

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202391980 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.10.03

(22) Дата подачи заявки  
2022.02.02

(51) Int. Cl. A61K 39/09 (2006.01)  
A61K 39/385 (2006.01)  
A61K 39/39 (2006.01)  
A61P 11/00 (2006.01)  
A61P 31/04 (2006.01)  
A61P 37/04 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИЯ НАНОЭМУЛЬСИОННОГО АДЪЮВАНТА ДЛЯ ПНЕВМОКОККОВЫХ  
КОНЬЮГИРОВАННЫХ ВАКЦИН

(31) 63/145,651

(32) 2021.02.04

(33) US

(86) PCT/US2022/014812

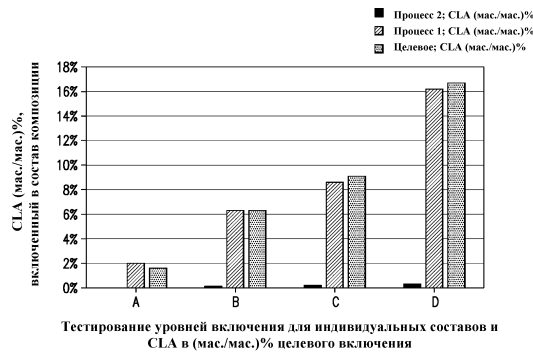
(87) WO 2022/169789 2022.08.11

(71) Заявитель:  
МЕРК ШАРП ЭНД ДОУМ ЭЛЭЛСИ  
(US)

(72) Изобретатель:  
Смит Уильям Дж., Ахл Патрик Л.,  
Соукуп Рэндал Дж., Скиннер  
Джули М. (US)

(74) Представитель:  
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В.,  
Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М.,  
Христофоров А.А. (RU)

(57) Настоящее изобретение в целом относится к профилактике пневмококковой инфекции. Более конкретно, изобретение относится к композиции, содержащей пневмококковые конъюгаты и стабильную наноэмульсию (SNE).



A1

202391980

202391980

A1

# **КОМПОЗИЦИЯ НАНОЭМУЛЬСИОННОГО АДЬЮВАНТА ДЛЯ ПНЕВМОКОККОВЫХ КОНЬЮГИРОВАННЫХ ВАКЦИН**

## **Описание**

### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

Пневмококковая инфекция – это инфекция, вызываемая бактериями *Streptococcus pneumoniae* (пневмококками). Известно, что различные серотипы пневмококка приводят к разным проявлениям заболевания, и инфекции могут вызывать целый ряд симптоматики от инфекций уха и носовых пазух до пневмонии и инфекций кровотока. Пневмококковая инфекция характеризуется высокой заболеваемостью и смертностью во всем мире, особенно среди пожилых людей и детей младшего возраста. На настоящий момент идентифицировано 100 капсульных полисахаридов (Ganaie, F. et al. (2020) *Clinical Science and Epidemiology*, Vol. 11, Issue 3, page 1-15). Эти серотипы различаются по химической структуре, серологическому ответу и другим параметрам, связанным с генетическими мутациями.

В 1983 г. в США была одобрена 23-валентная пневмококковая вакцина PNEUMOVAX® (Merck Sharp & Dohme Corp., дочерняя компания Merck & Co., Inc., Кенилворт, Нью-Джерси, США). Эта вакцина продемонстрировала сниженную иммуногенность у маленьких детей из-за независимых Т-клеточных ответов. Для решения этой проблемы, особенно у маленьких детей, были разработаны пневмококковые конъюгированные вакцины (PCV), получаемые путем ковалентного связывания полисахарида с белком-носителем, при этом иммуногенный ответ становился зависимым от Т-клеток. В 2000 году в США была одобрена 7-валентная пневмококковая конъюгированная вакцина PREVNAR® (Wyeth Pharmaceuticals LLC, Collegeville, PA). В 2010 году в США была одобрена 13-валентная пневмококковая конъюгированная вакцина PREVNAR13® (Wyeth Pharmaceuticals LLC, Колледжвилл, Пенсильвания). В 2021 году в США также были одобрены 15-валентная пневмококковая конъюгированная вакцина VAXNEUVANCE® (Merck Sharp & Dohme Corp., дочерняя компания Merck & Co., Inc., Кенилворт, Нью-Джерси, США) и PREVNAR20® (Wyeth Pharmaceuticals LLC, Колледжвилл, Пенсильвания) - 20-валентная пневмококковая конъюгированная вакцина. Известны и лицензированы во всем мире также и другие мультивалентные PCV.

В настоящее время в качестве адьювантов в лицензированных PCV используются алюминийсодержащие производные для повышения иммуногенности. Несмотря на то, что алюминиевые адьюванты повышают иммуногенный ответ по сравнению с исходным

уровнем, неизвестно, достаточен ли иммуногенный ответ для PCV с более высокой валентностью, особенно у детей. Таким образом, существует необходимость в поиске других адъювантов, которые могли бы обеспечить повышенную иммуногенность поливалентных PCV по сравнению с существующими стандартными алюминиевыми адъювантами.

### **Сущность настоящего изобретения**

Настоящее изобретение в целом относится к профилактике пневмококковой инфекции. Более конкретно, изобретение относится к композициям, вводимым в качестве вакцины, которые включают пневмококковые конъюгаты и стабильную наноэмульсионную (SNE) адъювантную композицию. В настоящем изобретении, помимо прочего, раскрывается композиция пневмококкового конъюгата, включающая SNE, содержащую эмульгаторы, и/или солубилизаторы, и/или поверхностно-активные вещества, и/или липиды. Настоящее изобретение относится, среди прочего, к композиции пневмококкового конъюгата, включающей SNE, содержащую поверхностно-активные вещества, и/или терпены, и/или катионные липиды, или их смеси. Настоящее изобретение относится, среди прочего, к композиции пневмококкового конъюгата, включающей SNE, содержащую сложные эфиры сорбитана, и/или терпены, и/или катионные липиды, или их смеси. Настоящее изобретение относится, среди прочего, к композиции пневмококкового конъюгата, включающей SNE, содержащую сложные эфиры сорбитана, в частности, полисорбат-20 или полисорбат-80, или полксамер, и/или терпены, и/или катионные липиды, или их смеси. Настоящее изобретение относится, среди прочего, к композиции пневмококкового конъюгата, включающей SNE, содержащую сложные эфиры сорбитана, в частности, полисорбат-20 или полисорбат-80, или полксамер, и/или терпены, и/или катионные липиды, или их смеси. Настоящее изобретение относится, среди прочего, к композиции пневмококкового конъюгата, включающей SNE, содержащую сорбитан триолеат (SPAN-85), полисорбат-20 или полисорбат-80, терпен и, необязательно, катионный липид. Настоящее изобретение относится, среди прочего, к композиции пневмококкового конъюгата, включающей SNE, содержащую сорбитан триолеат (SPAN-85), полисорбат-20 или полисорбат-80, сквален и, необязательно, катионный липид. Настоящее изобретение относится, среди прочего, к композиции пневмококкового конъюгата, включающей SNE, содержащую сорбитан триолеат (SPAN-85), полисорбат-20 или полисорбат-80, сквален и катионный липид. Настоящее изобретение далее относится, среди прочего, к композиции пневмококкового конъюгата, включающей состав SNE адъюванта, содержащий 1) триолеат сорбитана (SPAN-85); 2) полисорбат-20 (PS-20) или

полисорбат-80 (PS-80); 3) сквален; и необязательный 4) катионный липид. Конкретная композиция пневмококкового конъюгата включает состав SNE адъюванта, содержащий 1) триолеат сорбитана (SPAN-85); 2) полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); 3) сквален; и 4) катионный липид (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин («CLA» или, когда катионный липид включен в SNE, «CLA-SNE»). Конкретная композиция пневмококкового конъюгата включает состав SNE адъюванта, содержащий 1) триолеат сорбитана (SPAN-85); 2) полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); 3) сквален; и 4) катионный липид (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин («CLA» или, когда катионный липид включен в SNE, «CLA-SNE»). Конкретная композиция пневмококкового конъюгата включает состав SNE адъюванта, содержащий 1) триолеат сорбитана (SPAN-85); 2) полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); 3) сквален; и 4) катионный липид (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин («CLA» или, когда катионный липид включен в SNE, «CLA-SNE»). Конкретная композиция пневмококкового конъюгата включает состав SNE адъюванта, содержащий 1) триолеат сорбитана (SPAN-85); 2) полисорбат-20 (PS-20); 3) сквален; и 4) катионный липид (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин («CLA» или, когда катионный липид включен в SNE, «CLA-SNE»). По сравнению с эффективностью 1) композиции пневмококкового конъюгата без адъюванта; 2) композиции пневмококкового конъюгата с фосфатом алюминия (APA) в качестве адъюванта; или 3) композиции пневмококкового конъюгата с LNP-адъювантом; описанная композиция пневмококкового конъюгата со SNE-адъювантом обеспечивала эквивалентный или повышенный иммуногенный ответ для большинства протестированных пневмококковых серотипов.

### **Краткое описание фигур**

**Фигура 1:** Некоторые структуры катионных липидов: (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин (CLA); (6Z,9Z,26Z,29Z)-N,N-диметилпентаэтриаконта-6,9,26,29-тетраен-18-амин (CLX) и N,N-диметил-1-((1S,2R)-2-октилциклопропил)-гептадекан-8-амин (CLY).

**Фигура 2:** Компоненты CLA-SNE: (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин (CLA), SPAN-85, PS-20 и сквален.

**Фигура 3:** Определение параметров субстанции адъюванта CLA-SNE с использованием статического светорассеяния (SLS). См. Пример 3.

**Фигура 4:** Влияние процесса получения композиции на включение CLA в SNE. См. Пример 4.

**Фигура 5А:** Титры анти-6В IgG до иммунизации (объединенные) и после дозы 3 (день 35) после иммунизации мышей составами, описанными в Таблице 4. Планки погрешностей представляют собой среднее геометрическое с 95% доверительными интервалами. Преобразованные данные анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с послеэкспериментальным тестом Даннетта. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , NS - не является значимым. См. пример 6.

**Фигура 5В:** Титры опсонофагоцитарной активности против серотипа 6В до иммунизации (объединенные) и после дозы 3 (день 35) (объединенные) у мышей, иммунизированных составами, описанными в Таблице 4. См. Пример 6.

**Фигура 6А:** Соотношение титров серотип-специфических IgG у взрослых макак-резусов после иммунизации PCV24 в комбинации с CLA-SNE, по сравнению с PCV24 в комбинации с АРА, после введения дозы 1 (PD1: кружочки) и после введения дозы 2 (PD2: квадратики). PCV24 в комбинации с CLA-SNE (1200 мкг/мл CLA-SNE) приводит к такой же или лучшей иммуногенности по сравнению с PCV24 в комбинации с АРА. Данные для серотипов 6С и 15В включены для оценки перекрестной реактивности. См. Пример 7.

**Фигура 6В:** Соотношение титров серотип-специфических IgG у взрослых макак-резусов после иммунизации препаратами, описанными в Таблице 5, по сравнению с PCV24 в комбинации с АРА после введения дозы 2 (PD2). PCV24 в комбинации с CLA-SNE (кружочки и треугольники), CLA-LNP (квадратики) или SNE (ромбы), приводит к такой же или лучшей иммуногенности по сравнению с PCV24 в комбинации с АРА. Данные для серотипов 6С и 15В включены для оценки перекрестной реактивности. См. Пример 7.

**Фигура 7А:** Титры опсонофагоцитарной активности взрослых макак-резусов до иммунизации (объединенные), после дозы 1 (день 14) и после дозы 2 (день 42) после иммунизации препаратами, описанными в Таблице 5. Объем вводимой дозы составляет 0,1 мл на животное и обеспечивает 0,08 мг или 0,12 мг доставляемой дозы CLA для групп PCV24/CLA-SNE (80 мкг) и PCV24/CLA-SNE (120 мкг) соответственно. Сыворотку резусов оценивали на наличие функциональных антител, определяемых с помощью мультиплексных опсонофагоцитарных анализов (МОРА) для серотипов 1 и 3. См. Пример 7.

**Фигура 7В:** Титры опсонофагоцитарной активности взрослых макак-резусов до иммунизации (индивидуальные/объединенные), после введения дозы 1 (день 14) и после введения дозы 2 (день 42) после иммунизации препаратами, описанными в таблице 5. Объем вводимой дозы составляет 0,1 мл на животное и обеспечивает 0,08 мг или 0,12 мг

доставляемой дозы CLA для групп PCV24/CLA-SNE (80 мкг) и PCV24/CLA-SNE (120 мкг) соответственно. Сыворотку резусов оценивали на наличие функциональных антител, определяемых с помощью мультиплексных опсонофагоцитарных анализов (МОРА) для серотипов 4 и 5. См. Пример 7.

**Фигура 7С:** Титры опсонофагоцитарной активности взрослых макак-резусов до иммунизации (объединенные), после дозы 1 (день 14) и после дозы 2 (день 42) после иммунизации составами, описанными в Таблице 5. Объем вводимой дозы составляет 0,1 мл на животное и обеспечивает 0,08 мг или 0,12 мг доставляемой дозы CLA для групп PCV24/CLA-SNE (80 мкг) и PCV24/CLA-SNE (120 мкг) соответственно. Сыворотку резусов оценивали на наличие функциональных антител, определяемых с помощью мультиплексных опсонофагоцитарных анализов (МОРА) для серотипов 6А и 6В. См. Пример 7.

**Фигура 7D:** Титры опсонофагоцитарной активности взрослых макак-резусов до иммунизации (объединенные), после дозы 1 (день 14) и после дозы 2 (день 42) после иммунизации составами, описанными в Таблице 5. Объем вводимой дозы составляет 0,1 мл на животное и обеспечивает 0,08 мг или 0,12 мг доставляемой дозы CLA для групп PCV24/CLA-SNE (80 мкг) и PCV24/CLA-SNE (120 мкг) соответственно. Сыворотку резусов оценивали на наличие функциональных антител, определяемых с помощью мультиплексных опсонофагоцитарных анализов (МОРА) для серотипов 6С и 7F. См. пример 7.

**Фигура 7E:** Титры опсонофагоцитарной активности взрослых макак-резусов до иммунизации (объединенные), после дозы 1 (день 14) и после дозы 2 (день 42) после иммунизации составами, описанными в Таблице 5. Объем вводимой дозы составляет 0,1 мл на животное, и обеспечивает 0,08 мг или 0,12 мг доставляемой дозы CLA для групп PCV24/CLA-SNE (80 мкг) и PCV24/CLA-SNE (120 мкг) соответственно. Сыворотку резусов оценивали на наличие функциональных антител, определяемых с помощью мультиплексных опсонофагоцитарных анализов (МОРА) для серотипов 8 и 9V. См. Пример 7.

**Фигура 7F:** Титры опсонофагоцитарной активности взрослых макак-резусов до иммунизации (объединенные), после дозы 1 (день 14) и после дозы 2 (день 42) после иммунизации составами, описанными в Таблице 5. Объем вводимой дозы составляет 0,1 мл на животное, и обеспечивает 0,08 мг или 0,12 мг доставляемой дозы CLA для групп PCV24/CLA-SNE (80 мкг) и PCV24/CLA-SNE (120 мкг) соответственно. Сыворотку резусов оценивали на наличие функциональных антител, определяемых с помощью

мультиплексных опсонофагоцитарных анализов (МОРА) для серотипов 10А и 11А. См. пример 7.

**Фигура 7G:** Титры опсонофагоцитарной активности взрослых макак-резусов до иммунизации (объединенные), после дозы 1 (день 14) и после дозы 2 (день 42) после иммунизации составами, описанными в Таблице 5. Объем вводимой дозы составляет 0,1 мл на животное, и обеспечивает 0,08 мг или 0,12 мг доставляемой дозы CLA для групп PCV24/CLA-SNE (80 мкг) и PCV24/CLA-SNE (120 мкг) соответственно. Сыворотку резусов оценивали на наличие функциональных антител, определяемых с помощью мультиплексных опсонофагоцитарных анализов (МОРА) для серотипов 12F и 14. См. Пример 7.

**Фигура 7H:** Титры опсонофагоцитарной активности взрослых макак-резусов до иммунизации (объединенные), после дозы 1 (день 14) и после дозы 2 (день 42) после иммунизации составами, описанными в Таблице 5. Объем вводимой дозы составляет 0,1 мл на животное, и обеспечивает 0,08 мг или 0,12 мг доставляемой дозы CLA для групп PCV24/CLA-SNE (80 мкг) и PCV24/CLA-SNE (120 мкг) соответственно. Сыворотку резусов оценивали на наличие функциональных антител, определяемых с помощью мультиплексных опсонофагоцитарных анализов (МОРА) для серотипов 15А и 15С. См. Пример 7.

**Фигура 7I:** Титры опсонофагоцитарной активности взрослых макак-резусов до иммунизации (объединенные), после дозы 1 (день 14) и после дозы 2 (день 42) после иммунизации составами, описанными в Таблице 5. Объем вводимой дозы составляет 0,1 мл на животное, и обеспечивает 0,08 мг или 0,12 мг доставляемой дозы CLA для групп PCV24/CLA-SNE (80 мкг) и PCV24/CLA-SNE (120 мкг) соответственно. Сыворотку резусов оценивали на наличие функциональных антител, определяемых с помощью мультиплексных опсонофагоцитарных анализов (МОРА) для серотипов 18С и 19А. См. Пример 7.

**Фигура 7J:** Титры опсонофагоцитарной активности взрослых макак-резусов до иммунизации (объединенные), после дозы 1 (день 14) и после дозы 2 (день 42) после иммунизации составами, описанными в Таблице 5. Объем вводимой дозы составляет 0,1 мл на животное, и обеспечивает 0,08 мг или 0,12 мг доставляемой дозы CLA для групп PCV24/CLA-SNE (80 мкг) и PCV24/CLA-SNE (120 мкг) соответственно. Сыворотку резусов оценивали на наличие функциональных антител, определяемых с помощью мультиплексных опсонофагоцитарных анализов (МОРА) для серотипов 19F и 22F. См. Пример 7.

**Фигура 7К:** Титры опсонофагоцитарной активности взрослых макак-резусов до иммунизации (объединенные), после дозы 1 (день 14) и после дозы 2 (день 42) после иммунизации составами, описанными в Таблице 5. Объем вводимой дозы составляет 0,1 мл на животное, и обеспечивает 0,08 мг или 0,12 мг доставляемой дозы CLA для групп PCV24/CLA-SNE (80 мкг) и PCV24/CLA-SNE (120 мкг) соответственно. Сыворотку резусов оценивали на наличие функциональных антител, определяемых с помощью мультиплексных опсонофагоцитарных анализов (МОРА) для серотипов 23В и 23F. См. Пример 7.

**Фигура 7L:** Титры опсонофагоцитарной активности взрослых макак-резусов до иммунизации (объединенные), после дозы 1 (день 14) и после дозы 2 (день 42) после иммунизации составами, описанными в Таблице 5. Объем вводимой дозы составляет 0,1 мл на животное, и обеспечивает 0,08 мг или 0,12 мг доставляемой дозы CLA для групп PCV24/CLA-SNE (80 мкг) и PCV24/CLA-SNE (120 мкг) соответственно. Сыворотку резусов оценивали на наличие функциональных антител, определяемых с помощью мультиплексных опсонофагоцитарных анализов (МОРА) для серотипов 24F и 33F. См. Пример 7.

**Фигура 7М:** Титры опсонофагоцитарной активности взрослых макак-резусов до иммунизации (объединенные), после дозы 1 (день 14) и после дозы 2 (день 42) после иммунизации составами, описанными в Таблице 5. Объем вводимой дозы составляет 0,1 мл на животное, и обеспечивает 0,08 мг или 0,12 мг доставляемой дозы CLA для групп PCV24/CLA-SNE (80 мкг) и PCV24/CLA-SNE (120 мкг) соответственно. Сыворотку резусов оценивали на наличие функциональных антител, определяемых с помощью мультиплексных опсонофагоцитарных анализов (МОРА) для серотипа 35В. См. Пример 7.

**Фигура 8А:** Соотношение титров серотип-специфических IgG у детенышей макак-резусов после иммунизации PCV13, PCV24 с CLA-LNP (доза 120 мкг), PCV24 с CLA-SNE (295 мкг CLA и 2,5 мг сквалена), PCV24 с CLA-SNE (295 мкг CLA и 0,5 мг сквалена) по сравнению с иммунизацией PCV24, приготовленной с АРА после введения дозы 2 (день 42). Данные для серотипов 6С и 15В включены для оценки перекрестной реактивности. См. Пример 8.

**Фигура 8В:** Соотношение титров серотип-специфических IgG у детенышей макак-резусов после иммунизации выбранными составами, описанными в Таблице 6, по сравнению с PCV24, приготовленным с АРА, после введения дозы 1 (день 14). Данные для серотипов 6С и 15В включены для оценки перекрестной реактивности. См. Пример 8.

**Фигура 8С:** Соотношение титров серотип-специфических IgG у детенышей макак-резусов после иммунизации выбранными составами, описанными в Таблице 6, по



сравнению с PCV24, приготовленным с АРА, после введения дозы 2 (день 42). Данные для серотипов 6С и 15В включены для оценки перекрестной реактивности. См. Пример 8.

**Фигура 8D:** Соотношение титров серотип-специфических IgG у детенышей макак-резусов после иммунизации выбранными составами, описанными в Таблице 6, по сравнению с PCV24, приготовленным с АРА, после введения дозы 3 (день 70). Данные для серотипов 6С и 15В включены для оценки перекрестной реактивности. См. Пример 8.

**Фигура 9:** Мыши, иммунизированные PCV24, в комбинации с составами CLA-SNE, CLA-LNP и SNE, защищены от интратрахеального заражения серотипом 24F *Streptococcus pneumoniae*. См. Пример 9.

**Фигуры 10A-10D:** Анализ нанотрекинга (NTA) составов CLA-SNE и SNE, хранившихся при 4°C и 37°C в течение 1 месяца (Фигура 10A: CLA-SNE [6 мг/мл CLA и 30 мг/мл сквалена]; Фигура 10B: SNE [40 мг/мл сквалена]; Фигура 10C: CLA-SNE [4 мг/мл CLA и 4 мг/мл сквалена] и Фигура 10D: SNE [8 мг/мл сквалена]). См. Пример 10.

**Фигуры 11A-11D:** Динамическое рассеяние света (DLS) для составов CLA-SNE и SNE, хранившихся при 4°C, 25°C и 37°C в течение 1 месяца (Фигура 11A: CLA-SNE [6 мг/мл CLA и 30 мг/мл сквалена]; Фигура 11B: CLA-SNE [4 мг/мл CLA и 4 мг/мл сквалена]; Фигура 11C: SNE [40 мг/мл сквалена] и Фигура 11D: SNE [8 мг/мл сквалена]). См. Пример 10.

**Фигура 12A:** Концентрация CLA (мг/мл), измеренная с помощью UPLC-CAD для составов CLA-SNE и SNE, хранившихся при 4°C, 25°C и 37°C в течение 1 месяца. См. Пример 11.

**Фигура 12B:** Концентрация сквалена (мг/мл), измеренная с помощью UPLC-CAD, для составов CLA-SNE и SNE, хранившихся при 4°C, 25°C и 37°C в течение 1 месяца. См. Пример 11.

**Фигура 13A:** Серотип-специфическая стабильность конъюгатов пневмококковой полисахарид-белок-носитель, приготовленных с CLA-SNE (1,2 мг/мл CLA, 6,5 мг/мл сквалена) и хранившихся при 4°C в течение 1 месяца. См. Пример 12.

**Фигура 13B:** Серотип-специфическая стабильность комбинированных составов конъюгатов пневмококковой полисахарид-белок-носитель, приготовленных с CLA-SNE (1,2 мг/мл CLA, 1,2 мг/мл сквалена) и хранившихся при 4°C до 1 месяца. См. Пример 12.

**Фигура 13C:** Серотип-специфическая стабильность комбинированных составов конъюгатов пневмококковой полисахарид-белок-носитель, приготовленных с SNE (6,5 мг/мл сквалена) и хранившихся при 4°C в течение 1 месяца. См. пример 12.

**Фигура 13D:** Серотип-специфическая стабильность комбинированных составов конъюгатов пневмококковой полисахарид-белок-носитель, приготовленных с SNE (0,4 мг/мл сквалена) и хранившихся при 4°C в течение 1 месяца. См. Пример 12.

**Фигура 14А:** Соотношение титров серотип-специфических IgG у взрослых макак-резусов после иммунизации PCV21, приготовленным с CLA-SNE, по сравнению с PCV21 (без адьюванта) после введения дозы 1 (день 14) [обозначается как D14PD1: квадратики]. Доза PCV21 0,25 мл (4 мкг/мл на ST), приготовленная с CLA-SNE (1200 мкг/мл CLA-SNE), приводит к такой же или лучшей иммуногенности по сравнению с дозой 0,25 мл PCV21 (4 мкг/мл на ST) на D14PD1. Данные о серотипах 6С и 15В включены для оценки перекрестной реактивности. См. пример 13.

**Фигура 14В:** Соотношение титров серотип-специфических IgG у взрослых макак-резусов после иммунизации PCV21, приготовленным с CLA-SNE, по сравнению с PCV21 (без адьюванта) после введения дозы 1 (день 28) [обозначается как D28PD1: квадратики]. Доза PCV21 0,25 мл (4 мкг/мл на ST), приготовленная с CLA-SNE (1200 мкг/мл CLA-SNE), приводит к такой же или лучшей иммуногенности по сравнению с дозой 0,25 мл PCV21 (4 мкг/мл на ST) на D28PD1. Данные для серотипов 6С и 15В включены для оценки перекрестной реактивности. См. Пример 13.

**Фигура 14С:** Соотношение титров серотип-специфических IgG у взрослых макак-резусов после иммунизации PCV21, приготовленным с CLA-SNE, по сравнению с PCV21 (без адьюванта) после введения дозы 2 (день 42) [обозначается как D42PD2: квадратики]. Доза PCV21 0,25 мл (4 мкг/мл на ST), приготовленная с CLA-SNE (1200 мкг/мл CLA-SNE), приводит к такой же или лучшей иммуногенности по сравнению с дозой 0,25 мл PCV21 (4 мкг/мл на ST) при D42PD2. Данные для серотипов 6С и 15В включены для оценки перекрестной реактивности. См. пример 13.

**Фигура 15А:** Соотношение CLA/сквален (мас./мас.) % после диализа нанесено на график против «целевого» соотношения (мас./мас.) % до самосборки. Соотношения CLA/сквален в мас./мас. % (X) измеряли с помощью UPLC-CAD с обращенной фазой до и после самосборки и диализа наноэмульсии. См. Пример 14.

**Фигура 15В:** Определенные при помощи DLS взвешенные по интенсивности Z-средние диаметры CLA-SNE наночастиц после диализа (X) нанесены на график в зависимости от измеренного соотношения CLA/сквален (мас./мас.) % после диализа для каждого состава MNS. См. Пример 14.

**Фигура 15С:** Измеренный дзета-потенциал CLA-SNE наночастиц сквалена (X) после диализа при pH 5,5 нанесен на график в зависимости от измеренного соотношения

CLA/сквален (мас./мас.) % после диализа для каждого из приготовленных составов MNS. См. пример 14.

**Фигура 16.** Определенные при помощи DLS Z-средние диаметры образцов CLA-SNE, сформированных и обработанных водной фазой (20 мМ L-гистидина) с увеличивающимися значениями pH. См. пример 15.

**Фигура 17.** Конечная концентрация [CLA] (мг/мл) образцов CLA-SNE, сформированных и обработанных водной фазой (20 мМ L-гистидин) с увеличивающимися значениями pH. См. Пример 15.

### **Подробное описание настоящего изобретения**

Неожиданно было обнаружено, что композиция пневмококкового конъюгата, содержащая стабильную наноэмульсионную (SNE) адъювантную композицию (с катионным липидом или без него), обеспечивает сравнимый или усиленный иммуногенный ответ по сравнению с композицией пневмококкового конъюгата, содержащей алюминий адъювант, и/или композицией пневмококкового конъюгата, содержащий адъювант LNP.

Настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и стабильную наноэмульсию (SNE).

Настоящее изобретение также относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, SNE, а также фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, содержащую эмульгатор, и/или солюбилизатор, и/или поверхностно-активное вещество, и необязательно катионный липид, или их смеси.

Настоящее изобретение также относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, содержащую поверхностно-активные вещества и/или терпены, или их смеси.

Настоящее изобретение далее относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, содержащую поверхностно-активные вещества, и/или терпены, и/или катионные липиды, или их смеси.

Настоящее изобретение далее относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, содержащую одно или несколько поверхностно-активных веществ и один или несколько терпенов и, необязательно, один или несколько катионных липидов.

Настоящее изобретение далее относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, содержащую от одного до трех поверхностно-активных веществ и от одного до трех терпенов и, необязательно, от одного до трех катионных липидов.

Настоящее изобретение далее относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, содержащую от одного до двух поверхностно-активных веществ и от одного до двух терпенов и, необязательно, от одного до двух катионных липидов.

Настоящее изобретение далее относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, где SNE содержит сорбитан триолеат (SPAN-85), полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80), сквален и, необязательно, катионный липид.

Настоящее изобретение далее относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, где SNE содержит сорбитан триолеат (SPAN-85), полисорбат-20 (PS-20), сквален и, необязательно, катионный липид.

Настоящее изобретение далее относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, где SNE содержит сорбитан триолеат (SPAN-85), полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80), сквален и катионный липид.

Настоящее изобретение далее относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, где SNE содержит сорбитан триолеат (SPAN-85), полисорбат-20 (PS-20), сквален и катионный липид.

Настоящее изобретение далее относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, где SNE включает сорбитан триолеат (SPAN-85), полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80), сквален и катионный липид (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин.

Настоящее изобретение далее относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-

носителем и SNE, где SNE содержит сорбитан триолеат (SPAN-85), полисорбат-20 (PS-20), сквален и катионный липид (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин.

Настоящее изобретение также относится к пневмококковой конъюгированной вакцине, содержащей 1) конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и 2) SNE, содержащую i) сорбитан триолеат (SPAN-85); (ii) полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS -80); iii) сквален; и, необязательно, iv) катионный липид. В некоторых вариантах осуществления изобретения пневмококковая конъюгированная вакцина не содержит катионного липида.

Настоящее изобретение также относится к пневмококковой конъюгированной вакцине, содержащей 1) конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и 2) SNE, содержащую i) сорбитан триолеат (SPAN-85); (ii) полисорбат-20 (PS-20); iii) сквален; и, необязательно, iv) катионный липид. В некоторых вариантах осуществления изобретения пневмококковая конъюгированная вакцина не содержит катионного липида.

Настоящее изобретение также относится к пневмококковой конъюгированной вакцине, содержащей 1) конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и 2) SNE, содержащую i) сорбитан триолеат (SPAN-85); (ii) полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); iii) сквален; и iv) катионный липид.

Настоящее изобретение также относится к пневмококковой конъюгированной вакцине, содержащей 1) конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и 2) SNE, содержащую i) сорбитан триолеат (SPAN-85); (ii) полисорбат-20 (PS-20); iii) сквален; и iv) катионный липид.

Настоящее изобретение также относится к пневмококковой конъюгированной вакцине, содержащей 1) конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и 2) SNE, содержащую i) сорбитан триолеат (SPAN-85); (ii) полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); iii) сквален и iv) (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин.

Настоящее изобретение также относится к пневмококковой конъюгированной вакцине, содержащей 1) конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и 2) SNE, содержащую i) сорбитан триолеат (SPAN-85); (ii) полисорбат-20 (PS-20); iii) сквален и iv) (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин.

Настоящее изобретение также относится к пневмококковой конъюгированной вакцине, содержащей 1) конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и 2) SNE, содержащую i) сорбитан триолеат (SPAN-85); (ii) полисорбат-20 (PS-

20) или полисорбат-80 (PS-80); iii) сквален и iv) катионный липид, где катионный липид не связан с липидной наночастицей (LNP).

Настоящее изобретение также относится к пневмококковой конъюгированной вакцине, содержащей 1) конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и 2) SNE, содержащую i) сорбитан триолеат (SPAN-85); (ii) полисорбат-20 (PS-20); iii) сквален и iv) катионный липид, где катионный липид не связан с липидной наночастицей (LNP).

Настоящее изобретение также относится к композиции пневмококкового конъюгата, как описано выше, содержащей фармацевтически приемлемый носитель.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция содержит катионный липид CLA, CLX или CLY.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция содержит катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция содержит катионный липид, выбранный из DLinDMA, DLinKC2DMA, DLin-MC3-DMA, CLinDMA и S-Octyl CLinDMA.

В одном из вариантов осуществления изобретения каждый из конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем в композиции содержит полисахарид конкретного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где полисахариды в конъюгатах содержат один или несколько серотипов, выбранных из любых известных серотипов, включая серотипы 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B, 35F и 38. В другом варианте осуществления изобретения серотипы содержат, состоят по существу из или состоят из серотипов 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F. В другом варианте осуществления изобретения серотипы содержат, состоят по существу из или состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F. В другом варианте осуществления изобретения серотипы содержат, состоят по существу из или состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F. В другом варианте осуществления изобретения серотипы содержат, состоят по существу из или состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F. В другом варианте осуществления изобретения серотипы содержат, состоят по существу из или состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. В другом варианте осуществления изобретения серотипы содержат, состоят по существу из или состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 18C, 19A, 19F,

22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. В другом варианте осуществления изобретения серотипы содержат, состоят по существу из или состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. В другом варианте осуществления изобретения серотипы содержат, состоят по существу из или состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В другом варианте осуществления изобретения серотипы содержат, состоят по существу из или состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В другом варианте осуществления изобретения серотипы содержат, состоят по существу из или состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В другом варианте осуществления изобретения серотипы содержат, состоят по существу из или состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В другом варианте осуществления изобретения серотипы содержат, состоят по существу из или состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В другом варианте осуществления изобретения серотипы содержат, состоят по существу из или состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В другом варианте осуществления изобретения серотипы содержат, состоят по существу из или состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В другом варианте осуществления изобретения серотипы содержат, состоят по существу из или состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В другом варианте осуществления изобретения серотипы содержат, состоят по существу из или состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B.

В одном из вариантов осуществления изобретения конъюгаты полисахарид-белок-носитель содержат полисахариды, выбранные из группы пневмококковых серотипов, состоящей из серотипов: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20 (20A и 20B), 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B, 35F или 38. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов состоит из серотипов 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов состоит из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов состоит из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F. В другом варианте

осуществления изобретения группа серотипов состоит из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов состоит из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов состоит из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, де-О-ацетилированного-15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов состоит из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов состоит из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15В, 16F, 17F, 19А, 20А, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов состоит из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, де-О-ацетилированного-15В, 16F, 17F, 19А, 20А, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов состоит из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15С, 16F, 17F, 19А, 20А, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В. В еще одном варианте осуществления изобретения группа серотипов состоит из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15В, 16F, 17F, 19А, 20, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов состоит из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, де-О-ацетилированного-15В, 16F, 17F, 19А, 20, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов состоит из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15С, 16F, 17F, 19А, 20, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов состоит из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, де-О-ацетилированного-15В, 16F, 17F, 19А, 20В, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов состоит из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15В, 16F, 17F, 19А, 20В, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов состоит из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, де-О-ацетилированного-15В, 16F, 17F, 19А, 20В, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов состоит из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15С, 16F, 17F, 19А, 20В, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 7 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и любую из стабильных наноэмульсий (SNE), описанных в настоящем документе, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 4, 6В, 9V, 14, 18С, 19F и 23F.



В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 13 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, как описано в настоящем документе, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 15 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, как описано в настоящем документе, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 20 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, как описано в настоящем документе, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, как описано в настоящем документе, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, как описано в настоящем документе, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, как описано в настоящем документе, где *Streptococcus pneumoniae* полисахариды состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат

полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, как описано в настоящем документе, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15В, 16F, 17F, 19А, 20, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, как описано в настоящем документе, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, де-О-ацетилированного-15В, 16F, 17F, 19А, 20, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, как описано в настоящем документе, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15С, 16F, 17F, 19А, 20, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 7 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 4, 6В, 9V, 14, 18С, 19F и 23F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80) и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 13 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F и 23F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 15 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и

дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 20 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, де-О-ацетилизованного-15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197 и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (СПАН-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15В,

16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилизованного-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 7 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален; и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 13 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален; и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 15 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды

*Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален; и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 20 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален; и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, де-О-ацетилизованного-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 7 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 13 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и

дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 15 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 20 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, де-О-ацетилизованного-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN -85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды

*Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15В, 16F, 17F, 19А, 20, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, де-О-ацетилированного-15В, 16F, 17F, 19А, 20, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15С, 16F, 17F, 19А, 20, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном варианте осуществления вышеуказанных композиций SNE содержит PS-20. В другом варианте осуществления вышеуказанных композиций SNE содержит PS-80.

В одном из вариантов осуществления указанных выше композиций композиции не содержат конъюгатов полисахарид-белок-носитель, содержащих полисахариды любых других серотипов *Streptococcus pneumoniae*.

В одном из вариантов осуществления композиций по изобретению белок-носитель выбран из OMPC, PhtD, pLys, DT (дифтерийный анатоксин), TT (столбнячный анатоксин),



С фрагмента ТТ, анатоксина коклюша, анатоксина холеры и CRM197. В другом варианте осуществления изобретения белок-носитель представляет собой CRM197.

Настоящее изобретение относится к указанным выше композициям, дополнительно содержащим от 5 мМ до 40 мМ гистидина при рН 5,1-7,0 и от 25 мМ до 300 мМ NaCl.

Настоящее изобретение относится к указанным выше композициям, дополнительно содержащим около 20 мМ гистидина при рН около 5,8 и около 75 мМ NaCl.

Настоящее изобретение относится к указанным выше композициям, дополнительно содержащим 20 мМ гистидина при рН 5,8 и 75 мМ NaCl.

Настоящее изобретение относится к указанным выше композициям, дополнительно содержащим от 5 мМ до 40 мМ гистидина при рН 5,1-7,0; 0,0125 - 0,2% PS-20 или PS-80 и от 25 мМ до 300 мМ NaCl.

Настоящее изобретение относится к указанным выше композициям, дополнительно содержащим около 20 мМ гистидина при рН около 5,8, 0,05% PS-20 или PS-80 и около 75 мМ NaCl.

Настоящее изобретение относится к указанным выше композициям, дополнительно содержащим 20 мМ гистидина при рН 5,8, 0,05% PS-20 или PS-80 и 75 мМ NaCl.

Настоящее изобретение также относится к способу получения композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 1) конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и 2) SNE, включающую i) сорбитан триолеат (SPAN-85); (ii) полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); iii) сквален и, необязательно, iv) катионный липид.

Настоящее изобретение также относится к способу получения композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 1) конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и 2) SNE, включающую i) сорбитан триолеат (SPAN-85); (ii) полисорбат-20 (PS-20); iii) сквален и, необязательно, iv) катионный липид.

Настоящее изобретение также относится к способу получения композиции пневмококкового конъюгата, содержащей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения или профилактики пневмококковых инфекций с помощью композиции пневмококкового конъюгата по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к применению композиции пневмококкового конъюгата по настоящему изобретению для лечения или профилактики пневмококковых инфекций.

## Определения

На протяжении всего описания и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа «а», «an» и «the» включают ссылку на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

На протяжении всего описания и в прилагаемой формуле изобретения применяются следующие сокращения и определения:

APA	адъювант фосфат алюминия
CLA	((13Z,16Z)-N,N- диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин)
DMSO	диметилсульфоксид
ECL	электрохемилюминесценция
GMT	среднее геометрическое титров
HPSEC	высокоэффективная эксклюзионная хроматография
ID	внутрикожно
IM	внутримышечно
LNP	липидная наночастица
LOS	липоолигосахарид
LPS	липополисахарид
ME	микроэмульсия
MNS	самосборка микрофлюидной наноэмульсии
Mw	молекулярная масса
NE	наноэмульсия
NMWCO	номинальная молекулярная масса отсечения
OPA	опсонофагоцитарный анализ
PCV	пневмококковая конъюгированная вакцина
PD1	после дозы 1
PD2	после дозы 2
PD3	после дозы 3
PHE	предварительно гомогенизированная эмульсия
PnPs	пневмококковый полисахарид
Ps	полисахарид
PS-20	Полисорбат-20
PS-80	Полисорбат -80
SNE	стабильная наноэмульсия
SPAN-85	сорбитана триолеат

ST6B or ST-6B	серотип 6B
w/v	масса на объем (мас./об.)

В контексте настоящего документа термин «приблизительно», когда он используется в отношении численного значения, относится к значению, которое является таким же или, согласно контексту, близким указанному значению. Как правило, специалистам в данной области техники, знакомым с контекстом, понятна абсолютная величина и/или относительная степень отличия, охватываемая словом «приблизительно» в данном контексте. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения термин «приблизительно» может охватывать диапазон значений, которые находятся в пределах 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % или менее от указанного значения.

В контексте настоящего документа термин «алкенил» относится к ненасыщенному алифатическому углеводороду с прямой, циклической или разветвленной цепью, содержащему определенное число атомов углерода. В одном из вариантов осуществления изобретения алкенильная группа содержит от 8 до 24 атомов углерода (C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub> алкенил). В одном из вариантов осуществления изобретения алкенильная группа представляет собой линейную группу. В другом варианте осуществления изобретения алкенильная группа представляет собой разветвленную группу. В следующем варианте осуществления изобретения алкенильная группа является незамещенной.

В контексте настоящего документа термин «алкил» относится к линейному, циклическому или разветвленному насыщенному алифатическому углеводороду, содержащему определенное число атомов углерода. В одном варианте осуществления изобретения алкильная группа содержит от 8 до 24 атомов углерода (C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub> алкил). В одном из вариантов осуществления изобретения алкильная группа представляет собой линейную группу. В другом варианте осуществления изобретения алкильная группа представляет собой разветвленную группу. В следующем варианте осуществления изобретения алкильная группа является незамещенной.

«Адьювант» в контексте настоящего изобретения представляет собой вещество, которое служит для усиления (например, увеличения, ускорения, пролонгации или модулирования) иммуногенности композиции по изобретению. Как раскрыто в настоящем документе, в качестве адьюванта в соответствии с настоящим изобретением следует использовать SNE. Адьювант может усиливать иммунный ответ на антиген, который является слабоиммуногенным при введении отдельно, например, не индуцирующим титры антител или индуцирующим слабые титры антител, или клеточно-опосредованный

иммунный ответ; повышать титры антител к антигену и/или снижать дозу антигена, эффективную для достижения иммунного ответа у человека. В контексте настоящего документа термин «композиция с адьювантом» представляет собой композицию, содержащую адьювант.

В контексте настоящего документа термин «введение» относится к акту доставки активного агента, композиции или состава субъекту. Введение в человеческий организм может осуществляться через глаза (офтальмологическим путем), рот (перорально), кожу (трансдермально), нос (назально), легкие (ингаляционно), ректально, вагинально, через слизистую оболочку полости рта (буккально), ухо, путем инъекции (например, внутривенно (IV), подкожно, внутриопухолево, внутрибрюшинно, внутримышечно (IM), внутрикожно (ID) и т.д.) и т.п.

Термин «антиген» относится к любому антигену, который может вызывать один или несколько иммунных ответов. Антиген может быть белком (включая рекомбинантные белки), полипептидом или пептидом (включая синтетические пептиды). В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой липид или углевод (полисахарид). В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой белковый экстракт, клетку (включая опухолевую клетку) или ткань. Антиген может представлять собой антиген, вызывающий гуморальный и/или CTL-иммунный ответ. Антигены по настоящему изобретению представляют собой полисахариды *Streptococcus pneumoniae*.

Термин «катионный липид» относится к видам липидов, которые несут суммарный положительный заряд при выбранном pH, таком как физиологический pH. Катионный липид может использоваться в качестве ингредиента в составе многокомпонентного адьюванта SNE. Специалистам в данной области техники будет ясно, что катионные липиды могут включать липиды, раскрытые в публикациях патентных заявок США № US 2008/0085870, US 2008/0057080, US 2009/0263407, US 2009/0285881, US 2010/0055168, US2010/0055169, US2010/0063135, US2010/0076055, US2010/0099738, US2010/0104629, US2013/0017239 и US2016/0361411, публикациях международных заявок WO2011/022460, WO 2012/040184, WO2011/076807, WO2010/ 021865 , WO 2009/132131, WO2010/042877, WO2010/146740 и WO2010/105209, а также патентов США US5,208,036, US5,264,618, US5,279,833, US5,283,185, US6,890,557 и US 9,669,097, но не ограничиваются ими.

В контексте настоящего документа термин «композиция» относится к составу, содержащему активный фармацевтический или биологический ингредиент (например, конъюгат пневмококкового полисахарида с белком-носителем и SNE) вместе с одним или несколькими дополнительными компонентами. Термин «композиция» используется

взаимозаменяемо с терминами «фармацевтическая композиция» и «состав». Композиции могут быть жидкими или твердыми (например, лиофилизированными). Дополнительные компоненты, которые могут быть включены в случае необходимости, включают фармацевтически приемлемые эксципиенты, добавки, разбавители, буферы, сахара, аминокислоты, хелатирующие агенты, поверхностно-активные вещества, полиолы, наполнители, стабилизаторы, лиопротекторы, солубилизаторы, эмульгаторы, соли, адъюванты, повышающие тоничность агенты, средства доставки и противомикробные консерванты. В используемых дозировках и концентрациях композиции нетоксичны для реципиентов.

Термин «содержит» при использовании в отношении композиции по изобретению относится к включению любых других компонентов, таких как адъюванты и эксципиенты, или к добавлению одного или нескольких конъюгатов полисахарид-белок-носитель, которые не перечислены специально.

Термин «состоящий из» или «состоит из» при использовании в отношении композиции(ий) конъюгата мультивалентного полисахарида с белком-носителем относится к составу, содержащему указанные конкретные конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и не содержащему других конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* других серотипов с белком-носителем.

