от около 40 до около 75 мкг белка-носителя CRM<sub>197</sub>; от около 0,125 до около 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 наполнять 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 иммунизации. 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, подхо-

дящих 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, 19<sup>th</sup> 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 патентах США № 4,886,499, 5,190,521, 5,328,483, 5,527,288, 4,270,537, 5,015,235, 5,141,496, 5,417,662 (все из которых включены в данный документ посредством ссылки). Внутрикожные композиции также можно вводить устройствами, которые ограничивают эффективное проникновение длины иглы в кожу, например, описанными 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 патентах США № 5,480,381, 5,599,302, 5,334,144, 5,993,412, 5,649,912, 5,569,189, 5,704,911, 5,383,851, 5,893,397, 5,466,220, 5,339,163, 5,312,335, 5,503,627, 5,064,413, 5,520,639, 4,596,556, 4,790,824, 4,941,880, 4,940,460, WO 1997/37705 и WO 1997/1353 7 (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, полиэтиленгликоль, такие масла, как оливковое масло, и такие инъекционные органические сложные 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 pH от 4 до 10, такой как pH от 5 до 9 или от 6 до 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, диэтанолламин, глицин, триэтанолламин 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 DOW-FAX) этиленоксида (EO), пропиленоксида (PO), бутиленоксида (BO); октоксинолы с различными повторами этокси(окси-1,2-этандиильной) группы, в частности октоксинол-9 (Triton-100); этилфеноксиполиэтоксизтанол (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 октилфеноксиполиоксиэтананола или нонилфеноксиполиоксиэтананола (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 полноксиэтиленового 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 техники. 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 6A: ATCC № 6306; серотип 6B: ATCC № 6326; серотип 7F: ATCC № 10351; серотип 9N: ATCC № 6309; серотип 9V: ATCC № 10368; серотип 14: ATCC № 6314; серотип 18C: ATCC № 10356; серотип 19A: ATCC № 10357; серотип 19F: ATCC № 6319; серотип 23F: ATCC № 6323). Использовали внутрилабораторные штаммы для серотипов 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F, но можно применять любой общедоступный штамм. Характеристики *S. pneumoniae* определяли по капсулам и подвижности, грамположительной окраске, кофейной форме диплококков и альфа-гемолузу в среде кровяного агара. Серотипы идентифицировали тестом Quelling с использованием специфических антисывороток (патент США № 5,847,112).

Получение банков клеток.

С целью размножения штаммов и удаления компонентов животного происхождения были получены несколько поколений посевных культур (генерации F1, F2 и F3). Были получены две дополнительные генерации 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 дистилли-

рованной 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  $-20^{\circ}\text{C}$ .

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

Полисахариды различных серотипов активировали, следуя различными путями, и затем конъюгировали белок-носитель CRM<sub>197</sub> или ТТ. Конкретно, конъюгаты получали путем конъюгирования каждого из капсульного полисахарида всех серотипов, кроме 15В и 22F, с CRM<sub>197</sub> и путем конъюгирования каждого из капсульных полисахаридов серотипов 1, 3, 5, 15В и 22F 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. Винальную диольную структуру моносахарида можно окислять периодатом натрия ( $\text{NaIO}_4$ ) 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 (при 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 до около  $25^{\circ}\text{C}$  и к нему добавляли хлористоводородную кислоту до конечного значения рН  $6,0 \pm 0,1$ , тем самым останавливая гидролиз.

В случае серотипов 3, 8, 11А и 15В к раствору капсульного полисахарида добавляли хлористоводородную кислоту (при 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 до около  $25^{\circ}\text{C}$  и к нему добавляли 0,1 М фосфат натрия до конечного значения рН  $6,0 \pm 0,1$ , тем самым останавливая гидролиз.

В случае серотипа 4 к раствору капсульного полисахарида добавляли хлористоводородную кислоту (при 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 до около  $25^{\circ}\text{C}$  и к нему добавляли 1 М фосфат натрия до конечного значения рН  $6,0 \pm 0,1$ , тем самым останавливая гидролиз.