«Состоит по существу из» и варианты, такие как «состоять по существу из» или «состоящий по существу из», указывают на включение любых перечисленных элементов или группы элементов, а также на необязательное включение других элементов такой же или иной природы, по сравнению с указанными элементами, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного режима дозирования, способа или композиции.

В контексте настоящего документа термин «де-О-ацетилированный-15В», или «де-О-ацетил-15В», или «де-О-Ас-15В» относится к де-О-ацетилированному серотипу 15В, в котором содержание О-ацетила составляет менее 5% на повторяющееся звено. В другом варианте осуществления изобретения содержание О-ацетила составляет менее 1% на повторяющееся звено. В другом варианте осуществления изобретения содержание О-ацетила составляет менее 0,5% на повторяющееся звено. В еще одном варианте осуществления изобретения содержание О-ацетила составляет менее 0,1% на повторяющееся звено. Способы де-О-ацетилирования известны в данной области техники, например, описаны в Rajam et al., *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, 14(9):1223-1227.

В контексте настоящего документа термин «доза» означает количество агента, API (активного фармацевтического ингредиента), состава или композиции, принятое или рекомендованное для приема в определенное время.

В контексте настоящего документа термин «иммуногенный» или «иммуногенность» относится к способности антигена вызывать иммунный ответ у субъекта. Термин «иммуногенная композиция» относится к способности агента, API, состава или композиции вызывать иммунный ответ у субъекта. Композиции пневмококковых конъюгатов по настоящему изобретению представляют собой иммуногенные композиции.

К «нуждающимся в лечении» относятся те, кто ранее подвергся воздействию или был инфицирован *Streptococcus pneumoniae*, те, кто ранее был вакцинирован против *Streptococcus pneumoniae*, а также те, кто предрасположен к инфекции, или любое лицо, у которого желательное снижение вероятности заражения, например, люди с ослабленным иммунитетом, пожилые люди, дети, взрослые или здоровые люди.

Фраза «предназначена для профилактики пневмококковой инфекции» означает, что вакцина или композиция одобрены одним или несколькими регуляторными органами, такими как Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), для профилактики одного или нескольких заболеваний, вызванных любым серотипом *Streptococcus pneumoniae*, включая, но не ограничиваясь следующими: пневмококковая инфекция в целом, пневмококковая пневмония, пневмококковый менингит, пневмококковая бактериемия, инвазивное заболевание, вызванное *Streptococcus pneumoniae*, и средний отит, вызванный *Streptococcus pneumoniae*.

В контексте настоящего документа термин «липид» относится к любому из группы органических соединений, которые представляют собой сложные эфиры жирных кислот и характеризуются нерастворимостью в воде или низкой растворимостью в воде, но могут быть растворимы во многих органических растворителях. Липиды можно разделить по крайней мере на три класса: (1) «простые липиды», которые включают, например, жиры и масла, а также воски; (2) «составные липиды», которые включают, например, фосфолипиды и гликолипиды; и (3) «производные липидов», которые включают, например, стероиды.

В контексте настоящего документа термин «липидная наночастица» (или «LNP») относится к липидной композиции, которая образует частицу, имеющую длину или ширину (например, максимальное значение длины или ширины) от 10 до 1000 нанометров и содержащую более чем один класс и/или тип липидов. Например, согласно настоящему

изобретению липидная наночастица не может состоять исключительно из катионных липидов.

В контексте настоящего документа термин «нейтральный липид» относится к видам липидов, которые при выбранном рН существуют либо в незаряженной, либо в нейтральной цвиттер-ионной форме. При физиологическом рН такие липиды включают, например, диацилфосфатидилхолин, диацилфосфатидилэтаноламин, церамид, сфингомиелин, кефалин, холестерин, цереброзиды и диацилглицеролы.

«Пациент» (альтернативно называемый здесь «субъект») относится к млекопитающему, которое может быть инфицировано *Streptococcus pneumoniae*. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения пациент представляет собой человека. Пациент может подвергаться профилактическому или терапевтическому лечению. Профилактическое лечение обеспечивает достаточный защитный иммунитет, чтобы снизить вероятность или тяжесть пневмококковой инфекции или ее последствий, например пневмококковой пневмонии. Терапевтическое лечение может проводиться для снижения тяжести или предотвращения рецидива инфекции *Streptococcus pneumoniae* или ее клинических симптомов. Профилактическое лечение может проводиться с использованием композиции пневмококкового конъюгата или вакцины по изобретению, как описано в настоящем документе. Композиции пневмококковых конъюгатов или вакцины по изобретению могут вводиться населению в целом или лицам с повышенным риском пневмококковой инфекции, например, пожилым людям или тем, кто живет с пожилыми людьми или ухаживает за ними.

«PCV1» в контексте настоящего документа обозначает 1-валентную пневмококковую конъюгированную вакцину или композицию, содержащую один конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* и белка-носителя, содержащий капсулярный полисахарид серотипа *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем. В конкретных вариантах осуществления изобретения белок-носитель представляет собой CRM197.

«PCV13» в контексте настоящего документа обозначает 13-валентную пневмококковую конъюгированную вакцину или композицию, содержащую тринадцать конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, каждый из которых содержит капсулярный полисахарид серотипа *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* представляют собой серотипы: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F. В конкретных вариантах осуществления изобретения белок-носитель в каждом из

конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем представляет собой CRM197.

«PCV21» в контексте настоящего документа обозначает 21-валентную пневмококковую конъюгированную вакцину или композицию, содержащую двадцать конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, каждый из которых содержит капсулярный полисахарид серотипа *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* представляют собой серотипы: 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, и один из следующих серотипов серогруппы 15: 15B, 15C или де-О-ацетилированный-15B. В конкретном варианте осуществления изобретения серотип серогруппы 15 представляет собой серотип 15C или де-О-ацетилированный-15B. В другом варианте осуществления изобретения серотип серогруппы 15 представляет собой де-О-ацетилированный-15B. В конкретных вариантах осуществления изобретения белок-носитель одного или нескольких конъюгатов с полисахаридом *Streptococcus pneumoniae* представляет собой CRM197. В дополнительных вариантах осуществления изобретения белок-носитель каждого из конъюгатов с полисахаридом *Streptococcus pneumoniae* представляет собой CRM197.

«PCV24» обозначает 24-валентную пневмококковую конъюгированную вакцину или композицию, содержащую двадцать три конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, каждый из которых содержит капсулярный полисахарид серотипа *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* представляют собой серотипы: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, и один из следующих серотипов серогруппы 15: 15B, 15C или де-О-ацетилированный-15B. В конкретном варианте осуществления изобретения серотип серогруппы 15 представляет собой серотип 15C или де-О-ацетилированный-15B. В другом варианте осуществления изобретения серотип серогруппы 15 представляет собой де-О-ацетилированный серотип 15B. В конкретных вариантах осуществления изобретения белок-носитель одного или нескольких конъюгатов с полисахаридом *Streptococcus pneumoniae* представляет собой CRM197. В дополнительных вариантах осуществления изобретения белок-носитель каждого из конъюгатов с полисахаридом *Streptococcus pneumoniae* представляет собой CRM197.

В отношении носителя, разбавителя или наполнителя фармацевтической композиции термин «фармацевтически приемлемый» означает, что носитель, разбавитель или наполнитель должны быть совместимы с другими ингредиентами композиции и не оказывать вредного воздействия на реципиента.



В контексте настоящего документа термин «пневмококковый конъюгат» или «конъюгат пневмококкового полисахарида с белком-носителем» относится к конъюгату полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем.

В контексте настоящего документа термин «пневмококковая конъюгированная вакцина» (или «PCV») обозначает фармацевтический препарат или композицию, содержащую конъюгат(ы) пневмококкового полисахарида с белком-носителем, которые обеспечивают активный иммунитет к заболеванию или патологическим состояниям, вызванным серотипом(ами) *Streptococcus pneumoniae*.

В контексте настоящего документа термины «стабильная наноэмульсия» или «SNE» относятся к композиции эмульгаторов, и/или солюбилизаторов, и/или поверхностно-активных веществ, и/или липидов, которые обладают свойствами адьюванта в пневмококковой конъюгированной вакцине. В частности, SNE относится к композиции SNE с адьювантом, включающей 1) сорбитан триолеат (SPAN-85); 2) полисорбат-20 (PS-20); 3) сквален и, необязательно, 4) катионный липид.

«Поверхностно-активные вещества» представляют собой стабилизирующие ингредиенты в составе многокомпонентного адьюванта SNE и включают такие сурфактанты, как сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана (обычно называемые Твинами, в частности, PS-20 и PS-80), сополимеры этиленоксида (EO), пропиленоксида (PO) и/или оксид бутилена (BO), продаваемый под торговой маркой DOWFAX™, линейные EO/PO блок-сополимеры (полуксамеры); октоксинолы, которые могут различаться по количеству повторяющихся этокси(окси-1,2-этандиильных) групп, причем особый интерес представляет октоксинол-9 (тритон X-100 или трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол); (октилфенокси)полиэтоксиэтанол (IGEPAL CA-630/NP-40); этоксилаты нонилфенола, такие как серия Tergitol™ NP; жирные эфиры полиоксиэтилена, полученные из лаурилового, цетилового, стеарилового и олеилового спиртов (известные как сурфактанты Brij), такие как монолауриловый эфир триэтиленгликоля (Brij 30); и сложные эфиры сорбитана (широко известные как SPAN), такие как сорбитан триолеат (Span-85, Tween-85 или [2-[(2R,3S,4R)-4-гидрокси-3-[(Z)-октадек-9-еноил]оксиоксолан-2-ил]-2-[(Z)-октадек-9-еноил]оксиэтил](Z)-октадек-9-еноат) и сорбитан монолаурат. В одном из вариантов осуществления изобретения сурфактанты представляют собой сложные эфиры сорбитана и полуксамеры. В одном из вариантов осуществления изобретения сурфактанты представляют собой полисорбат-20 (PS-20) и полисорбат-80 (PS-80).

«Терпены» представляют собой стабилизирующие ингредиенты в составе многокомпонентного адьюванта SNE и включают, но не ограничиваются следующими:

монотерпены, включая гераниол, терпинеол, лимонен, мирцен, линалоол и пинен; сесквитерпены, включая гумулен, фарнезены и фарнезол; дитерпены, включая кафестол, кахвеол, цембрен и таксадиен; тритерпены, включая сквален и сквалан; тетратерпены, включая ациклический ликопин, моноциклический гамма-каротин, бициклические альфа- и бета-каротины; политерпены и норисопреноиды. В одном из вариантов осуществления изобретения терпен представляет собой сквален.

Термин «терапевтически эффективное количество» обозначает количество композиции или вакцины, достаточное для получения желаемого терапевтического эффекта у человека или животного, например количество, необходимое для индукции иммунного ответа, лечения, излечения, предотвращения или ингибирования развития и прогрессирования заболевания или его симптомов и/или количество, необходимое для облегчения симптомов или вызывающее регрессию заболевания. Специалист в данной области техники может легко определить терапевтически эффективное количество данной композиции или вакцины.

В контексте настоящего документа термин «валентный» относится к присутствию в композиции определенного количества конъюгатов полисахарид-белок-носитель.

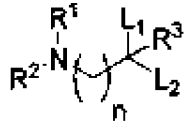
В контексте настоящего документа термин «вакцина» или «вакцинная композиция» относится к биологическому препарату, используемому для стимуляции производства антител и обеспечения иммунитета против инфекционного заболевания.

### *Катионные липиды*

Катионные липиды и способы получения катионных липидов хорошо известны в данной области.

В некоторых вариантах осуществления изобретения катионный липид включает любой катионный липид, упомянутый в публикациях патентных заявок США: US 2008/0085870, US 2008/0057080, US 2009/0263407, US 2009/0285881, US 2010/0055168, US 2010/0055169, US 2010/0063135, US 2010/0076055, US 2010/0099738, US 2010/0104629, US 2013/0017239 и US 2016/0361411, публикациях международных патентных заявок WO2011/022460 A1; WO2012/040184, WO2011/076807, WO2010/021865, WO2009/132131, WO 2010/042877, WO2010/146740, WO2010/105209 и в патентах США 5,208,036, 5,264,618, 5,279,833, 5,283,185, 6,890,557 и 9,669,097.

В некоторых вариантах осуществления изобретения катионные липиды по настоящему изобретению имеют следующую структуру, представленную Формулой 1:



Формула 1

где:

каждый из  $R^1$  и  $R^2$  представляют собой метил;

$R^3$  представляет собой H;

n равно 1 или 2;

$L_1$  выбран из  $C_8$ - $C_{24}$  алкила и  $C_8$ - $C_{24}$  алкенила; и

$L_2$  выбран из  $C_4$ - $C_9$  алкила и  $C_4$ - $C_9$  алкенила;

или любую ее фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер.

Катионный липид может представлять собой аминоалкильный липид.

Катионный липид может представлять собой асимметрический аминоалкильный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения катионный липид представляет собой (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин (CLA); или (6Z,9Z,26Z,29Z)-N,N-диметилпентатриаконта-6,9,26,29-тетраен-18-амин (CLX); или N,N-диметил-1-((1S,2R)-2-октилциклопропил)гептадекан-8-амин (CLY).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения катионный липид выбран из:

DLinDMA;

DLinKC2DMA;

DLin-MC3-DMA;

CLinDMA;

S-октил CLinDMA;

(2S)-1-{7-[(3P)-холест-5-ен-3-илокси]гептилокси}-3-[(4Z)-дец-4-ен-1-илокси]-N,N-диметилпропан-2-амин;

(2R)-1-{4-[(3P)-холест-5-ен-3-илокси]бутоксид}-3-[(4Z)-дец-4-ен-1-илокси]-N,N-диметилпропан-2-амин;

1-[(2R)-1-{4-[(3β)-холест-5-ен-3-илокси]бутоксид}-3-(октилокси)пропан-2-ил]гуанидин;

1-[(2R)-1-{7-[(3β)-холест-5-ен-3-илокси]гептилокси}-N,N-диметил-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]пропан-2-амин];

1-[(2R)-1-{4-[(3β)-холест-5-ен-3-илокси]бутоксид}-N,N-диметил-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]пропан-2-амин];

(2S)-1-({6-[(3P)-холест-5-ен-3-илокси]гексил}окси)-N,N-диметил-3-[(9Z)-октадец-9-ен-1-илокси]пропан-2-амина;

(3β)-3-[6-{{(2S)-3-[(9Z)-октадек-9-ен-1-илоксил]-2-(пирролидин-1-ил)пропил}окси}гексил)окси] холест-5-ена;

(2R)-1-{4-[(3P)-холест-5-ен-3-илокси]бутоксис}-3-(октилокси)пропан-2-амина;

(2R)-1-({8-[(3P)-холест-5-ен-3-илокси]октил}окси)-N,N-диметил-3-(пентилокси)пропан-2-амина;

(2R)-1-({8-[(3P)-холест-5-ен-3-илокси]октил}окси)-3-(гептилокси)-N,N-диметилпропан-2-амина;

(2R)-1-({8-[(3P)-холест-5-ен-3-илокси]октил}окси)-N,N-диметил-3-[(2Z)-пент-2-ен-1-илокси]пропан-2-амина;

(2S)-1-бутоксис-3-({8-[(3P)-холест-5-ен-3-илокси]октил}окси)-N,N-диметилпропан-2-амина;

(2S)-1-({8-[(3P)-холест-5-ен-3-илокси]октил}окси)-3-[2,2, 3,3, 4,4, 5,5, 6,6, 7,7, 8,8, 9,9-гексадекафторонил)окси]-N,N-диметилпропан-2-амина;

2-амино-2-{{(9Z, 12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]метил}пропан-1,3-диола;

2-амино-3-({9-[(3β,8ξ,9ξ,14ξ,17ξ,20ξ)-холест-5-ен-3-илокси]нонил}окси)-2-{{(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]метил}пропан-1-ола;

2-амино-3-({6-[(3β,8ξ,9ξ,14ξ,17ξ,20ξ)-холест-5-ен-3-илокси]нонил}окси)-2-{{(9Z)-октадец-9-ен-1-илокси]метил}пропан-1-ола;

(20Z,23Z)-N,N-диметилнонакоза-20,23-диен-10-амина;

(17Z,20Z)-N,N-диметилгексакоза-17,20-диен-9-амина;

(16Z,19Z)-N,N-диметилпентакоза-16,19-диен-8-амина;

(13Z,16Z)-N,N-диметилдокоза-13,16-диен-5-амина;

(12Z,15Z)-N,N-диметилгеникоза-12,15-диен-4-амина;

(14Z,17Z)-N,N-диметилтрикоза-14,17-диен-6-амина;

(15Z,18Z)-N,N-диметилтетракоза-15,18-диен-7-амина;

(18Z,21Z)-N,N-диметилгептакоза-18,21-диен-10-амина;

(15Z,18Z)-N,N-диметилтетракоза-15,18-диен-5-амина;

(14Z,17Z)-N,N-диметилтрикоза-14,17-диен-4-амина;

(19Z,22Z)-N,N-диметилоктакоза-19,22-диен-9-амина;

(18Z,21Z)-N,N-диметилгептакоза-18,21-диен-8-амина;

(17Z,20Z)-N,N-диметилгексакоза-17,20-диен-7-амина;

(16Z,19Z)-N,N-диметилпентакоза-16,19-диен-6-амина;

(22Z,25Z)-N,N-диметилгентриаконта-22,25-диен-10-амина;

(21Z,24Z)-N,N-диметилтриаконта-21,24-диен-9-амина;  
 (18Z)-N,N-диметилгептакоз-18-ен-10-амина;  
 (17Z)-N,N-диметилгексакоз-17-ен-9-амина;  
 (19Z,22Z)-N,N-диметилоктакоза-19,22-диен-7-амина;  
 N,N-диметилгептакозан-10-амина;  
 (20Z,23Z)-N-этил-N-метилнонакоза-20,23-диен-10-амина;  
 1-[(11Z,14Z)-1-нонилкоза-11,14-диен-1-ил]пирролидина;  
 (20Z)-N,N-диметилгептакос-20-ен-10-амина;  
 (15Z)-N,N-диметилгептакос-15-ен-10-амина;  
 (14Z)-N,N-диметилнонакос-14-ен-10-амина;  
 (17Z)-N,N-диметилнонакос-17-ен-10-амина;  
 (24Z)-N,N-диметилтриаконт-24-ен-10-амина;  
 (20Z)-N,N-диметилнонакос-20-ен-10-амина;  
 (22Z)-N,N-диметилгентриаконт-22-ен-10-амина;  
 (16Z)-N,N-диметилпентакос-16-ен-8-амина;  
 (12Z,15Z)-N,N-диметил-2-нонилгеникоза-12,15-диен-1-амина;  
 (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилкоза-13,16-диен-1-амина;  
 N,N-диметил-1-[(1S,2R)-2-октилциклопропил]гептадекан-8-амина;  
 1-[(1S,2R)-2-гексилциклопропил]-N,N-диметилнонадекан-10-амина;  
 N,N-диметил-1-[(1S,2R)-2-октилциклопропил]нонадекан-10-амин;  
 N,N-диметил-21-[(1S,2R)-2-октилциклопропил]геникозан-10-амина;  
 N,N-диметил-1-[(1S,2S)-2-{{(1R,2R)-2-пентилциклопропил}метил}циклопропил]-  
 наонадекан-10-амина;  
 N,N-диметил-1-[(1S,2R)-2-октилциклопропил]гексадекан-8-амина;  
 N,N-диметил-1-[(1R,2S)-2-ундецилциклопропил]тетрадекан-5-амина;  
 N,N-диметил-3-{{7-[(1S,2R)-2-октилциклопропил]гептил}додекан-1-амина;  
 1-[(1R,2S)-2-гептилциклопропил]-N,N-диметилоктадекан-9-амина;  
 1-[(1S,2R)-2-децилциклопропил]-N,N-диметилпентадекан-6-амина;  
 N,N-диметил-1-[(1S,2R)-2-октилциклопропил]пентадекан-8-амина; и  
 (11E,20Z,23Z)-N,N-диметилнонакоза-1,20,23-триен-10-амина;  
 или фармацевтически приемлемой соли, или стереоизомера любого из  
 вышеперечисленных соединений.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения катионный липид  
 выбран из (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилкоза-13,16-диен-1-амина или его  
 фармацевтически приемлемой соли или стереоизомера.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения катионный липид представляет собой (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин (CLA).

Настоящее изобретение, среди прочего, относится к композиции, которая содержит пневмококковые конъюгаты и 3 компонента SNE: 1) сорбитан триолеат (SPAN-85); 2) полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80) и 3) сквален.

В некоторых вариантах осуществления изобретения SNE содержит 32-97 мольных % сквалена, 1-34 мольных % SPAN-85 и 1-34 мольных % PS-20 или PS-80.

В некоторых вариантах осуществления изобретения SNE содержит 86-98 мольных % сквалена, 1-7 мольных % SPAN-85 и 1-7 мольных % PS-20 или PS-80.

В некоторых вариантах осуществления изобретения SNE содержит 92-94 мольных % сквалена, 3-4 мольных % SPAN-85 и 3-4 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения SNE включает 92,91 мольных % сквалена, 3,98 мольных % SPAN-85 и 3,11 мольных % PS-20 или PS-80.

Настоящее изобретение, среди прочего, относится к композиции, которая содержит пневмококковые конъюгаты и 4 компонента SNE: 1) катионный липид; 2) сорбитан триолеат (SPAN-85); 3) полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80) и 4) сквален. Конкретная композиция SNE содержит катионный липид (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин («CLA» или, когда катионный липид включен в SNE, «CLA-SNE»).

В некоторых вариантах осуществления изобретения SNE содержит 1-60 мольных % катионного липида, 32-97 мольных % сквалена, 1-4 мольных % SPAN-85 и 1-4 мольных % PS-20 или PS-80.

В некоторых вариантах осуществления изобретения SNE содержит 10-14 мольных % катионного липида, 78-84 мольных % сквалена, 1-6 мольных % SPAN-85 и 1-6 мольных % PS-20 или PS-80.

В некоторых вариантах осуществления изобретения SNE содержит 40-46 мольных % катионного липида, 44-52 мольных % сквалена, 1-8 мольных % SPAN-85 и 1-8 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения SNE содержит 13,82 мольных % катионного липида, 80,07 мольных % сквалена, 3,43 мольных % SPAN-85 и 2,68 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения SNE содержит 44,5 мольных % катионного липида, 51,56 мольных % сквалена, 2,21 мольных % SPAN-85 и 1,72 мольных % PS-20 или PS-80.

В некоторых вариантах осуществления изобретения SNE дополнительно содержит один или несколько некаатионных липидов, которые могут быть выбраны из поверхностно-активного вещества, смеси поверхностно-активных веществ, фосфолипида, терпена, терпеноида, тритерпена или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения поверхностно-активное вещество может включать: поверхностно-активные вещества на основе сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана (обычно называемые Твинами), предпочтительно PS-20 и PS-80; сополимеры этиленоксида (EO), пропиленоксида (PO) и/или бутиленоксида (BO), продаваемые под торговой маркой DOWFAX™, такие как линейные EO/PO блок-сополимеры; октоксинолы, которые могут различаться по количеству повторяющихся этокси(окси-1,2-этандиольных) групп, причем особый интерес представляет октоксинол-9 (тритон X-100 или трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол); (октилфенокси)-полиэтоксиэтанол (IGEPAL CA-630/NP-40); этоксилаты нонилфенола, такие как серия Tergitol™ NP; жирные эфиры полиоксиэтилена, полученные из лаурилового, цетилового, стеарилового и олеилового спиртов (известные как сурфактанты Brij), такие как монолауриловый эфир триэтиленгликоля (Brij 30); и сложные эфиры сорбитана (широко известные как SPAN), такие как сорбитана триолеат (Span-85, Tween-85 или [2-[(2*R*,3*S*,4*R*)-4-гидрокси-3-[(*Z*)-октадек-9-еноил]оксиоксолан-2-ил]-2-[(*Z*)-октадек-9-еноил]-оксиэтил]-(*Z*)-октадек-9-еноат) и сорбитана монолаурат, но не ограничивается ими.

В некоторых вариантах осуществления изобретения могут быть использованы смеси поверхностно-активных веществ, например смеси PS-20/Span 85 или PS-80/Span 85. Комбинация сложного эфира полиоксиэтиленсорбитана, такого как моноолеат полиоксиэтиленсорбитана (PS-80), и октоксинола, такого как *t*-октилфеноксиполиэтоксиэтанол (Triton X-100), также является подходящей. Другая подходящая комбинация включает лаурет 9 плюс сложный эфир полиоксиэтиленсорбитана и/или октоксинол.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предпочтительные количества поверхностно-активных веществ или эмульгаторов составляют: сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана (такие как PS-20 или PS-80) от 0,01 до 10 мольных %, в частности, около от 1 до 4 мольных %; октил- или нонилфеноксиполиоксиэтанола (такие как Triton X-100 или другие детергенты из серии Triton) от 0,001 до 10 мольных %, в частности, около от 1 до 4 мольных %; мас./об., в частности, от 0,01 до 0,1 мас./об. %; полиоксиэтиленовые эфиры (такие как лаурет 9) от 0,1 до 20 мольных %, предпочтительно от 0,5 до 10 мольных % и, в частности, от 1 до 4 мольных % или около 10 % по массе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фосфолипиды могут включать, среди прочего, природные фосфолипиды, включая фосфатидилхолин (PC), фосфатидилэтаноламин (PE) и фосфатидилглицерин (PG), фосфатидилсерин (PS), фосфатидилинозитол (PI), фосфатидную кислоту (фосфатидат) (PA), дипальмитоилфосфатидилхолин, моноацилфосфатидилхолин (лизо PC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC), N-ацил-PE, фосфоинозитиды и фосфосфинголипиды. Производные фосфолипидов включают фосфатидную кислоту (DMPA, DPPA, DSPA), фосфатидилхолин (DDPC, DLPC, DMPC, DPPC, DSPC, DOPC, POPC, DEPC), фосфатидилглицерин (DMPG, DPPG, DSPG, POPG), фосфатидилэтаноламин (DMPE, DPPE, DSPE DOPE), фосфатидилсерин (DOPS). Жирные кислоты включают C14:0, пальмитиновую кислоту (C16:0), стеариновую кислоту (C18:0), олеиновую кислоту (C18:1), линолевую кислоту (C18:2), линоленовую кислоту (C18:3) и арахидоновую кислоту (C20:4), C20:0, C22:0 и лецитин. В некоторых вариантах осуществления изобретения фосфолипид может представлять собой фосфатидилсерин, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), 1,2-дипальмитолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин, 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC), дилауроилфосфатидилхолин (DLPC), 1,2-диикоконоил-sn-глицеро-3-фосфохолин или 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC).

В некоторых вариантах осуществления изобретения терпен может включать, помимо прочего, монотерпены, включая гераниол, терпинеол, лимонен, мирцен, линалоол или пинен; сесквитерпены в том числе гумулен, фарнезены, фарнезол; дитерпены, включая кафестол, кахвеол, цембрен и таксадиен, тритерпены, включая сквален и сквалан; тетратерпены, включая ациклический ликопин, моноциклический гамма-каротин и бициклические альфа- и бета-каротины; политерпены и норисопреноиды. В некоторых вариантах осуществления изобретения терпен представляет собой сквален.

В одном из вариантов осуществления изобретения SNE содержит 50-85 мольных % сквалена и 1-10 мольных % неионогенных поверхностно-активных веществ. В одном аспекте этого варианта осуществления изобретения неионогенное поверхностно-активное вещество содержит смесь PS-20 и SPAN-85 или смесь PS-80 и SPAN-85.

В одном из вариантов осуществления изобретения SNE содержит 0-45 мольных % катионного липида, 50-85 мольных % сквалена и 1-10 мольных % неионогенных поверхностно-активных веществ. В одном аспекте этого варианта осуществления изобретения неионогенное поверхностно-активное вещество содержит смесь PS-20 и SPAN-85 или смесь PS-80 и SPAN-85.



*Общие методы получения SNE (с катионным липидом и без него)*

Как правило, SNE могут быть получены, например, путем исходного комбинирования и смешивания вместе липидных компонентов или использования вначале одного липида, такого как катионный липид. После объединения и перемешивания (при объединении и смешивании вместе липидных компонентов) добавляют водный буфер и смешивают с исходным липидом или липидными компонентами с получением смешанной эмульсионной смеси. Перемешанные компоненты эмульсии сначала подвергают общей гомогенизации, а затем тонкой гомогенизации. Затем полученный состав подвергают последней стадии фильтрации и хранят при 4°C. Липидный раствор может включать один или несколько катионных липидов, один или несколько терпенов (например, сквален), одно или несколько поверхностно-активных веществ на основе сорбитана (например, PS-20 или PS-80; SPAN-85) в определенных молярных соотношениях.

*Общие методы получения LNP (липидных наночастиц)*

LNP и способы получения LNP хорошо известны в данной области техники. LNP известны и описаны в следующих публикациях: US,7,691,405, US2006/0083780, US2006/0240554, US2008/0020058, US2009/0263407, US2009/0285881, WO2009/086558, WO2009/127060, WO2009/132131, WO2010/042877, WO2010/054384, WO2010/054401, WO2010/054405 и WO2010/054406.

Процесс получения LNP состоит из 4 основных стадий: 1) приготовление раствора смеси липидов и водного буфера; 2) образование LNP за счет смешения разделенных потоков; 3) ультрафильтрация; и 4) фильтрация.

Как правило, перед стерильной фильтрацией липидные компоненты растворяют в этаноле с получением смеси липидов. Также готовят несколько водных буферов. Затем липидную смесь и потоки буферов объединяют с помощью трубок Т-образного или Y-образного смесителя, а затем, сразу на выходе, разбавляют и смешивают с водным буфером с образованием промежуточных LNP. Промежуточные LNP затем подвергают ультрафильтрации как для концентрирования продукта, так и с целью диафильтрации продукта против подходящего буфера для удаления остаточного этанола. После диафильтрации выполняют заключительную стадию концентрирования, чтобы получить конечную целевую концентрацию. Полученный LNP-продукт затем фильтруют с помощью стерилизующего фильтра и хранят в замороженном виде при -70°C.

*Композиции пневмококковой конъюгированной вакцины*

Пневмококковые конъюгированные вакцины или композиции были раскрыты ранее. См. WO2011/100151, WO2019/139692 и WO2020/131763.

Примерами бактериальных капсульных полисахаридов из *Streptococcus pneumoniae* являются серотипы: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20 (20A и 20B), 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B, 35F или 38.

#### *Общие методы получения капсульных полисахаридов*

Способы получения композиций пневмококковых конъюгированных вакцин были раскрыты ранее. См. WO2011/100151, WO2019/139692 и WO2020/131763.

Бактериальные капсулярные полисахариды, особенно те, которые использовались в качестве антигенов, подходят для применения в изобретении и легко могут быть идентифицированы при помощи способов идентификации иммуногенных и/или антигенных полисахаридов. Примерами бактериальных капсульных полисахаридов из *Streptococcus pneumoniae* являются серотипы: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20 (20A и 20B), 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B, 35F или 38.

Полисахариды могут быть очищены при помощи известных методик. Однако изобретение не ограничивается полисахаридами, выделенными из природных источников, и полисахариды могут быть получены другими способами, такими как полный или частичный синтез. Капсульные полисахариды из *Streptococcus pneumoniae* могут быть получены стандартными способами, известными специалистам в данной области техники. Например, полисахариды могут быть известными способами выделены из бактерий и до некоторой степени могут быть отсортированы по размеру (см., например, европейские патенты EP497524 и EP497525); предпочтительно, путем микрофлюидизации, осуществляемой с использованием гомогенизатора или путем химического гидролиза. Штаммы *Streptococcus pneumoniae*, соответствующие каждому полисахаридному серотипу, можно выращивать в среде на основе сои. Затем конкретные полисахариды могут быть очищены с помощью стандартных стадий, включая центрифугирование, осаждение и ультрафильтрацию. См., например, публикацию заявки на патент США № 2008/0286838 и патент США No. № 5,847,112. Для снижения вязкости и/или улучшения фильтруемости и однородности характеристик последующих конъюгированных продуктов от партии к партии полисахариды могут быть отсортированы по размеру.

Очищенные полисахариды могут быть химически активированы для введения функциональных групп, способных реагировать с белком-носителем, с использованием

стандартных методик. Химическую активацию полисахаридов и последующую конъюгацию с белком-носителем осуществляют способами, описанными в патентах США №4,365,170; №4,673,574 и №4,902,506. Вкратце, пневмококковый полисахарид вводят в реакцию с окислителем на основе периодата, таким как периодат натрия, периодат калия или периодная кислота, что приводит к окислительному расщеплению соседних гидроксильных групп с образованием реакционноспособных альдегидных групп. Подходящее количество молярных эквивалентов периодата (например, периодата натрия, метапериодата натрия и т.п.) составляет от 0,05 до 0,5 молярных эквивалентов (молярное отношение периодата к повторяющемуся звену полисахарида) или от 0,1 до 0,5 молярных эквивалентов. Реакция периодата может протекать в течение промежутка времени от 30 минут до 24 часов в зависимости от конформации диола (например, ациклические диолы, цис-диолы, транс-диолы), которая регулирует доступность реакционноспособных гидроксильных групп для периодата натрия.

Термин «периодат» включает как периодат, так и периодную кислоту; этот термин также включает метапериодат ( $\text{IO}^{4-}$ ) и ортопериодат ( $\text{IO}^{6-}$ ), а также различные соли периодной кислоты (например, периодат натрия и периодат калия). Капсульный полисахарид может быть окислен в присутствии метапериодата или периодата натрия ( $\text{NaIO}_4$ ). Кроме того, капсулярный полисахарид может быть окислен в присутствии ортопериодата или в присутствии периодной кислоты.

Очищенные полисахариды также могут быть соединены с линкером. После активации или соединения с линкером каждый капсульный полисахарид может быть отдельно конъюгирован с белком-носителем с образованием гликоконъюгата. Полисахаридные конъюгаты могут быть получены при помощи известных методик связывания.

Полисахарид может быть связан с линкером с образованием промежуточного соединения полисахарид-линкер, в котором свободный конец линкера представляет собой сложноэфирную группу. Таким образом, линкер представляет собой линкер, в котором по крайней мере один конец представляет собой сложноэфирную группу. Другой конец выбирают таким образом, чтобы он мог взаимодействовать с полисахаридом с образованием промежуточного соединения полисахарид-линкер.

Полисахарид может быть связан с линкером с использованием первичной аминогруппы полисахарида. В этом случае линкер обычно имеет на обоих концах сложноэфирную группу. Это позволяет осуществить связывание путем взаимодействия одной из сложноэфирных групп с первичной аминогруппой полисахарида путем нуклеофильного-ацильного замещения. В результате реакции образуется промежуточное

соединение полисахарид-линкер, в котором полисахарид связан с линкером посредством амидной связи. Таким образом, линкер представляет собой бифункциональный линкер, который обеспечивает первую сложноэфирную группу для взаимодействия с первичной аминогруппой полисахарида и вторую сложноэфирную группу для взаимодействия с первичной аминогруппой в молекуле-носителе. Типичным линкером является диэфир N-гидроксисукцинимид и адипиновой кислоты (SIDEA).

Связывание также может происходить косвенно, т.е. с дополнительным линкером, который используется для дериватизации полисахарида перед связыванием с линкером.

Полисахарид можно соединить с дополнительным линкером, используя карбонильную группу на восстанавливаемом конце полисахарида. Такое связывание включает две стадии: (a1) взаимодействие карбонильной группы с дополнительным линкером; и (a2) взаимодействие свободного конца дополнительного линкера с линкером. В этих вариантах осуществления изобретения дополнительный линкер обычно содержит на обоих концах первичную аминогруппу, что позволяет проводить стадию (a1) путем взаимодействия одной из первичных аминогрупп с карбонильной группой полисахарида посредством восстановительного аминирования. Используется первичная аминогруппа, которая взаимодействует с карбонильной группой полисахарида. Подходящими являются гидразидные или гидроксиламиногруппы. Обычно на обоих концах дополнительного линкера находится одна и та же первичная аминогруппа, что допускает возможность связывания полисахарида в виде (Ps)-Ps. В результате реакции образуется промежуточное соединение полисахарид-дополнительный линкер, в котором полисахарид связан с дополнительным линкером через связь C-N.

Полисахарид можно соединить с дополнительным линкером, используя другую группу полисахарида, в частности, карбоксильную группу. Это связывание включает две стадии: (a1) взаимодействие группы с дополнительным линкером; и (a2) взаимодействие свободного конца дополнительного линкера с линкером. В этом случае дополнительный линкер обычно содержит на обоих концах первичную аминогруппу, что позволяет осуществить стадию (a1) путем взаимодействия одной из первичных аминогрупп с карбоксильной группой полисахарида посредством EDAC-активации. Используется первичная аминогруппа, которая вступает в реакцию с EDAC-активированной карбоксильной группой полисахарида. Подходящей является гидразидная группа. Обычно на обоих концах дополнительного линкера находится одна и та же первичная аминогруппа. В результате реакции образуется промежуточное соединение полисахарид-дополнительный линкер, в котором полисахарид связан с дополнительным линкером посредством амидной связи.

*Белок-носитель*

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения в качестве белка-носителя используется CRM197. CRM197 представляет собой нетоксичный вариант (то есть анатоксин) дифтерийного токсина. CRM197 может быть выделен из культур *Corynebacterium diphtheria* штамма С7 (b197), выращенных в среде на основе казаминокислот и дрожжевого экстракта. Кроме того, CRM197 может быть получен рекомбинантным путем в соответствии со способами, описанными в патенте США No. 5,614,382. Как правило, для очистки CRM197 используют комбинацию ультрафильтрации, осаждения сульфатом аммония и ионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления изобретения CRM197 получают в *Pseudomonas fluorescens* с использованием Pfenex Expression Technology™ (Pfenex Inc., Сан-Диего, Калифорния).

Другие подходящие белки-носители включают дополнительные инактивированные бактериальные токсины, такие как DT (дифтерийный анатоксин), TT (столбнячный анатоксин) или С-фрагмент TT, коклюшный анатоксин, холерный анатоксин (например, как описано в публикации международной патентной заявки № WO 2004/083251), *E. coli* LT, *E. coli* ST и экзотоксин А из *Pseudomonas aeruginosa*. Также можно использовать бактериальные белки внешней мембраны, такие как комплекс С внешней мембраны (ОМРС), порины, белки, связывающие трансферрин, пневмококковый поверхностный белок А (PspA; см. публикацию международной патентной заявки WO02/091998), пневмококковый поверхностный адгезивный белок (PsaA), пептидазу С5а из стрептококка группы А или группы В, или белок D *Haemophilus influenzae*, пневмококковый пневмолизин (Kuo *et al.*, 1995, *Infect Immun* 63; 2706-13), включая слой, детоксифицированный специальным образом, например, dPLY-GMBS (см. публикацию международной патентной заявки WO 04/081515) или dPLY-формол, PhtX, включая PhtA, PhtB, PhtD, PhtE и слитые Pht-белки, например, слитый белок PhtDE, слитый белок PhtBE (см. публикации международных патентных заявок WO01/98334 и WO03/54007). Также можно использовать в качестве белков-носителей и другие белки, такие как овальбумин, гемоцианин лимфы улитки (KLH), бычий сывороточный альбумин (BSA) или очищенное белковое производное туберкулина (PPD), PotB (из *N. meningitidis*), PD (белок D из *Haemophilus influenzae*; см., например, Европейский патент EP 0594610B) или их иммунологически функциональные эквиваленты, синтетические пептиды (см. европейские патенты № EP 0378881 и EP 0427347), белки теплового шока (см. публикации международных патентных заявок WO93/17712 и WO 94/03208), коклюшные белки (см. публикацию международной патентной заявки WO 98/58668 и европейский

патент EP0471177), цитокины, лимфокины, факторы роста или гормоны (см. публикацию международной патентной заявки № WO 91/01146), искусственные белки, содержащие множественные человеческие CD4+ Т-клеточные эпитопы из антигенов, полученных из различных патогенов (см. Falugi *et al.*, 2001, Eur J Immunol 31:3816-3824), таких как белок N19 (см. Baraldoi *et al.*, 2004, Infect Immun 72:4884-7), белки, накапливающие железо (см. публикацию международной патентной заявки WO 01/72337), токсины А или В из *S. difficile* (см. публикацию международной патентной заявки WO 00/61761) и флагеллин (см. Ben-Yedidia *et al.*, 1998, Immunol Lett 64:9).

Когда используются поливалентные вакцины, для одного или нескольких антигенов поливалентной вакцины может применяться второй носитель. Второй белок-носитель предпочтительно представляет собой белок, который является нетоксичным и нереагтогенным и может быть получен в достаточном количестве и с достаточной чистотой. Второй белок-носитель также конъюгируют или соединяют с антигеном, например, полисахаридом *Streptococcus pneumoniae*, чтобы усилить иммуногенность антигена. Белки-носители должны поддаваться стандартным процедурам конъюгации. Каждый капсульный полисахарид, не конъюгированный с первым белком-носителем, может быть конъюгирован с одним и тем же вторым белком-носителем (например, каждая молекула капсульного полисахарида конъюгирована с одним белком-носителем). Капсульные полисахариды, не конъюгированные с первым белком-носителем, могут быть конъюгированы с двумя или более другими белками-носителями (каждая молекула капсульного полисахарида конъюгирована с одним белком-носителем). В таких вариантах осуществления изобретения каждый капсульный полисахарид одного и того же серотипа обычно конъюгирован с одним и тем же белком-носителем. В качестве второго белка-носителя могут быть использованы другие мутанты DT, такие как CRM176, CRM228, CRM45 (Uchida *et al.*, 1973, J Biol Chem 218:3838-3844); CRM9, CRM45, CRM102, CRM103 и CRM107 и другие мутации, описанные Nicholls и Youle в Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; делеция или мутация Glu148 в Asp, Gln или Ser и/или Ala158 в Gly и другие мутации раскрыты в патентах США №4709017 или №4950740; мутация по меньшей мере одного или нескольких остатков Lys516, Lys526, Phe530 и/или Lys534 и другие мутации раскрыты в патентах США No. 5,917,017 или No. 6,455,673; и фрагмент раскрыт в патенте США No. 5,843,711.

#### *Конъюгация посредством восстановительного аминирования*

Ковалентное связывание полисахарида с белком-носителем может быть осуществлено посредством восстановительного аминирования, при котором реагирующий

с амином фрагмент полисахарида непосредственно связывается с первичными аминогруппами белка (в основном остатками лизина). Как это хорошо известно, реакция восстановительного аминирования протекает по двухстадийному механизму. Во-первых, промежуточное соединение основания Шиффа формулы  $R-CH=N-R'$  образуется в результате реакции альдегидной группы молекулы 1 ( $R-CHO$ ) с первичной аминогруппой ( $R'-NH_2$ ) молекулы 2. На второй стадии основание Шиффа восстанавливают с получением амина формулы  $R-CH_2-NH-R'$ . Хотя можно использовать различные восстанавливающие агенты, чаще всего применяется высокоселективный восстанавливающий агент, такой как цианоборогидрид натрия ( $NaCNBH_3$ ), поскольку такие реагенты специфически восстанавливают только иминную функциональную группу основания Шиффа.

Поскольку все полисахариды содержат альдегидную функциональную группу на конце цепи (концевая альдегидная функция), методы конъюгации, включающие восстановительное аминирование полисахарида, могут применяться очень широко и, когда в повторяющемся звене нет другой альдегидной функциональной группы (внутрицепочечная альдегидная функция), такие методы позволяют получать конъюгаты, в которых молекула полисахарида связана с одной молекулой белка-носителя.

Типичным восстанавливающим агентом является цианоборогидридная соль, такая как цианоборогидрид натрия. В качестве иминселективного восстанавливающего агента обычно используют цианоборогидрид натрия, хотя могут применяться и другие соли цианоборогидрида, включая цианоборогидрид калия. Различия в начальных уровнях цианида в партиях реагентов цианоборогидрида натрия и остаточного цианида в реакции конъюгации могут привести к нестабильности результатов конъюгации, что приведет к различным свойствам продукта, таким как размер конъюгата и соотношение Ps к CRM 197 в конъюгатах. Контролируя и/или снижая уровни свободного цианида в конечном продукте реакции, можно снизить вариабельность конъюгации.

Оставшиеся непрореагировавшие альдегиды на полисахариде необязательно восстанавливают добавлением сильного восстанавливающего агента, такого как борогидрид натрия. Как правило, предпочтительно использование сильного восстанавливающего агента. Однако для некоторых полисахаридов предпочтительно избегать этой стадии. Например, серотип 5 *Streptococcus pneumoniae* содержит кетонную группу, которая может легко реагировать с сильным восстановителем. В этом случае предпочтительно избегать стадии восстановления, чтобы защитить антигенную структуру полисахарида.

После конъюгации конъюгаты полисахарид-белок-носитель очищают, чтобы удалить избыток реагентов для конъюгации, а также остаточный свободный белок-

носитель и свободный полисахарид, с помощью одного или нескольких методов, хорошо известных специалистам в данной области техники, включая проведение концентрирования/диафильтрации, ультрафильтрации, осаждения/элюирования, колоночной хроматографии и глубоинной фильтрации. См., например, патент США No. 6,146,902. В одном из вариантов осуществления изобретения этап очистки представляет собой ультрафильтрацию.

#### *Композиции пневмококковых конъюгатов*

Настоящее изобретение относится к композициям пневмококковых конъюгатов, содержащим, состоящим по существу из или, альтернативно, состоящим из конъюгатов полисахарид-белок-носитель вместе с SNE, и катионного липида, или без него. Настоящее изобретение также относится к композициям пневмококковых конъюгатов, содержащим, состоящим по существу из или, альтернативно, состоящим из конъюгатов полисахарид-белок-носитель вместе с SNE, катионного липида, или без него, и фармацевтически приемлемого носителя. Настоящее изобретение также относится к композициям пневмококковых конъюгатов, содержащим, состоящим по существу из или, альтернативно, состоящим из любых описанных в настоящем документе комбинаций конъюгатов полисахарид-белок-носитель вместе со SNE, с катионным липидом, или без него, и, необязательно, фармацевтически приемлемым носителем. Композиции по настоящему изобретению могут содержать, состоять по существу из или состоять из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 различных конъюгатов полисахарид-белок-носитель, где каждый из конъюгатов содержит отличный капсулярный полисахарид, конъюгированный с белком-носителем. В одном из вариантов осуществления изобретения полисахариды, входящие в конъюгаты полисахарид-белок-носитель, включают серотипы *Streptococcus pneumoniae* 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20 (20A или 20B), 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B, 35F и 38, но не ограничены ими. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов содержит, по существу состоит из или состоит из серотипов 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F. В еще одном варианте осуществления изобретения группа серотипов содержит, по существу состоит из или состоит из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов содержит, по существу состоит из или состоит из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F. В следующем варианте осуществления изобретения группа серотипов содержит, по существу состоит из или состоит из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F,



14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов содержит, по существу состоит из или состоит из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов содержит, по существу состоит из или состоит из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. В еще одном варианте осуществления изобретения группа серотипов содержит, по существу состоит из или состоит из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов содержит, по существу состоит из или состоит из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов содержит, по существу состоит из или состоит из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В еще одном варианте осуществления изобретения группа серотипов содержит, по существу состоит из или состоит из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов содержит, по существу состоит из или состоит из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов содержит, по существу состоит из или состоит из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов содержит, по существу состоит из или состоит из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В следующем варианте осуществления изобретения группа серотипов содержит, по существу состоит из или состоит из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В другом варианте осуществления изобретения группа серотипов содержит, по существу состоит из или состоит из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В еще одном варианте осуществления изобретения серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197. В другом варианте осуществления изобретения все серотипы конъюгированы с белком-

носителем. В другом варианте осуществления изобретения предпочтительным белком-носителем является CRM197.

### *Способы применения/дозировки*

Композиции по настоящему изобретению могут применяться для защиты или лечения человека, восприимчивого к инфекции, например пневмококковой инфекции, посредством введения вакцины системным путем или через слизистые. В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу индукции иммунного ответа на конъюгат капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae*, включающий введение человеку иммунологически эффективного количества композиции по настоящему изобретению. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу вакцинации человека против пневмококковой инфекции, включающему стадию введения человеку иммунологически эффективного количества композиции по настоящему изобретению.

Оптимальное количество компонентов для конкретной вакцины может быть установлено стандартными исследованиями, включающими наблюдение за соответствующими иммунными ответами у субъектов. Например, в еще одном варианте осуществления изобретения дозу для вакцинации людей определяют путем экстраполяции данных исследований на животных на человека. В другом варианте осуществления изобретения дозу определяют эмпирически.

Способы по изобретению могут применяться для профилактики и/или уменьшения первичных клинических синдромов, вызванных *Streptococcus pneumoniae*, включая как инвазивные инфекции (менингит, пневмонию и бактериемию), так и неинвазивные инфекции (острый средний отит и синусит).

Введение композиций по изобретению может осуществляться одним или несколькими путями: внутримышечным, внутрибрюшинным, внутрикожным или подкожным путем; или через слизистую оболочку ротового/пищеварительного, респираторного или мочеполового трактов. В одном из вариантов осуществления изобретения для лечения пневмонии или среднего отита применяют интраназальное введение (поскольку перенос пневмококков через носоглотку можно предотвратить наиболее эффективно, таким образом ослабляя инфекцию на ее самой ранней стадии).

Количество конъюгата в каждой дозе вакцины может быть выбрано как количество, которое вызывает иммунопротективный ответ без значительных побочных эффектов. Такое количество может варьироваться в зависимости от серотипа пневмококка. Как правило, для конъюгатов на основе полисахарида каждая доза будет

включать от 0,1 до 100 мг каждого полисахарида, в частности, от 0,1 до 10 мг и предпочтительно, от 1 до 5 мг. Например, каждая доза может содержать 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 или 750 нг или 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг.

В соответствии с любым из способов по настоящему изобретению и в одном варианте осуществления изобретения субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент-человек представляет собой младенца (младше 1 года), ребенка ясельного возраста (приблизительно от 12 до 24 месяцев) или маленького ребенка (приблизительно от 2 до 5 лет). В других вариантах осуществления изобретения пациент-человек представляет собой пожилого пациента (> 65 лет). Композиции по настоящему изобретению также подходят для применения у детей старшего возраста, подростков и взрослых (например, в возрасте от 18 до 45 лет или от 18 до 65 лет).

Соответственно, один вариант осуществления изобретения включает способ лечения или профилактики заболевания или расстройства, вызванного *Streptococcus pneumoniae*, у пациента или субъекта, включающий введение субъекту иммунологически эффективного количества любой из композиций по изобретению. В дополнительных вариантах осуществления изобретение включает композиции по изобретению (т.е. композиции, приведенные в описании)

(i) для применения ... ,

(ii) для применения в качестве лекарственного средства или композиции ... или

(iii) для применения при получении (или производстве) лекарственного средства ... :

(a) в терапии (например, человека);

(b) в медицине;

(c) для лечения или профилактики инфекции *Streptococcus pneumoniae*;

(e) для предотвращения рецидива инфекции *Streptococcus pneumoniae*;

(f) для уменьшения прогрессирования, возникновения или тяжести патологических симптомов, связанных с инфекцией, вызванной *Streptococcus pneumoniae*, и/или снижения вероятности инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae*, или

(g) для лечения, профилактики или предотвращения начала заболевания, тяжести, или прогрессирования заболевания, связанного с *Streptococcus pneumoniae*, включая, в числе прочего, менингит, пневмонию, бактериемию, острый средний отит и синусит, а также лечение или профилактику заболеваний или расстройств, вызванных *Streptococcus pneumoniae*.

В одном из вариантов осуществления способов по настоящему изобретению композицию по настоящему изобретению вводят в виде однократной прививки. В другом

варианте осуществления изобретения вакцину вводят два, три, четыре раза или более с подходящими интервалами. Например, композиция может вводиться с интервалами в 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев или любой их комбинацией. График иммунизации может следовать графику, установленному для пневмококковых вакцин. Например, обычная схема для младенцев и детей младшего возраста против инвазивного заболевания, вызванного *Streptococcus pneumoniae*, это 2, 4, 6 и 12-15 месяцев. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления изобретения композицию вводят в виде серии из 4 доз в возрасте 2, 4, 6 и 12-15 месяцев.

Композиции по настоящему изобретению могут также включать один или несколько белков из *Streptococcus pneumoniae*. Примеры белков *Streptococcus pneumoniae*, подходящие для введения, включают белки, приведенные в публикациях международных патентных заявок WO 02/083855 и WO 02/053761.

#### *Композиции по изобретению*

В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие по меньшей мере 1, или по меньшей мере 3, или по меньшей мере 7, или по меньшей мере 10, или по меньшей мере 13, или по меньшей мере 15, или по меньшей мере 20, или по меньшей мере 24, или по меньшей мере 27, или по меньшей мере 30 серотипов *Streptococcus pneumoniae*. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, включающие 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 серотипов *Streptococcus pneumoniae*. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F. В

некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, де-О-ацетил-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, де-О-ацетил-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A,

12F, 14, 15A, де-О-ацетил-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилированный-15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилированный-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарид *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы

*Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, де-О-ацетилированный-15В, 16F, 17F, 19А, 20В, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает SNE и конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae*-белок-носитель, содержащие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, состоящие из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15С, 16F, 17F, 19А, 20В, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В.

Настоящее изобретение также относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и стабильную наноэмульсию (SNE).

Настоящее изобретение также относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, а также фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к композиции пневмококкового конъюгата, включающей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, содержащей эмульгатор, и/или солубилизатор, и/или поверхностно-активное вещество, и, необязательно, катионный липид, или их смеси.

Настоящее изобретение также относится к композиции пневмококкового конъюгата, включающей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, содержащей поверхностно-активные вещества, и/или терпены, и/или катионные липиды, или их смеси.

Настоящее также относится к композиции пневмококкового конъюгата, включающей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, содержащей одно или несколько поверхностно-активных веществ и один или несколько терпенов и, необязательно, один или несколько катионных липидов.

Настоящее изобретение далее относится к композиции пневмококкового конъюгата, включающей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, содержащей от одного до трех поверхностно-активных веществ, от одного до трех терпенов и, необязательно, от одного до трех катионных липидов.

Настоящее изобретение также относится к композиции пневмококкового конъюгата, включающей конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и SNE, содержащей от одного до двух поверхностно-активных веществ, от одного до двух терпенов и, необязательно, от одного до двух катионных липидов.

Настоящее изобретение также относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 1) конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-

носителем и 2) SNE, включающую i) сорбитан триолеат (SPAN-85); (ii) полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); iii) сквален и, необязательно, iv) катионный липид.

Настоящее изобретение далее относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 1) конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и 2) SNE, включающую i) сорбитан триолеат (SPAN-85); (ii) полисорбат-20 (PS-20); iii) сквален и, необязательно, iv) катионный липид.

Настоящее изобретение также относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 1) конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и 2) SNE, включающую i) сорбитан триолеат (SPAN-85); (ii) полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); iii) сквален и, необязательно, iv) катионный липид, где катионный липид не связан с липидной наночастицей (LNP).

Настоящее изобретение также относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 1) конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и 2) SNE, включающую i) сорбитан триолеат (SPAN-85); (ii) полисорбат-20 (PS-20); iii) сквален и, необязательно, iv) катионный липид, где катионный липид не связан с липидной наночастицей (LNP).

Настоящее изобретение далее относится к композиции пневмококкового конъюгата, как описано выше, содержащей фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные выше композиции содержат конъюгаты полисахарид-белок-носитель, где белок-носитель представляет собой CRM197.

В одном из вариантов вышеуказанных композиций SNE содержит PS-20. В другом варианте осуществления SNE содержит PS-80.

В одном варианте осуществления изобретения композиция содержит катионный липид CLA, CLX или CLY.

В еще одном варианте осуществления изобретения композиция содержит катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция содержит катионный липид, выбранный из DLinDMA, DLinKC2DMA, DLin-MC3-DMA, CLinDMA и S-Octyl CLinDMA.

В одном из вариантов осуществления изобретения конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем содержат полисахарид конкретного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, который включает среди прочего любой из серотипов, выбранных из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20 (20A и 20B), 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B, 35F и 38,



конъюгированный с белком-носителем, который представляет собой CRM197. В другом варианте осуществления изобретения конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем содержат, состоят по существу или состоят из серотипов 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F, конъюгированных с белком-носителем CRM197. В еще одном варианте осуществления изобретения серотипы включают, состоят по существу или состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, конъюгированных с белком-носителем CRM197. В другом варианте осуществления изобретения серотипы включают, состоят по существу или состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, конъюгированных с белком-носителем CRM197. В еще одном варианте осуществления изобретения серотипы включают, состоят по существу или состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, конъюгированных с белком-носителем CRM197. В другом варианте осуществления изобретения серотипы включают, состоят по существу или состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, конъюгированных с белком-носителем CRM197. В еще одном варианте осуществления изобретения серотипы включают, состоят по существу или состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, де-О-ацетилированного 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, конъюгированных с белком-носителем CRM197. В другом варианте осуществления изобретения серотипы включают, состоят по существу или состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, конъюгированных с белком-носителем CRM197. В следующем варианте осуществления изобретения серотипы включают, состоят по существу или состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, конъюгированных с белком-носителем CRM197. В еще одном варианте осуществления изобретения серотипы включают, состоят по существу или состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, конъюгированных с белком-носителем CRM197. В другом варианте осуществления изобретения серотипы включают, состоят по существу или состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, конъюгированных с белком-носителем CRM197. В следующем варианте осуществления изобретения серотипы включают, состоят по существу или состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, конъюгированных с белком-носителем CRM197. В другом варианте осуществления изобретения серотипы включают, состоят по существу или состоят из серотипов 3, 6A, 7F,

8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, конъюгированных с белком-носителем CRM197. В другом варианте осуществления изобретения серотипы включают, состоят по существу или состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, конъюгированных с белком-носителем CRM197. В еще одном варианте осуществления изобретения серотипы включают, состоят по существу или состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, конъюгированных с белком-носителем CRM197. В другом варианте осуществления изобретения серотипы включают, состоят по существу или состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, конъюгированных с белком-носителем CRM197. В следующем варианте осуществления изобретения серотипы включают, состоят по существу или состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, конъюгированных с белком-носителем CRM197.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 7 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80) и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 13 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80) и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 15 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и

дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 15 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80) и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, де-О-ацетилированного-15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80) и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80) и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15В,

16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитан триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилизованного-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80) и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80) и сквален.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 7 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 13 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 15 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды

*Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 20 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, де-О-ацетилизованного-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15В, 16F, 17F, 19А, 20, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, де-О-ацетилированного-15В, 16F, 17F, 19А, 20, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15С, 16F, 17F, 19А, 20, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 7 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 4, 6В, 9V, 14, 18С, 19F и 23F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 13 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F and 23F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и

дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 15 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 20 различных конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, де-О-ацетилизованного-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 24 различных конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды

*Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 5B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококкового конъюгата, содержащей 21 различных конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где полисахариды *Streptococcus pneumoniae* состоят из серотипов 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, причем все серотипы конъюгированы с белком-носителем CRM197, и дополнительно содержащей сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); сквален и катионный липид CLA.

В одном из вариантов осуществления вышеуказанных композиций SNE содержит PS-20. В другом варианте осуществления SNE содержит PS-80.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает от около 2 мкг/мл до около 400 мг/мл катионного липида и по меньшей мере один конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов присутствует в концентрации от около 0,02 мкг/мл до около 200 мкг/мл.



В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает от около 0,04 мкг/мл до около 80 мг/мл катионного липида и по меньшей мере один конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов присутствует в концентрации от около 0,004 мкг/мл до около 40 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая содержит от около 100 мкг/мл до около 4,2 мг/мл катионного липида и по меньшей мере один конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов присутствует в концентрации от около 0,004 мкг/мл до около 40 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает от около 100 мкг/мл до около 20 мг/мл катионного липида и по меньшей мере один конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов присутствует в концентрации от около 0,004 мкг/мл до около 40 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает от около 2 мкг/мл до около 400 мг/мл катионного липида и по меньшей мере один конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов, приготовленный в виде со-лиофилизированной композиции, присутствует в концентрации от около 0,02 мкг/мл до около 200 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает от около 2 мкг/мл до около 400 мг/мл катионного липида, от 2 мкг/мл до около 2 мг/мл алюминия в форме АРА и по меньшей мере один конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов присутствует в концентрации от около 0,02 мкг/мл до около 200 мкг/мл, приготовленная в виде совместно лиофилизированного состава.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает от около 20 мкг/мл до около 2,4 мг/мл катионного липида и по меньшей мере один конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов присутствует в концентрации от около 0,2 мкг/мл до около 24 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает от около 60 мкг/мл до около 2,4 мг/мл катионного липида и по меньшей мере один конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где

каждый из конъюгатов присутствует в концентрации от около 0,2 мкг/мл до около 24 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, как указано в различных приведенных выше вариантах осуществления изобретения, которая включает от около 0,1 мкг/мл до около 400 мг/мл катионного липида и дополнительно включает SPAN-85, PS-20 или PS-80 и сквален. В другом варианте осуществления изобретения катионный липид представляет собой CLA. В другом варианте осуществления изобретения катионный липид представляет собой CLX. В еще одном варианте осуществления изобретения катионный липид представляет собой CLY.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, как указано в различных приведенных выше вариантах осуществления изобретения, которая включает от около 60 мкг/мл до около 2,4 мг/мл катионного липида и дополнительно включает 6 - 240 мкг/мл SPAN-85, 6 - 240 мкг/мл PS-20 или PS-80 и 60 мкг/мл - 2,4 мг/мл сквалена. В другом варианте осуществления изобретения катионный липид представляет собой CLA. В другом варианте осуществления изобретения катионный липид представляет собой CLX. В еще одном варианте осуществления изобретения катионный липид представляет собой CLY.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает около 6 мкг/мл - 24 мг/мл SPAN-85, 6 мкг/мл - 24 мг/мл PS-20 или PS-80 и 60 мкг/мл - 240 мг/мл сквалена и меньшей мере один конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов присутствует в концентрации от около 0,02 мкг/мл до около 200 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает около 6 мкг/мл - 24 мг/мл SPAN-85, 6 мкг/мл - 24 мг/мл PS-20 или PS-80 и 60 мкг/мл - 240 мг/мл сквалена и по крайней мере один конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов присутствует в концентрации от около 0,004 мкг/мл до около 40 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает около 6 мкг/мл - 24 мг/мл SPAN-85, 6 мкг/мл - 24 мг/мл PS-20 или PS-80 и 60 мкг/мл - 240 мг/мл сквалена и по крайней мере один конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов присутствует в концентрации от около 0,004 мкг/мл до около 40 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает около 2 мкг/мл - 24 мг/мл SPAN-85, 2 мкг/мл - 2,4 мг/мл PS-20 или PS-80 и 20 мкг/мл - 24 мг/мл сквалена и по меньшей мере один конъюгат полисахарида

*Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов присутствует в концентрации от около 0,004 мкг/мл до около 40 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает около 6 мкг/мл - 2,4 мг/мл SPAN-85, 6 мкг/мл - 2,4 мг/мл PS-20 или PS-80 и 60 мкг/мл - 24 мг/мл сквалена и по меньшей мере один конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов присутствует в концентрации от около 0,02 мкг/мл до около 200 мкг/мл, приготовленная в виде солифицированного состава.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает от около 20 мкг/мл до около 2,4 мг/мл катионного липида и по меньшей мере один конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов присутствует в концентрации от около 0,2 мкг/мл до около 24 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает 6 мкг/мл – 2,4 мг/мл SPAN-85, 6 мкг/мл – 2,4 мг/мл PS-20 или PS-80 и 60 мкг/мл - 24 мг/мл сквалена и по крайней мере один конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов присутствует в концентрации от около 0,2 мкг/мл до около 24 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает 6 мкг/мл – 2,4 мг/мл SPAN-85, 6 мкг/мл – 2,4 мг/мл PS-20 или PS-80 и 60 мкг/мл - 24 мг/мл сквалена и по крайней мере один конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов присутствует в концентрации от около 0,2 мкг/мл до около 24 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция, как указано в различных приведенных выше вариантах осуществления, включает 6 мкг/мл - 24 мг/мл SPAN-85, 6 мкг/мл - 24 мг/мл PS-20 или PS-80 и 60 мкг/мл - 240 мг/мл сквалена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция, как указано в различных приведенных выше вариантах осуществления, включает 6 мкг/мл - 2,4 мг/мл SPAN-85, 6 мкг/мл - 2,4 мг/мл PS-20 или PS-80 и 60 мкг/мл - 24 мг/мл сквалена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, как указано в различных приведенных выше вариантах осуществления, которая включает от около 30 мкг/мл до около 2,4 мг/мл катионного липида и дополнительно включает 6 мкг/мл - 14 мг/мл SPAN-85, 6 мкг/мл - 14 мг/мл PS-20 или PS-80 и 60 мкг/мл - 34 мг/мл сквалена. В другом варианте осуществления изобретения катионный липид представляет собой CLA. В другом варианте осуществления изобретения катионный липид

представляет собой CLX. В еще одном варианте осуществления изобретения катионный липид представляет собой CLY.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, как указано в различных приведенных выше вариантах осуществления, которая включает от около 60 мкг/мл до около 2,4 мг/мл катионного липида и дополнительно включает 6 мкг/мл - 14 мг/мл SPAN-85, 6 мкг/мл - 14 мг/мл PS-20 или PS-80 и 60 мкг/мл - 34 мг/мл сквалена. В другом варианте осуществления изобретения катионный липид представляет собой CLA. В другом варианте осуществления изобретения катионный липид представляет собой CLX. В еще одном варианте осуществления изобретения катионный липид представляет собой CLY.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена композиция, которая включает 6 мкг/мл - 14 мг/мл SPAN-85, 6 мкг/мл - 14 мг/мл PS-20 или PS-80 и 60 мкг/мл - 34 мг/мл сквалена и по крайней мере один конъюгат полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов присутствует в концентрации от около 0,2 мкг/мл до около 24 мкг/мл.

Композиции по настоящему изобретению можно вводить подкожно, местно, перорально, на слизистую оболочку, внутривенно или внутримышечно. Композиции вводят в количестве, достаточном для того, чтобы вызвать защитный ответ. Композиции можно вводить различными путями, например, перорально, парентерально, подкожно, на слизистую оболочку или внутримышечно. Вводимая доза может варьироваться в зависимости от общего состояния, пола, массы тела и возраста пациента, а также пути введения.

Композиции по настоящему изобретению, как указано в различных приведенных выше вариантах осуществления, могут называться иммуногенными композициями.

Композиции по настоящему изобретению, как указано в различных приведенных выше вариантах осуществления, могут называться вакцинами или вакцинными композициями.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE содержит PS-20, сорбитана триолеат, сквален и (13Z, 16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE содержит 5-15 мольных % сорбитана триолеата, 25-35 мольных % PS-20 или PS-80, 1-2,5 мольных % сквалена и 55-65 мольных % (13Z, 16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза 13,16-диен-1-амина.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE, включающая катионный липид, содержит до 75 мольных % катионного липида, до 30 мольных % сорбитана триолеата, до 30 мольных % полисорбата-20 или полисорбата-80 и 25-85 мольных % сквалена.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE, включающая катионный липид, содержит до 50 мольных % катионного липида, до 10 мольных % сорбитана триолеата, до 10 мольных % полисорбата-20 или полисорбата-80 и 50-80 мольных % сквалена.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE, включающая катионный липид, содержит до 24 мольных % катионного липида, 1-8 мольных % сорбитана триолеата, 1-8 мольных % полисорбата-20 или полисорбата-80 и 60-75 мольных % сквалена.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE, включающая катионный липид, содержит примерно 10-14 мольных % катионного липида, 1-4 мольных % сорбитана триолеата, 1-4 мольных % полисорбата-20 или полисорбата-80 и 50-80 мольных % сквалена.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE, включающая катионный липид, содержит 30-65 мольных % катионного липида, 5-30 мольных % сорбитана триолеата, 10-40 мольных % сквалена и 0,5-4 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE, включающая катионный липид, содержит 55-65 мольных % катионного липида, 5-15 мольных % сорбитана триолеата, 25-35 мольных % сквалена и 1-2,5 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE, включающая катионный липид, содержит 13-45 мольных % катионного липида, 2-4 мольных % сорбитана триолеата, 50-82 мольных % сквалена и 1,5-3 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE, включающая катионный липид, содержит 13-14 мольных % катионного липида, 1-2 мольных % сорбитана триолеата, 79-81 мольных % сквалена и 1-2 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE, включающая катионный липид, содержит 0 мольных % катионного липида,

8-10 мольных % сорбитана триолеата, 80-84 мольных % сквалена и 8-10 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE, включающая катионный липид, содержит 20 мольных % катионного липида, 30 мольных % сорбитана триолеата, 20 мольных % сквалена и 30 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE, включающая катионный липид, содержит около 2 мольных % катионного липида, около 8 мольных % сорбитана триолеата, около 82 мольных % сквалена и около 8 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE, включающая катионный липид, содержит 2 мольных % катионного липида, 8 мольных % сорбитана триолеата, 82 мольных % сквалена и 8 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE, включающая катионный липид, содержит около 13,82 мольных % катионного липида, около 3,43 мольных % сорбитана триолеата, около 80,07 мольных % сквалена и около 2,68 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE, включающая катионный липид, содержит 13,82 мольных % катионного липида, 3,43 мольных % сорбитана триолеата, 80,07 мольных % сквалена и 2,68 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE, включающая катионный липид, содержит около 44,5 мольных % катионного липида, около 2,21 мольных % сорбитана триолеата, около 51,56 мольных % сквалена и около 1,72 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE, включающая катионный липид, содержит 44,5 мольных % катионного липида, 2,21 мольных % сорбитана триолеата, 51,56 мольных % сквалена и 1,72 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE содержит 32 мольных % сквалена, 34 мольных % SPAN-85 и 34 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE содержит 98 мольных % сквалена, 1 мольный % SPAN-85 и 1 мольный % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE содержит 86 мольных % сквалена, 7 мольных % SPAN-85 и 7 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE содержит 92 мольных % сквалена, 4 мольных % SPAN-85 и 4 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE содержит 94 мольных % сквалена, 3 мольных % SPAN-85 и 3 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE содержит 92,91 мольных % сквалена, 3,98 мольных % SPAN-85 и 3,11 мольных % PS-20 или PS-80.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложена композиция, в которой SNE содержит 62 мольных % сквалена, 17 мольных % SPAN-85 и 17 мольных % PS-20 или PS-80.

В каждом из описанных выше вариантов осуществления изобретения, композиция дополнительно содержит конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем.

В настоящем изобретении предложены способы лечения или профилактики пневмококковых заболеваний путем введения композиций, описанных выше.

В настоящем изобретении предложено применение описанных выше композиций для лечения или профилактики пневмококковых заболеваний.

Все упомянутые здесь публикации, включены посредством ссылки с целью описания и раскрытия методологий и материалов, которые могут быть использованы в связи с настоящим изобретением. Ничто в данном документе не должно быть истолковано как признание того, что в силу предшествующего изобретения настоящее изобретение не может быть датировано ранее такого раскрытия.

Что касается описания предпочтительных вариантов осуществления изобретения со ссылкой на прилагаемые чертежи, следует понимать, что изобретение не ограничивается этими конкретными вариантами осуществления и что специалист в данной области техники может использовать различные изменения и модификации, не

выходя за рамки объема или сущности изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

Следующие примеры иллюстрируют, но не ограничивают изобретение.

### **Примеры**

#### **Пример 1: Получение конъюгатов пневмококкового полисахарида с белком-носителем с использованием DMSO-конъюгации**

Полисахариды (как указано ниже, а также в таблицах и примерах) растворяли, доводили до заданной молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер с помощью ультрафильтрации. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали по отдельности и повторно растворяли в DMSO. Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и проводили конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной 0,2-микронной фильтрацией. Для получения конъюгатов с желаемыми характеристиками на каждой стадии контролировали определенные параметры процесса, такие как pH, температура, концентрация и время.

#### *Уменьшение размера полисахаридов*

Порошок очищенного пневмококкового капсулярного полисахарида (также обозначаемого «Ps») растворяли в воде. За исключением ST-19A (серотип иначе обозначается как «ST»), размер которого не был уменьшен, для уменьшения молекулярной массы Ps растворенные полисахариды фильтровали через 0,45-мкм фильтр и либо гомогенизировали, либо подвергали кислотному гидролизу. В ходе гомогенизации целевого размера Ps достигали за счет контроля давления и количества проходов. В ходе кислотного гидролиза целевого размера Ps достигали за счет регулирования температуры и времени. Затем полисахарид отфильтровывали через 0,2-микронный фильтр, концентрировали и подвергали диафильтрации против воды с использованием ультрафильтрационной мембраны с тангенциальным потоком с NMWCO 5 или 10 кДа.

#### *Де-О-ацетилирование*

Раствор Ps ST-15B уменьшенного размера нагревали до 60°C и добавляли натрий-бикарбонатный буфер с pH 9,4 до конечной концентрации 50 mM. Партию инкубировали при 60°C для высвобождения О-ацетильных групп. Добавляли калий-фосфатный буфер с pH 6 для нейтрализации pH и охлаждали раствор до температуры окружающей среды.



Затем раствор концентрировали и подвергали диафильтрации против воды с использованием мембраны для ультрафильтрации в тангенциальном потоке с порогом отсечения по молекулярной массе (NMWCO) 5 или 10 кДа.

#### *Декетализация (только ST-4)*

Раствор Ps ST-4 уменьшенного размера доводили до 50°C и pH 4,1 с помощью натрий-ацетатного буфера для частичной декетализации полисахарида. Затем раствор полисахарида охлаждали до 22°C перед активацией.

#### *Окисление полисахаридов*

Раствор полисахарида доводили до 22°C для всех серотипов, за исключением ST-5, 7F и 19F, которые доводили до 4°C. С помощью натрий-ацетатного буфера доводили pH раствора до pH 4-5, чтобы свести к минимуму уменьшение размера полисахарида из-за активации. Активацию полисахаридов инициировали добавлением раствора метаперiodата натрия. Количество добавленного метаперiodата натрия контролировали для достижения заданного уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида).

Активированный продукт в случае всех серотипов, кроме ST-5, подвергали диафильтрации против 10 mM фосфата калия, pH 6,4 с последующей диафильтрацией против воды с использованием мембраны для ультрафильтрации в тангенциальном потоке с NMWCO 5 или 10 кДа. В случае ST-5 активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 mM ацетата натрия, pH 4,1 с последующей диафильтрацией против воды с использованием мембраны для ультрафильтрации в тангенциальном потоке с NMWCO 5 кДа. Ультрафильтрацию для всех серотипов проводили при 2-8°C.

#### *Конъюгация полисахарида с CRM197*

Очищенный CRM197, полученный посредством экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как было описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 mM фосфатного буфера с pH 7,2, с использованием мембраны для ультрафильтрации в тангенциальном потоке с NMWCO 5 кДа и фильтровали через 0,2 микронный фильтр. Для лиофилизации активированные полисахариды смешивали с водой и сахарозой. CRM197 готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл (белок-носитель CRM197 иначе обозначают «Pr») с концентрацией сахарозы 1% мас./об. Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали по отдельности. Лيوфилизированные субстанции Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в

равных объемах DMSO. В случае некоторых серотипов в Ps-DMSO добавляли такие добавки, как соль. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали для достижения целевой концентрации полисахарида и массового соотношения полисахарида к CRM197. Массовое соотношение выбирали таким, чтобы контролировать соотношение полисахарида к CRM197 в итоговом конъюгате. К большинству серотипов добавляли восстанавливающий агент, такой как цианоборогидрид натрия, и проводили конъюгацию при 22°C.

#### *Итоговое восстановление*

После реакции конъюгации добавляли восстанавливающий агент, такой как борогидрид натрия, и инкубировали все серотипы при 22°C. Партию разбавляли 150 мМ хлоридом натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбата-20 при температуре около 4 °C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Некоторые партии концентрировали и подвергали диафильтрации около при 4 ° C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, с использованием мембраны для ультрафильтрации в тангенциальном потоке с NMWCO 30 кДа.

#### *Окончательная фильтрация и хранение продукта*

Отдельные партии далее концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлорида натрия, pH 7,0, с 0,015% (мас./объем) полисорбата 20, при 4°C с использованием мембраны для ультрафильтрации в тангенциальном потоке с NMWCO 300 кДа. В частности, для ST-5, на середине стадии диафильтрации, собирали конъюгат ST-5 и инкубировали с 50 мМ бикарбонатом натрия, pH 9,3, в течение 3 часов. Перед завершением диафильтрации раствор ST-5 нейтрализовали 1,5 М фосфатом калия, с pH 6,0.

Отдельные партии ретентата фильтровали через 0,2 мкм фильтр (с предварительным 0,5 мкм фильтром), затем разбавляли дополнительным количеством 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, с 0,015% (масса/объем) полисорбата 20, распределяли на аликвоты и замораживали при  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ . Уточнения, касающиеся конъюгатов специфических серотипов, можно найти в ранних публикациях (WO2011/100151, WO2019/139692 и WO2020/131763).

#### **Пример 2: Состав композиций пневмококковых конъюгатов**

Отдельные конъюгаты пневмококкового полисахарида с белком-носителем, полученные с использованием различных химических способов, как описано в Примере 1,

использовали для приготовления композиции 1-, 21- или 24-валентного пневмококкового конъюгата, обозначаемых как PCV1, PCV21 или PCV24, соответственно.

Композиция PCV1, которую добавляли к CLA-SNE или SNE или использовали как таковую, содержала серотип 6B, конъюгированный с использованием восстановительного аминирования в апротонном растворителе (DMSO), как описано в Примере 1, в комбинации с 20 мМ L-гистидина, pH 5,8, 150 мМ NaCl и 0,1% (масса/объем) PS-20 с получением конечной концентрации пневмококкового полисахарида (PnPs) в вакцине 4 мкг/мл (масса/объем). Вакцину PCV1, содержащую APA и серотип 6B, конъюгированный с использованием восстановительного аминирования в апротонном растворителе (DMSO), как описано в Примере 1, готовили в 20 мМ L-гистидина, pH 5,8, 150 мМ NaCl и 0,2% (масса/объем) PS-20 и 250 мг  $[Al^{+3}]/mL$  в форме APA с получением конечной концентрации пневмококкового полисахарида (PnPs) в вакцине 4 мкг/мл (масса/объем).

Композиция PCV21, которую добавляли к CLA-SNE или SNE или использовали как таковую, содержала серотипы 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилованный-15B (deOAc15B), 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, конъюгированные с белком-носителем CRM197 с использованием восстановительного аминирования в апротонном растворителе (например, DMSO), в комбинации с 20 мМ L-гистидина, pH 5,8, 50-150 мМ NaCl и 0,02-0,1% PS-20. Концентрация пневмококкового полисахарида (PnPs) для каждого конъюгата полисахарид-белок-носитель составляла 4-8 мкг/мл (масса/объем) с получением конечной концентрации 84-168 мкг/мл PnPs в вакцине.

Композиция PCV24, которую добавляли к CLA-SNE или SNE или использовали как таковую, содержала серотипы 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, де-О-Ас-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, конъюгированные с белком-носителем CRM197 с использованием восстановительного аминирования в апротонном растворителе (например, DMSO) в комбинации с 20 мМ L-гистидина, pH 5,8, 50-150 мМ NaCl и 0,02-0,1% PS-20. Концентрация пневмококкового полисахарида (PnPs) для каждого конъюгата полисахарид-белок-носитель составляла 4-8 мкг/мл (масса/объем) с получением конечной концентрации 96 мкг/мл PnPs в вакцине.

Для получения композиций PCV необходимые объемы субстанций моновалентных конъюгатов, необходимых для получения указанной конечной концентрации (масса/объем) пневмококкового полисахарида (также обозначаемого PnPs), рассчитывали на основе объема партии и удельной концентрации полисахарида.

Процесс получения состоял из приготовления субстанции, содержащей смесь конъюгатов при 2-кратной конечной концентрации смесей PnPs в 20 мМ гистидина, 0,05 - 0,15% (масса/объем) PS-20 и 150 мМ хлорида натрия, pH 5,8.

Готовили растворы гистидина с рН 5,8, PS-20 и хлорида натрия и добавляли их в сосуд для приготовления композиции. Отдельные конъюгаты пневмококкового полисахарида с белком-носителем, хранившиеся в замороженном виде, оттаивали при 2-8°C и затем добавляли в сосуд для приготовления композиции. Во время добавления конъюгата полисахарид-белок-носитель (смеси конъюгатов) к буферу композиции, содержимое сосуда перемешивали для обеспечения гомогенности с помощью магнитного стержня или магнитного импеллера. После внесения всех добавок и перемешивания раствора смесь конъюгатов пропускали через стерилизующие фильтры и собирали в сосуд с АРА или без него. В некоторых случаях стерилизующие фильтры обрабатывали 150 мМ хлоридом натрия, чтобы довести партию до заданной концентрации.

Составы помещали в пластиковые шприцы, стеклянные шприцы или флаконы.

Композиция PCV13, 13-валентная пневмококковая конъюгированная вакцина, используемая в настоящем документе, была получена из коммерчески доступного PREVNAR13®.

### **Пример 3: Получение стабильной наноэмульсионной (SNE) адъювантной системы с катионным липидом (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амином) и без него**

Адъювант SNE может быть получен с катионными липидами и без них, (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амином), также обозначаемым CLA, или (6Z,9Z,26Z,29Z)-N,N-диметилпентатриаконта-6,9,26,29-тетраен-18-амином, также обозначаемым как CLX; или N,N-диметил-1-((1S,2R)-2-октилциклопропил)гептадекан-8-амином, также обозначаемым как CLY (фиг. 1). SNE представляет собой многокомпонентную эмульсионную композицию, состоящую из 3 стабилизирующих ингредиентов; сквален, сорбитан триолеат (SPAN-85) и полисорбат-20 (PS-20) с катионным липидом, например, CLA (обозначается CLA-SNE, см. Таблицу 1) и без катионного липида (обозначается SNE, см. Таблицу 2). Эта композиция была приготовлена путем объединения и смешивания вместе катионного липида (если он используется), сквалена, SPAN-85 и PS-20 или аналогичных компонентов (например, поверхностно-активных веществ, масел и солюбилизаторов) (Таблица 1 и Фигура 2). После объединения и перемешивания добавляли гистидиновый буфер и смешивали с исходными компонентами эмульсии. Перемешанные компоненты эмульсии сначала подвергали общей гомогенизации с последующей тонкой гомогенизацией, как описано ниже. Полученный состав подвергали финальной стадии фильтрации через 0,2 мкм фильтр. Для получения эмульсионной системы с желаемыми характеристиками на каждой

стадии контролировали определенные параметры процесса, такие как порядок добавления, время перемешивания, pH, температура, концентрация компонентов, гомогенизация, микрофлюидизация.

Таблица 1: Композиция типичного адъюванта CLA-SNE

Компонент	Описание	Содержание каждого липида (мол. %)	Молекулярная масса (г/моль)	Содержание каждого липида (мас. %)
CLA	(13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин	13,82-44,5	475,9	14,29-45,45
Сквален	сквален	51,56-80,07	410,72	45,45-71,43
SPAN-85	сорбитана триолеат	2,21-3,43	957,5	4,55-7,14
PS-20	полисорбат-20	1,72-2,68	1228	4,55-7,14
Буферная матрица	20 мМ гистидина, pH 5,8	Н/Д		

Таблица 2: Состав типичного адъюванта SNE

Компонент	Описание	Содержание каждого липида (мол.%)	Молекулярная масса (г/моль)	Содержание каждого липида (мас. %)
Сквален	сквален	92,25-93,57	410,72	81,97-84,75
SPAN-85	сорбитана триолеат	3,61-4,35	957,5	7,63-9,02
PS-20	полисорбат-20	2,82-3,39	1228	7,63-9,02
Буферная матрица	20 мМ гистидина, pH 5,8	Н/Д		

#### *Получение композиции*

Комбинацию сквалена и солюбилизатора (называемую масляной фазой) для стабильной эмульсии готовили добавлением в сосуд сквалена, SPAN-85, PS-20 и CLA. Затем масляную фазу перемешивали с помощью магнитной мешалки при 100-1000 об/мин в течение 10-120 минут. После смешивания этих компонентов к масляной фазе медленно,

при перемешивании с использованием магнитной мешалки, добавляли водную фазу, состоящую из 20 мМ гистидина с рН=5,8. Композицию затем снова оставляли перемешиваться в течение 1 часа.

#### *Грубая гомогенизация*

Затем смесь масляной и водной фаз (называемую предварительно гомогенизированной эмульсией или РНЕ) гомогенизировали с использованием роторно-статорного гомогенизатора при температуре окружающей среды и уменьшали размер с получением грубой эмульсии. Наконечник гомогенизатора погружали в РНЕ, удерживали у дна сосуда для приготовления композиции, и он работал со скоростью от 6 до 10 тыс. об/мин в течение 5-15 минут. Этот процесс приводил к получению гомогенной микроэмульсионной (МЕ) суспензии частиц эмульсии сквалена с диаметром в диапазоне от 4 до 20 мкм, которые подходили для дополнительного уменьшения размера путем микрофлюидизации в гомогенизаторе высокого давления для создания стабильной наноэмульсии (SNE).

#### *Тонкая гомогенизация для получения стабильной наноэмульсии (SNE)*

После грубой гомогенизации эмульсию дополнительно обрабатывали с использованием гомогенизатора/микрофлюидизатора высокого давления для получения стабильных частиц эмульсии нанометрового размера. МЕ вводили в гомогенизатор высокого давления, такой как микрофлюидайзер Microfluidics low volume®, GEA Group PandaPlus 2000 или Bee International, NanoDeBEE, и устанавливали контур рециркуляции. В контур рециркуляции включали противоточный теплообменник, питаемый от блока с регулируемой температурой с заданным значением 5°C для нейтрализации тепла, выделяемого при гомогенизации под высоким давлением. Для получения частиц эмульсии желаемого размера и технологичности в качестве заданной рабочей точки для этой стадии процесса было выбрано давление 20 кПа на квадратный дюйм. Гомогенизатор высокого давления работает с постоянной и неизменной скоростью потока через установленный контур рециркуляции. Используя эту измеренную скорость потока и объем обрабатываемой МЕ, рассчитывали теоретическое время, необходимое для того, чтобы вся эмульсия один раз прошла через контур рециркуляции. Учитывая это рассчитанное время одного прохода, гомогенизатор высокого давления обычно работал до тех пор, пока не было достигнуто желаемое количество проходов, по крайней мере, 10, что давало либо SNE, либо CLA-SNE.

### *Фильтрация*

После составления комбинации SNE или CLA-SNE пропускали через 0,8/0,2 мкм фильтр PES. Поток 42 LMH через фильтр был выбран с учетом его оптимального массового выхода и стабильности частиц при фильтрации.

Для измерения объемно-взвешенного распределения наноземульсии по размеру во время приготовления применяли метод лазерной дифракции или статического светорассеяния (SLS) с использованием прибора Malvern Panalytical Ltd. MS3000. Затем эти данные анализировали для расчета размера частиц, образующих картину рассеяния. Были получены образцы фракций эмульсии до гомогенизации (PHE), микроэмульсии (ME) и стабильной наноземульсии (SNE). Эти эмульсионные составы разбавляли до заданного потемнения 3% 5 мМ гистидином, pH 5,8, и 2,5 мМ буфером NaCl, проводили SLS и собирали при рециркуляции 1200 об/мин. Образцы наборов данных собирали со сканированием 30 секунд на набор данных. На фигуре 3 представлены три набора данных с каждой стадии процесса приготовления CLA-SNE. Хотя 20 мМ гистидиновый буфер с pH 5,8 идеально подходил для обеспечения стабильности субстанции во время процесса приготовления и при хранении в полимерных контейнерах (например, пластиковых), при хранении в стекле наблюдалась неспецифическая абсорбция CLA-SNE или SNE поверхностью стекла. Для оценки поверхностно-активных веществ/солюбилизаторов, буферов и солей был проведен скрининг, и несколько композиций оказались подходящими для устранения указанной проблемы со стабильностью, среди которых в качестве стабилизирующего состава (данные не показаны) была выбрана композиция, содержащая 20 мМ гистидина, 0,05% PS-20 и 75 мМ NaCl.

#### **Пример 4: Получение стабильной наноземульсионной (SNE) адьювантной системы и добавление катионного липида, (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амина) или CLA в виде свободного основания непосредственно после микрофлюидизации SNE**

Два процесса получения композиции были оценены на предмет включения CLA в наноземульсионную частицу, которая содержит PS-20, сорбитана триолеат (SPAN-85) и сквален, приготовленные в гистидиновом буфере с pH 5,8. В первом процессе (обозначенном как Процесс 1) SNE готовили с использованием процесса, описанного в Примере 3. Во втором процессе (обозначенном как Процесс 2) объединяли и смешивали только PS-20, сорбитана триолеат (SPAN-85) и сквален. После объединения и перемешивания добавляли гистидиновый буфер и смешивали его с исходными компонентами эмульсии (PS-20, сорбитан триолеат и сквален). Перемешанные

компоненты эмульсии сначала подвергали гомогенизации для получения микроэмульсии (ME) с последующей микрофлюидизацией для получения наноэмульсии (NE), как описано в Примере 3. В отдельном стеклянном сосуде растворяли 0,25 мг/мл CLA в 100% этаноле при комнатной температуре. Затем, для получения желаемой конечной концентрации CLA, достаточный объем этого этанольного раствора CLA добавляли к SNE, содержащей PS-20, сорбитана триолеат и сквален в гистидиновом буфере с pH 5,8, и затем перемешивали в течение 60 минут при комнатной температуре. После инкубации раствор подвергали диализу против 5 мМ гистидина, 2,5 мМ NaCl, pH 5,8, используя 10 мл образца к 500 мл буфера в течение ночи при 4°C с двумя заменами буфера. Затем две обработанные эмульсии (согласно Процессам 1 и 2) проверяли на включение CLA в SNE с использованием UPLC-CAD. Результаты показывают, что по сравнению с индивидуальным составом, использование Процесса 2 не привело к включению значительного количества CLA в (мас./мас.)% целевого включения, что указывает на то, что для успешного включения и стабильности CLA в наноэмульсии Процесс 1 является предпочтительным (Фигура 4).

#### **Пример 5: Получение катионного липидсодержащего адьюванта LNP**

CLA-LNP представляет собой многокомпонентный препарат LNP, состоящий из 4 компонентов: один катионный липид (обозначаемый, как CLA; на Фигуре 1 показан предпочтительный катионный липид, CLA, (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин), холестерин, дистеароил фосфатидилхолин (DSPC) и ePEG-DMG.

В итоговой композиции CLA-LNP относительные целевые значения мольных % для липидных компонентов составляют: 58% CLA, 30% холестерина, 2% ePEG 2000-DMG и 10% DSPC (Таблица 3).

Таблица 3: Композиция адьюванта CLA-LNP

Компонент	Описание	Содержание каждого липида (мол. %)	Молекулярная масса (г/моль)	Содержание каждого липида (мас. %)
CLA	(13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин)	58	475,9	52
Холестерин	Холест-5-ен-3β-ол	30	386,7	22



Дистеароил-фосфитидил-холин (DSPC)	1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин	10	790,2	15
ePEG2000-DMG	$\alpha$ -[8'-(1,2-димиристоил-3-пропанокси)-карбоксамид-3',6'-диоксаоктанил]-карбамоил- $\omega$ -метил-поли(этиленгликоль)-2000	2	2837	11
Буферная матрица	20 мМ трис, 10% (масса/объем) сахарозы рН 7,5)	Н/Д		

Процесс получения CLA-LNP состоит из 5 стадий: 1) приготовление раствора смеси липидов и разбавленного цитрата А; 2) образование LNP посредством Т-смешения; 3) ультрафильтрация; 4) осветляющая фильтрация; и 5) стерильная фильтрация и заполнение флаконов.