В случае серотипа 6А к раствору капсульного полисахарида добавляли ледяную уксусную кислоту (при 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 до около  $25^{\circ}\text{C}$  и к нему добавляли 1 М гидроксид натрия до конечного значения рН  $6,0 \pm 0,1$ , тем самым останавливая гидролиз.

В случае серотипа 12F к раствору капсульного полисахарида добавляли хлористоводородную кислоту (при 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 до около  $25^{\circ}\text{C}$  и к нему добавляли 0,1 М фосфат натрия до конечного значения рН  $6,0 \pm 0,1$ , 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 до около  $25^{\circ}\text{C}$  и к нему добавляли 1 М фосфат натрия таким образом, чтобы конечное значение рН раствора составляло  $6,0 \pm 0,1$ , тем самым останавливая гидролиз. В случае серотипов 22F и 33F к раствору капсульного полисахарида добавляли хлористоводородную кислоту (при 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 до около  $25^{\circ}\text{C}$  и к нему добавляли 0,1 М фосфат натрия до конечного значения рН  $6,0 \pm 0,1$ , 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 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  $25^{\circ}\text{C}$  для всех серотипов, за исключением 1, 7F и 19F, для которых температура составляла  $10^{\circ}\text{C}$  и меньше. Для поддержания постоянного и стабильного продуцирования конъюгатов в процессе конъюгации для каждого серо-

типа 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 CRM<sub>197</sub>

| Серотип    | Диапазон Do | Серотип     | Диапазон Do |
|------------|-------------|-------------|-------------|
| Серотип 1  | от 4 до 10  | Серотип 10A | от 1 до 12  |
| Серотип 3  | от 2 до 8   | Серотип 11A | от 1 до 15  |
| Серотип 4  | от 1 до 5   | Серотип 12F | от 1 до 9   |
| Серотип 6A | от 5 до 15  | Серотип 14  | от 6 до 13  |
| Серотип 6B | от 7 до 13  | Серотип 18C | от 6 до 14  |
| Серотип 7F | от 2 до 8   | Серотип 19A | от 7 до 13  |
| Серотип 8  | от 1 до 17  | Серотип 19F | от 6 до 12  |
| Серотип 9N | от 5 до 10  | Серотип 23F | от 6 до 14  |
| Серотип 9  | от 4 до 9   | Серотип 33F | от 1 до 15  |

Таблица 2

Диапазон Do для серотипов 1, 3, 5, 15B и 22F, которые необходимо конъюгировать с TT

| Серотип          | Диапазон Do | Серотип              | Диапазон Do |
|------------------|-------------|----------------------|-------------|
| Серотип 1 (1-TT) | от 1 до 15  | Серотип 15B (15B-TT) | от 1 до 15  |
| Серотип 3 (3-TT) | от 2 до 14  | Серотип 22F (22F-TT) | от 1 до 20  |
| Серотип 5 (5-TT) | от 1 до 15  |                      |             |

### Стадия 3. Ультрафильтрация.

Окисленный сахарид концентрировали и подвергали диафильтрации с использованием WFI на ультраfiltре с отсечением молекулярной массы (MWCO) 100 кДа (ультрафильтр на 30 кДа для серотипа 1 и ультрафильтр на 5 кДа для серотипа 18C). Диафильтрацию проводили с использованием 0,9% раствора хлорида натрия для серотипа 1, 0,01 М буфера ацетата натрия (pH 4,5) для серотипов 7F и 23F и 0,01 М буфера фосфата натрия (pH 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 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  $-25\pm 5^\circ\text{C}$ .

Для капсульных полисахаридов серотипов 1 и 18C, 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  $-25\pm 5^\circ\text{C}$ . Для капсульных полисахаридов серотипов 6A, 6B, 7F, 15B-TT, 19A, 19F, 22F-TT 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  $-25\pm 5^\circ\text{C}$ .

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  $-25\pm 5^\circ\text{C}$ .