#### *Приготовление раствора липидной смеси и разбавленного цитрата А*

Липидные компоненты взвешивали, объединяли и растворяли в этаноле, затем проводили стерильную фильтрацию с образованием смеси липидов. Цитрат А (20 мМ цитрата, рН 5,0) разбавляли в соотношении один к одному стерильной водой с получением разбавленного цитрата А (DCA).

#### *Образование LNP посредством Т-смешения*

Затем смесь липидов и DCA смешивали друг с другом на соседних концах Т-образного трубчатого смесителя. Поток, выходящий из Т-образного аппарата, сразу разбавляли 20 мМ цитратом, 300 мМ NaCl, рН 6,0 при соотношении 1:1, затем эту смесь продуктов еще раз разбавляли 1-кратным фосфатно-солевым буфером Дульбекко при соотношении 1:1 и затем собирали в виде образовавшихся LNP. Затем LNP-интермедиат инкубировали при температуре окружающей среды в течение 30 минут и выдерживали в течение ночи при 4°C.

#### *Ультрафильтрация*

Далее LNP-интермедиат подвергали ультрафильтрации с NMWCO 500 кДа, чтобы сконцентрировать субстанцию приблизительно в 10 раз, а также провести диафильтрацию субстанции против 20 мМ Трис, 10% (масса/объем) сахарозы, рН 7,5. После

диафильтрации выполняли финальную стадию концентрирования для достижения конечной целевой концентрации.

#### *Осветляющая фильтрация*

Далее субстанцию адьюванта подвергали предварительной фильтрации через 0,45 мкм целлюлозно-ацетатный (СА) фильтр, а затем фильтровали через осветляющий 0,2 мкм СА-фильтр и хранили в замороженном виде при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### *Стерильная фильтрация и розлив во флаконы*

Субстанцию замороженного адьюванта оттаивали на водяной бане с регулируемой температурой  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ . Размороженную субстанцию адьюванта пропускали через 0,45-мкм поливинилиденфторидный (PVDF) осветляющий фильтр и 0,22-мкм PVDF стерилизующий градиентный фильтр и собирали. Затем отфильтрованную субстанцию адьюванта разбавляли 20 мМ Трис, 10% (масса/объем) сахарозы, рН 7,5 до целевой концентрации адьюванта LNP. Затем эту разбавленную итоговую субстанцию адьюванта помещали в стеклянные флаконы и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **Пример 6: Иммуногенность PCV1 у мышей: оценка систем адьювантов**

Молодых самок мышей BALB/c (возраст 6-8 недель, 10 особей в группе ( $n=10$ )) внутримышечно (IM) иммунизировали 0,1 мл PCV1, приготовленной с различными адьювантами (Таблица 4), в дни 0, 14 и 28. Доза PCV1 содержала 0,08 мкг РnР (6В, конъюгированного с CRM197) на иммунизацию. Средний медицинский персонал, обученный уходу за животными, осматривал мышей по меньшей мере ежедневно на предмет наличия каких-либо признаков заболевания или дистресса. Композиции вакцин были сочтены безопасными для мышей и хорошо переносимыми, так как не было отмечено связанных с вакцинами побочных эффектов. Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с рекомендациями Руководства по уходу и использованию лабораторных животных Национального института здоровья. Экспериментальный протокол для мышей был одобрен Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных в Merck & Co., Inc. (Кенилворт, Нью-Джерси, США).

Таблица 4: Составы композиций, которые оценивали в исследовании иммуногенности PCV1 на мышах

Композиция
ST-6B-CRM197; 0,8 мкг PnPs/мл; 20 mM L-гистидин, 150 mM NaCl, 0,1 % мас./об. PS-20 [Без адъюванта]
ST-6B-CRM197; 0,8 мкг PnPs/мл; 20 mM L-гистидин, 150 mM NaCl, 0,2% масс./об. PS-20 20 [50 мкг/мл APA]
ST-6B-CRM197; 0,8 мкг PnPs/мл; 10 mM L-гистидин, 75 mM NaCl, 0,05 % мас./об. PS-20 [8 мкг/мл CLA-SNE]
ST-6B-CRM197; 0,8 мкг PnPs/мл; 10 mM L-гистидин, 75 mM NaCl, 0,05 % мас./об. PS-20 [80 мкг/мл CLA-SNE]
ST-6B-CRM197; 0,8 мкг PnPs/мл; 10 mM L-гистидин, 75 mM NaCl, 0,05 % мас./об. PS-20 [800 мкг/мл CLA-SNE]
ST-6B-CRM197; 0,8 мкг PnPs/мл; 10 mM L-гистидин, 75 mM NaCl, 0,05 % мас./об. PS-20 [SNE (10 мг/мл сквалена; 1,0 мг/мл PS-20; 1,0 мг/мл SPAN-85)]
10 mM L-гистидин, 75 mM NaCl, 0,05 % мас./об. PS-20 [SNE (10 мг/мл сквалена; 1,0 мг/мл PS-20; 1,0 мг/мл SPAN-85)]

Сыворотки мышей оценивали на IgG иммуногенность с использованием ELISA для определения титров анти-6B IgG. Функциональные антитела определяли с помощью опсонофагоцитарного анализа (ОПА) на основании описанных ранее протоколов, доступных в пневмококковой референс-лаборатории UAB (референс-лаборатория Университета Алабамы в Бирмингемской справочной библиотеке бактериальных респираторных патогенов) и программного обеспечения Opsotiter® 3, принадлежащего и лицензированного Исследовательским Фондом Университета Алабамы (UAB) (см. Caro-Aguilar I. et al., *Vaccine* (2017) 35(6):865-72 and Burton R.L. and Nahm M.H. *Clin. Vaccine Immunol.* (2006) 13(9):1004-9). Как показано на Фигуре 5А, иммунизация мышей BALB/с против PCV1 приводила к генерации титров антител к вакцине с серотипом 6B (ST-6B) при наличии и отсутствии APA в составе вакцины. Было обнаружено, что ST-6B, в комбинации с CLA-SNE (0,08, 8 или 80 мг CLA на дозу) или SNE адъювантами, является иммуногенным для мышей и приводит к более высокой иммуногенности после введения дозы 3 по сравнению с ST-6B как таковым или в комбинации с APA. Титры анти-6B функциональных антител генерировались у мышей BALB/с, которые были иммунизированы ST-6B в комбинации с APA и без него (Фигура 5B).

#### **Пример 7: Иммуногенность PCV24 у взрослых макак-резусов**

PCV24 (серотипы 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, de-O-Ac-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, каждый из которых конъюгирован с CRM197), оценивали на модели иммуногенности взрослых макак-резусов. Макак-резусов внутримышечно иммунизировали PCV24, содержащей APA; PCV24, содержащей SNE, или CLA, приготовленным в виде SNE (CLA-SNE) или LNP (CLA-LNP) (Таблица 5) в дни 0 и 28. PCV24 вводили в дозе 0,4 мкг PnP в объеме 0,1 мл на иммунизацию. Сыворотки собирали до начала исследования (до иммунизации, в день 0), а также в 14-й (PD1) и 42-й дни (PD2).

Таблица 5: Составы PCV24, которые оценивали на модели иммуногенности взрослых макак-резусов

Композиция
PCV24 в 20 мМ L-гистидине, 150 мМ NaCl, 0,2% (мас./об.) PS-20 [250 мкг/мл APA]
PCV24 в 10 мМ L-гистидина, 10 мМ Трис, 5% (мас./об.) сахарозы, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20 [1200 мкг/мл CLA-LNP]
PCV24 в 10 мМ L-гистидине, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20 [800 мкг/мл CLA-SNE (25 мг/мл сквалена; 5,0 мг/мл PS-20; 5,0 мг/мл SPAN-85)]
PCV24 в 10 мМ L-гистидине, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20 [1200 мкг/мл CLA-SNE (25 мг/мл сквалена; 5,0 мг/мл PS-20; 5,0 мг/мл SPAN-85)]
PCV24 в 10 мМ L-гистидине, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20 [SNE (25 мг/мл сквалена; 5,0 мг/мл PS-20; 5,0 мг/мл SPAN-85)]

Для оценки серотип-специфических IgG иммуногенных ответов на 24-валентную вакцину был разработан мультиплексный электрохемилюминесцентный (ECL) анализ. Этот анализ был разработан для использования с сывороткой резусов на основе предыдущих анализов, описанных Marchese et al. и Skinner et al. (Marchese R.D. et al., Clin. Vaccine Immunol. (2009) 16(3):387-96 and Skinner, J.M. et al., Vaccine (2011) 29(48):8870-8876). В технологии, разработанной MesoScale Discovery (подразделением MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD), используются полисахариды пневмококковых серотипов (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, de-O-Ac-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B), нанесенные в ячейки 96-луночного планшета, и антитело, меченное SULFO-TAG™, которое испускает свет при электрохимической стимуляции. Античеловеческие IgG, меченные SULFO-TAG™, использовали в качестве

вторичного антитела для тестирования образцов сыворотки резусов. Титр в конечной точке разведения вычисляли как величину, обратную линейно интерполированному разведению, соответствующему пороговому значению (контрольный сигнал ECL), с использованием логарифмического масштабирования ECL и разведения. Для образцов, выходящих за пределы исследуемого максимального разведения, титры экстраполировали посредством линейной экстраполяции (при двойном логарифмическом масштабировании) с использованием отрезка, отсекаемого на оси, и углового коэффициента для последних 2 или 3 точек данных ECL на кривой образца, расположенных полностью выше пороговой линии. Все титры получали посредством обратного преобразования линейно экстраполированного разведения. Если кривая образца была полностью ниже линии отсечения, в качестве титра при анализе всех данных и на фигурах 6А и 6В использовали значение 100. Функциональные антитела определяли с помощью мультиплексных опсонофагоцитарных анализов (МОРА), на основании описанных ранее протоколов, доступных в пневмококковой референс-лаборатории UAB (референс-лаборатория Университета Алабамы в Бирмингемской справочной библиотеке бактериальных респираторных патогенов) и программного обеспечения Opsotiter® 3, принадлежащего и лицензированного Исследовательским Фондом Университета Алабамы (UAB) (см. Caro-Aguilar I. et al., *Vaccine* (2017) 35(6):865-72 and Burton R.L. and Nahm M.H. *Clin. Vaccine Immunol.* (2006) 13(9):1004-9).

Было обнаружено, что PCV24 в комбинации с CLA-SNE с концентрацией 1200 мкг/мл CLA-SNE (25 мг/мл сквалена; 5,0 мг/мл PS-20; 5,0 мг/мл SPAN-85), является иммуногенной для взрослых макак-резусов и приводит к более высокой иммуногенности после введения дозы 1 и после введения дозы 2 по сравнению с PCV24 в комбинации с APA (фиг. 6А). PCV24 в комбинации с CLA-SNE в дозировке 120 мкг приводит к такой же или лучшей иммуногенности по сравнению с PCV24 в комбинации с APA (сплошная линия) после введения дозы 1 (PD1) и после введения дозы 2 (PD2). После введения PD2 PCV24 в комбинации с CLA-SNE при двух уровнях доз CLA (120 мкг показаны кружочками, 80 мкг показаны треугольниками) приводит к такой же или лучшей иммуногенности по сравнению с PCV24 в комбинации с APA (сплошная линия) или PCV24 в комбинации с CLA-LNP (120 мкг, квадратики) (фиг. 6В).

Эти же композиции приводили к генерации функциональных антител (фиг. 7А-7М), которые убивали бактериальные штаммы вакцинного типа во всех протестированных временных точках, и опять CLA-SNE, SNE сама по себе и CLA-LNP усиливали ответ на PCV24 по сравнению с ответом на PCV24 в комбинации с APA. Единственным исключением был 23В, у которого высокий уровень пневмококковой предварительной

сенсibilизации мешал вторичному иммунному ответу после вакцинации. Все временные точки исследования были протестированы в МОРА как объединенные или отдельные образцы (рис. 7А-7М). Большой разницы в титрах ОРА между PD1 и PD2 не наблюдали.

Сыворотку взрослых макак-резусов, иммунизированных PCV24, оценивали на перекрестную реактивность с другими бактериями *Streptococcus pneumoniae*. Сыворотки макак, иммунизированных PCV24, имели перекрестную реактивность с серотипами 6С (фиг. 6А, 6В и 7D) и 15В (фиг. 6А и 6В). Перекрестная реактивность к 6С, вероятно, связана с иммунизацией полисахаридным конъюгатом 6А-CRM197 в составе поливалентной PCV24 (Cooper D, Yu X, Sidhu M, Nahm MH, Fernsten P, Jansen KU). 13-валентная пневмококковая конъюгированная вакцина (PCV13) вызывает у людей перекрестно-функциональные опсонофагоцитарные ответы на серотипы 6С и 7А *Streptococcus pneumoniae*. (Vaccine. 2011; 29:7207-11). Аналогично, иммунизация полисахаридными конъюгатами de-O-Ас-15В-CRM197 в составе поливалентной PCV приводила к перекрестной реактивности по отношению к серотипу 15С (Rajam et al., *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, 14(9):1223–1227).

#### **Пример 8: Исследование иммуногенности PCV24 у детенышей макак-резусов (IRM)**

PCV24 (серотипы 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, de-O-Ас-15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В, каждый из которых конъюгирован с CRM197), и адьювантные композиции готовили, как описано в примерах выше. IRM (детенышей макак-резусов, n = 5 в группе) внутримышечно иммунизировали 0,1 мл вакцины, как описано в Таблице 6 ниже, в дни 0, 28 и 56. Сыворотку собирали до начала исследования (до) и в дни 14 (PD1), 42 (PD2) и 70 (PD3). Средний медицинский персонал, обученный уходу за животными, осматривал IRM два раза в сутки на предмет любых признаков болезни или дистресса. Композиции вакцин были сочтены безопасными для IRM и хорошо переносимыми, так как не было отмечено связанных с вакцинами побочных эффектов.

Таблица 6: Композиции PCV24, которые оценивали в модели иммуногенности у детенышей макак-резусов

Композиция
PCV24 в 20 мМ L-гистидине, 150 мМ NaCl, 0,2% (мас./об.) PS-20, [250 мкг/мл АРА]
PCV24 в 10 мМ L-гистидина, 10 мМ Трис, 5% (мас./об.) сахарозы, 75 мМ NaCl, 0,05

% (мас./об.) PS-20, [1200 мкг/мл CLA-LNP]
PCV24 в 10 мМ L-гистидине, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20, [SNE (25 мг/мл сквалена; 2,5 мг/мл PS-20; 2,5 мг/мл SPAN-85)]
PCV24 в 10 мМ L-гистидине, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20, [600 мкг/мл CLA-SNE (25 мг/мл сквалена; 2,5 мг/мл PS-20; 2,5 мг/мл SPAN-85)]
PCV24 в 10 мМ L-гистидине, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20, [1200 мкг/мл CLA-SNE (25 мг/мл сквалена; 2,5 мг/мл PS-20; 2,5 мг/мл SPAN-85)]
PCV24 в 10 мМ L-гистидина, 10 мМ Трис, 5% сахарозы, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20, [2950 мкг/мл CLA-SNE (25 мг/мл сквалена; 2,5 мг/мл PS-20; 2,5 мг/мл SPAN-85)]
PCV24 в 10 мМ L-гистидине, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20, [600 мкг/мл CLA-SNE (5 мг/мл сквалена; 0,5 мг/мл PS-20; 0,5 мг/мл SPAN-85)]
PCV24 в 10 мМ L-гистидине, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20, [1200 мкг/мл CLA-SNE (5 мг/мл сквалена; 0,5 мг/мл PS-20; 0,5 мг/мл SPAN-85)]
PCV24 в 10 мМ L-гистидине, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20, [ 2950 мкг/мл CLA-SNE (5 мг/мл сквалена; 0,5 мг/мл PS-20; 0,5 мг/мл SPAN-85)]
[ PCV24 в 20 мМ L-гистидине, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20, [1200 мкг/мл CLA-SNE (0,8 мг/мл сквалена; 0,08 мг/мл PS-20; 0,08 мг/мл SPAN-85)]

Для оценки ответов серотип-специфических IgG на 24-валентную вакцину был разработан мультиплексный анализ электрохемилюминесценции (ECL), как описано выше. Титр в конечной точке разведения вычисляли как величину, обратную линейно интерполированному разведению, соответствующему пороговому значению (контрольный сигнал ECL), с использованием логарифмического масштабирования ECL и разведения. Для образцов, выходящих за пределы исследуемого максимального разведения, титры экстраполировали посредством линейной экстраполяции (при двойном логарифмическом масштабировании) с использованием отрезка, отсекаемого на оси, и углового коэффициента для последних 2 или 3 точек данных ECL на кривой образца, расположенных полностью выше пороговой линии. Все титры получали посредством обратного преобразования линейно экстраполированного разведения. Если кривая образца была полностью ниже линии отсечения, в качестве титра при анализе всех данных и на фигурах использовали значение 100.

Как показано на Фигуре 8А, после введения дозы 2 (день 42), PCV24 в комбинации с CLA-LNP приводит к такой же или лучшей иммуногенности по сравнению с PCV24 в

комбинации с АРА (кружочки). PCV24 в комбинации с CLA-SNE (295 мкг CLA с 2,5 мг сквалена; 0,25 мг PS-20; 0,25 мг SPAN-85 на дозу 0,1 мл, показана треугольниками) или CLA-SNE (295 мкг CLA с 0,5 мг сквалена, 0,05 мг PS-20, 0,05 мг SPAN-85 на дозу 0,1 мл, показанную ромбиками) приводит к такой же или лучшей иммуногенности по сравнению с PCV24 в комбинации с АРА. PCV13 и PCV24/АРА обладали сравнимой иммуногенностью в отношении серотипов (ST) в целом, за исключением ST5, который демонстрировал более высокую иммуногенность в отношении PCV24/АРА (квадратики).

PCV24 в комбинации с CLA-SNE (60 мкг CLA с 2,5 мг сквалена; 0,25 мг PS-20; 0,25 мг SPAN-85 на дозу 0,1 мл, показано кружочками), CLA-SNE (120 мкг CLA с 2,5 мг сквалена; 0,25 мг PS-20; 0,25 мг SPAN-85 на дозу 0,1 мл, показанную треугольниками) или CLA-SNE (295 мкг CLA с 2,5 мг сквалена; 0,25 мг PS-20; 0,25 мг SPAN-85 на дозу 0,1 мл, показанную ромбиками), приводит к такой же или лучшей иммуногенности по сравнению с PCV24 в комбинации с АРА после PD1 (фиг. 8B), PD2 (фиг. 8C) и PD3 (фиг. 8D). Стоит отметить, что PCV24 в комбинации с CLA-SNE, содержащей 120 мкг CLA, 0,08 мг сквалена; 0,008 мг PS-20; 0,008 мг SPAN-85 на дозу 0,1 мл, приводит к сравнимой иммуногенности по сравнению с PCV24 в комбинации с CLA-SNE, содержащей 120 мкг CLA, 0,5 мг сквалена; 0,05 мг PS-20; 0,05 мг SPAN-85 на дозу 0,1 мл, или PCV в комбинации с CLA-SNE, содержащей 295 мкг CLA с 2,5 мг сквалена; 0,25 мг PS-20; 0,24 мг SPAN-85 на дозу 0,1 мл (данные не представлены).

### **Пример 9: PCV24 защищает от заражения у мышей**

Молодых самок мышей Swiss Webster (возраст 6-8 недель, n=10 особей в группе) внутримышечно (IM) иммунизировали 0,1 мл 24-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины (PCV24) в дни 0, 14 и 28. Доза PCV24 включала 0,4 мкг PnP (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, de-O-Ac-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B), каждый из которых был конъюгирован с CRM197, на иммунизацию. PCV24 готовили с несколькими адъювантными системами, как описано в Таблице 7. Средний медицинский персонал, обученный уходу за животными, ежедневно осматривал мышей на предмет наличия каких-либо признаков заболевания или дистресса. Композиции вакцин были сочтены безопасными для мышей и хорошо переносимыми, так как не было отмечено связанных с вакцинами побочных эффектов. Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с рекомендациями Руководства по уходу и использованию лабораторных животных Национального института здоровья. Экспериментальный протокол для мышей был одобрен Институциональным комитетом



по содержанию и использованию животных в Merck & Co., Inc. (Кенилворт, Нью-Джерси, США).

На 53-й день мышей анестезировали изофлураном и интратрахеально заражали серотипом 24F *Streptococcus pneumoniae*. Вкратце, культуры *Streptococcus pneumoniae*, находящиеся в экспоненциальной фазе, центрифугировали, промывали и суспендировали в стерильном PBS.  $4,6 \times 10^6$  КОЕ *Streptococcus pneumoniae* в 0,1 мл PBS помещали в горло мышей, подвешенных вертикально за резцы. Аспирацию бактерий индуцировали, осторожно вытягивая наружу язык и закрывая ноздри. Мышей взвешивали ежедневно и подвергали эвтаназии, если потеря веса превышала 20% от исходного веса. Для оценки бактериемии через 24 часа, 48 часов и 72 часа после заражения собирали кровь. Средний медицинский персонал, обученный уходу за животными, по меньшей мере дважды в день осматривал мышей на предмет наличия каких-либо признаков заболевания или дистресса.

Мыши, иммунизированные вакцинами PCV24, содержащими адьювант (CLA-LNP, CLA-SNE или только SNE), были защищены от интратрахеального заражения серотипом 24F (фиг. 9). Все мыши, иммунизированные PCV24, содержащей адьюванты, имели 100% выживаемость по сравнению с 10% выживаемостью интактных мышей через 7 дней после заражения. Эти данные показывают, что PCV24 с адьювантными составами была способна защитить мышей от интратрахеального заражения серотипом 24F.

Таблица 7: PCV24 в комбинации с адьювантами, используемыми для иммунизации мышей в модели интратрахеального заражения серотипом 24F *Streptococcus pneumoniae*

Композиции
PCV24 в 10 мМ L-гистидине, 10 мМ Трис, 5% (мас./об.) сахароза, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20 [1200 мкг/мл CLA-LNP]
PCV24 в 10 мМ L-гистидине, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20 [1200 мкг/мл CLA-SNE (25 мг/мл сквалена; 2,5 мг/мл PS-20; 2,5 мг/мл SPAN-85)]
PCV24 в 10 мМ L-гистидине, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20 [SNE (25 мг /мл сквалена; 2,5 мг/мл PS-20; 2,5 мг/мл SPAN-85)]

#### **Пример 10: Оценка влияния времени и температуры на физическую стабильность наноэмульсионной композиции с использованием NTA и DLS**

Как показано на Фигуре 10, для оценки стабильности наноэмульсионных систем (CLA-SNE или SNE), приготовленных, как описано в вышеприведенных примерах,

использовали анализ траекторий движения наночастиц (NTA). Этот метод собирает видео непосредственно отслеживаемых популяций наночастиц, движущихся в результате Броуновского движения, с целью определения размера и концентрации этих частиц. Лазер класса 1 с длиной волны 635 нм фокусирует красный лазерный луч диаметром 80 мкм на жидком образце, подсвечивая частицы, как быстро рассеивающиеся световые точки. CCD-камера записывает видео со скоростью 30 кадров в секунду, чтобы отслеживать движение каждой отдельной освещенной частицы во времени. Системное программное обеспечение идентифицирует центр каждой отдельной частицы из видео и независимо отслеживает пройденное расстояние, чтобы определить среднеквадратичное смещение. Это отслеживание выполнялось одновременно для каждой частицы популяции в образце в каждом кадре до тех пор, пока необработанные данные, собранные из всего видео, не были проанализированы. Путем одновременного измерения среднеквадратичного смещения каждой отдельной отслеживаемой частицы для нее определяют коэффициент диффузии ( $Dt$ ) и сферический эквивалентный гидродинамический радиус ( $r_h$ ) с помощью уравнения Стокса-Эйнштейна. Затем программное обеспечение представляет эти накопленные данные как размер частиц и распределение концентраций. Были собраны исходные данные, касающиеся не только размера и концентрации частиц, но также интенсивности или яркости отдельных частиц. Взятые вместе эти данные были приведены в соответствие и по-отдельности нанесены на график как интенсивность частиц по отношению к размеру частиц и концентрация частиц по отношению к размеру частиц, а затем на трехмерные контурные диаграммы, сравнивающие размер частиц, концентрацию и интенсивность всех популяций частиц.

При выдерживании композиций наноэмульсий (CLA-SNE или SNE) при 4 °C, 25 °C и 37 °C в промежутки времени до 1 месяца, согласно оценке с использованием NTA, в наноэмульсиях не наблюдалось значительного изменения в концентрации частиц или распределении по размерам (Фигура 10).

При диапазоне размеров частиц 10-1000 нм наноэмульсия может быть подвержена агрегации, что делает DLS подходящим методом определения стабильности для оценки и количественного определения явления агрегации. Для оценки стабильности наноэмульсионных систем, приготовленных, как описано в вышеприведенных примерах, проводили измерение среднего распределения частиц по размерам с использованием динамического светорассеяния (DLS). В приборах DLS для освещения частиц в растворе используется лазер, а затем определяются изменения интенсивности рассеянного света с течением времени, как результат броуновского движения. Корреляция интенсивности рассеянного света во времени с интенсивностью в нулевой момент времени приводит к

экспоненциальной кривой затухания или корреляционной функции. Скорость затухания корреляционной функции в зависимости от времени намного выше для более мелких частиц, чем для более крупных, и это составляет основу для расчета размеров частиц. При выдерживании наноэмульсии при 4°C, 25°C или 37°C в промежутки времени до 1 месяца никаких изменений в распределении наноэмульсий по размерам, оцениваемых с помощью DLS, не наблюдалось (фигура 11). Z-среднее значение оставалось в диапазоне примерно от 110 до 180 нм для CLA-SNE или SNE.

#### **Пример 11: Оценка влияния времени и температуры на химическую стабильность состава наноэмульсии с использованием UPLC-CAD**

Для оценки химической стабильности наноэмульсионных систем, приготовленных, как описано в вышеприведенных примерах, измеряли стабильность CLA (только CLA-SNE) и концентрацию сквалена при хранении при 4°C, 25°C и 37°C в течение 1 месяца с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с детектором заряженного аэрозоля (UPLC-CAD). При выдерживании наноэмульсии при 4°C, 25°C и 37°C в пределах 1 месяца концентрация CLA (фиг. 12A) или сквалена (фиг. 12B) в SNE не изменялась. Кроме того, UPLC-CAD позволяет количественно определять образование продуктов разложения из-за химического распада сквалена или CLA. При воздействии на адьювантные системы SNE или CLA-SNE повышенной температуры не наблюдалось поддающихся обнаружению пиков деградации, что указывает на то, что сквален и CLA-компоненты адьювантных систем CLA-SNE и SNE обладают превосходной термостабильностью (данные не показаны).

#### **Пример 12: Влияние стабильной эмульсионной системы (+/- CLA) на стабильность пневмококковой конъюгированной вакцины**

Индивидуальные конъюгаты пневмококкового полисахарида с белком-носителем, приготовленные с использованием растворителей для восстановительного аминирования (апротонный DMSO), использовали для приготовления препарата PCV24 в концентрации 192 мкг/мл, как описано в вышеприведенных примерах.

Композицию PCV24 комбинировали в стеклянном контейнере с различными адьювантными системами, описанными в Таблице 8, и выдерживали при 4°C до 30 дней. В анализе ELISA на основе флуоресценции препарат продемонстрировал хорошую стабильность и сочетаемость с CLA-SNE (1,2 мг/мл CLA-SNE [6,5 мг/мл сквалена; 0,65 мг/мл PS-20; 0,65 мг/мл SPAN-85] или 1,2 мг/мл CLA-SNE [1,2 мг/мл сквалена; 0,12 мг/мл PS-20; 0,12 мг/мл SPAN-85]) или SNE ([6,5 мг сквалена; 0,65 мг PS-20; 0,65 мг SPAN-85])

или [0,4 мг сквалена; 0,04 мг PS-20; 0,04 мг SPAN-85]), которые не влияли на стабильность дозы конъюгата пневмококкового полисахарида с белком-носителем (фиг. 13A-13D).

Таблица 8: Состав композиций PCV24, приготовленных с адъювантами CLA-SNE или SNE

Композиции
PCV24 в 10 мМ L-гистидине, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20 [1,2 мг/мл CLA-SNE (6,5 мг/мл сквалена; 0,65 мг/мл PS-20; 0,65 мг/мл SPAN-85)]
PCV24 в 10 мМ L-гистидине, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20 [1,2 мг/мл CLA-SNE (1,2 мг/мл сквалена; 0,12 мг/мл PS-20; 0,12 мг/мл SPAN-85)]
PCV24 в 10 мМ L-гистидине, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20 [SNE (6,5 мг сквалена; 0,65 мг PS-20; 0,65 мг SPAN-85)]
PCV24 в 10 мМ L-гистидине, 75 мМ NaCl, 0,05 % (мас./об.) PS-20 [SNE (0,4 мг сквалена; 0,04 мг PS-20; 0,04 мг SPAN-85)]

### Пример 13: Иммуногенность PCV21 у взрослых макак-резусов

PCV21 (серотипы 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилованный-15B (deOAc15B), 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, каждый из которых конъюгирован с CRM197) также оценивали на модели иммуногенности взрослых макак-резусов, как описано в вышеприведенных примерах. Макак-резусов внутримышечно иммунизировали PCV21 или PCV21 в комбинации с CLA, приготовленным в виде SNE (CLA-SNE) (Таблица 9) в дни 0 и 28. Доза PnP в PCV21 составляла 1,0 мкг в объеме 0,25 мл на одну иммунизацию. Сыворотки собирали до начала исследования (до иммунизации, 0-й день) и в дни 14-й (PD1), 28-й (PD1) и 42-й (PD2).

Таблица 9: Композиции PCV21, которые оценивали в модели иммуногенности взрослых макак-резусов

Композиции
PCV21 в 20 мМ L-гистидине, 150 мМ NaCl, 0,1 % (мас./об.) PS-20 [без адъюванта]
PCV21 в 20 мМ L-гистидине, 112,5 мМ NaCl, 0,75 % (мас./об.) PS-20 [1,2 мг/мл CLA-SNE (1,2 мг/мл сквалена; 0,12 мг/мл PS-20; 0,12 мг/мл SPAN-85)]

Для оценки серотип-специфических IgG иммуногенных ответов на 21-валентную вакцину был разработан мультиплексный электрохемилюминесцентный анализ (ECL). Этот анализ был разработан для использования с сывороткой резусов на основе предыдущих анализов, описанных Marchese et al. и Skinner et al. (Marchese R.D. et al., *Clin. Vaccine Immunol.* (2009) 16(3):387-96 and Skinner, J.M. et al., *Vaccine* (2011) 29(48):8870-8876). В технологии, разработанной MesoScale Discovery (подразделением MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD), используются полисахариды пневмококковых серотипов (3, 6A, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, deOAc15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B), нанесенные в ячейки 96-луночного планшета, и антитело, меченное SULFO-TAG™, которое испускает свет при электрохимической стимуляции. Античеловеческие IgG, меченые SULFO-TAG™, использовали в качестве вторичного антитела для тестирования образцов сыворотки резусов. Концентрация IgG была интерполирована по стандартной референс-сыворотке 007sp (Reference Serum Standard 007sp) для фигур 14A, 14B и 14C. Функциональные антитела определяли с помощью мультиплексных опсонофагоцитарных анализов (MOPA), на основании описанных ранее протоколов, доступных в пневмококковой референс-лаборатории UAB (референс-лаборатория Университета Алабамы в Бирмингемской справочной библиотеке бактериальных респираторных патогенов) и программного обеспечения OpsoTiter® 3, принадлежащего и лицензированного Исследовательским Фондом Университета Алабамы (UAB) (см. Caro-Aguilar I. et al., *Vaccine* (2017) 35(6):865-72 and Burton R.L. and Nahm M.H. *Clin. Vaccine Immunol.* (2006) 13(9):1004-9).

Было обнаружено, что PCV21 в комбинации с CLA-SNE с концентрацией 1,2 мг/мл CLA-SNE (1,2 мг/мл сквалена, 0,12 мг/мл PS-20, 0,12 мг/мл SPAN-85), является иммуногенной для взрослых макак-резусов и приводит к более высокой иммуногенности после введения дозы 1 (день 14 — фигура 14A; день 28 — фигура 14B) и после введения дозы 2 (день 42, рис. 14C) по сравнению с PCV21, приготовленной без адьюванта. PCV21 в комбинации с CLA-SNE в дозе 300 мкг после введения дозы 1 (PD1) и после введения дозы 2 (PD2) приводит к такой же или лучшей иммуногенности по сравнению с PCV21, приготовленной без адьюванта.

Эти же композиции приводили к генерации функциональных антител, которые убивали бактериальные штаммы вакцинного типа во всех протестированных временных точках, и опять CLA-SNE усиливал ответ на PCV21 по сравнению с ответом на PCV21 без адьюванта. Все временные точки исследования были протестированы в MOPA как объединенные или отдельные образцы (рис. 7A-7M). Большой разницы в титрах ОРА между PD1 и PD2 не наблюдали (данные не показаны).

Сыворотку взрослых макак-резусов, иммунизированных PCV21, оценивали на перекрестную реактивность с другими бактериями *Streptococcus pneumoniae*. Сыворотки макак, иммунизированных PCV21, имели перекрестную реактивность с серотипами 6С (фиг. 14А, 14В и 14С) и 15В (фиг. 14А, 14В и 14С). Перекрестная реактивность к 6С, вероятно, связана с иммунизацией полисахаридным конъюгатом 6А-CRM197 в составе поливалентной PCV24 (Cooper D, Yu X, Sidhu M, Nahm MH, Fernsten P, Jansen KU). 13-валентная пневмококковая конъюгированная вакцина (PCV13) вызывает у людей перекрестно-функциональные опсонофагоцитарные ответы на серотипы 6С и 7А *Streptococcus pneumoniae* (Vaccine. 2011; 29:7207-11)). Аналогично, иммунизация полисахаридными конъюгатами de-O-Ac-15B-CRM197 (deOAc15B-CRM197) в составе мультивалентной PCV приводила к перекрестной реактивности по отношению к серотипу (Rajam et al., *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, 14(9):1223–1227).

**Пример 14: Получение стабильной наноэмульсионной (SNE) адьювантной системы с катионным липидом (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амином) и без него посредством самосборки микрофлюидной наноэмульсии (Microfluidic Nanoemulsion Self-assembly, MNS)**

Готовят стабильный наноэмульсионный адьювант с ионизируемым катионным липидом (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амином, также называемым CLA (фиг. 1), и без него. Для получения SNE использовали процесс самосборки микрофлюидной наноэмульсии (MNS). SNE представляет собой многокомпонентную эмульсию, состоящую из 3 стабилизирующих ингредиентов; сквален, сорбитана триолеат (SPAN-85) и полисорбат-20 (PS-20), включающую CLA (обозначается CLA-SNE, Таблица 10) или не включающую CLA (обозначается SNE, Таблица 11). Биофизические характеристики (например, размер частиц, химический состав) и стабильность композиций SNE/CLA-SNE, полученных с использованием MNS, очень сходны с характеристиками композиций SNE/CLA-SNE, полученными в результате процесса тонкой гомогенизации под высоким давлением, описанного в Примере 3. По существу, процесс самосборки микрофлюидной наноэмульсии (MNS), описанный в этом примере, является альтернативным процессом для получения стабильной наноэмульсионной адьювантной системы (SNE). Процесс самосборки наночастиц, описанный в этом примере, был осуществлен с использованием «микрофлюидного» прибора для смешивания этанола и воды. Однако процесс самосборки наночастиц потока этанола/воды, описанный в данном изобретении, не ограничивается «микрофлюидным» смешиванием. Смешивание больших объемов потоков гидрофобных растворителей с

водными растворами может быть выполнено с использованием Т-образного процесса смешивания, описанного в Примере 4.

Композиции SNE MNS обычно могут быть приготовлены путем растворения катионного липида, сквалена, SPAN-85 и PS-20 в заданных концентрациях в подходящем неводном растворителе, таком как этанол. Процедура самосборки включает объединение потока компонентов гидрофобной эмульсии, растворенных в этаноле, с потоком раствора водной эмульсии. Когда два потока растворителя объединяются, гидрофобные молекулы (т.е. катионный липид, сквален, SPAN-85 и PS-20) взаимодействуют с водным растворителем. Затем молекулы самостоятельно собираются в эмульсию наноразмерных частиц, как описано ниже. После образования самособирающейся эмульсии наночастиц остаточный этанол может быть удален из стабильной эмульсии сквалена несколькими подходящими способами. В данном примере содержание этанола было снижено до менее чем 0,1% (масса/объем) путем диализа с водным буфером в течение ночи. Полученную композицию SNE стерилизовали фильтрованием через 0,2 мкм стерилизационный фильтр. Чтобы получить SNE адьювантные системы с желаемыми свойствами, на каждом этапе контролировали определенные параметры процесса, такие как порядок добавления, время смешивания, температура, концентрации неводных компонентов, концентрации компонентов водного буфера, pH водного раствора, соотношение смешивания неводного и водного раствора, общая скорость потока и объем отходов.

Таблица 10. Композиция адьюванта CLA-SNE, приготовленная с использованием MNS

Компонент	Описание	Содержание каждого липиды (мол.%)	Молекулярная масса (г/моль)	Содержание каждого липида (мас. %)
CLA	(13Z,16Z)-N,N-диметил- 3-нонилдокоза-13,16- диен-1-амин	4 - 45 %	475,9	4 - 46 %
сквален	сквален	52 - 89 %	410,72	45 - 80 %
SPAN-85	сорбитана триолеат	2 - 4 %	957,5	4 - 8%
PS-20	полисорбат-20	2 - 3 %	1228	4 - 8%
Буферная матрица	20 mM гистидина, pH 5,8	Н/Д		

Таблица 11: Композиция адьюванта SNE, приготовленная с использованием MNS

Компонент	Описание	Содержание каждого липида (мол.%)	Молекулярная масса (г/моль)	Содержание каждого липида (масс. %)
сквален	сквален	92,9%	410,72	83,3%
SPAN-85	сорбитана триолеат	4,0%	957,5	8,3%
PS-20	полисорбат-20	3,1%	1228	8,3%
Буферная матрица	20 мМ гистидина, pH 5,8	Н/Д		

#### *Приготовление состава с использованием самосборки микрофлюидной наноэмульсии*

В этом примере для определения биофизических характеристик одна композиция SNE и четыре композиции CLA-SNE были приготовлены в 20 мМ гистидина, pH 5,8 с помощью процедуры самосборки микрофлюидной наноэмульсии. Процесс самосборки наноэмульсии начинается с 15 мг/мл сквалена, 1,5 мг/мл SPAN-85 и 1,5 мг/мл PS-20, полностью растворенных в этаноле. Кроме того, каждый из описанных выше этанольных растворов также содержал CLA в количестве 0,75, 1,5, 5,0 или 15,0 мг CLA/мл. Таким образом, начальный «целевой» % (мас./мас.) CLA/сквален для всех пяти составов будет составлять 0,0, 5,0, 10,0, 33,3 и 100 (мас./мас.) % CLA/сквален. Для всех композиций использовали водный буфер, содержащий 20 мМ гистидина при pH 5,8. Настольный прибор NanoAssembler™ от Precision NanoSystems, Inc. (Ванкувер, Британская Колумбия, Канада) использовали для самосборки одной SNE и четырех CLA-SNE адьювантных наноэмульсий.

Композиции самособирающихся наночастиц сквалена были приготовлены следующим образом. В шприц на 1 мл набирали чуть более 0,7 мл смеси гидрофобных соединений, растворенной в этаноле, а в шприц на 3 мл набирали чуть более 1,4 мл 20 мМ водного гистидинового буфера с pH 5,8. После того, как оба шприца были заполнены соответствующими количествами раствора, шприцы присоединялись к прибору NanoAssembler™. В NanoAssembler™ были запрограммированы следующие параметры микрожидкостного смешивания:

- а) общий объем = 2 мл,
- б) соотношение скоростей потока = 2:1 (водный раствор к этанолу),



- в) общая скорость потока = 12 мл/мин,
- г) начальный объем отходов = 0,25 мл и
- е) конечный объем отходов = 0,05 мл.

Для активации прибора, чтобы начать процесс смешивания этанола и водного раствора, потребовалось всего несколько секунд. Приблизительно 2,0 мл эмульсии наночастиц после смешивания в приблизительно 30% этаноле собирали в пробирку Falcon объемом 15 мл для каждой из 5 композиций. Для каждой из 5 различных композиций SNE и CLA-SNE, описанных выше, использовали свежий NanoAssemblr™-картридж для смешивания. Концентрацию этанола в каждом препарате снижали посредством диализа в течение ночи. После диализа все образцы хранили при 4°C до проведения аналитической характеристики.

#### *Аналитическая характеристика*

Катионный липид, CLA и сквален были в равной степени включены в скваленовые CLA-SNE наночастицы, полученные посредством MNS, как показано на фигуре 15А. Для удаления технологического этанола для всех образцов составов, описанных в этом примере, сравнивали соотношение CLA/сквален (мас./мас.) % после диализа (т.е. ось Y) с соотношением CLA/сквален (мас./мас.) % до самосборки (т.е. ось X). «Измеренное» соотношение CLA/сквален (мас./мас.) % после MNS и диализа было равно «заданному» (мас./мас.)% соотношению по меньшей мере до 35 (мас./мас.)%. Даже при 100% «заданного» соотношения CLA/сквален (мас./мас.)% до самосборки, свыше 70% доступного CLA включается в наночастицы CLA-SNE относительно содержания сквалена в эмульсии наночастиц, приготовленной посредством MNS. Соотношения CLA/сквален (мас./мас.) % измеряли с помощью обращенно-фазовой UPLC-CAD. Очевидно, что при получении с помощью процесса самосборки микрофлюидной наноэмульсии (MNS) CLA включается в CLA-SNE.

Взвешенные по интенсивности Z-средние DLS диаметры композиций CLA-SNE, приготовленных с помощью процесса сборки MNS, измеряли с использованием Malvern ZetaSizer Ultra. Аликвоты образцов CLA-SNE после диализа из каждой композиции разводили либо в 50, либо в 100 раз в 2,0 мл 20 мМ гистидинового буфера с pH 5,8. Для каждой композиции средний DLS диаметр (т.е., определенный при помощи DLS) и стандартное отклонение наносили на график в зависимости от измеренного соотношения CLA/сквален (мас./мас.) % после диализа, как показано на Фигуре 15В. Для каждой композиции проводили три измерения при помощи DLS при комнатной температуре. Планки погрешностей, отображающих стандартное отклонение, показаны, если только

стандартное отклонение не меньше изображения точки данных. Взвешенные по интенсивности Z-средние DLS диаметры композиций CLA-SNE, полученных посредством MNS, варьировались от приблизительно 150 до 280 нм, как и в случае наночастиц CLA-SNE, полученных гомогенизацией под высоким давлением. Для получения адъювантных систем CLA-SNE с требуемыми диаметрами, регулировали параметры процесса MNS, такие как описано в данном примере выше.

Измеренный дзета-потенциал композиций CLA-SNE наночастиц сквалена при pH 5,5, полученных с помощью процесса MNS, показан на фигуре 15С. Дзета-потенциал измеряли с помощью Malvern ZetaSizer Ultra. Аликвоты образцов CLA-SNE после диализа из каждой композиции разводили либо в 50, либо в 100 раз в 2,0 мл 20 мМ цитратного буфера BIS TRIS пропан при pH 5,5. Для каждой композиции проводили три измерения Дзета-потенциала при комнатной температуре. Планки погрешностей, отображающих стандартное отклонение, показаны, если только стандартное отклонение не меньше изображения точки данных. Дзета-потенциал композиции с 0 (мас./мас.) % CLA в CLA-SNE, т.е. без CLA, составлял около -5 мВ. Как показано на фигуре 15С, добавление CLA значительно увеличивало дзета-потенциал наночастиц, около до +10 мВ.

#### **Пример 15: Оптимизация получения CLA-SNE путем изменения pH водной фазы.**

Процесс получения CLA-SNE включает использование обратимой катионной молекулы CLA с кажущейся  $pK_a = 6,4$ . Добавление CLA в процессе получения SNE и конечной матрицы с pH=5,8 приводит к протонированию CLA, которое обеспечивает общий положительный заряд частицам CLA-SNE, а также любым промежуточным продуктам процесса получения. Получение CLA-SNE завершается фильтрацией через 0,8/0,2 мкм фильтр, технологической стадией, которую оказалось трудно выполнить, поскольку при этом постоянно наблюдалось значительное засорение фильтра и низкий выход продукта. Однако при фильтрации SNE не возникало таких же масштабов этих проблем фильтрации, и стадия фильтрации наноэмульсии была более эффективной. Важно отметить, что SNE не несет сильного положительного заряда в отсутствие CLA, наблюдаемого в случае CLA-SNE. В попытке получить незаряженный CLA-SNE для более эффективного проведения стадии фильтрации CLA-SNE, была осуществлена серия экспериментов, в которых регулировали pH водной фазы (20 мМ L-гистидин) перед использованием при получении CLA-SNE. Готовили 20 мМ L-гистидина с целевыми значениями pH 5,0, 5,7, 5,8, 6,0, 6,2, 7,0 и 7,7. Затем каждый буфер использовали в качестве водной фазы в процессе приготовления CLA-SNE с заданной концентрацией 15 мг/мл CLA, приготовление CLA-SNE проводили точно так, как описано в Примере 3.

После завершения стадии гомогенизации размер частиц промежуточного соединения CLA-SNE измеряли с помощью DLS, используя Malvern Panalytical Nano ZS. Затем проводили фильтрацию с использованием 0,8/0,2 мкм PES-фильтра. Распределение частиц по размерам измеряли после фильтрации с помощью DLS, а [CLA] количественно определяли с помощью UPLC-CAD. Для образцов CLA-SNE, приготовленных в 20 мМ L-гистидине с рН 7,0 или 7,7, полное засорение фильтра наблюдалось сразу после нанесения материала на фильтр, и сбор отфильтрованного материала был невозможен, делая невозможной количественную оценку с помощью DLS или UPLC-CAD, нулевые значения приведены в иллюстративных целях. В предварительно отфильтрованных образцах, согласно DLS, наблюдалась тенденция к увеличению размера частиц при повышении рН буфера водной фазы (Фигура 16). Эта зависимость сохранялась в образцах после фильтрации, при этом каждый образец CLA-SNE демонстрировал умеренное уменьшение размера частиц после фильтрации, за очевидным исключением образцов с рН 7,0 и 7,7, которые снова продемонстрировали моментальное полное засорение фильтра и невозможность извлечения материала. Для образцов после фильтрации было замечено, что по мере повышения рН водной фазы [CLA] уменьшается в конечном материале CLA-SNE (фигура 17). Эта зависимость показывает, что получение CLA-SNE с использованием водной фазы при более низких рН приводит к увеличению выхода процесса на финальной стадии фильтрации и более эффективному процессу производства SLA-CAN.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Композиция пневмококкового конъюгата, содержащая конъюгаты полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем и стабильную наноэмульсию (SNE), где SNE содержит сорбитана триолеат (SPAN-85); полисорбат-20 (PS-20) или полисорбат-80 (PS-80); и сквален.

2. Композиция по п.1, в которой SNE содержит 6 мкг/мл - 14 мг/мл SPAN-85, 6 мкг/мл - 14 мг/мл PS-20 или PS-80 и 60 мкг/мл - 34 мг/мл сквалена.

3. Композиция по п.1 или 2, в которой SNE дополнительно содержит катионный липид.

4. Композиция по п.3, где катионный липид представляет собой (13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин.

5. Композиция по п.3 или 4, содержащая 30 мкг/мл - 2,4 мг/мл катионного липида.

6. Композиция по любому из пп.1-5, в которой каждый из конъюгатов полисахарида *Streptococcus pneumoniae* с белком-носителем содержит полисахарид конкретного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, и где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из группы, состоящей из серотипов:

a) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F;

b) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F;

c) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F;

d) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F;

e) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B;

f) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B;

g) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B;

h) 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B;

i) 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B;

j) 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B;

- k) 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B;
- l) 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B;
- m) 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B;
- n) 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B;
- o) 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B; и
- p) 3, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B.

7. Композиция по любому из пп.1-6, в которой белок-носитель представляет собой CRM197.

8. Композиция по п.7, в которой серотипы *Streptococcus pneumoniae* в композиции состоят из серотипов: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F.

9. Композиция по п.7, в которой серотипы *Streptococcus pneumoniae* в композиции состоят из серотипов: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F.

10. Композиция по п.7, в которой серотипы *Streptococcus pneumoniae* в композиции состоят из серотипов: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F.

11. Композиция по п.7, в которой серотипы *Streptococcus pneumoniae* в композиции состоят из серотипов: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F.

12. Композиция по п.7, в которой серотипы *Streptococcus pneumoniae* в композиции состоят из серотипов: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B.

13. Композиция по п.7, в которой серотипы *Streptococcus pneumoniae* в композиции состоят из серотипов: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, де-О-ацетилированного-15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B.

14. Композиция по п.7 в которой серотипы *Streptococcus pneumoniae* в композиции состоят из серотипов: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B.

15. Композиция по п.7, в которой серотипы *Streptococcus pneumoniae* в композиции состоят из серотипов: 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15В, 16F, 17F, 19А, 20, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В.

16. Композиция по п.7, в которой серотипы *Streptococcus pneumoniae* в композиции состоят из серотипов: 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, де-О-ацетилированного-15В, 16F, 17F, 19А, 20, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В.

17. Композиция по п.7, в которой серотипы *Streptococcus pneumoniae* в композиции состоят из серотипов: 3, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15С, 16F, 17F, 19А, 20, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В.

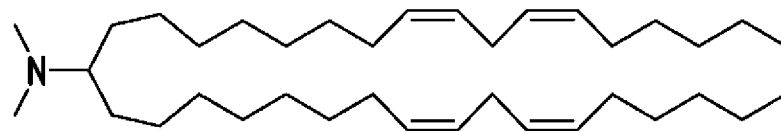
18. Композиция по любому из пп.1-17, в которой SNE содержит PS-20.

19. Композиция по любому из пп.1-18, которая дополнительно содержит от 5 мМ - 40 мМ гистидина при рН 5,1-7,0 и от 25 мМ - 300 мМ NaCl.

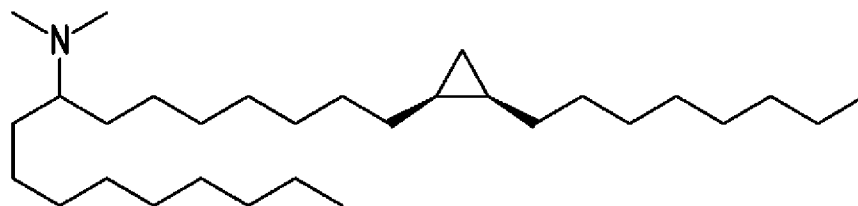
20. Композиция по любому из пп. 1-18, которая дополнительно содержит около 20 мМ гистидина при рН около 5,8 и около 75 мМ NaCl.

21. Способ лечения или профилактики пневмококковых заболеваний у пациента, включающий введение пациенту иммунологически эффективного количества композиции по любому из пп.1-20.

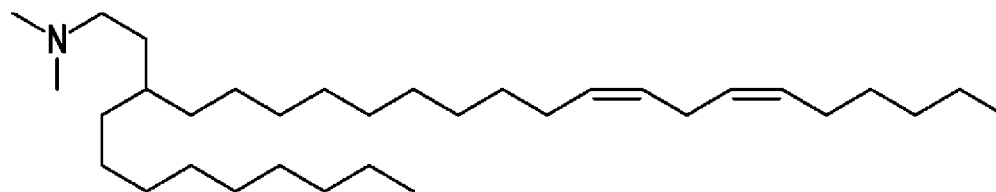
22. Применение композиции по любому из пп.1-20 для лечения или профилактики пневмококковых заболеваний.



**CLX ((6Z,9Z,26Z,29Z)-N,N-диметилпентатриаконта-6,9,26,29-тетраен-18-амин)**

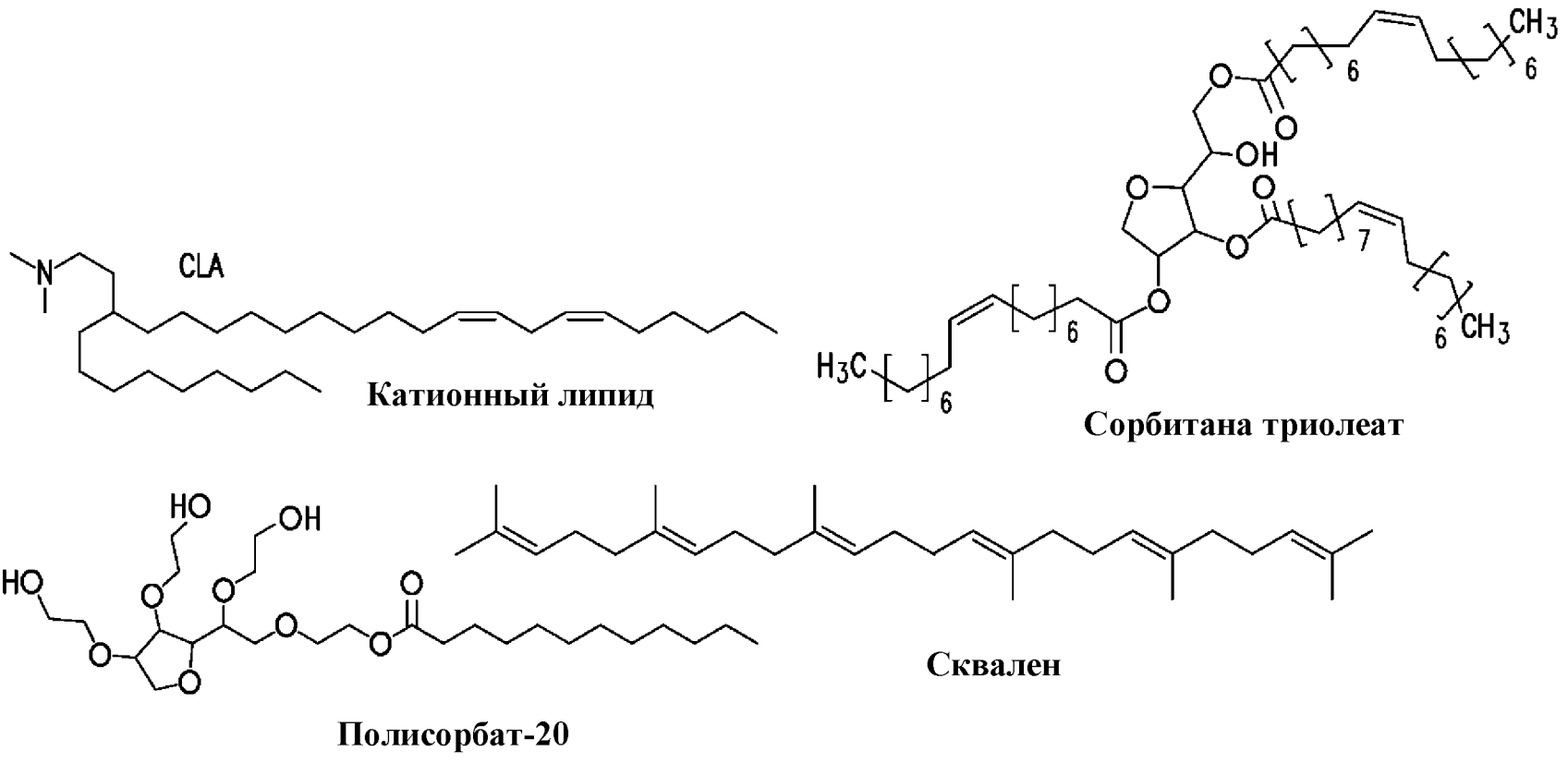


**CLY (N,N-диметил-1-((1S,2R)-2-октилциклопропил)гептадекан-8-амин)**



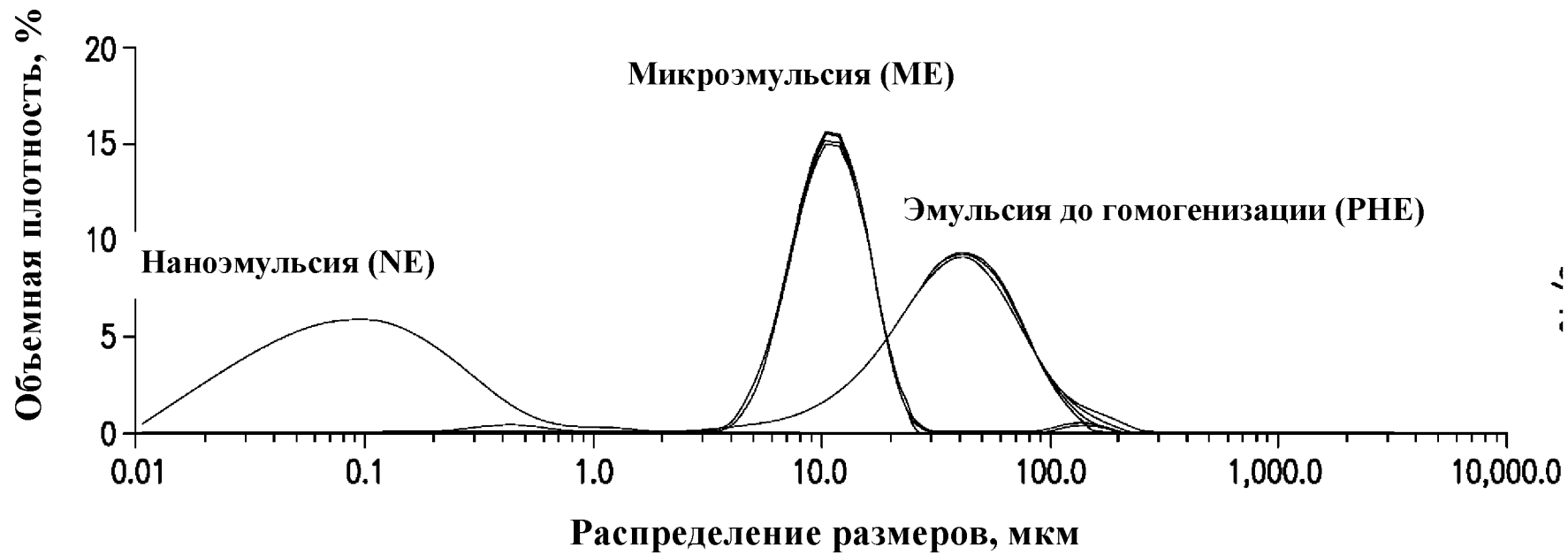
**CLA ((13Z,16Z)-N,N-диметил-3-нонилдокоза-13,16-диен-1-амин)**

**Фиг. 1**

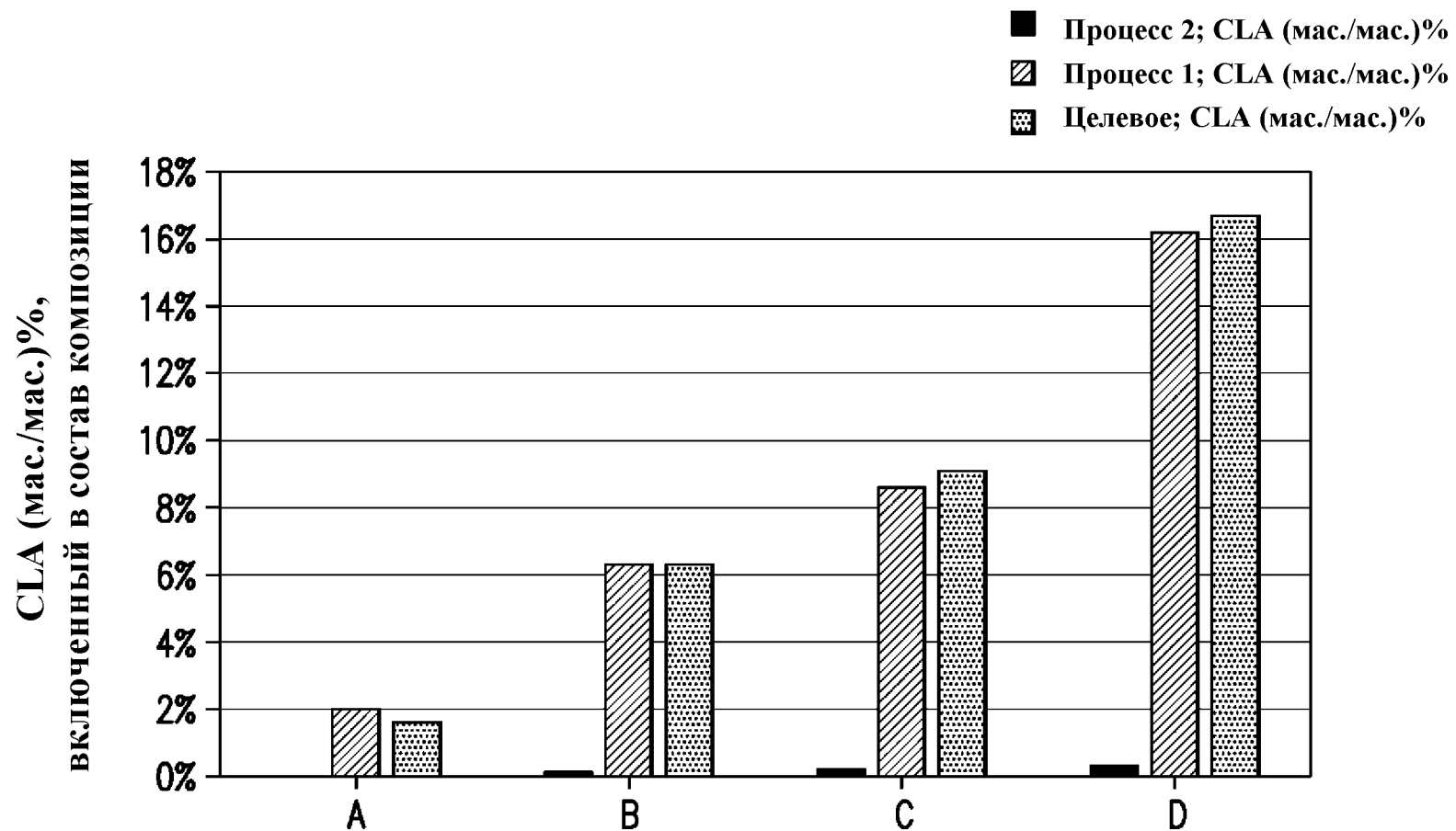


Фиг. 2



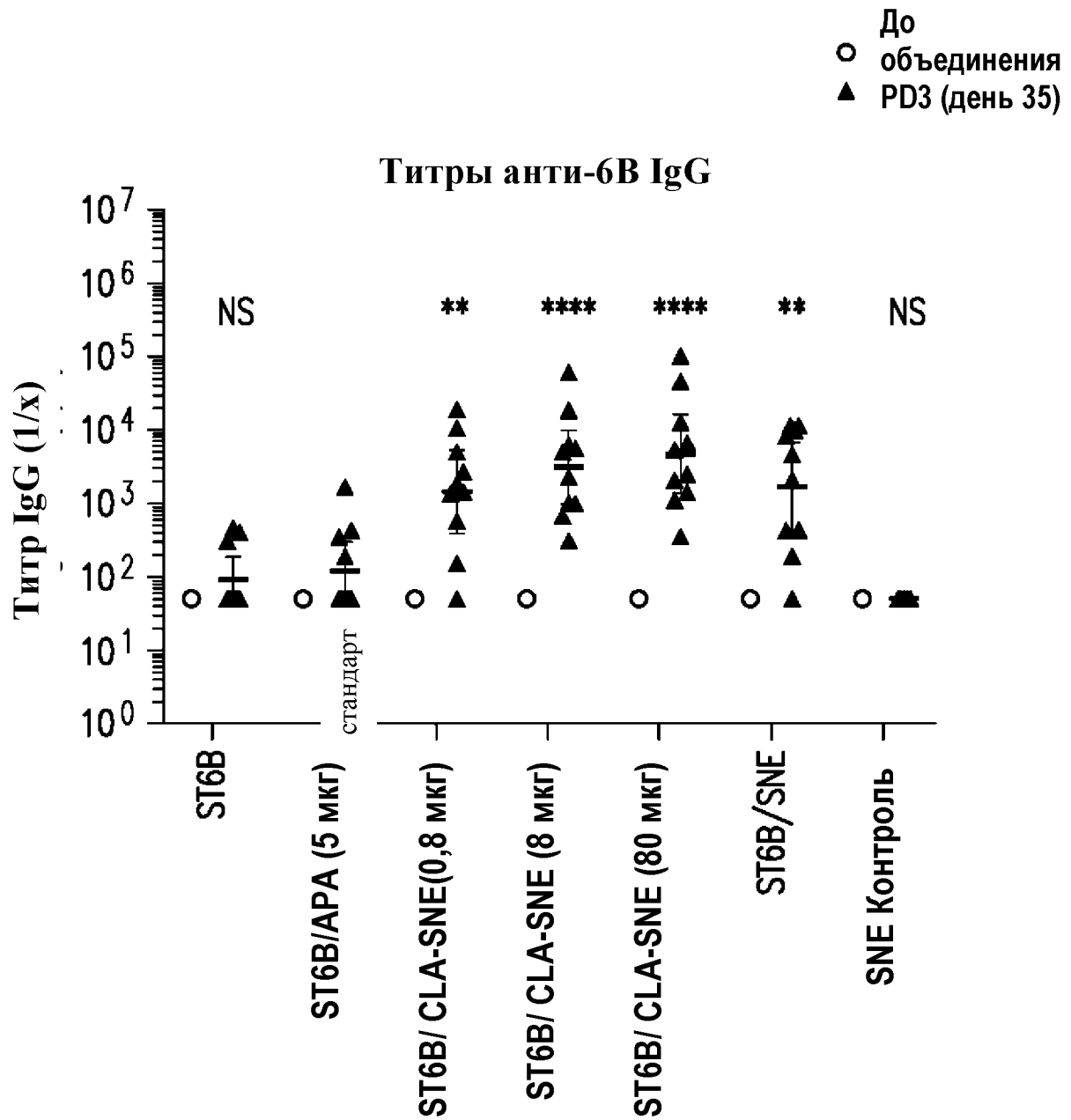


Фиг.3

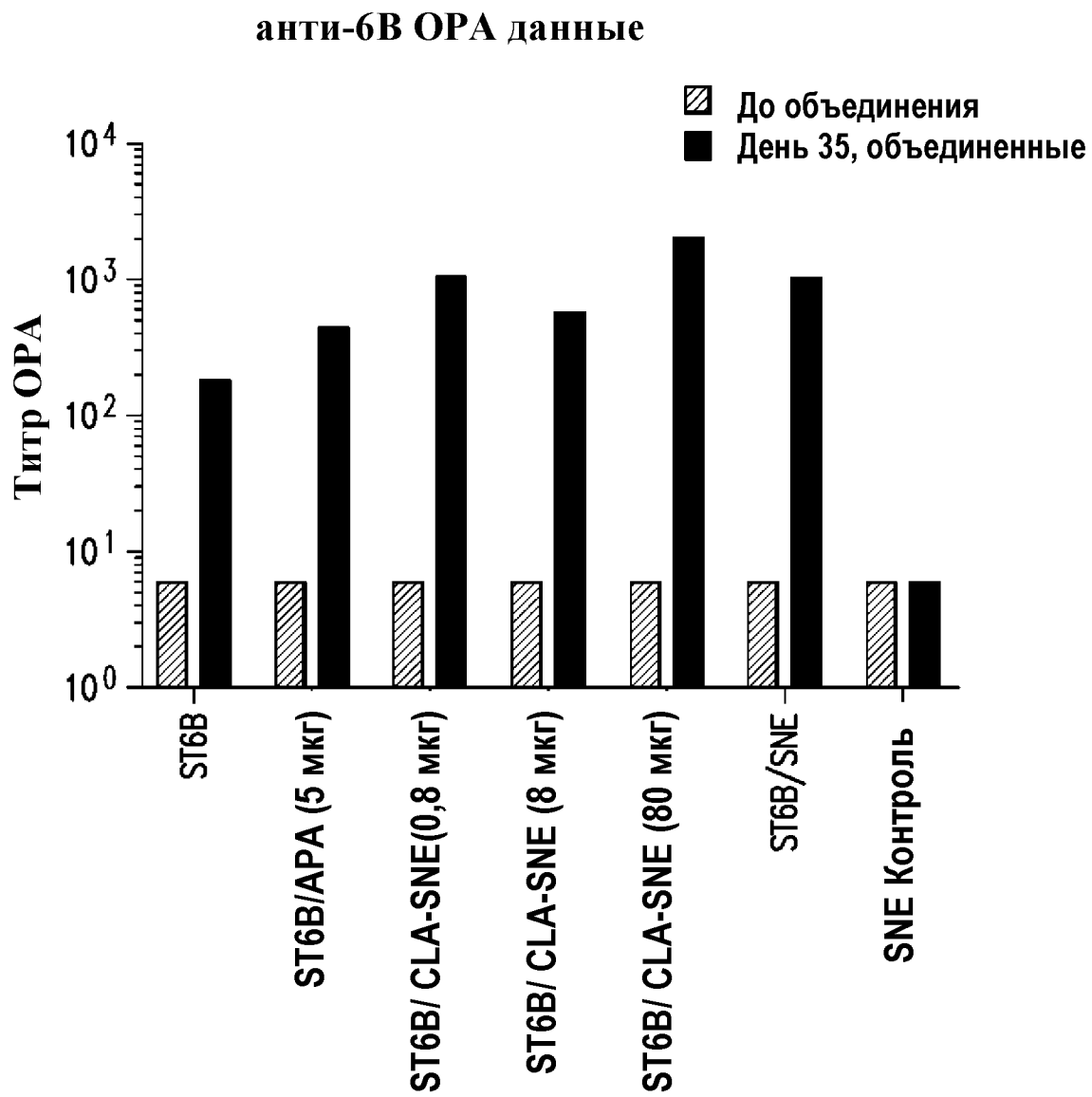


Тестирование уровней включения для индивидуальных составов и  
CLA в (мас./мас.)% целевого включения

Фиг.4



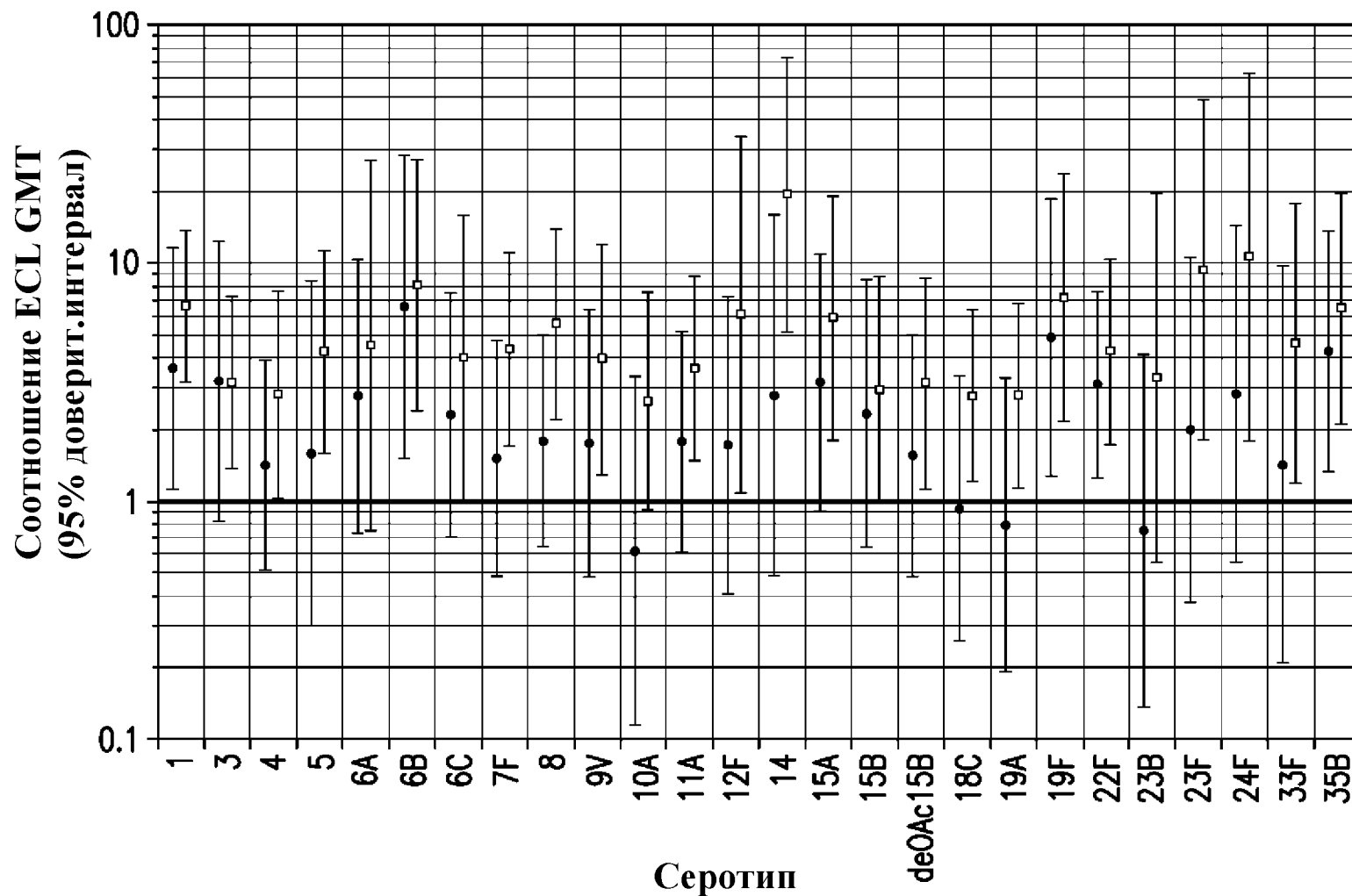
Фиг. 5А



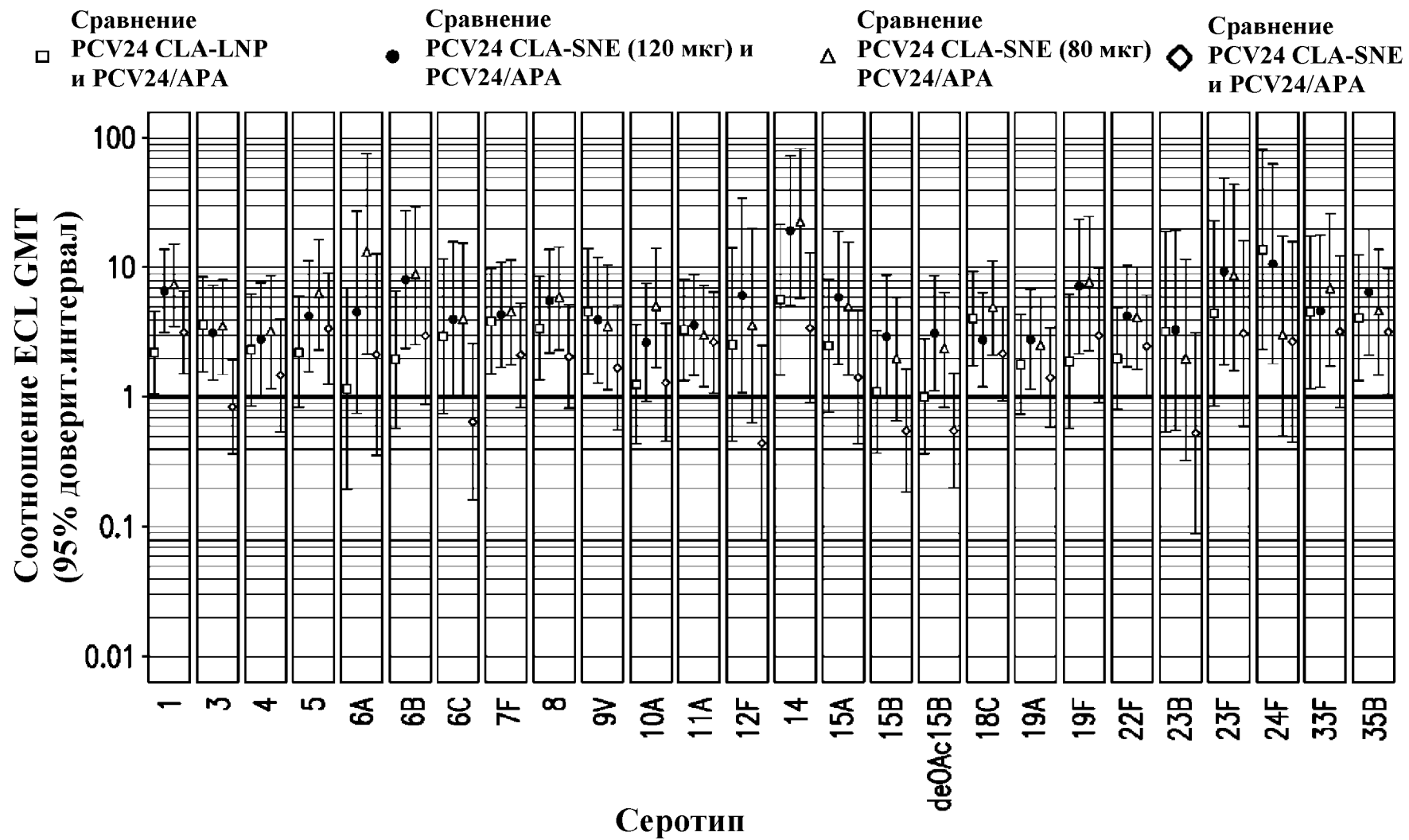
Фиг. 5В

● Сравнение PCV24 CLA-SNE (120 мкг) и PCV24/АРА (25 мкг) после дозы 1

□ Сравнение PCV24 CLA-SNE (120 мкг) и PCV24/АРА (25 мкг) после дозы 2

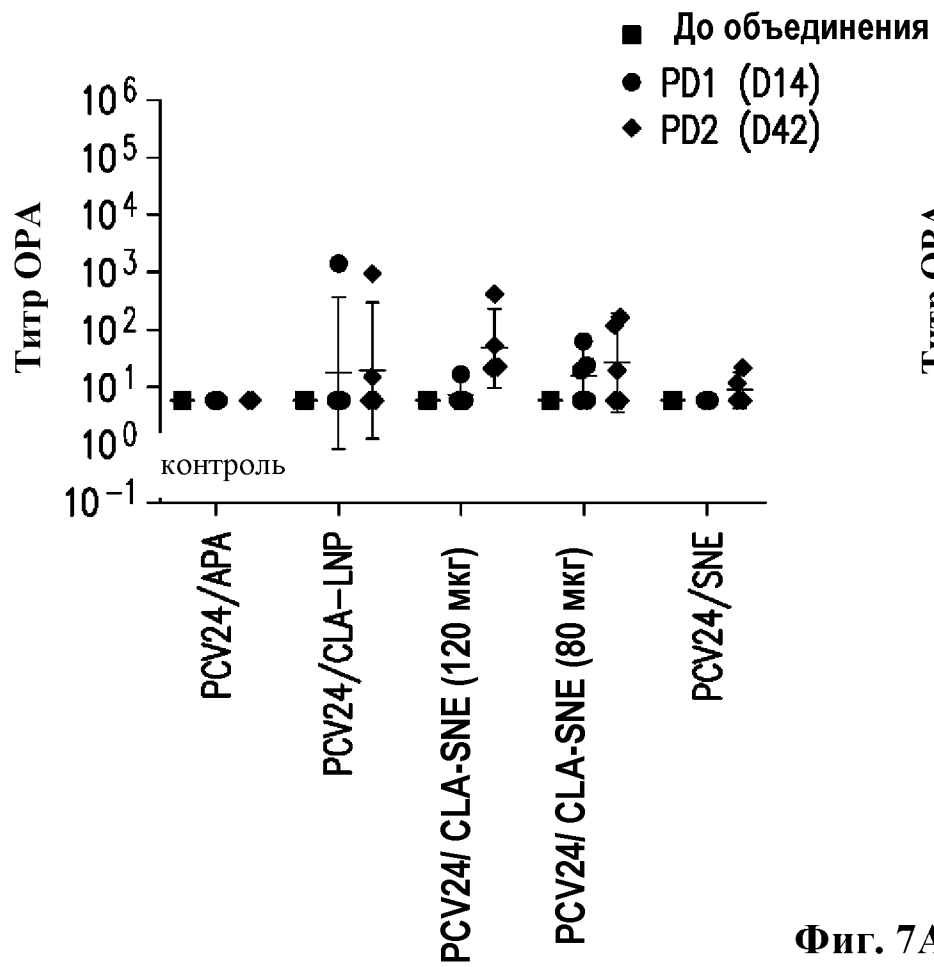


Фиг. 6А

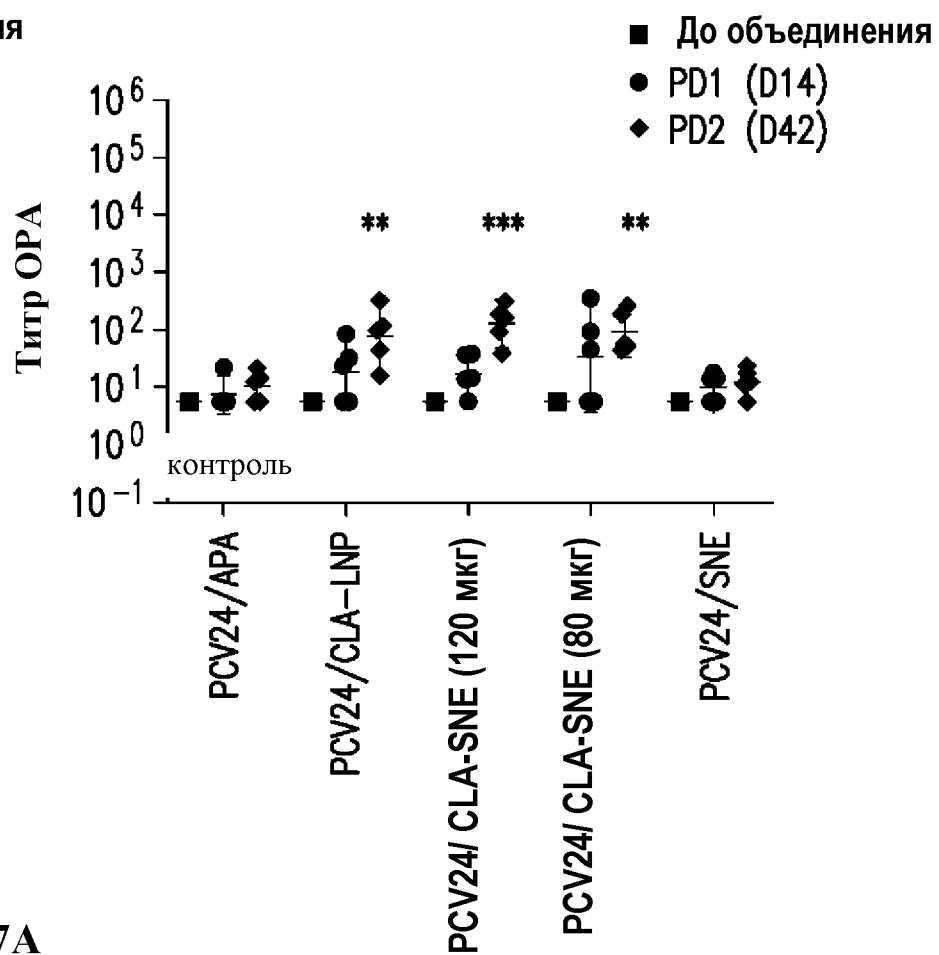


Фиг. 6В

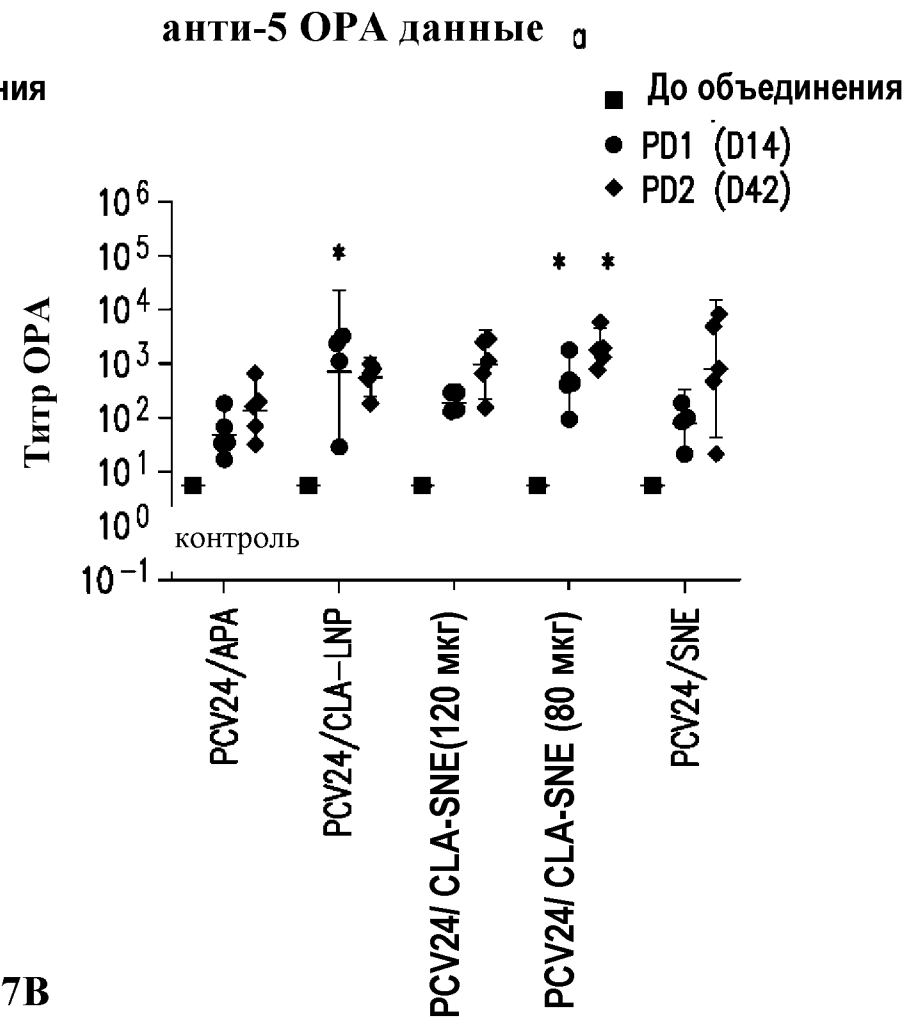
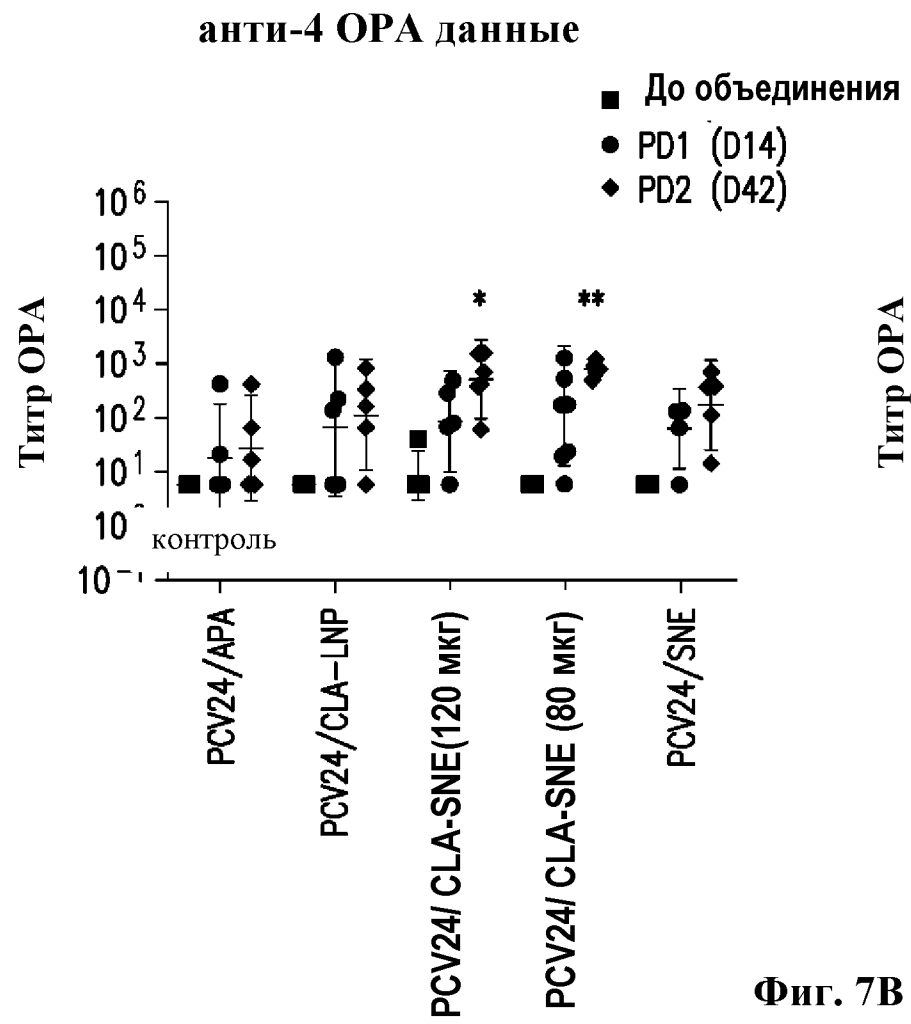
анти-1 ОРА данные