Для капсульного полисахарида серотипа 12F, к активированному полисахариду добавляли предварительно определенное количество сахарозы до достижения конечной концентрации сахарозы

10±5% (мас./об.) и независимо готовили полисахариды и белок-носитель, лиофилизировали, а затем хранили при -25±5°C.

(2) Процесс конъюгации.

Конъюгацию в водной среде проводили для серотипов 1, 3, 4, 5, 8, 9N, 9V, 10A, 14, 18C и 33F и конъюгацию в ДМСО проводили для серотипов 6A, 6B, 7F, 11A, 12F, 15B-ТТ, 19A, 19F, 22F-ТТ 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, 18C и 33F, лиофилизированный образец оттаивали и доводили до комнатной температуры. Растворяли лиофилизированный образец до реакционной концентрации путем использования буферного раствора фосфата натрия при 23±2°C в соотношении, установленном для каждого серотипа.

Конъюгация в среде диметилсульфоксида (ДМСО).

Для серотипов 6A, 6B, 7F, 11A, 12F, 15B-ТТ, 19A, 19F, 22F-ТТ и 23F, лиофилизированный образец оттаивали, доводили до комнатной температуры и растворяли в ДМСО.

Стадия 2. Реакция конъюгации.

Конъюгация в водной среде.

Для серотипов 3-ТТ, 4, 5-ТТ, 8, 9N, 9V, 10A, 14, 18C и 33F реакцию конъюгации инициировали добавлением раствора цианоборогидрида натрия (100 мг/мл) к 1,0-1,4 моль цианоборогидрида натрия на 1 моль сахара. Однако для серотипов 1, 1-ТТ и 3 реакцию инициировали добавлением раствора цианоборогидрида натрия к 0,5 моль цианоборогидрида натрия на 1 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±2°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 1 моль сахара. Смесь инкубировали при 23±2°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 6A, 6B, 7F, 11A, 12F, 15B-ТТ, 19A, 19F, 22F-ТТ 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 1 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±2°C. К реакционной смеси добавляли 100 мг/мл раствора борогидрида натрия (обычно от 1,8 до 2,2 мол.экв. борогидрида натрия на 1 моль активированного сахара) и WFI (целевая концентрация 5% об./об.) и инкубировали смесь в течение от 3 до 6 ч при 23±2°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 CRM<sub>197</sub>). Готовый концентрат охлаждали и хранили при 2-8°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(1/5/15B/22F)-ТТ и PCV21(3/5/15B/22F)-ТТ:

PCV21(1/5/15B/22F)-ТТ включал конъюгаты-полисахариды, полученные конъюгированием каждого полисахарида серотипов 1, 5, 15В и 22F с ТТ и каждого полисахарида серотипов 3, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 23F и 33F с CRM<sub>197</sub> и

PCV21(3/5/15B/22F)-ТТ включал конъюгаты-полисахариды, полученные конъюгированием каждого полисахарида серотипов 3, 5, 15В и 22F с ТТ и каждого полисахарида серотипов 1, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 23F и 33F с CRM<sub>197</sub>.

Композиция PCV21(1/5/15B/22F)-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, 5, 15В и 22F) и от 40 до 75 мкг CRM<sub>197</sub>, 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. Композиция PCV21(3/5/15B/22F)-ТТ в общей дозе 0,5 мл включала 2,2 мкг каждого полисахарида, за исключением серотипов 1, 3, 6В, 19А и 19F при 4,4 мкг; от 2 до 25 мкг ТТ (для серотипов 3, 5, 15В и 22F), 0,250 мг элементарного алюминия (1,13 мг фосфата алюминия), при этом остальные компоненты и их содержания идентичны таковым для PCV21(1/5/15B/22F)-ТТ.

Пример 4. Иммуногенность поливалентной противопневмококковой конъюгированной вакцины.

Поливалентные противопневмококковые вакцины, PCV21(1/5/15B/22F)-ТТ и PCV21(3/5/15B/22F)-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 опсонифагоцитарным анализом (ОРА) 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(3/5/15B/22F)-ТТ.