анти-3 ОРА данные



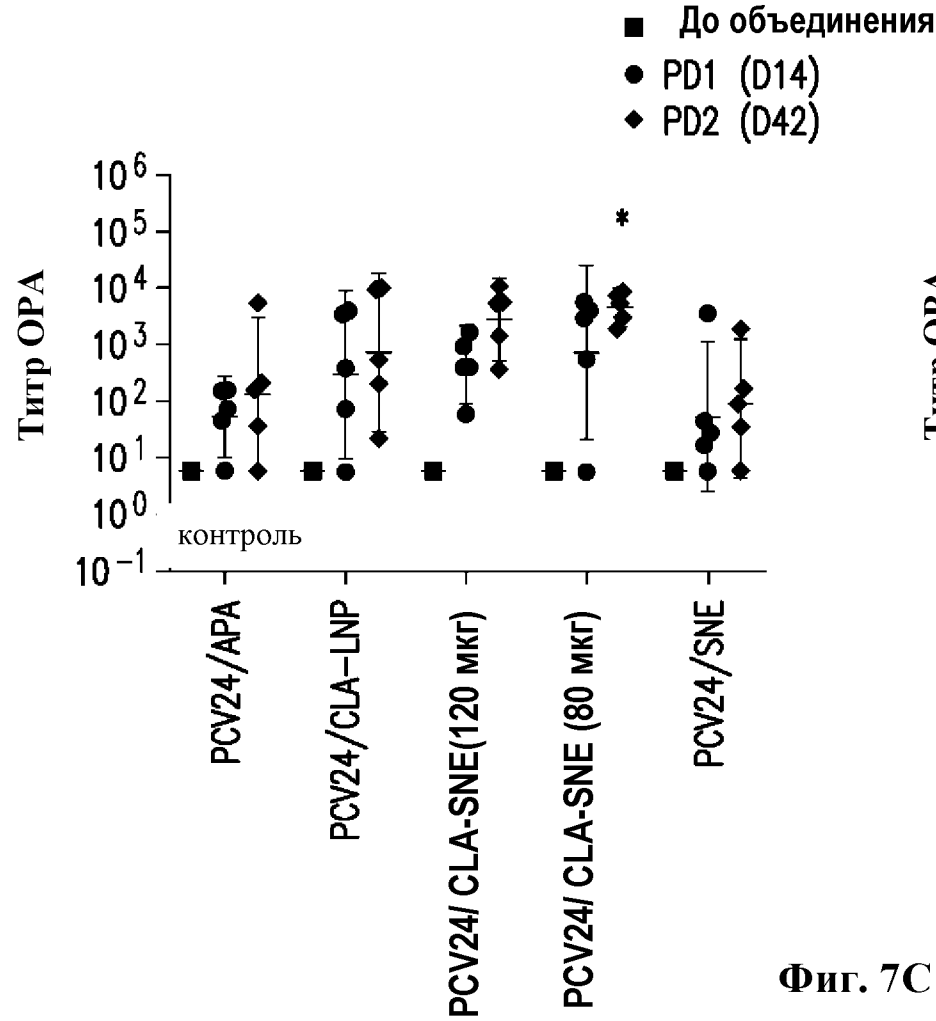
Фиг. 7А



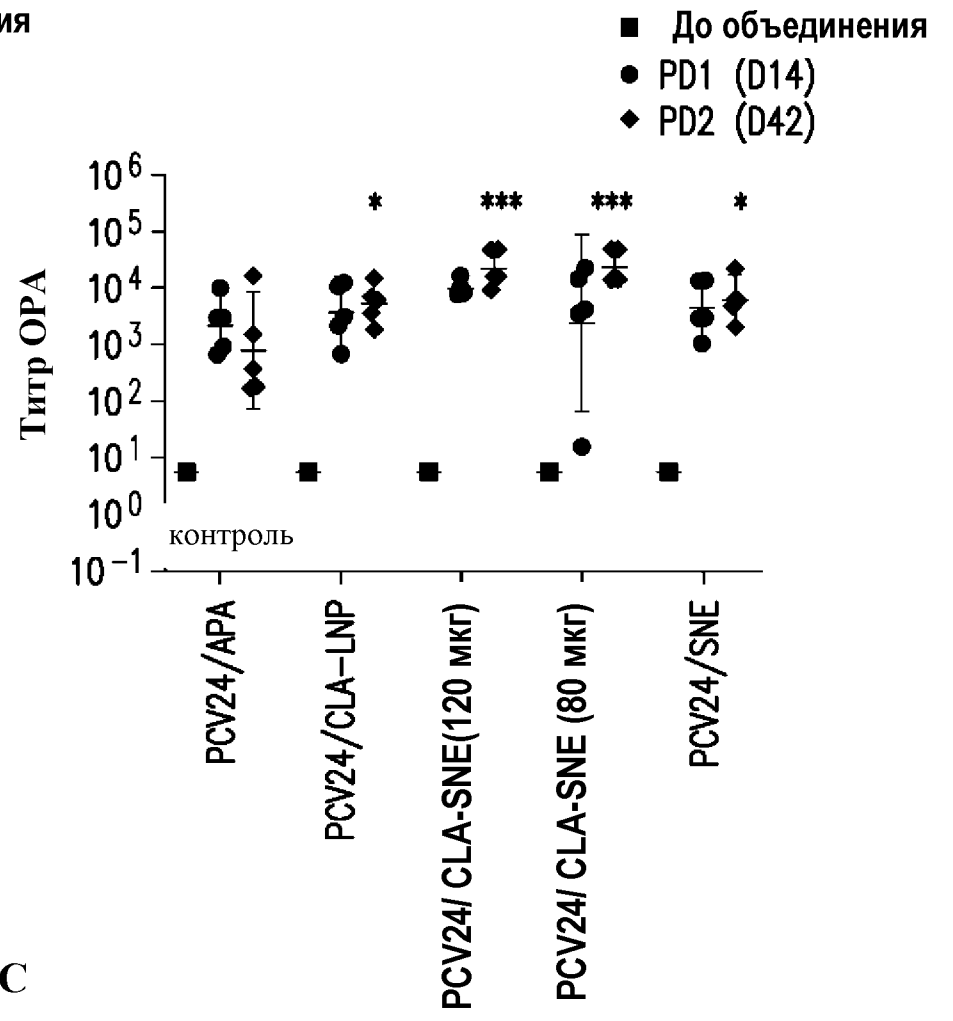
Фиг. 7В



анти-6A ОРА данные

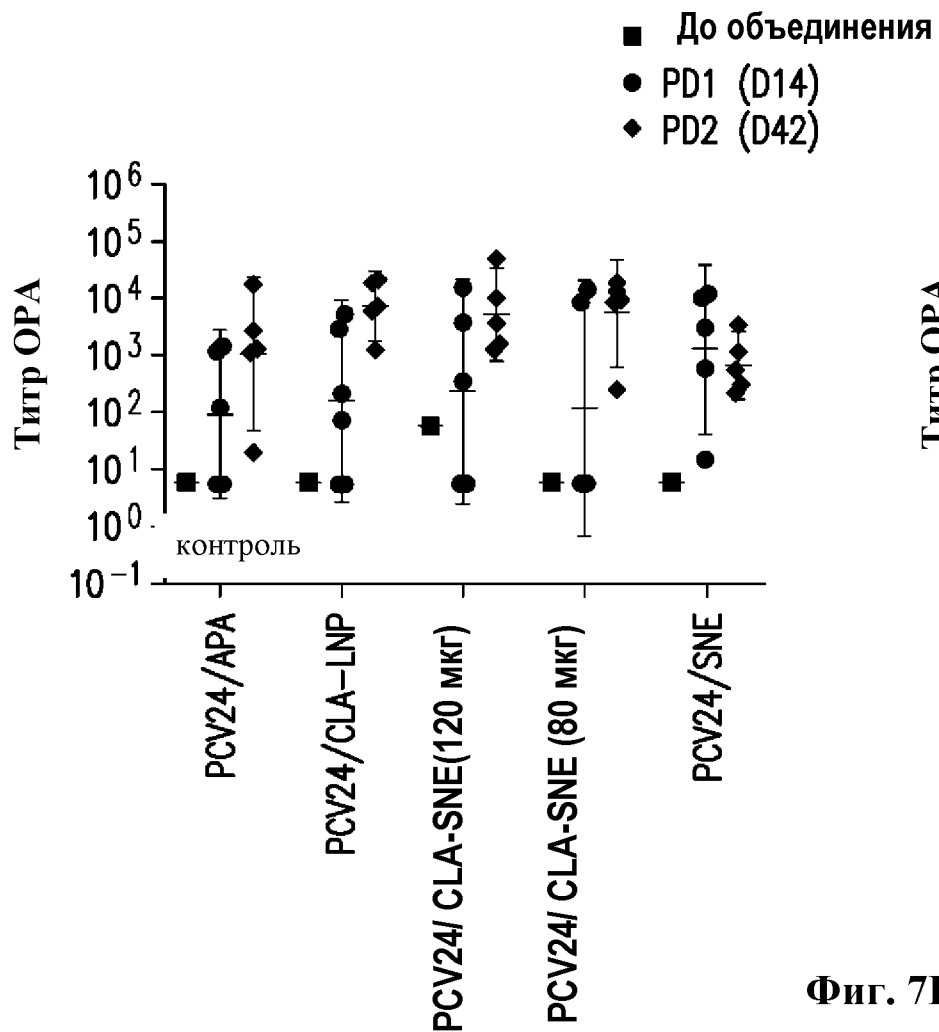


анти-6B ОРА данные

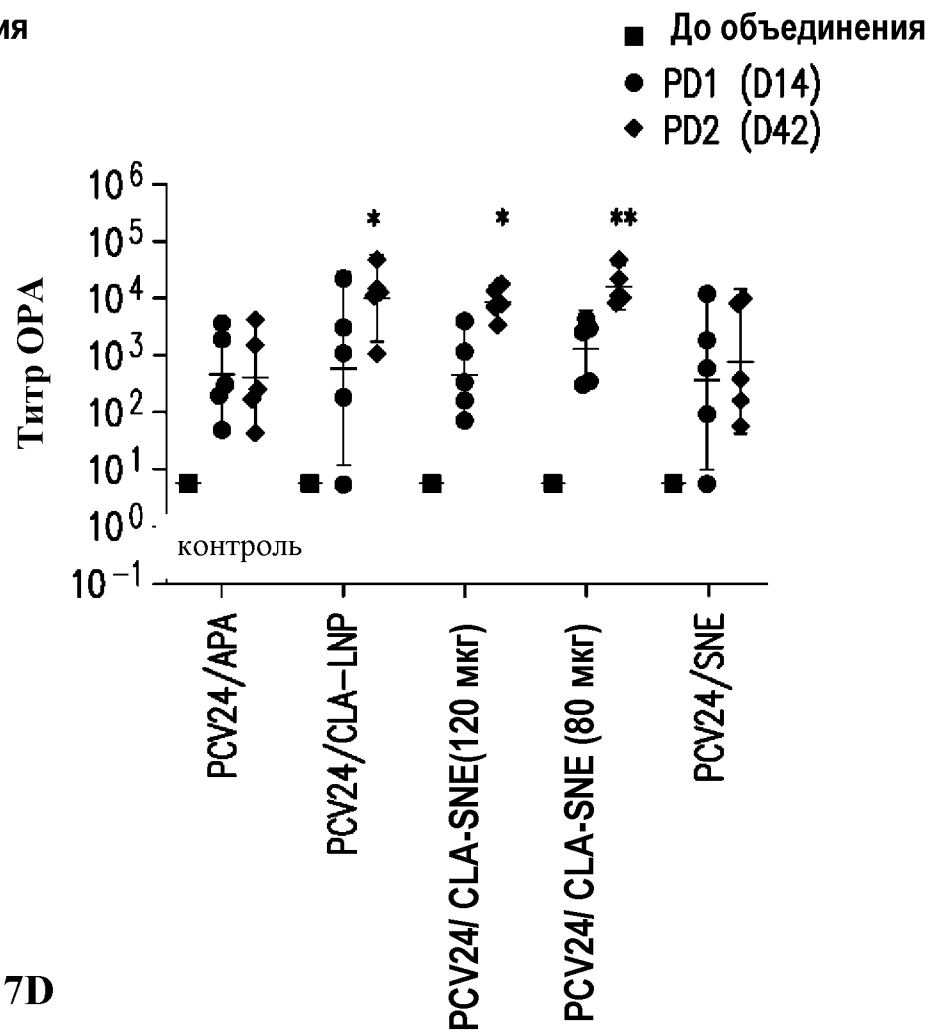


Фиг. 7С

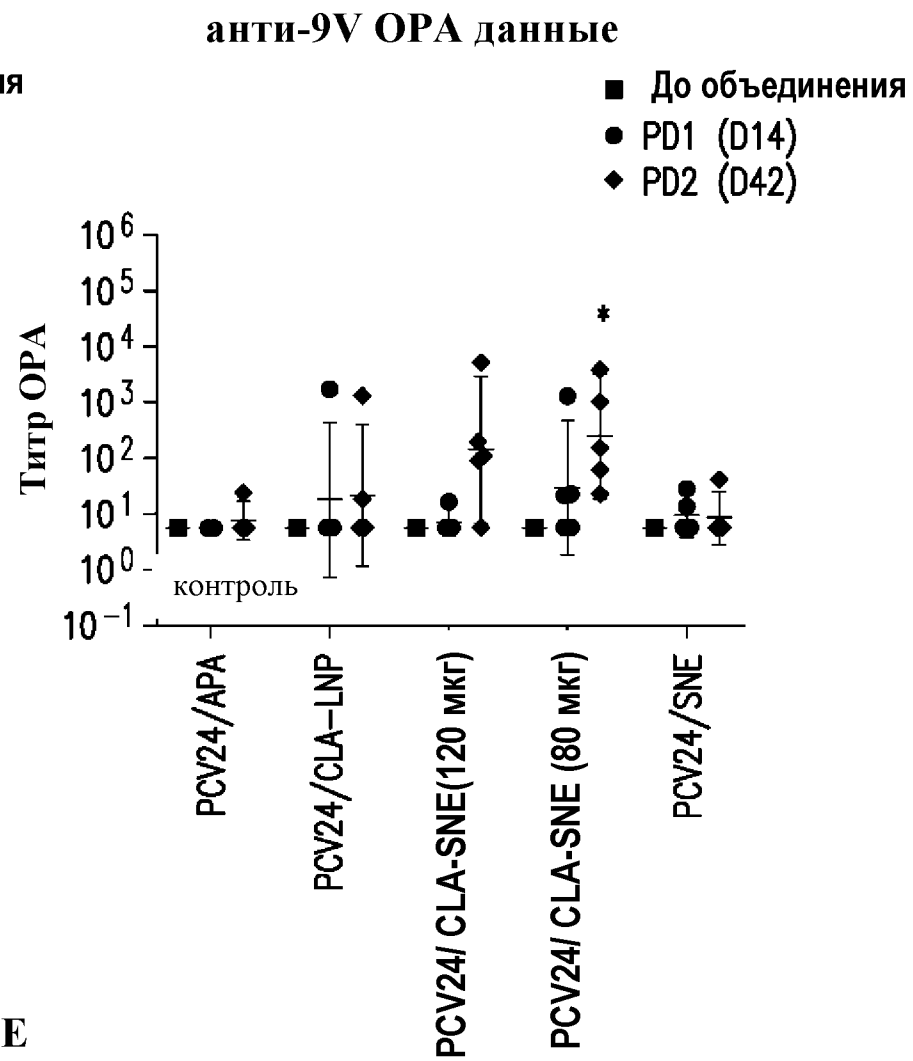
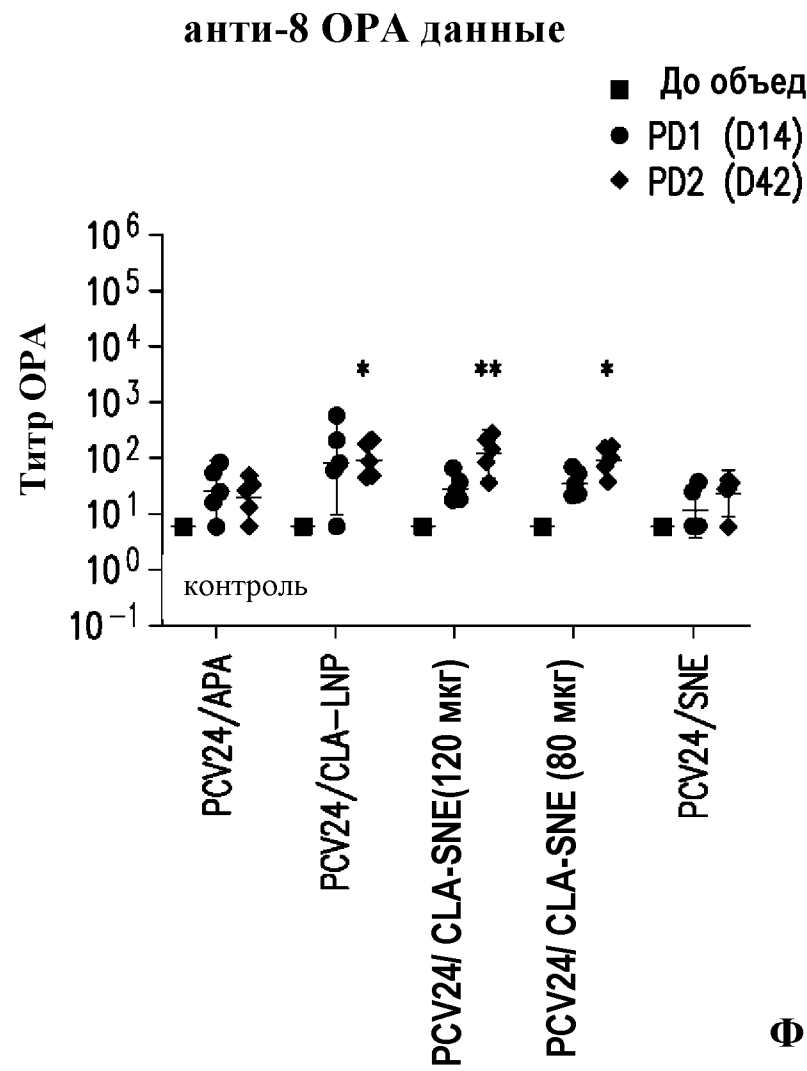
анти-6С ОРА данные



анти-7F ОРА данные

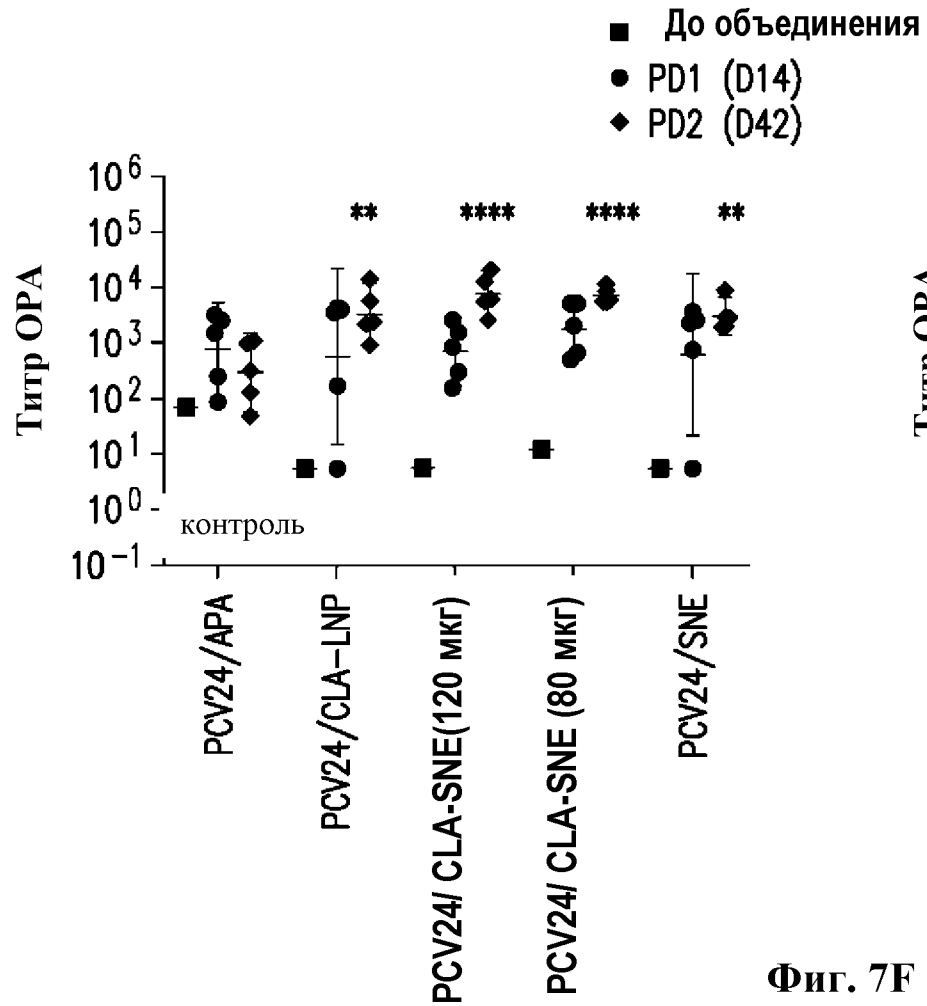


Фиг. 7D

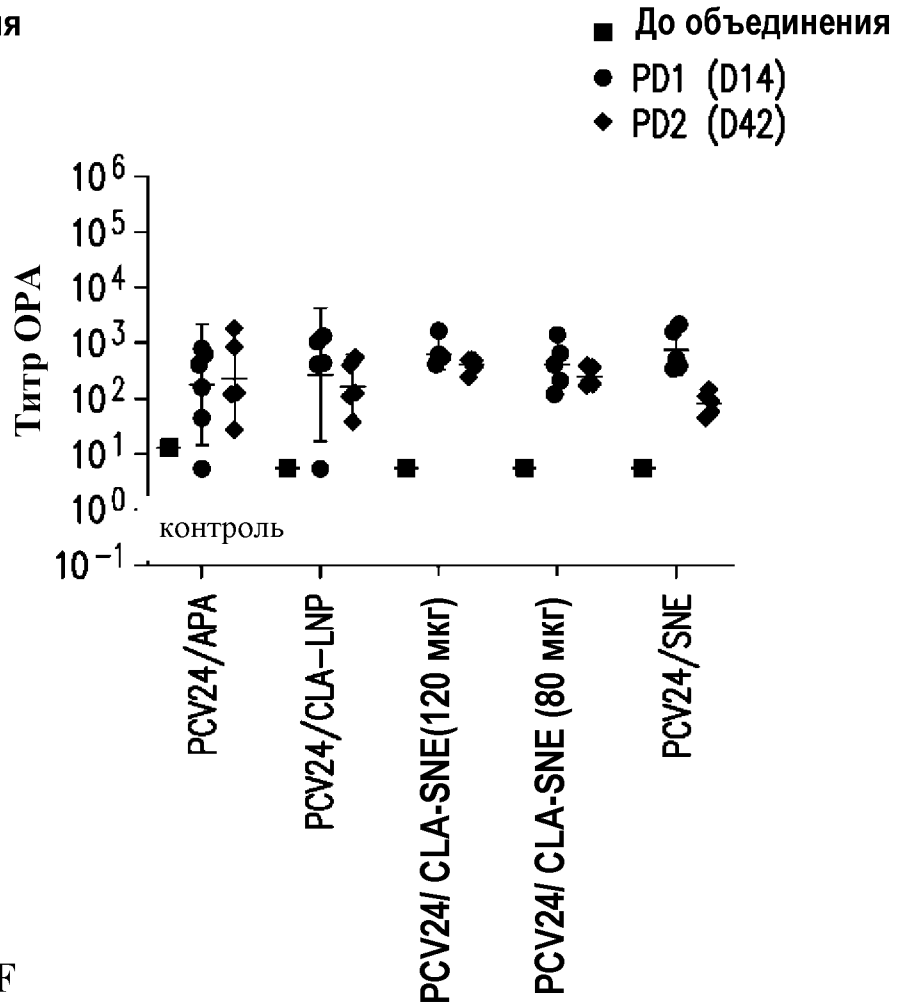


Фиг. 7E

анти-10 ОРА данные

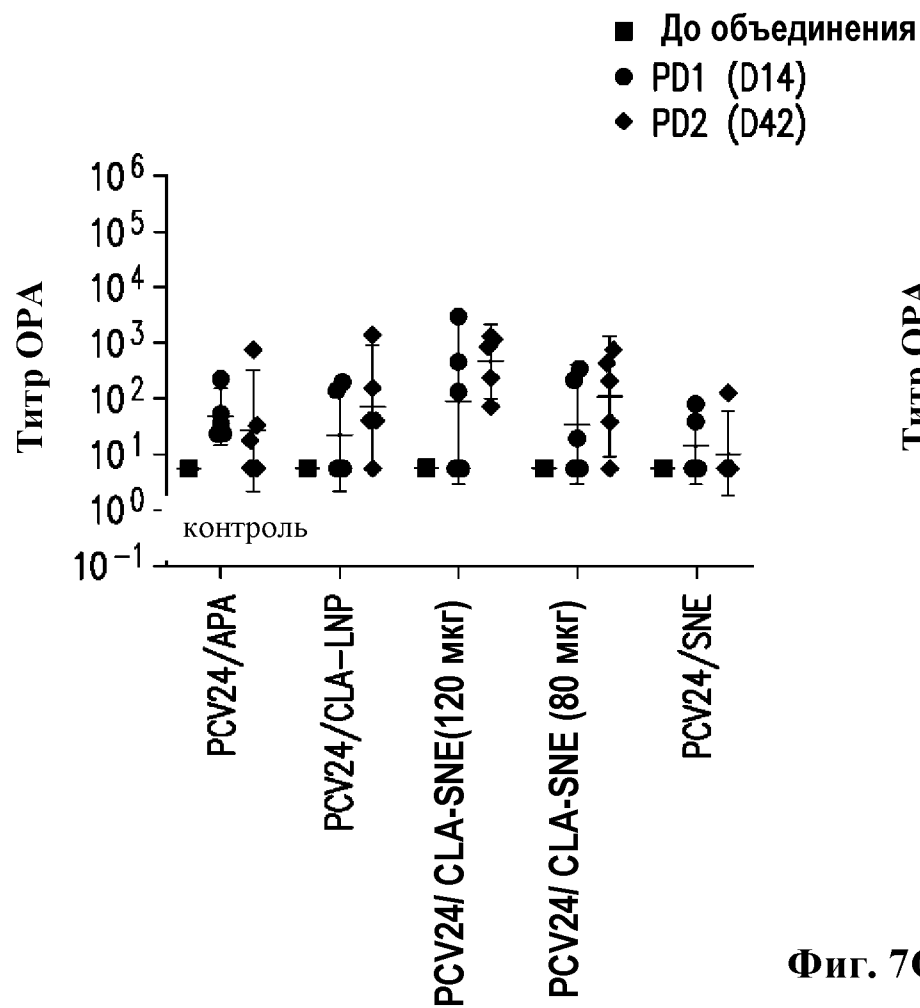


анти-11A ОРА данные

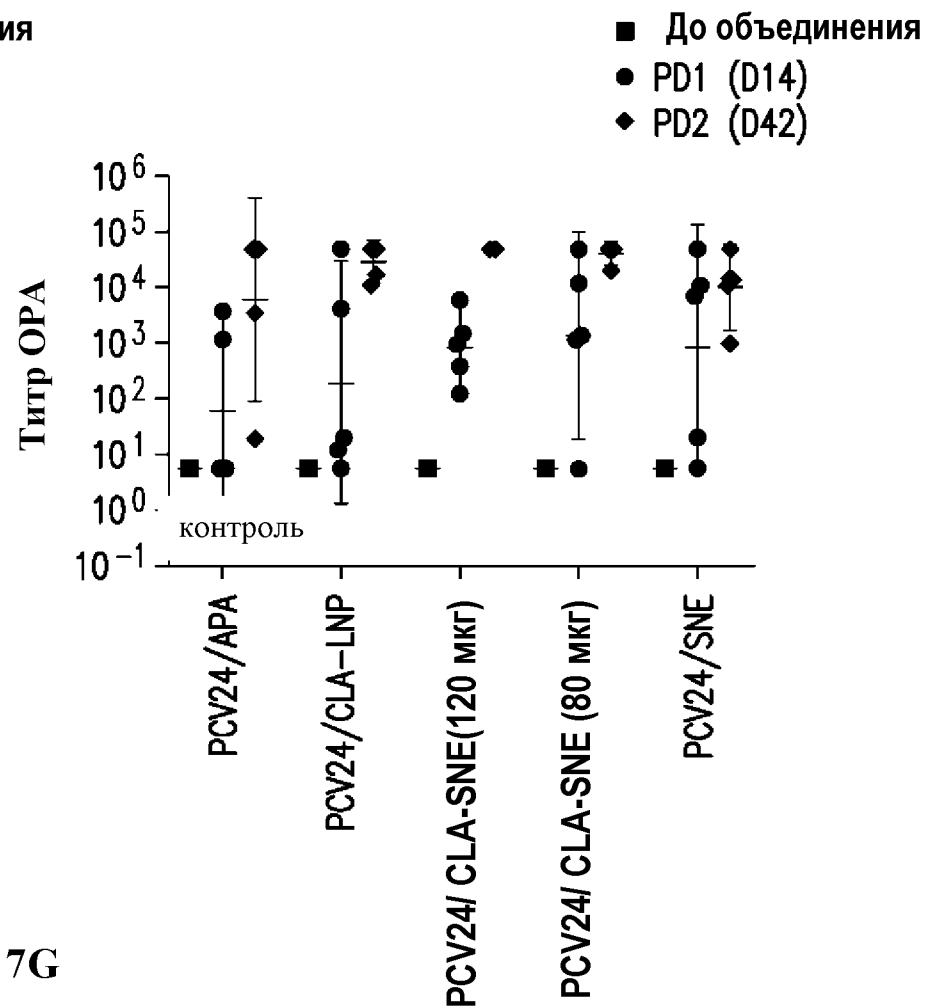


Фиг. 7F

анти-12F ОРА данные

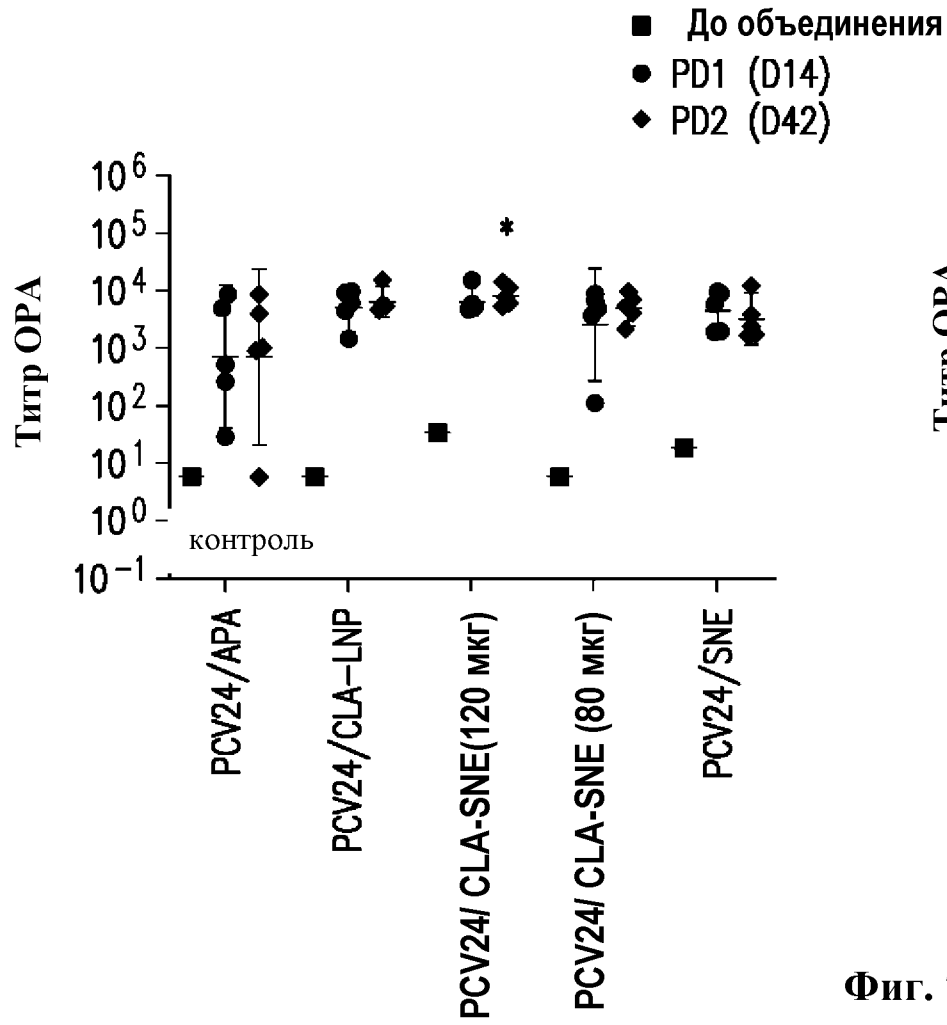


анти-14 ОРА данные

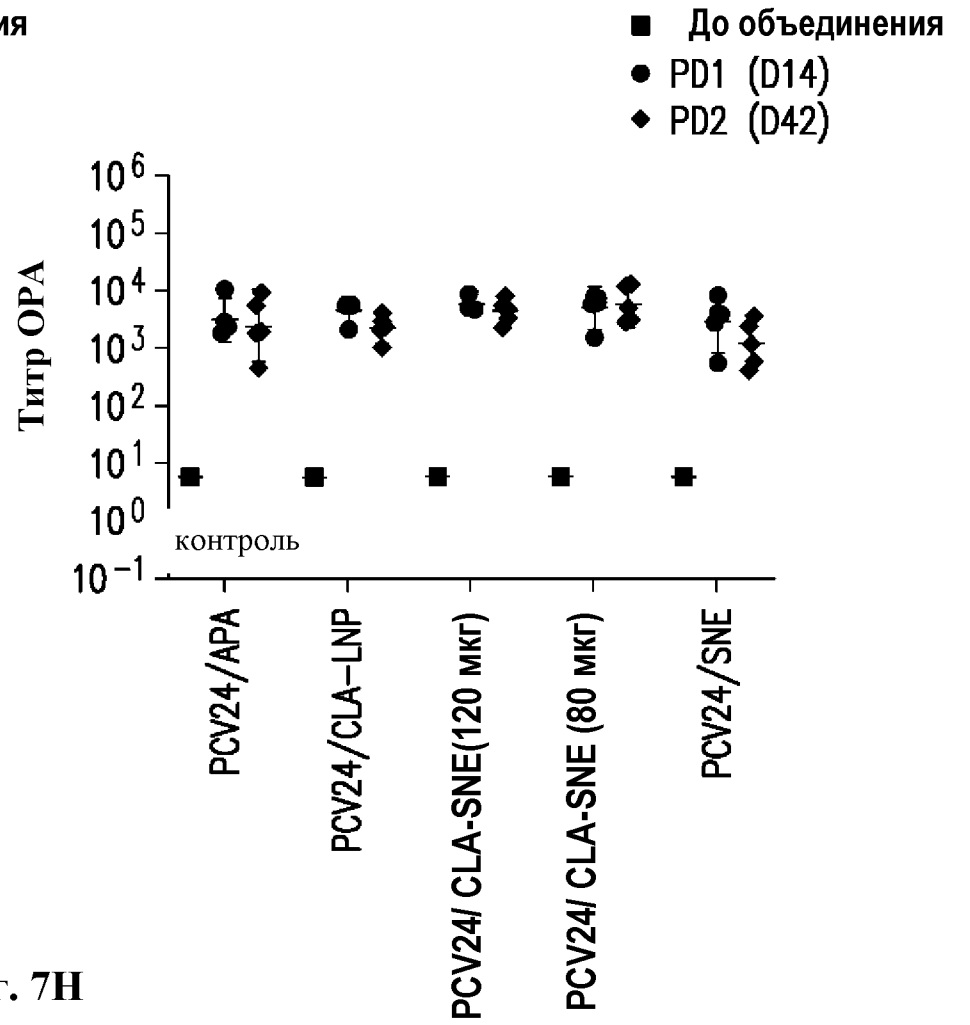


Фиг. 7G

анти-15А ОРА данные

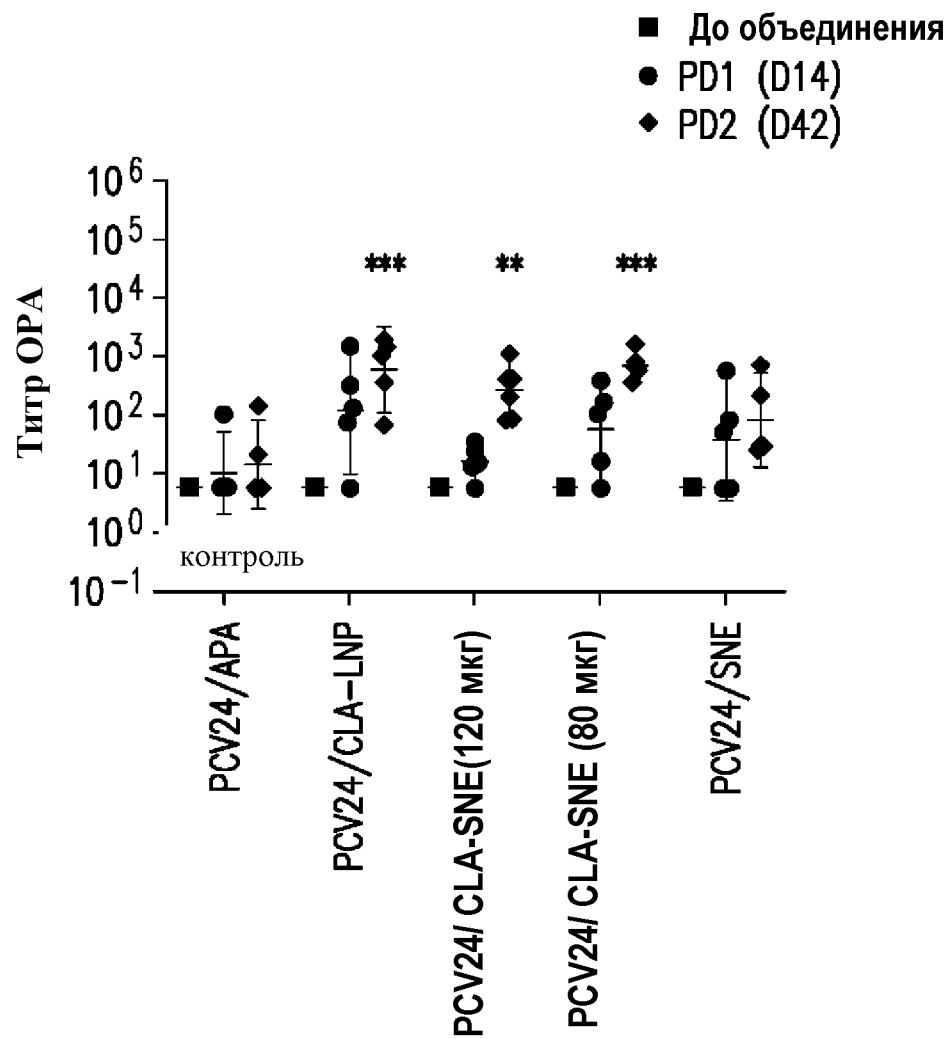


анти-15С ОРА данные

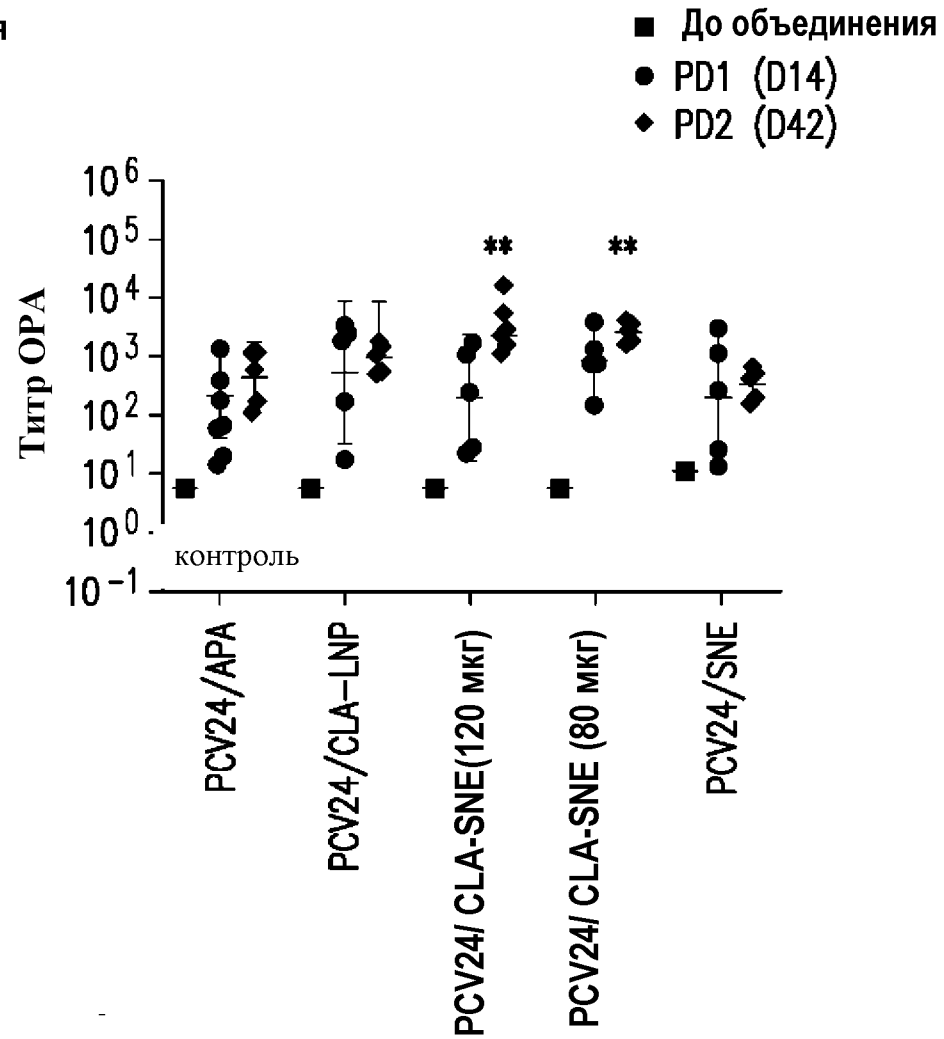


Фиг. 7Н

анти-18С ОРА данные ]

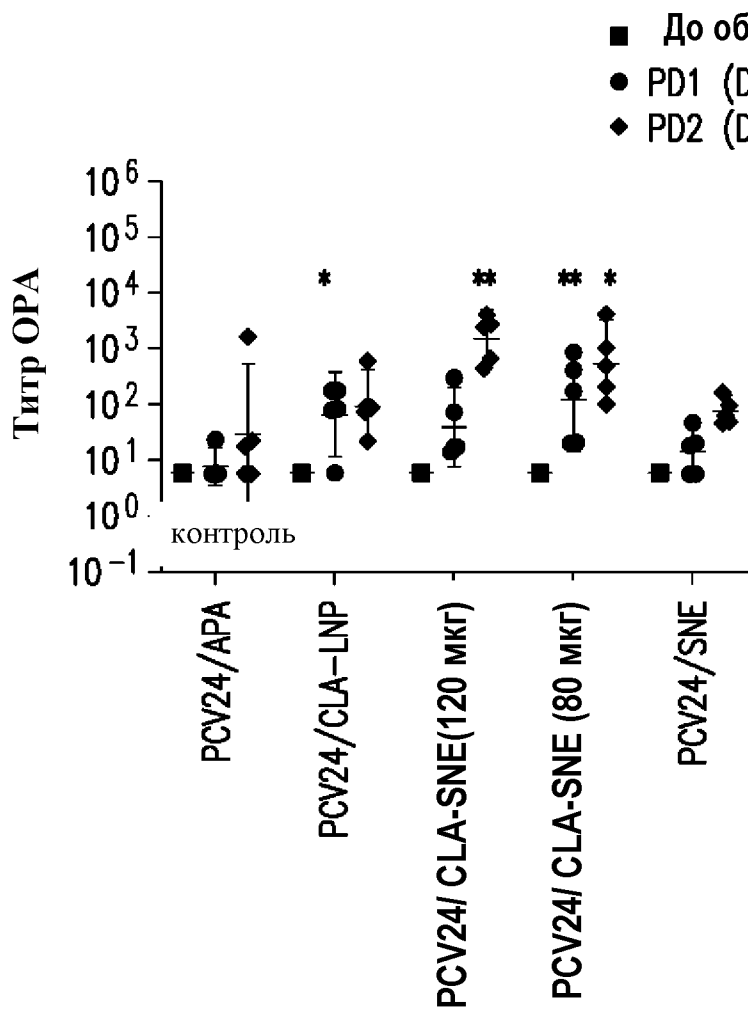


анти-19А ОРА данные

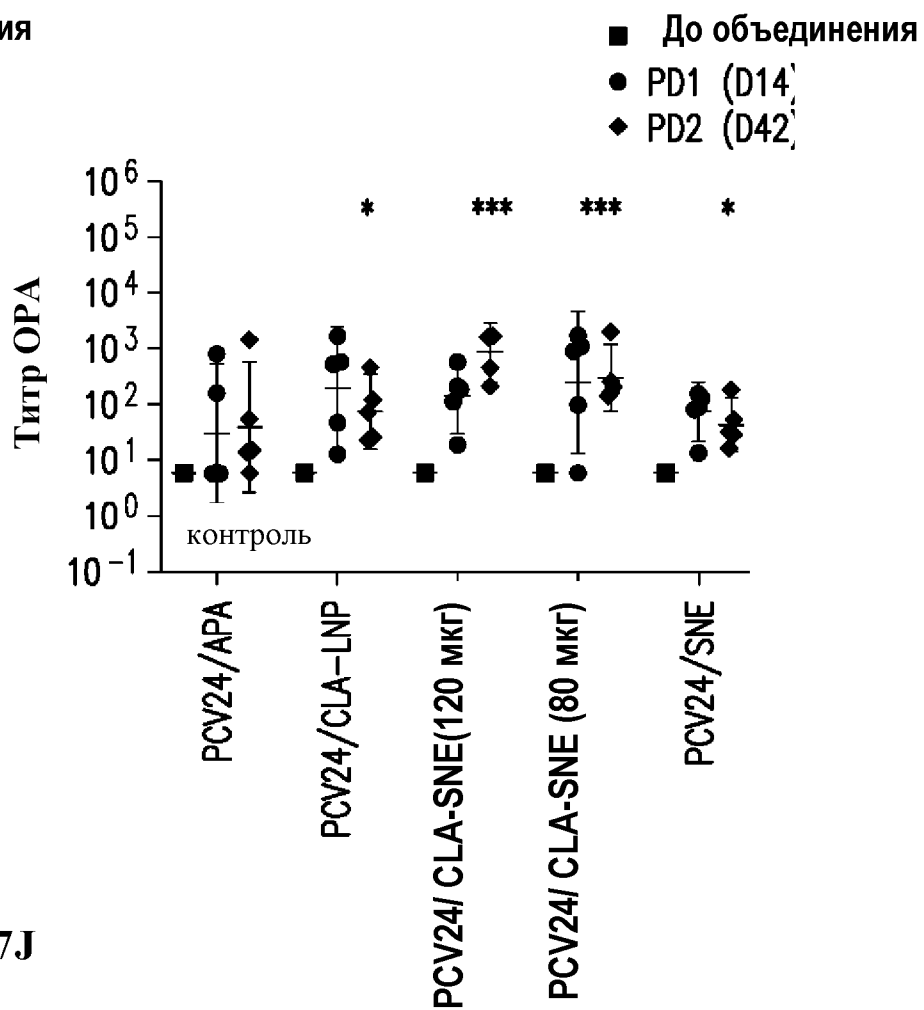


Фиг. 7I

анти-19F ОРА данные



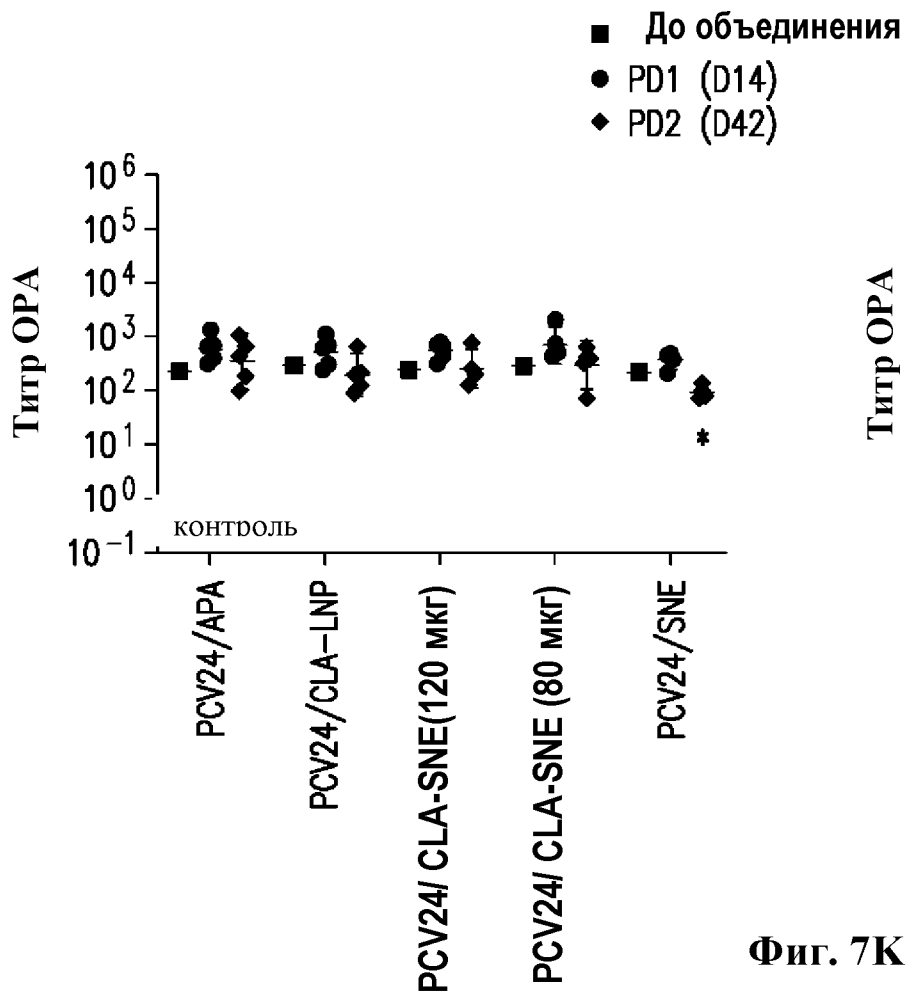
анти-22F ОРА данные



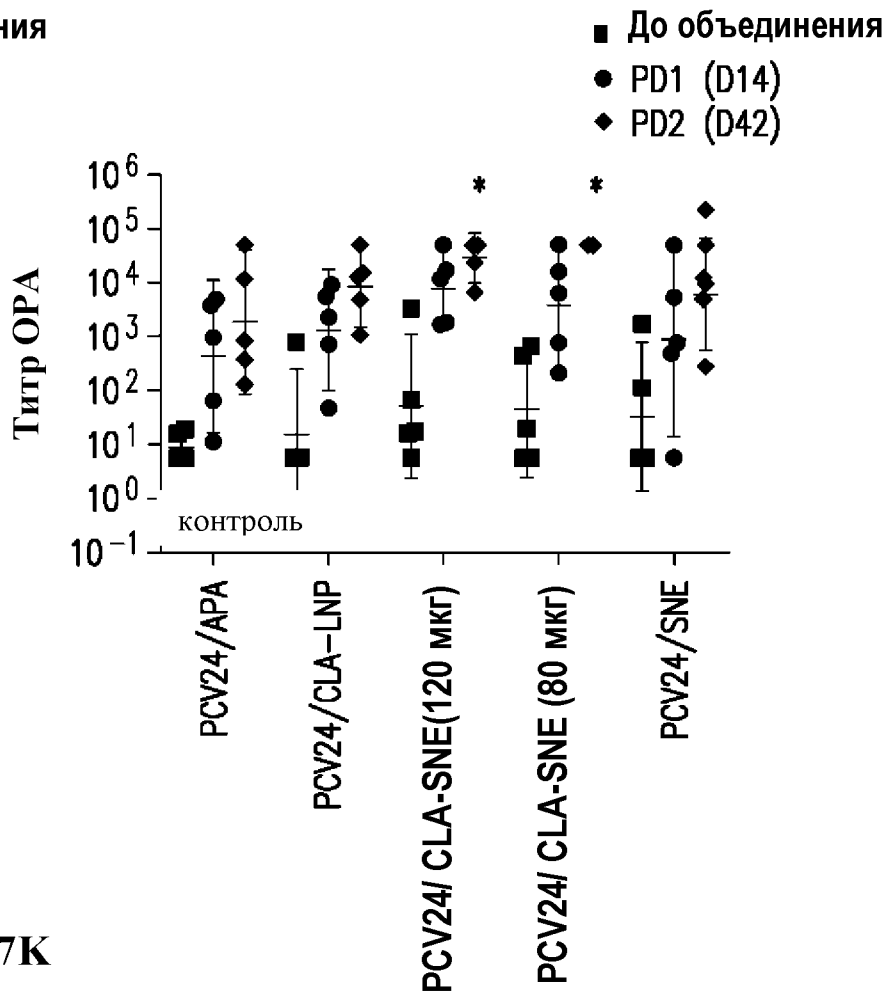
Фиг. 7J



анти-23В ОРА данные

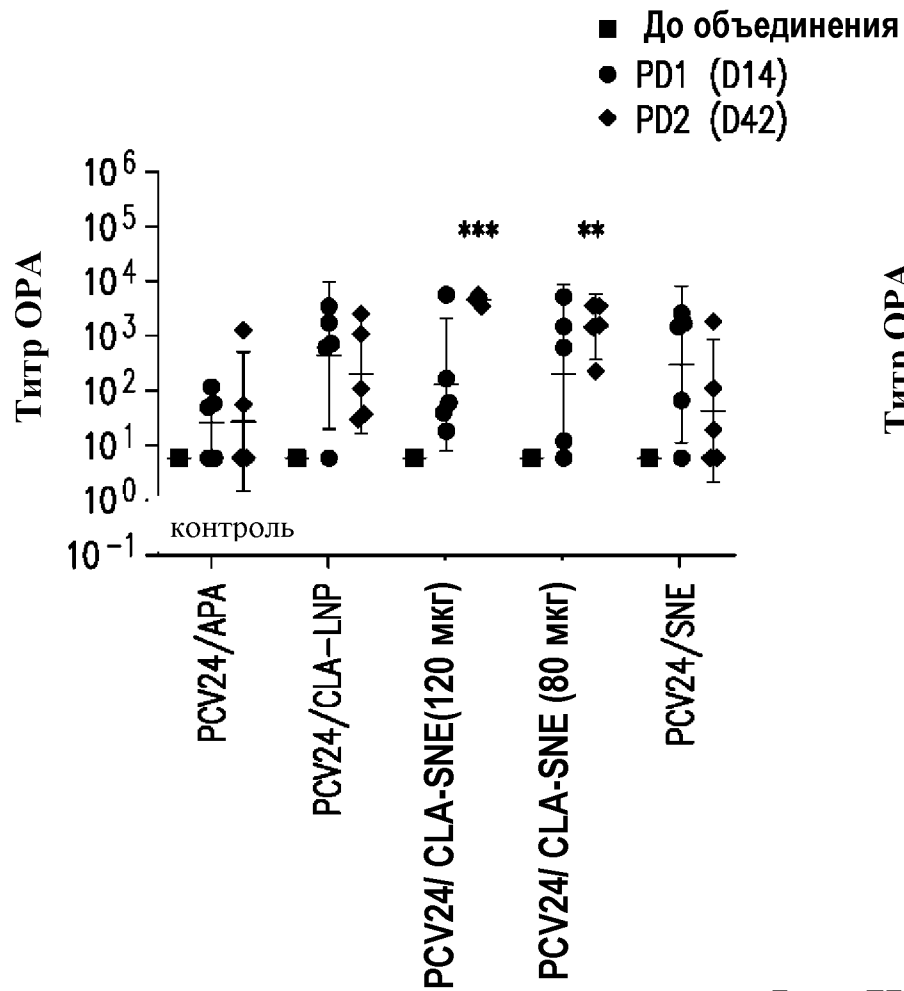


анти-23F ОРА данные

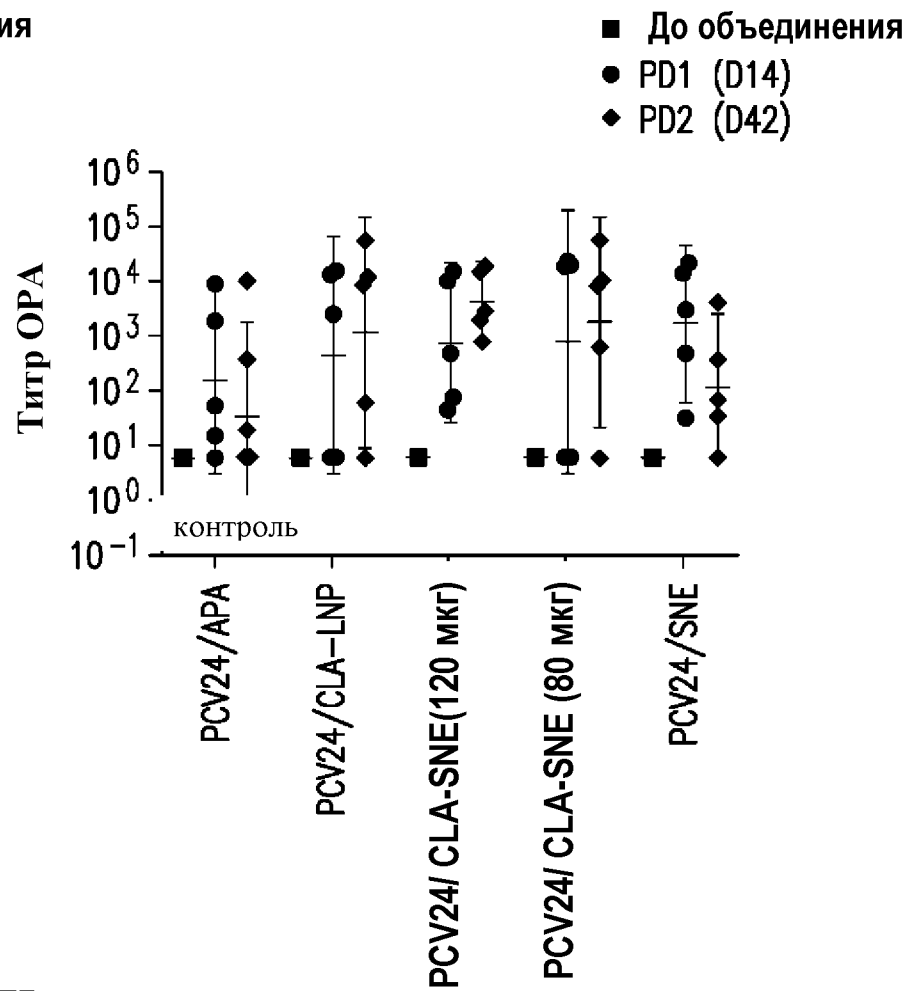


Фиг. 7К

анти-24F ОРА данные 1

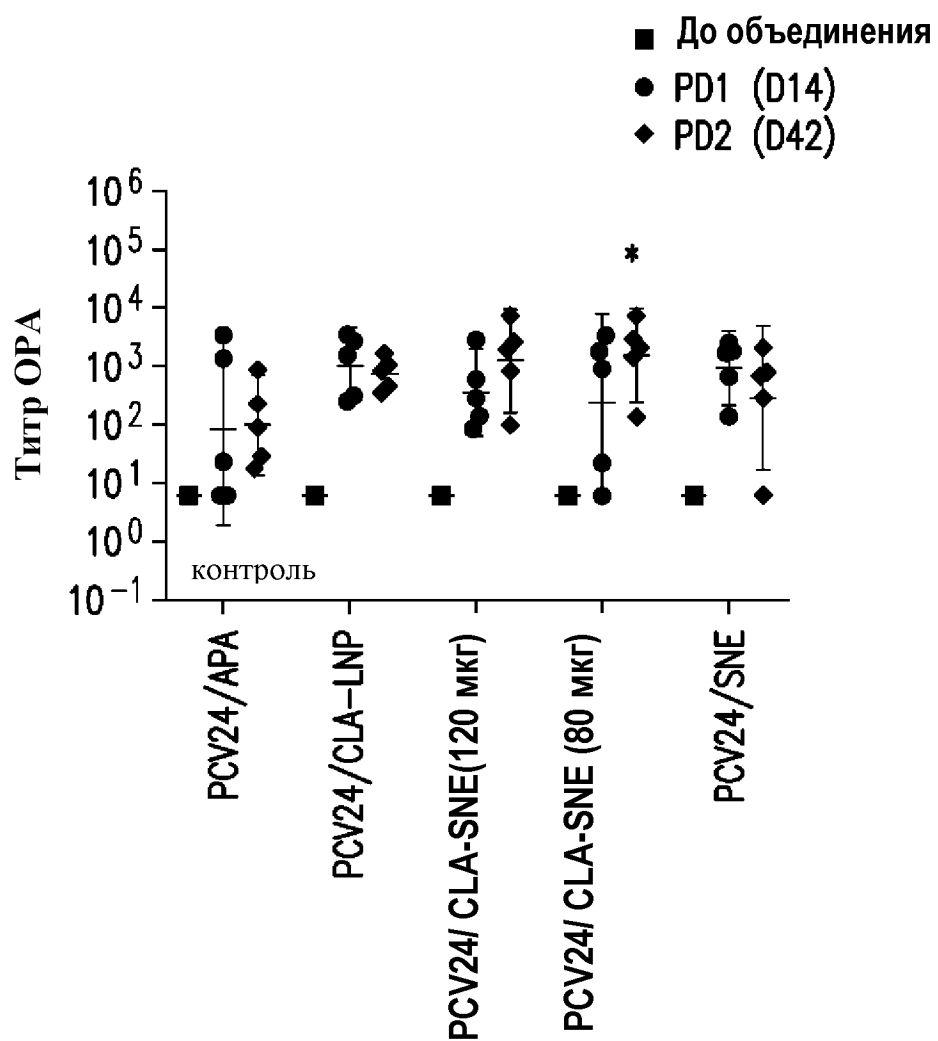


анти-33F ОРА данные



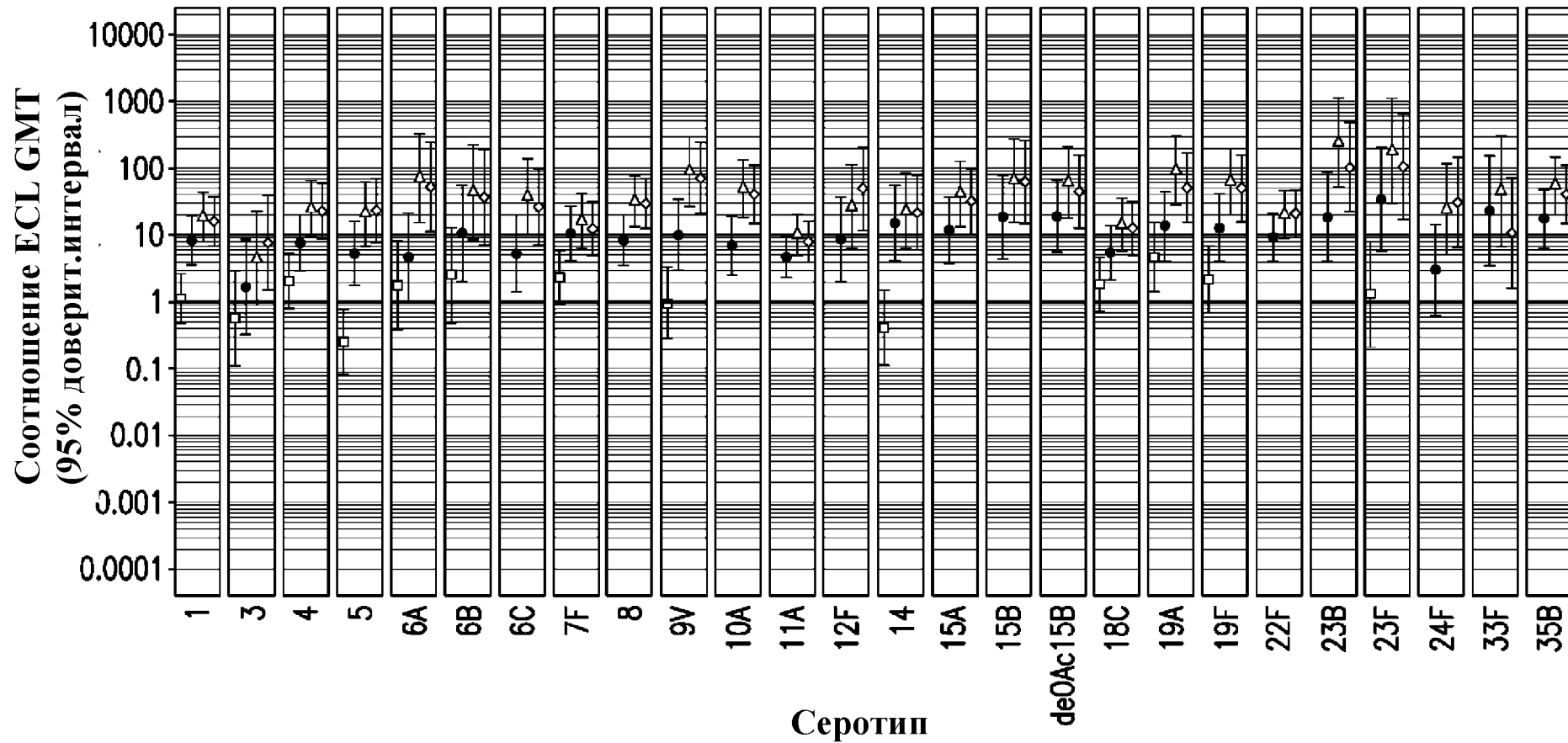
Фиг. 7L

## анти-35В ОРА данные

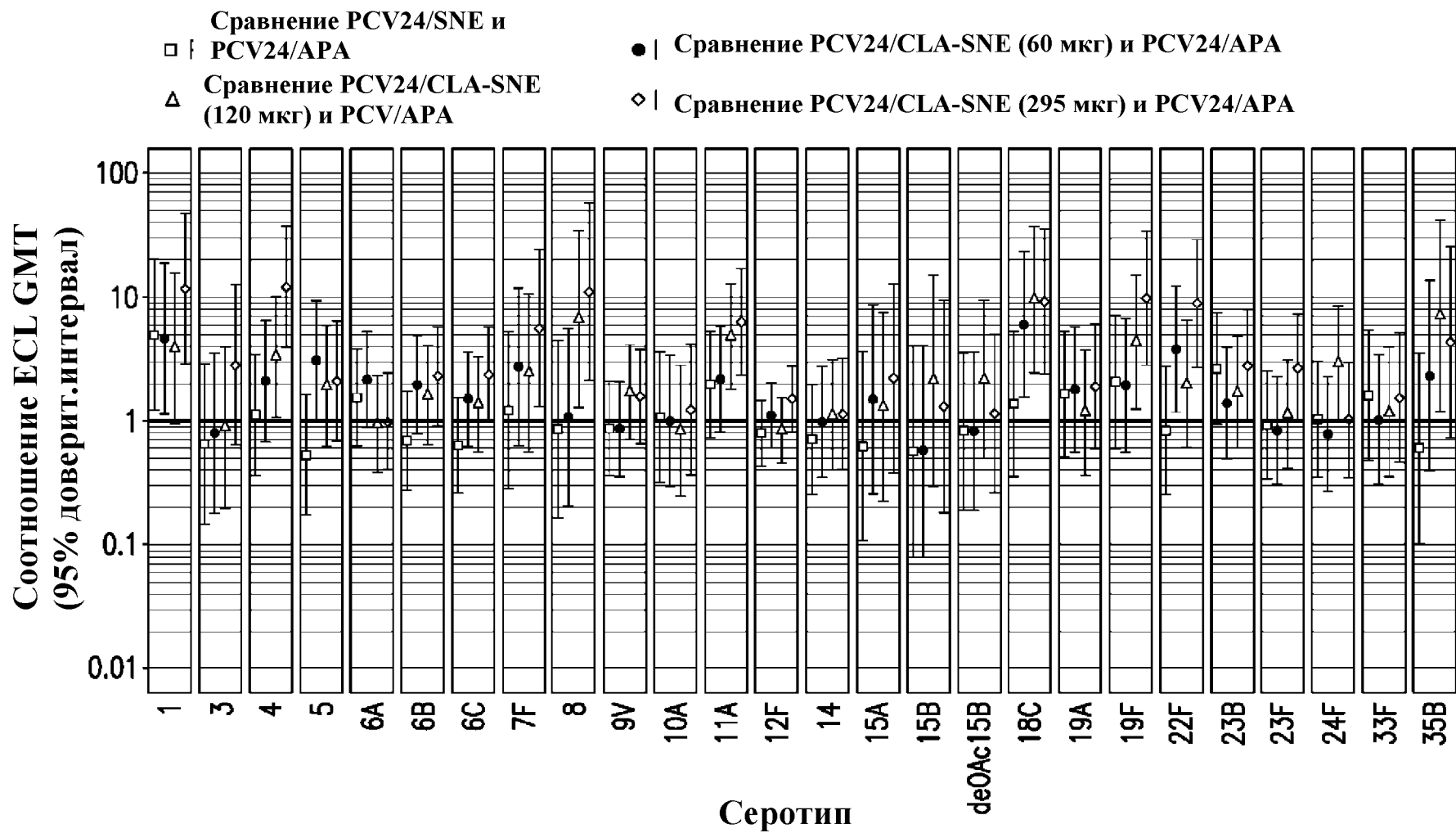


Фиг. 7М

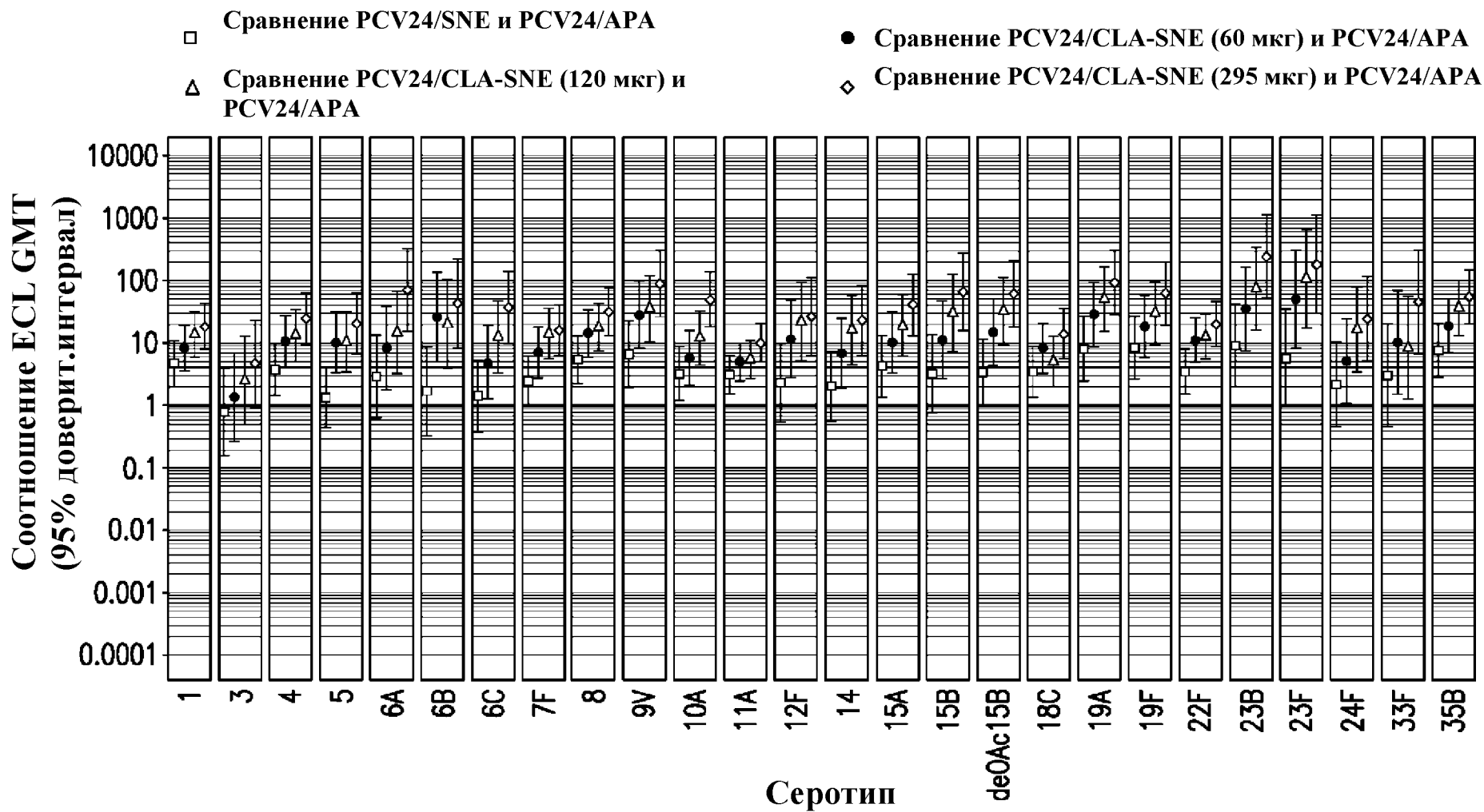
- Сравнение PCV13/АРА и PCV24/АРА
- Сравнение PCV24 CLA-LNP (120 мкг) и PCV24/АРА
- △ Сравнение PCV24/CLA-SNE (295 мкг CLA/2.5 мкг сквалена) и PCV24/АРА
- ◇ Сравнение PCV24/CLA-SNE (295 мкг CLA/0.5 мкг сквалена) и PCV24/АРА



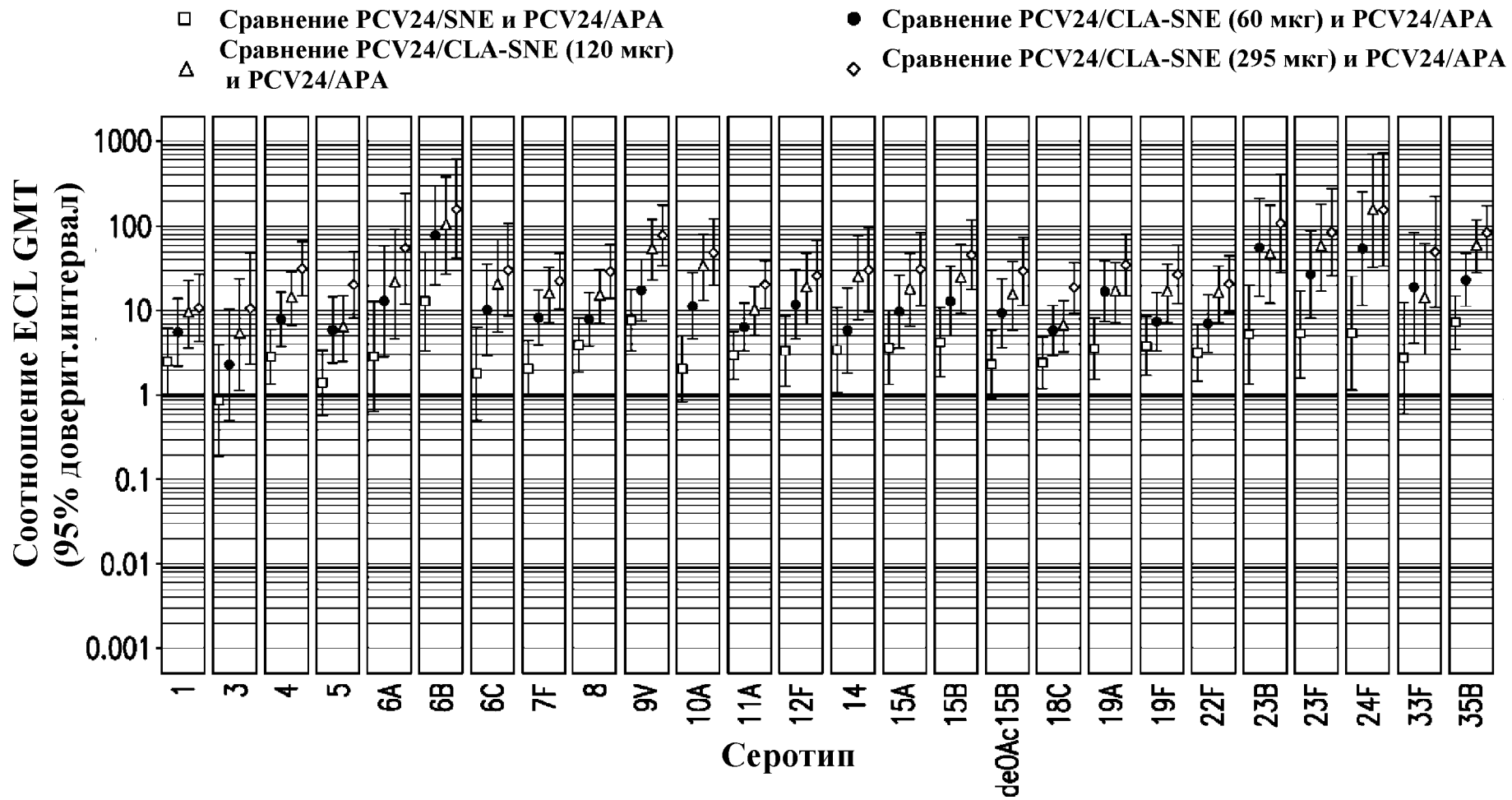
Фиг. 8А



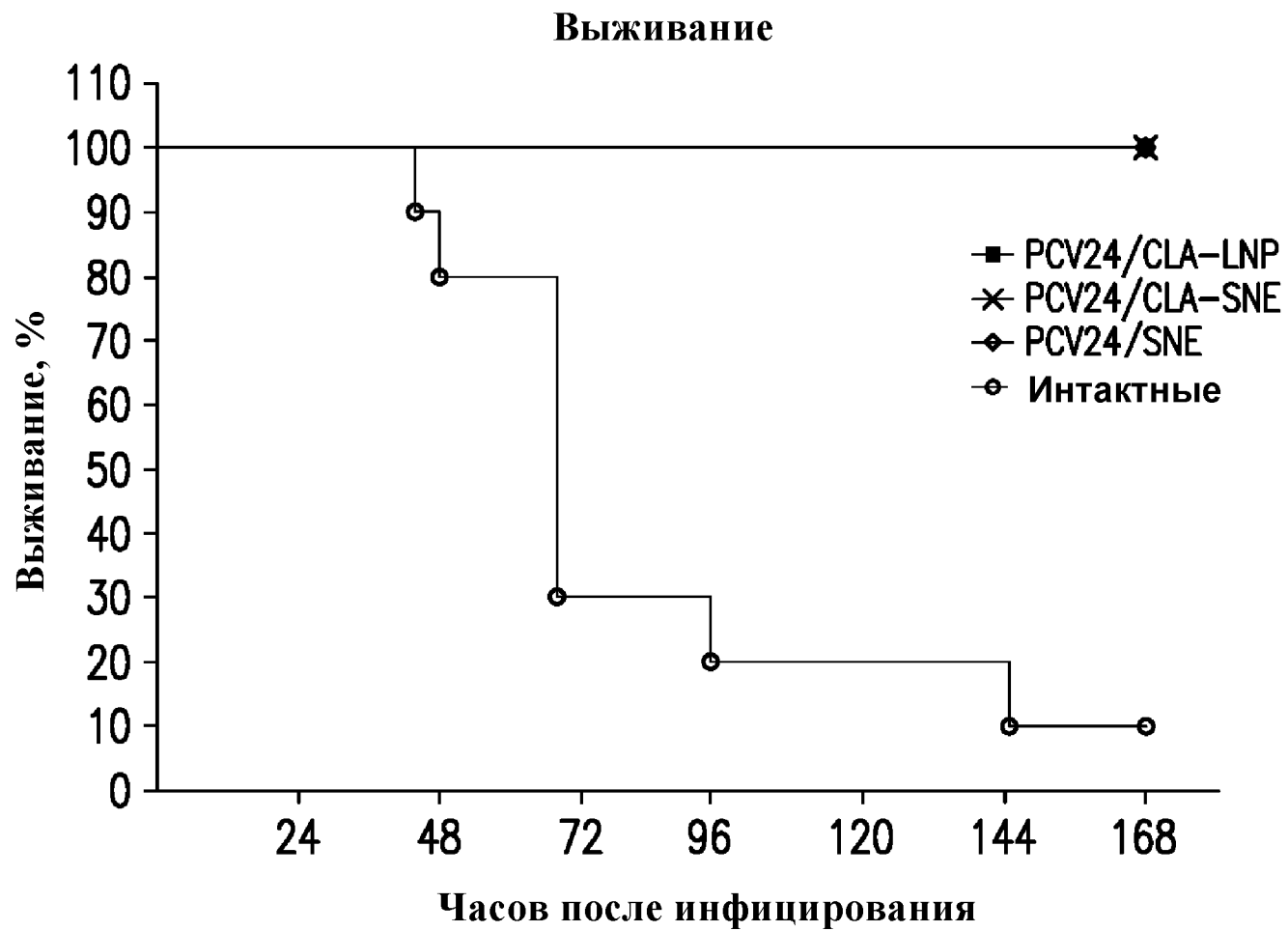
Фиг. 8В



Фиг. 8С

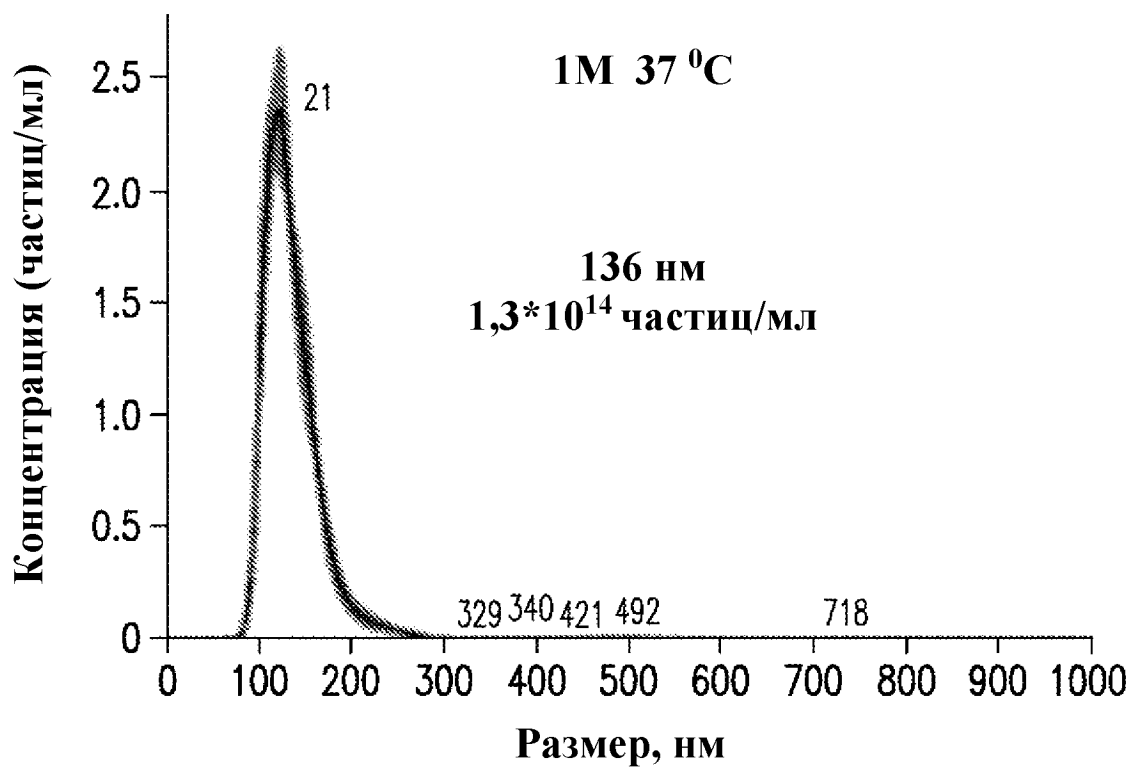
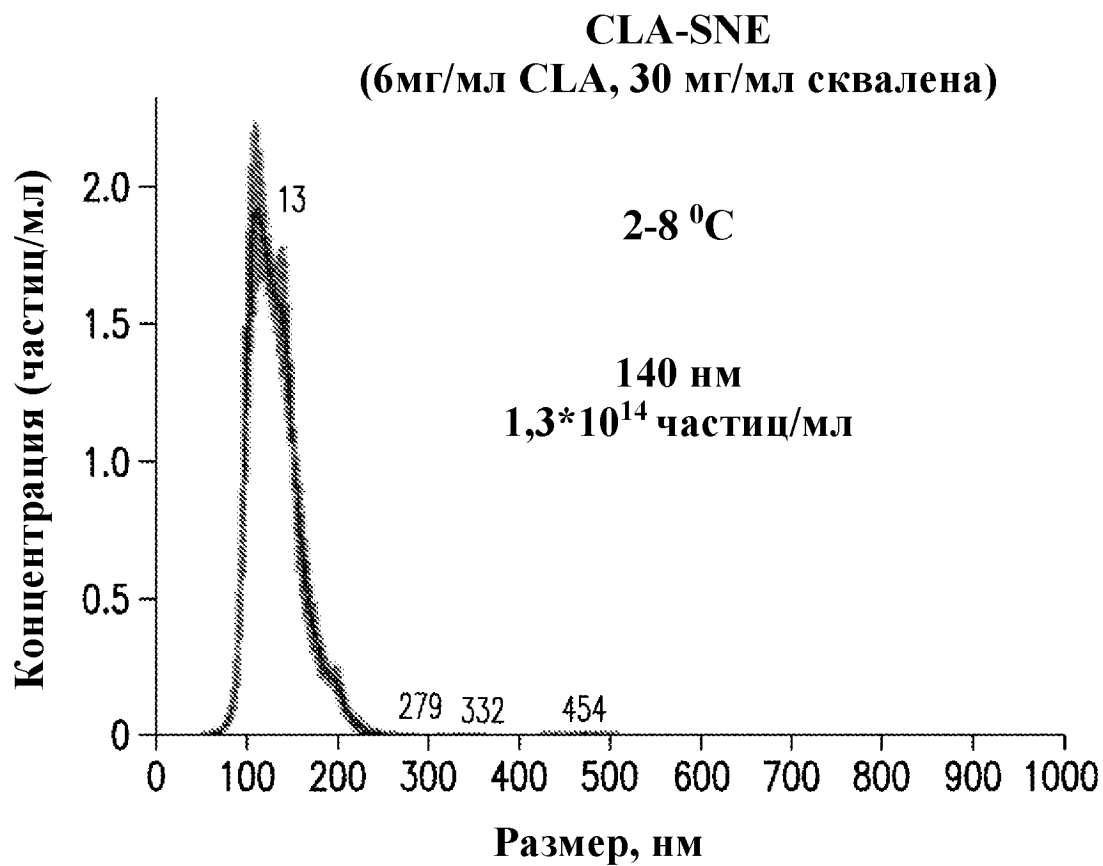


Фиг. 8D

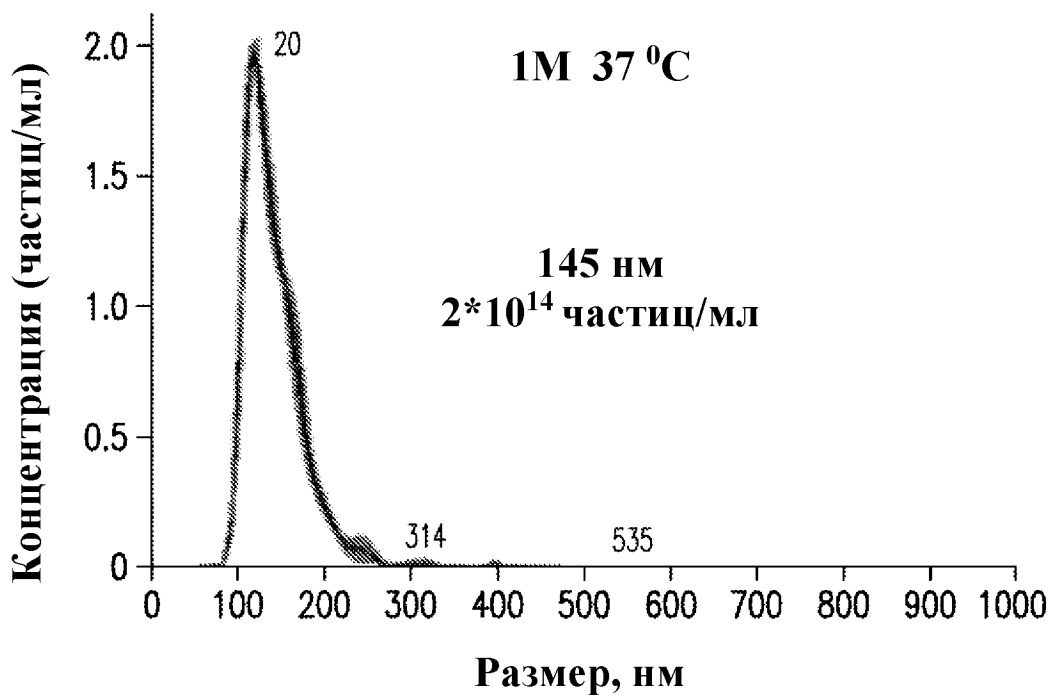
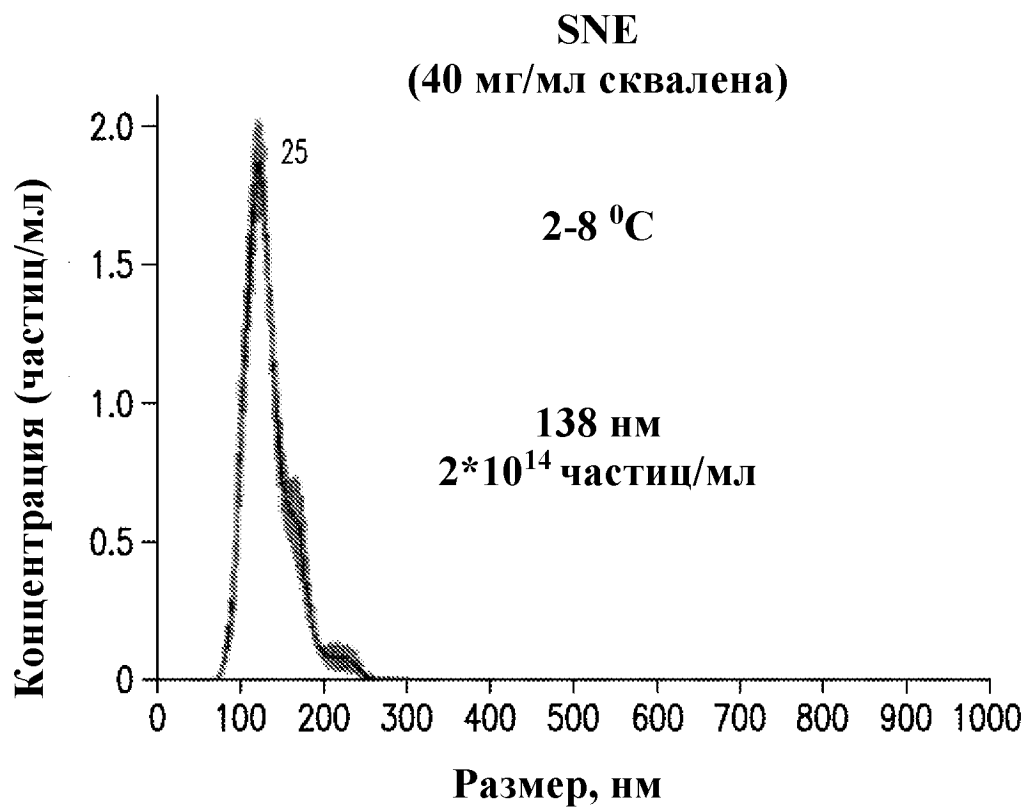