Измерение специфических к серотипам концентраций IgG.

Капсульные полисахариды (PnP) для каждого серотипа наносили на 96-луночный планшет по 0,5-1 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, затем проводили реакцию при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакцию гасили добавлением 50 мкл 3 М NaOH и измеряли абсорбцию на 405 и 690 нм. В качестве сравнительного примера той же процедуре можно подвергать коммерчески доступную 13-валентную вакцину (ПРЕВНАР 13). Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

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

| Серотип | ПРЕВНАР13 | PCV21(3/5/15B/22F)-ТТ |
|---------|-----------|-----------------------|
| 1       | 16770,4   | 13623,9               |
| 3       | 6603,4    | 29462,4               |
| 4       | 27969,9   | 44594,4               |
| 5       | 5758,6    | 10521,4               |
| 6A      | 9493,7    | 12696,6               |
| 6B      | 8690,6    | 8197,1                |
| 7F      | 60819,7   | 56995,0               |
| 8       | 594,8     | 61898,5               |
| 9N      | 5186,2    | 293936,9              |
| 9V      | 30043,9   | 39421,1               |
| 10A     | 169,8     | 27243,3               |
| 11A     | 184,5     | 52384,3               |
| 12F     | 130,0     | 26815,4               |
| 14      | 21906,0   | 39258,8               |
| 15B     | 843,5     | 8360,7                |
| 18C     | 91500,7   | 80523,0               |
| 19A     | 16470,7   | 5179,7                |
| 19F     | 13956,4   | 17673,4               |
| 22F     | 139,7     | 11716,5               |
| 23F     | 12089,4   | 8934,6                |
| 33F     | 143,2     | 29774,3               |

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 CRM<sub>197</sub>. Кролики, иммунизированные PCV21(3/5/15B/22F)-ТТ, также продемонстрировали значительное увеличение концентрации IgG против дополнительных восьми серотипов, отсутствующих в ПРЕВНАР 13 (т.е. 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F). Серотип 9N, в частности, дал более чем 50-кратное увеличение концентрации сывороточного специфического IgG по сравнению с ПРЕВНАР 13.

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 50000 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 CO<sub>2</sub>-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 CO<sub>2</sub>-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 (ПРЕВНАР 13). Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

Титры МОРА для 21 серотипа через 2 недели после  
вторичной иммунизации

| Серотип | ПРЕВНАР13        | PCV21(3/5/15B/22F)-ТТ |
|---------|------------------|-----------------------|
| 1       | 94               | 80                    |
| 3       | 829              | 3772                  |
| 4       | 2428             | 2370                  |
| 5       | 1169             | 1972                  |
| 6A      | 4925             | 3094                  |
| 6B      | 5693             | 3927                  |
| 7F      | 2731             | 2386                  |
| 8       | Не тестировалось | 669                   |
| 9N      | Не тестировалось | 2339                  |
| 9V      | 271              | 175                   |
| 10A     | Не тестировалось | 805                   |
| 11A     | Не тестировалось | 2040                  |
| 12F     | Не тестировалось | 894                   |
| 14      | 1917             | 1874                  |
| 15B     | Не тестировалось | 311                   |
| 18C     | 5347             | 3758                  |
| 19A     | 5760             | 888                   |
| 19F     | 2059             | 710                   |
| 22F     | Не тестировалось | 1286                  |
| 23F     | 1975             | 1868                  |
| 33F     | Не тестировалось | 1011                  |

При конъюгировании серотипов 3 и 5 с ТТ функциональные титры МОРА значительно возросли по сравнению с титрами МОРА, полученными при их конъюгировании с CRM<sub>197</sub>. Кролики, иммунизированные PCV21(3/5/15B/22F)-ТТ, также продемонстрировали значительные увеличения функциональных титров МОРА против каждого из дополнительных восьми серотипов, отсутствующих в ПРЕВНАР 13 (т.е. 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F).

#### 4-2. PCV21(1/5/15B/22F)-ТТ.

Концентрация IgG, специфических для серотипов, и титр функциональной иммуногенности измеряли таким же образом, как и в 4-1, и результаты двух отдельных экспериментов показаны ниже.

Измерение специфических к серотипам концентраций IgG.

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

| Серотип | Эксперимент 1 |                       | Эксперимент 2 |                       |
|---------|---------------|-----------------------|---------------|-----------------------|
|         | ПРЕВНАР1<br>3 | PCV21(1/5/15B/22F)-ТТ | ПРЕВНАР1<br>3 | PCV21(1/5/15B/22F)-ТТ |
| 1       | 5105,5        | 46202,4               | 14208,3       | 28405,2               |
| 3       | 6303,0        | 10591,0               | 6575,6        | 8883,8                |
| 4       | 46727,3       | 69813,7               | 16600,3       | 39330,1               |
| 5       | 6873,9        | 16468,4               | 5079,3        | 21510,8               |
| 6A      | 32561,4       | 34321,1               | 8965,5        | 7658,8                |
| 6B      | 25398,7       | 20484,6               | 5105,2        | 2885,6                |
| 7F      | 27560,5       | 85909,1               | 59993,0       | 55489,8               |
| 8       | 521,0         | 89658,7               | 274,7         | 83945,4               |
| 9N      | 5198,2        | 304294,1              | 3824,7        | 207073,2              |
| 9V      | 62169,3       | 41229,0               | 39503,5       | 42000,7               |
| 10A     | 166,4         | 37705,0               | 130,0         | 19173,7               |
| 11A     | 195,3         | 43766,3               | 163,9         | 49047,9               |
| 12F     | 154,4         | 25797,6               | 130,0         | 14503,3               |
| 14      | 17765,9       | 34321,5               | 12312,4       | 18367,4               |
| 15B     | 436,0         | 4658,6                | 280,6         | 6711,2                |
| 18C     | 103154,7      | 158798,8              | 62963,5       | 95617,7               |
| 19A     | 19191,1       | 6398,0                | 9807,5        | 4133,7                |
| 19F     | 16349,2       | 37946,5               | 9838,7        | 12775,0               |
| 22F     | 130,0         | 10335,4               | 130,0         | 1705,8                |
| 23F     | 15166,5       | 10104,6               | 5835,1        | 4128,6                |
| 33F     | 146,1         | 35918,2               | 141,4         | 34004,5               |

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(1/5/15B/22F)-ТТ, также продемонстрировали значительное увеличение концентрации IgG против дополнительных восьми серотипов, отсутствующих в ПРЕВНАР 13 (т.е. 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F). Снова серотип 9N показал значительное увеличение (более чем 50-кратное) по сравнению с ПРЕВНАР 13.

Тестирование функциональной иммуногенности (MOPA).

Таблица 6

Титры МОРА для 21 серотипа через 2 недели после  
вторичной иммунизации

| Серотип | Эксперимент 1           |                       | Эксперимент 2 |                       |
|---------|-------------------------|-----------------------|---------------|-----------------------|
|         | ПРЕВНАР1<br>3           | PCV21(1/5/15B/22F)-ТТ | ПРЕВНАР1<br>3 | PCV21(1/5/15B/22F)-ТТ |
| 1       | 99                      | 294                   | 109           | 214                   |
| 3       | 479                     | 792                   | 740           | 820                   |
| 4       | 2560                    | 4083                  | 2272          | 2671                  |
| 5       | 1046                    | 2696                  | 3638          | 13927                 |
| 6A      | 5624                    | 4871                  | 4949          | 2417                  |
| 6B      | 5451                    | 9599                  | 4915          | 4516                  |
| 7F      | 2355                    | 2585                  | 2414          | 2305                  |
| 8       | Не<br>тестировалос<br>ь | 692                   | -             | 779                   |
| 9N      | 54                      | 1860                  | 84            | 1391                  |
| 9V      | 282                     | 165                   | 295           | 371                   |
| 10A     | Не<br>тестировалос<br>ь | 949                   | -             | 810                   |
| 11A     | Не<br>тестировалос<br>ь | 986                   | -             | 2118                  |
| 12F     | Не<br>тестировалос<br>ь | 795                   | -             | 713                   |
| 14      | 1052                    | 2715                  | 1659          | 2362                  |
| 15B     | 59                      | 461                   | 79            | 403                   |
| 18C     | 6257                    | 7200                  | 2933          | 3261                  |
| 19A     | 2962                    | 1151                  | 3910          | 1794                  |
| 19F     | 968                     | 1874                  | 1570          | 1109                  |
| 22F     | Не<br>тестировалос<br>ь | 2091                  | -             | 261                   |
| 23F     | 1854                    | 1481                  | 1956          | 660                   |
| 33F     | Не<br>тестировалос<br>ь | 1862                  | -             | 850                   |

При конъюгировании серотипов 1 и 5 с ТТ функциональные титры МОРА значительно возросли по сравнению с титрами МОРА, полученными при их конъюгировании с CRM<sub>197</sub>. Кролики, иммунизированные PCV21(3/5/15B/22F)-ТТ, также продемонстрировали значительные увеличения функциональных титров МОРА против каждого из дополнительных восьми серотипов, отсутствующих в ПРЕВНАР 13 (т.е. 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F).

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, содержа-

щий 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 колориметрическим 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 многоугольного 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 капсульный 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 CRM<sub>197</sub> в соотношении 0,5-2 г CRM<sub>197</sub> на 1 г активированного полисахарида. Затем объединенную смесь лиофилизировали. Лيوфилизированную смесь активированного полисахарида и CRM<sub>197</sub> хранили при температуре -20°C.

Лيوфилизированную смесь активированного полисахарида и CRM<sub>197</sub> 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 (NaBH<sub>3</sub>CN), 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 (NaBH<sub>4</sub>) для блокирования нереагировавшего 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. 7.

Таблица 7

| 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 |     |     |     |     |     |

  

| Номер конъюгат   | 1    | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
|--|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 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 CRM<sub>197</sub> во время конъюгации. Результат приведен в табл. 8.

Таблица 8

| 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. 9.

Таблица 9

| 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 CRM<sub>197</sub>.

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 AlPO<sub>4</sub>) 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. 10. 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. 10 показан результат измерения концентрации IgG после иммунизации кроликов конъюгатом номер 8 из табл. 8.

Таблица 10

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

Поскольку в данном документе 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 настоящем документе цитируются следующие ссылки, и они дают общую информацию, касающуюся технической области, а также предоставляют описания анализов и другие подробности, обсуждаемые в этом документе. 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.I.)*.
- [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, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F,

причем белковый носитель представляет собой CRM<sub>197</sub> или столбнячный анатоксин, и

при этом четыре из капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>, причем четыре капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, имеют серотипы 15B, 22F, а два серотипа 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, 5, 15B и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от серотипов 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F и 33F конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

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

18С, 19А, 19F, 23F и 33F конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

4. Поливалентная противопневмококковая конъюгированная композиция со смешанным носителем по п.1, в которой капсульные полисахариды от серотипов 3, 5, 15В и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды от серотипов 1, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 23F и 33F конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

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 CRM<sub>197</sub> 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 CRM<sub>197</sub>, имеет молекулярную массу, равную 500-4000 кДа;

соотношение капсульного полисахарида от серотипа 9N и CRM<sub>197</sub> в конъюгате, образованном между капсульным полисахаридом от серотипа 9N и CRM<sub>197</sub>, составляет 0,5-2,5 (мас./мас.) и/или

15-60% конъюгата, образованного между капсульным полисахаридом от серотипа 9N и CRM<sub>197</sub>, имеет значение K<sub>d</sub>, равное 0,3 или ниже, на колонке CL-4B.

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

11. Вакцина по п.10, в которой указанный 21 различных конъюгат пневмококковых капсульных полисахаридов-белков состоит из полисахаридов из серотипов 1, 5, 15В и 22F, каждый из которых конъюгирован со столбнячным анатоксином, и капсульных полисахаридов из серотипов 3, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 23F и 33F, каждый из которых конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

12. Вакцина по п.11, составленная в форме одной дозы 0,5 мл, содержащей от 2 до 2,5 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением капсульного полисахарида серотипа 6В, и от 4 до 5 мкг капсульного полисахарида из серотипа 6В.

13. Вакцина по п.12, составленная в форме одной дозы 0,5 мл, содержащей 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением капсульного полисахарида серотипа 6В, и 4,4 мкг капсульного полисахарида из серотипа 6В.

14. Вакцина по п.11, составленная в форме одной дозы 0,5 мл, содержащей от 2 до 2,5 мкг каждого капсульного полисахарида из серотипов 1, 5, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 22F, 23F и 33F и от 4 до 5 мкг каждого капсульного полисахарида из серотипов 3, 4, 6В, 9V, 19А и 19F.

15. Вакцина по п.14, составленная в форме одной дозы 0,5 мл, содержащей 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида из серотипов 1, 5, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 22F, 23F и 33F и 4,4 мкг каждого капсульного полисахарида из серотипов 3, 4, 6В, 9V, 19А и 19F.

16. Вакцина по п.11, составленная в форме одной дозы 0,5 мл, содержащей 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида для до шести серотипов, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 9V, 19А и 19F, и 4,4 мкг каждого капсульного полисахарида из до шести серотипов, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 9V, 19А и 19F.

17. Вакцина по п.16, составленная в форме одной дозы 0,5 мл, содержащей 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида из серотипов 1, 4, 5, 6А, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 22F, 23F и 33F и 4,4 мкг каждого капсульного полисахарида из серотипов 3, 6В, 19А и 19F.

18. Вакцина по п.11, составленная в форме одной дозы 0,5 мл, содержащей:

от 2 до 2,5 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением серотипа 6В;

от 4 до 5 мкг капсульного полисахарида из серотипа 6В;

от 2 до 25 мкг столбнячного анатоксина;

от 40 до 75 мкг CRM<sub>197</sub>;

от 0,125 до 0,250 мг адъюванта элементарного алюминия;

хлорид натрия и

сукцинатный буфер.

19. Вакцина по п.18, дополнительно содержащая полисорбат 80.

20. Вакцина по п.18 или 19, где адъювант элементарного алюминия содержит фосфат алюминия.

21. Вакцина по любому из пп.18-20, содержащая 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за ис-

ключением серотипа 6В, и 4,4 мкг капсульного полисахарида из серотипа 6В.

22. 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 любому из пп.11-21.

23. Способ по п.22, в котором субъект является человеком в возрасте по меньшей мере 50 лет и заболевание представляет собой пневмонию или инвазивное пневмококковое заболевание (IPD).

24. Способ по п.22, 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).

25. Способ по п.24, в котором субъект находится в возрасте от 6 недель до 5 лет, от 2 до 15 месяцев или от 6 до 17 лет.

26. Способ по п.22, в котором субъект является человеком.

27. Способ по любому из пп.22-26, в котором поливалентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем или вакцину вводят путем внутримышечной инъекции.

28. Способ по любому из пп.22-27, в котором поливалентную противопневмококковую конъюгированную композицию со смешанным носителем или вакцину вводят как часть серии иммунизации.

29. Применение поливалентной противопневмококковой конъюгированной композиции со смешанным носителем по любому из пп.1-9 для профилактики у субъекта инфекции *Streptococcus pneumoniae* или заболевания, вызванного инфекцией *Streptococcus pneumoniae*.

30. Применение вакцины по п.21 для профилактики инфекции *Streptococcus pneumoniae* или заболевания, вызванного инфекцией *Streptococcus pneumoniae*, у субъекта-человека.

31. Применение вакцины по п.11 для профилактики инфекции *Streptococcus pneumoniae* или заболевания, вызванного инфекцией *Streptococcus pneumoniae*, у субъекта-человека.