Фиг. 9

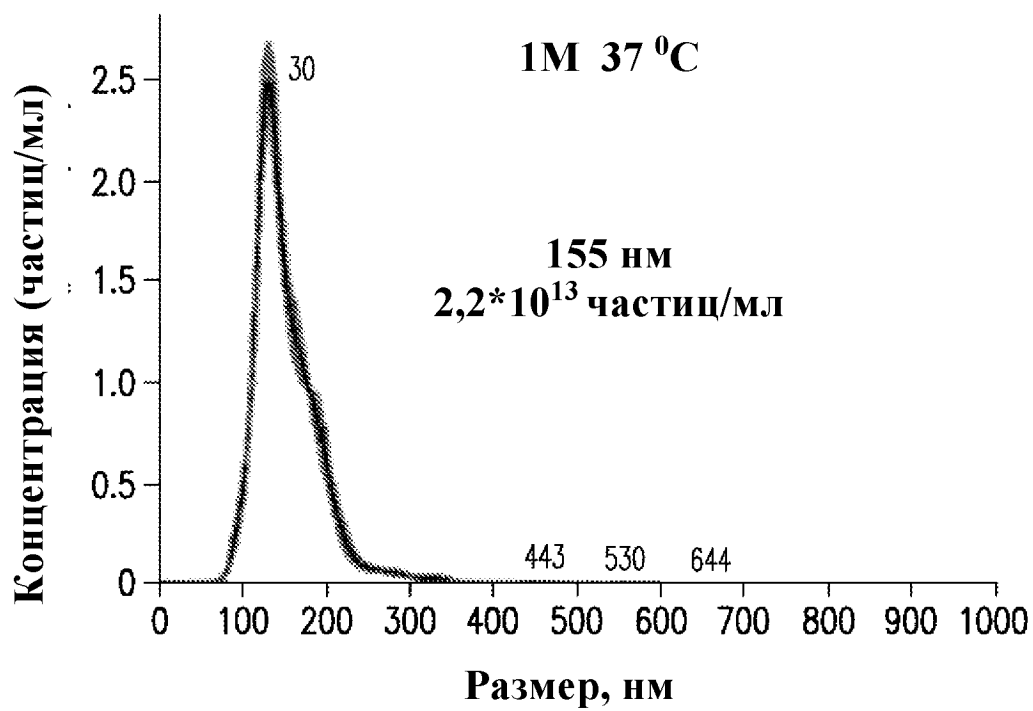
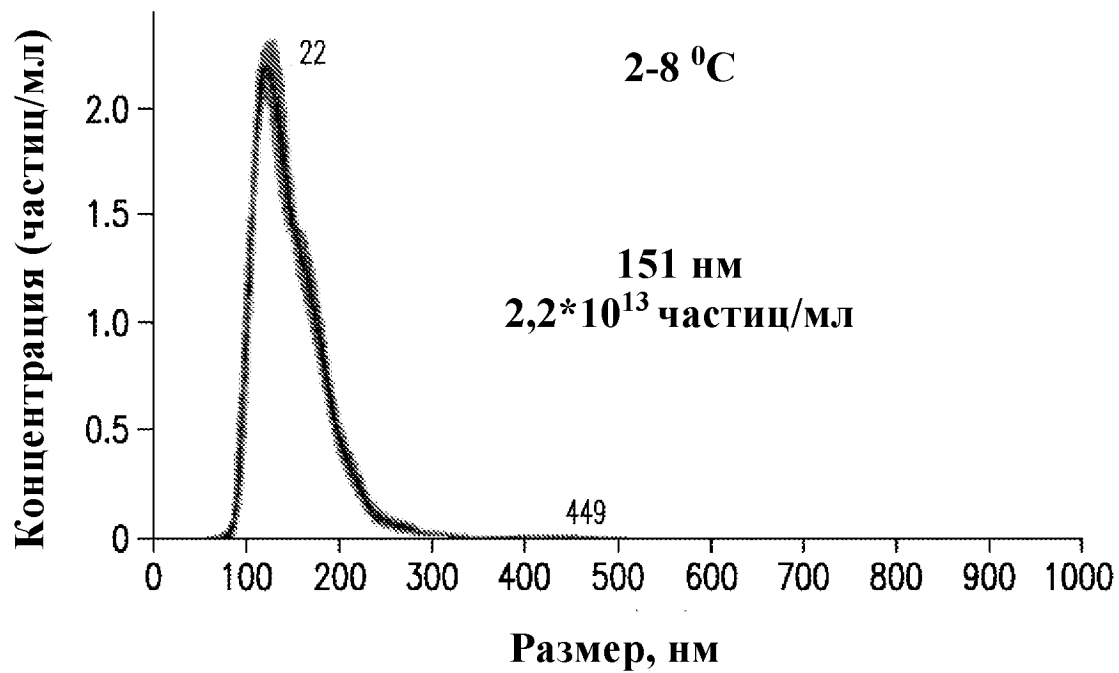




Фиг.10А

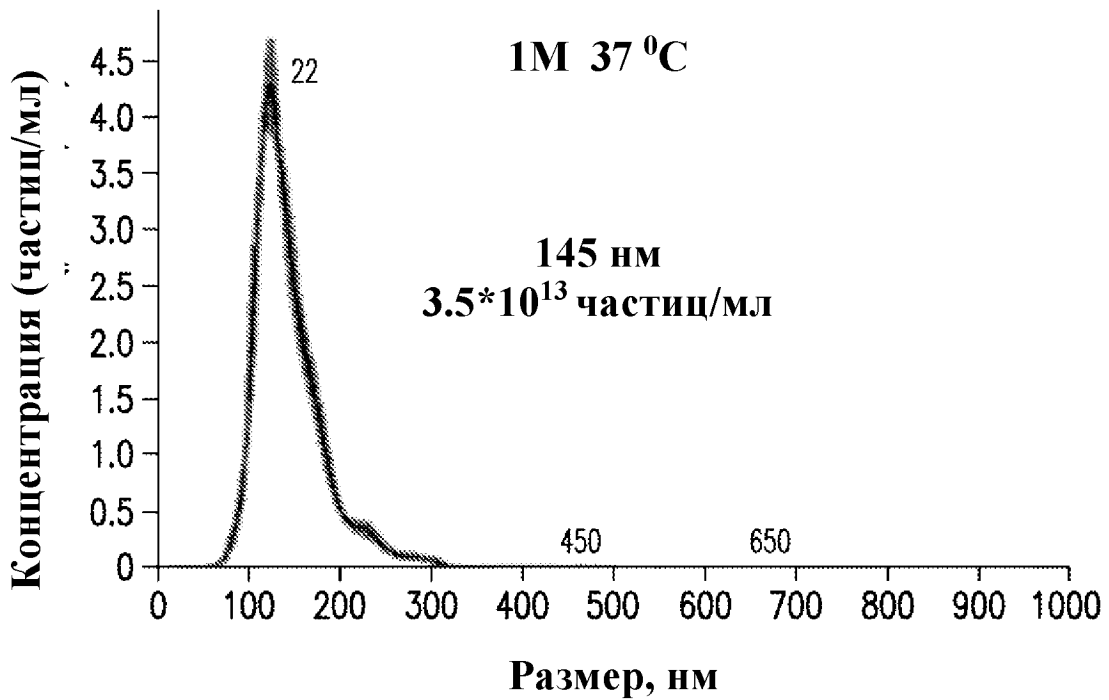
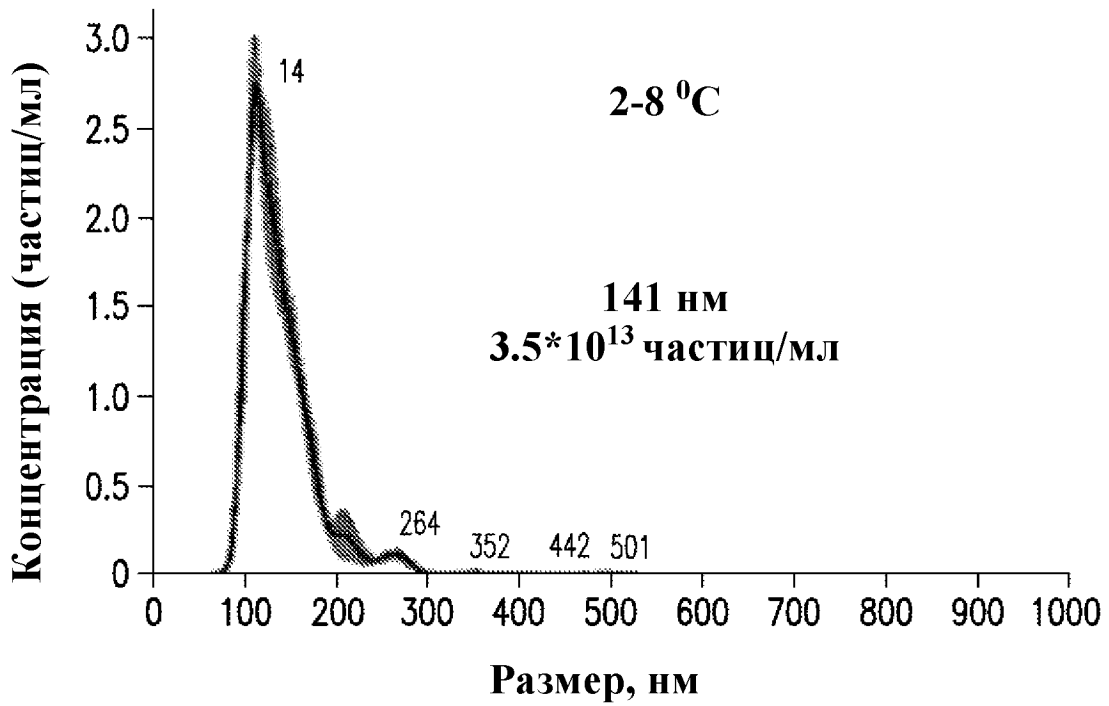
**Фиг.10В**

**CLA-SNE**  
**(4 мг/мл CLA, 4 мг/мл сквалена)**



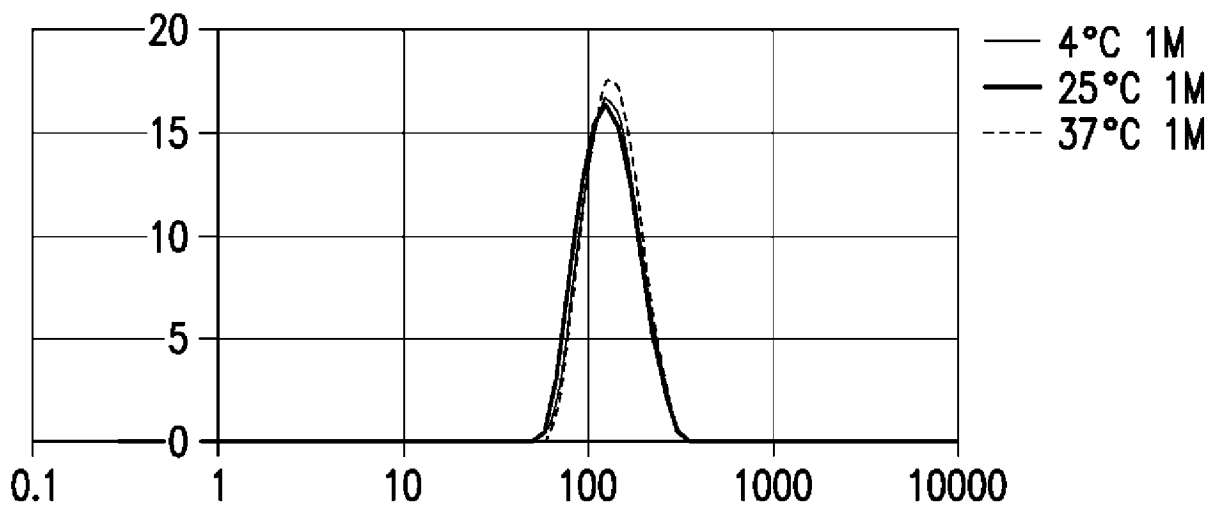
**Фиг. 10С**

**SNE**  
**(8 мг/мл сквалена)**



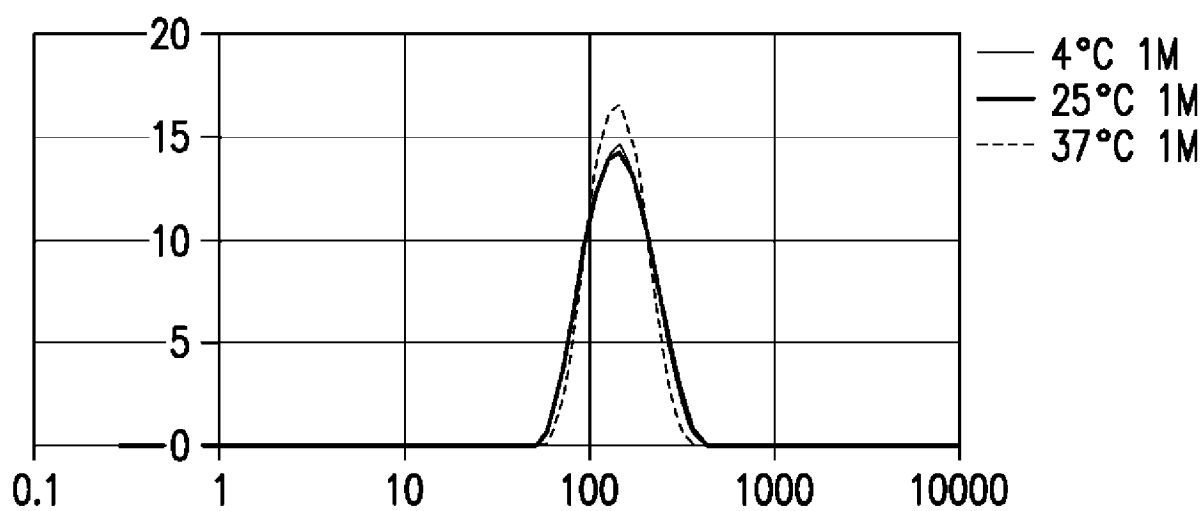
**Фиг. 10D**

**CLA-SNE**  
**(6 мг/мл CLA, 30 мг/мл сквалена)**



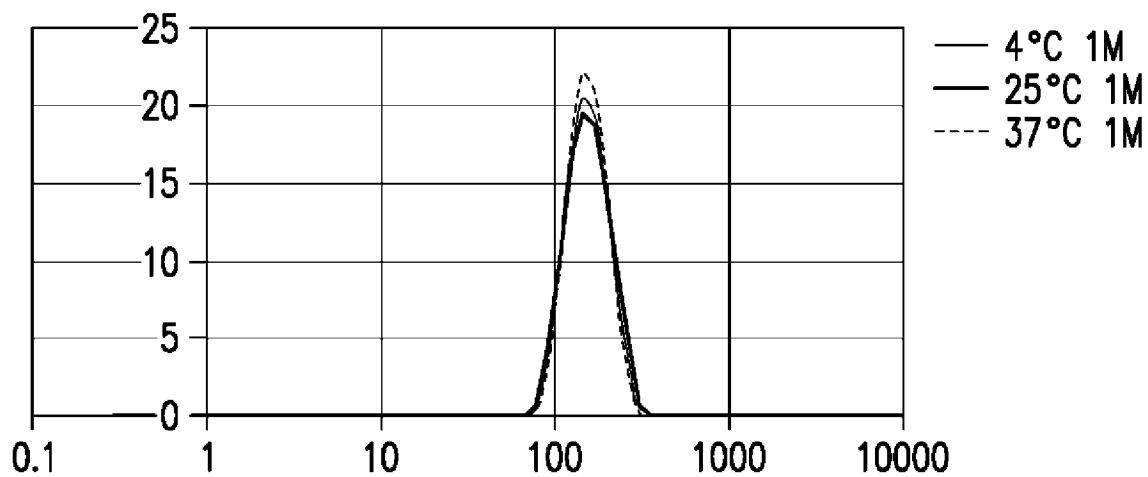
Фиг. 11А

**CLA-SNE**  
**(4 мг/мл CLA, 4 мг/мл сквалена)**



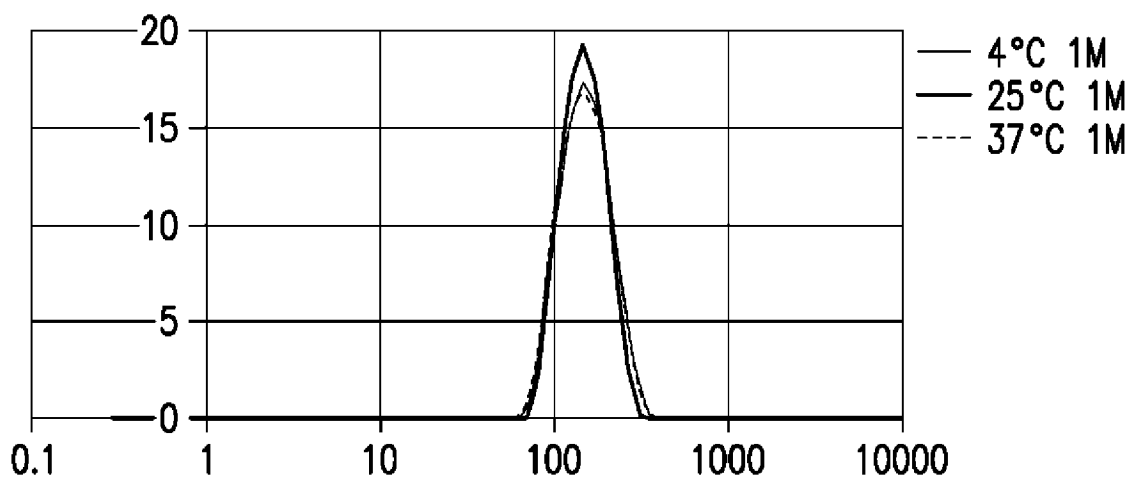
Фиг. 11В

**SNE**  
**(40 мг/мл сквалена)**

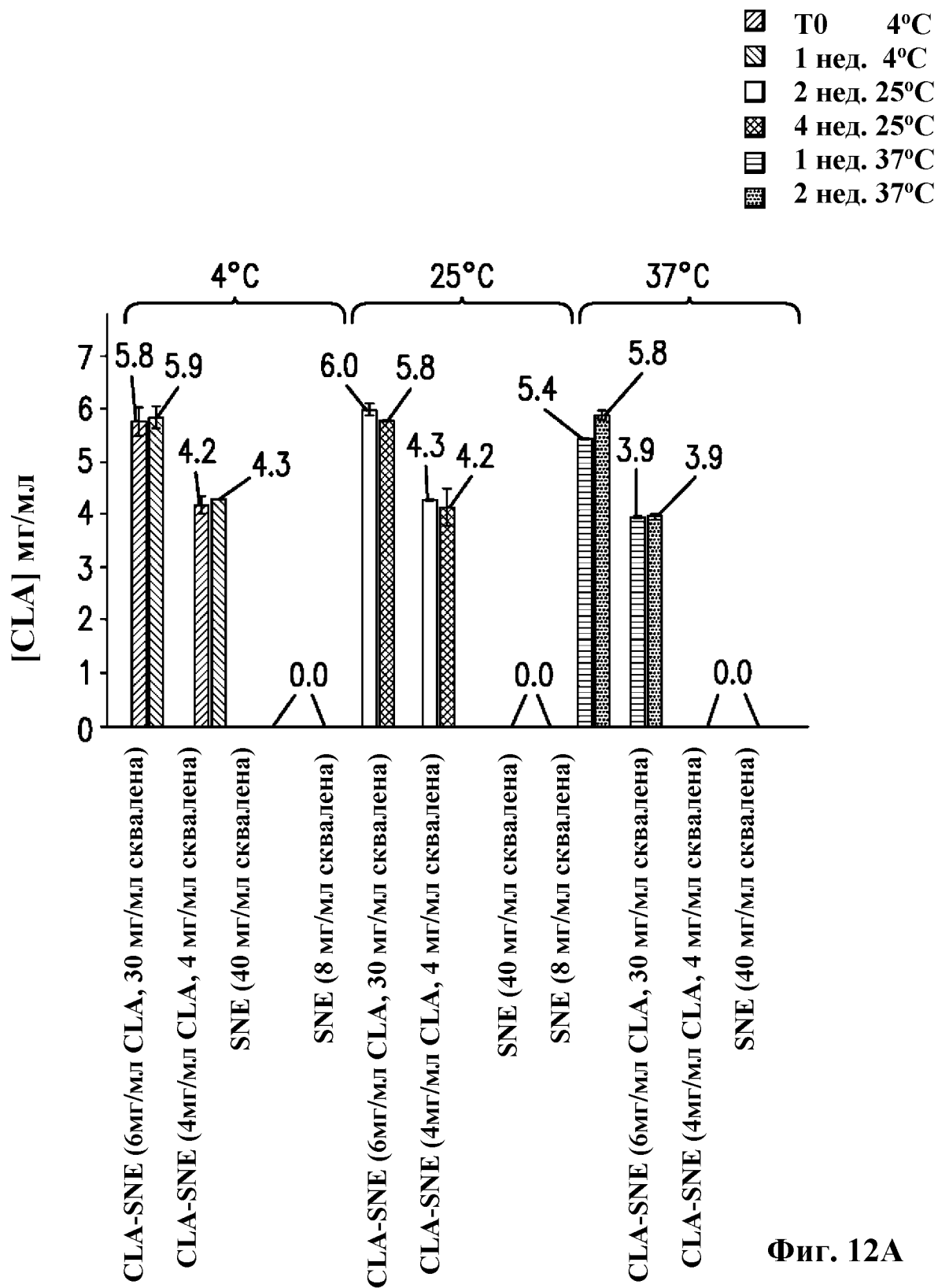


**Фиг. 11С**

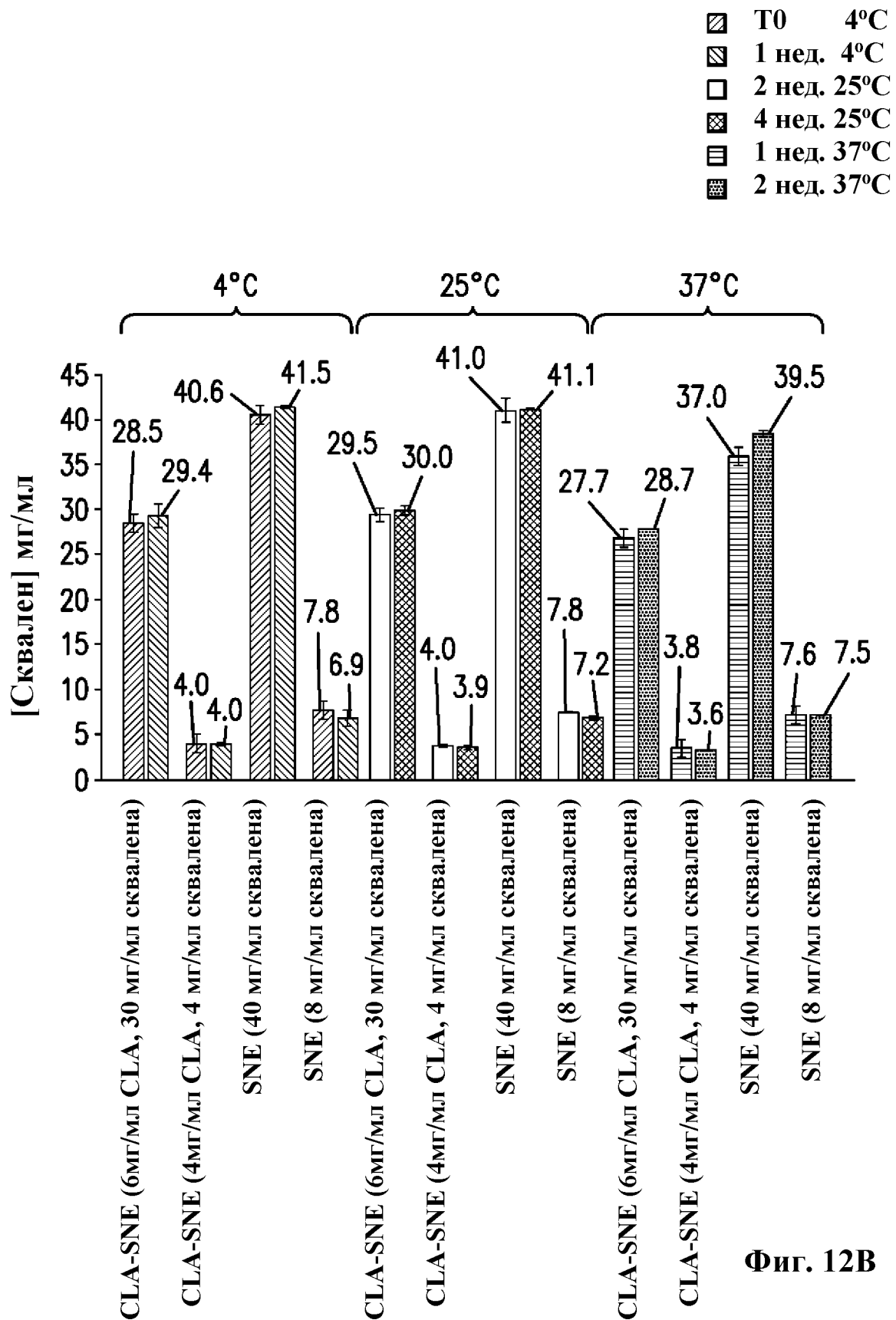
**SNE**  
**(8 мг/мл сквалена)**



**Фиг. 11D**



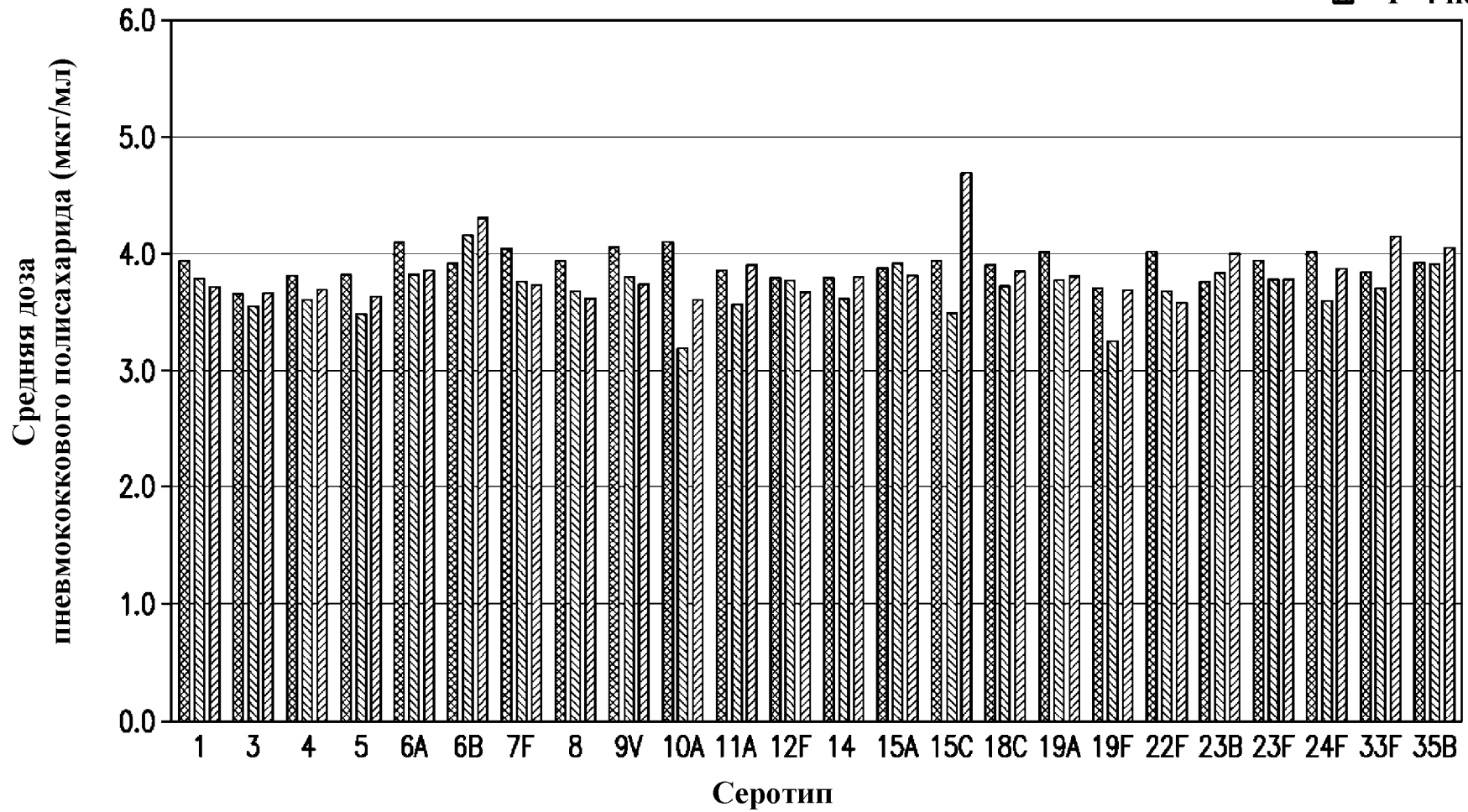
Фиг. 12А








**CLA-SNE**  
**(1,2 мг/мл CLA, 6,5 мг/мл сквалена)**

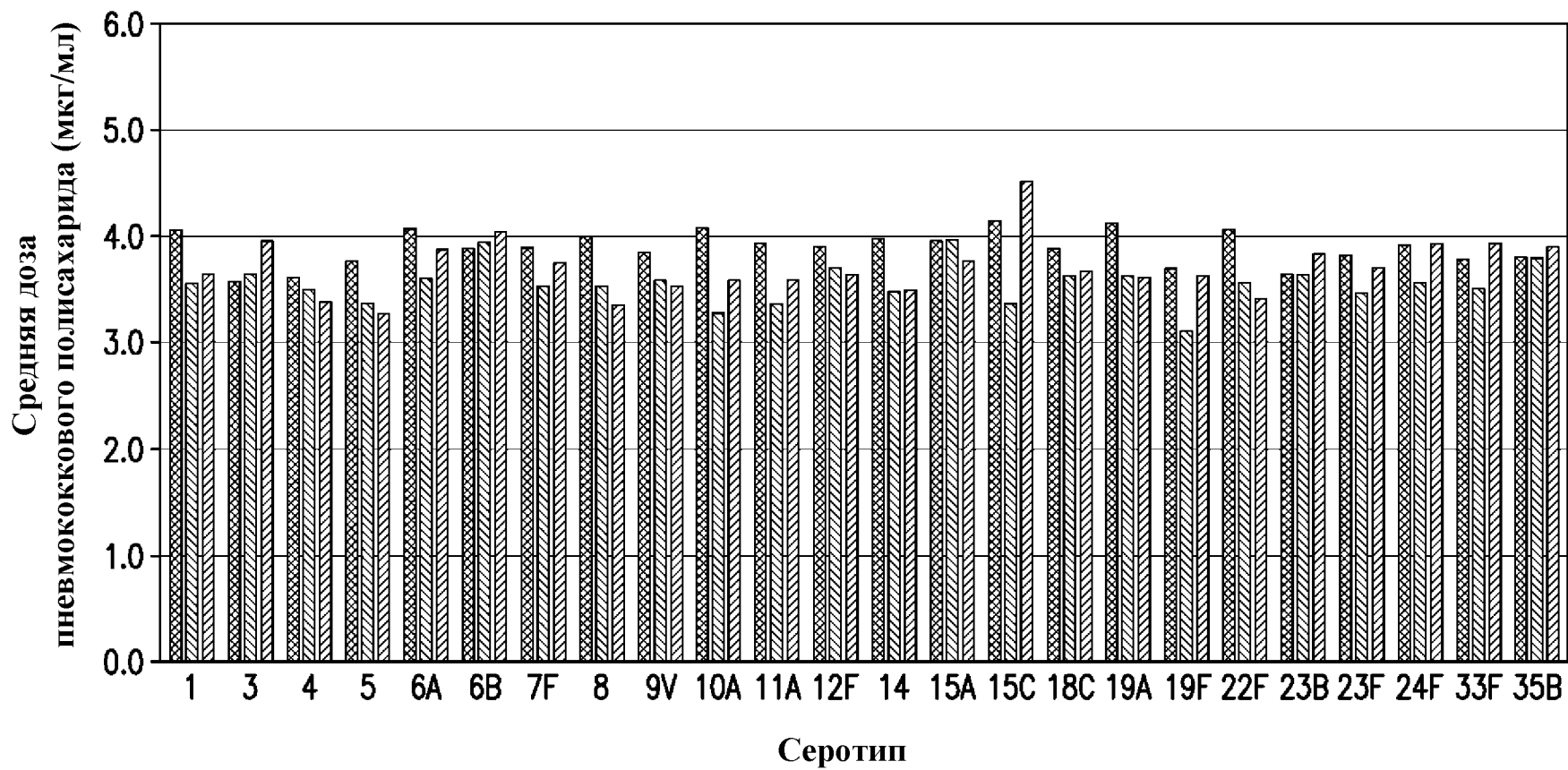
- ▣ T=0
- ▤ T=2 нед.
- ▥ T=4 нед.



**Фиг. 13А**

**CLA-SNE**  
**(1,2 мг/мл CLA, 1,2 мг/мл сквалена)**

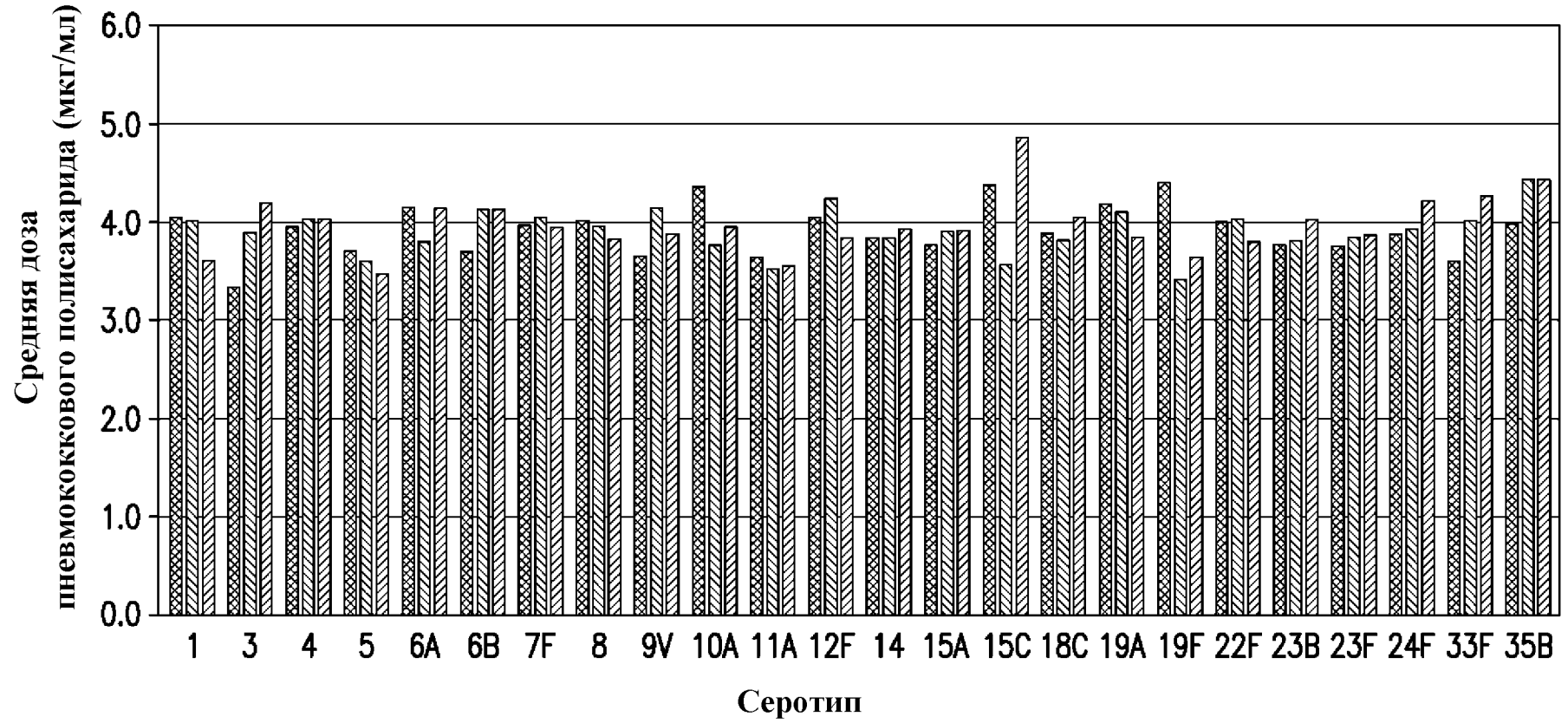
 T=0  
 T=2 нед.  
 T=4 нед.



**Фиг. 13В**

**SNE**  
**(6,5 мг/мл сквалена)**

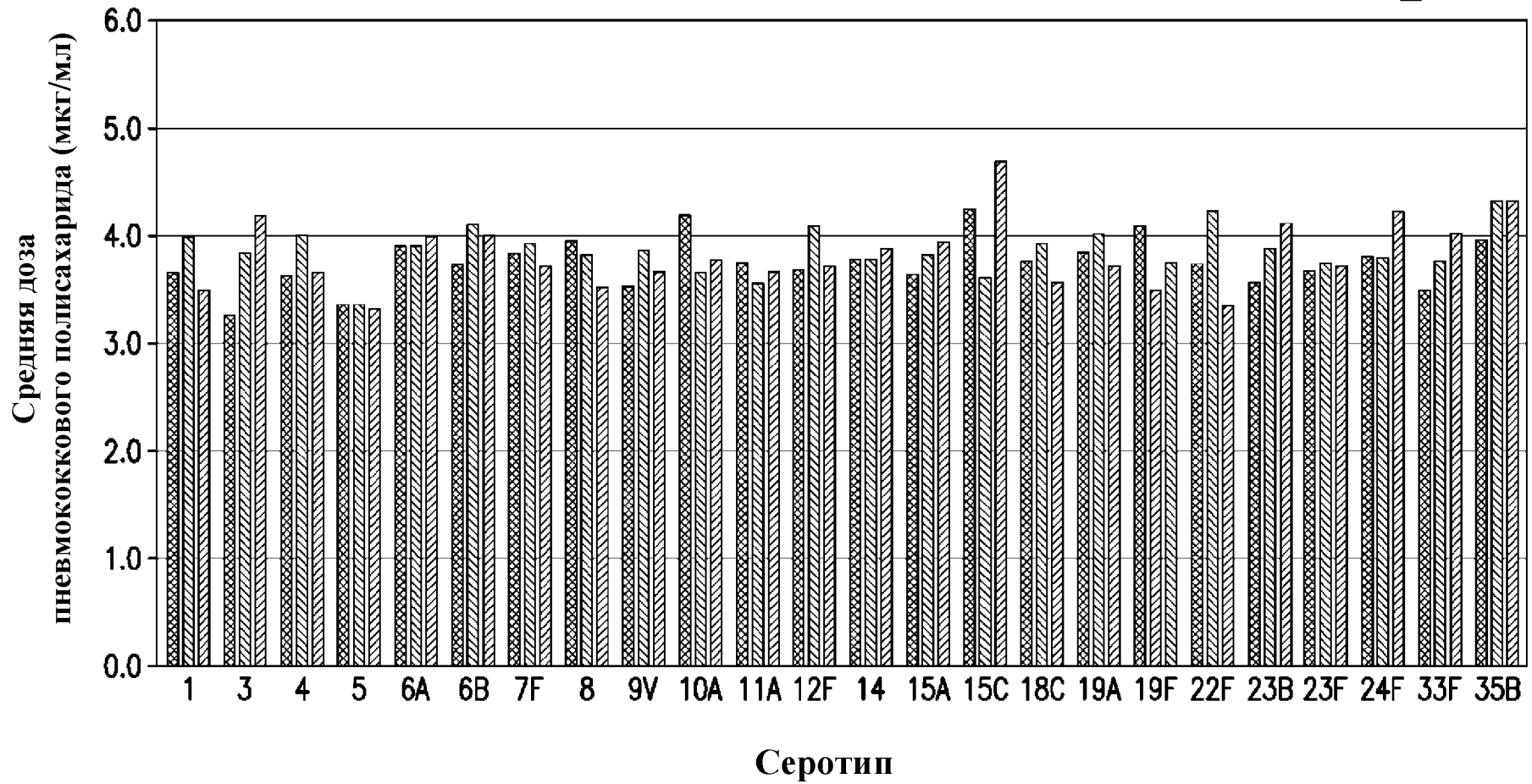
- ▣ T=0
- ▤ T=2 нед.
- ▥ T=4 нед.



**Фиг. 13С**

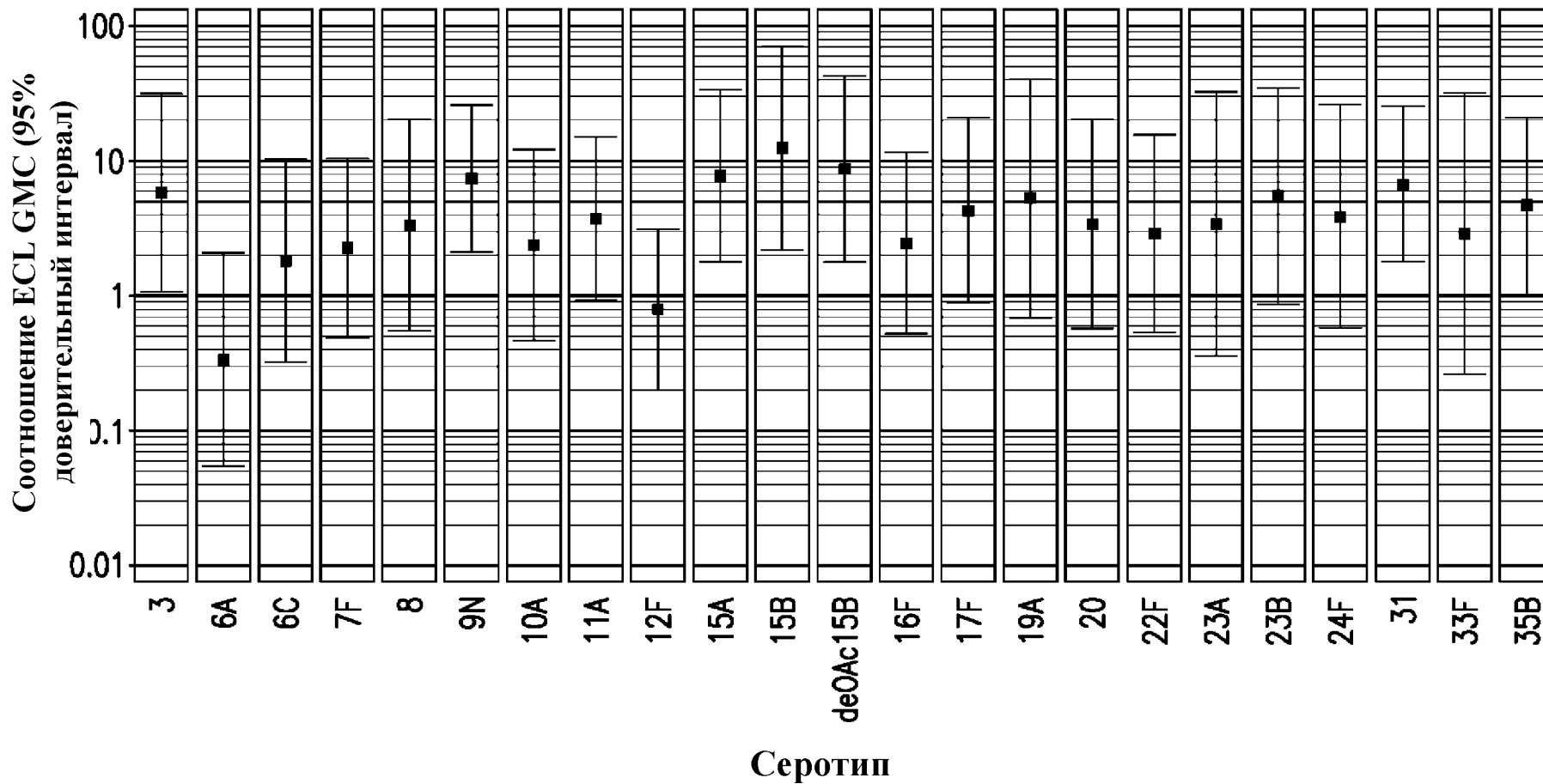
**SNE**  
**(0,4 мг/мл сквалена)**

■ T=0  
▨ T=2 нед.  
▩ T=4 нед.



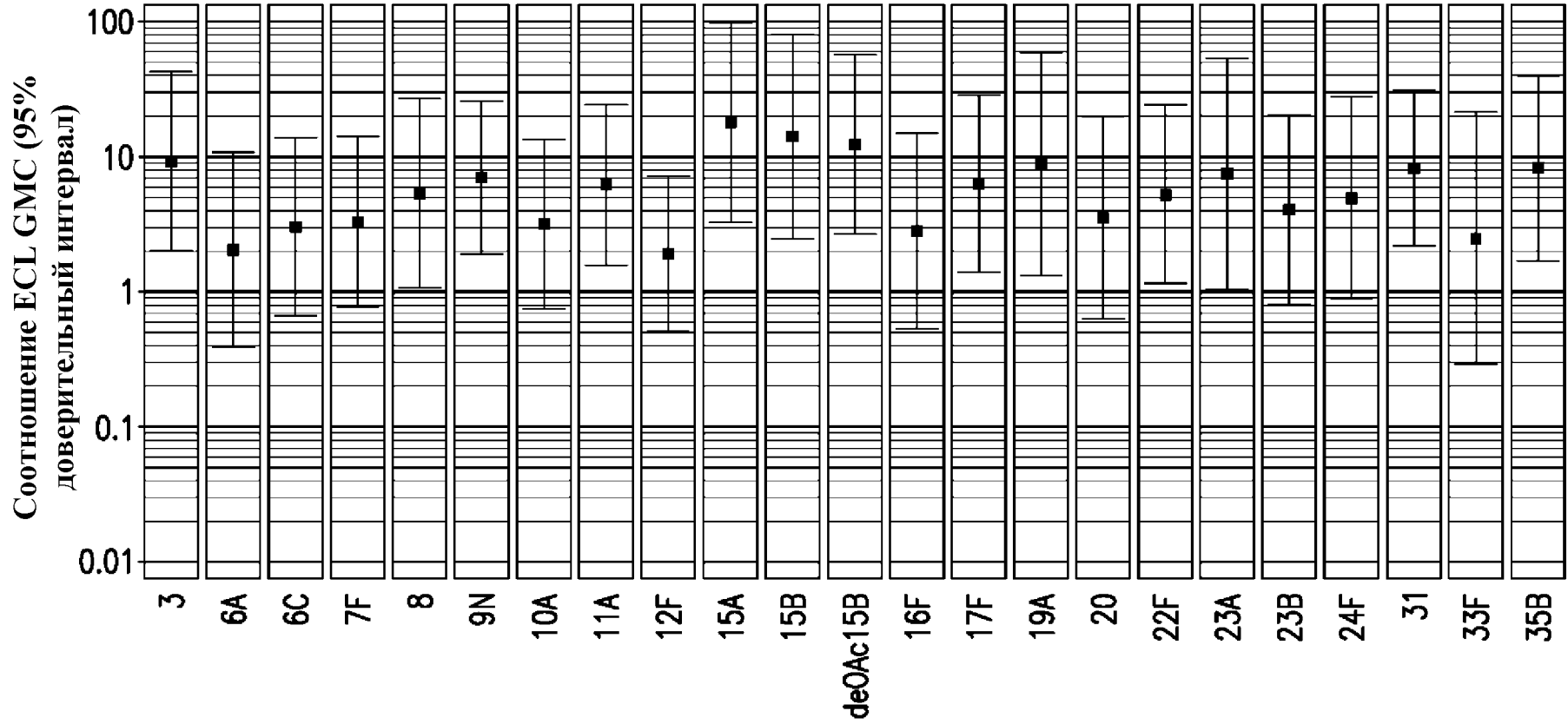
**Фиг. 13D**

■ PCV21/CLA-SNE (300 мкг CLA) в сравнении с PCV21 (без адьюванта)



Фиг. 14А

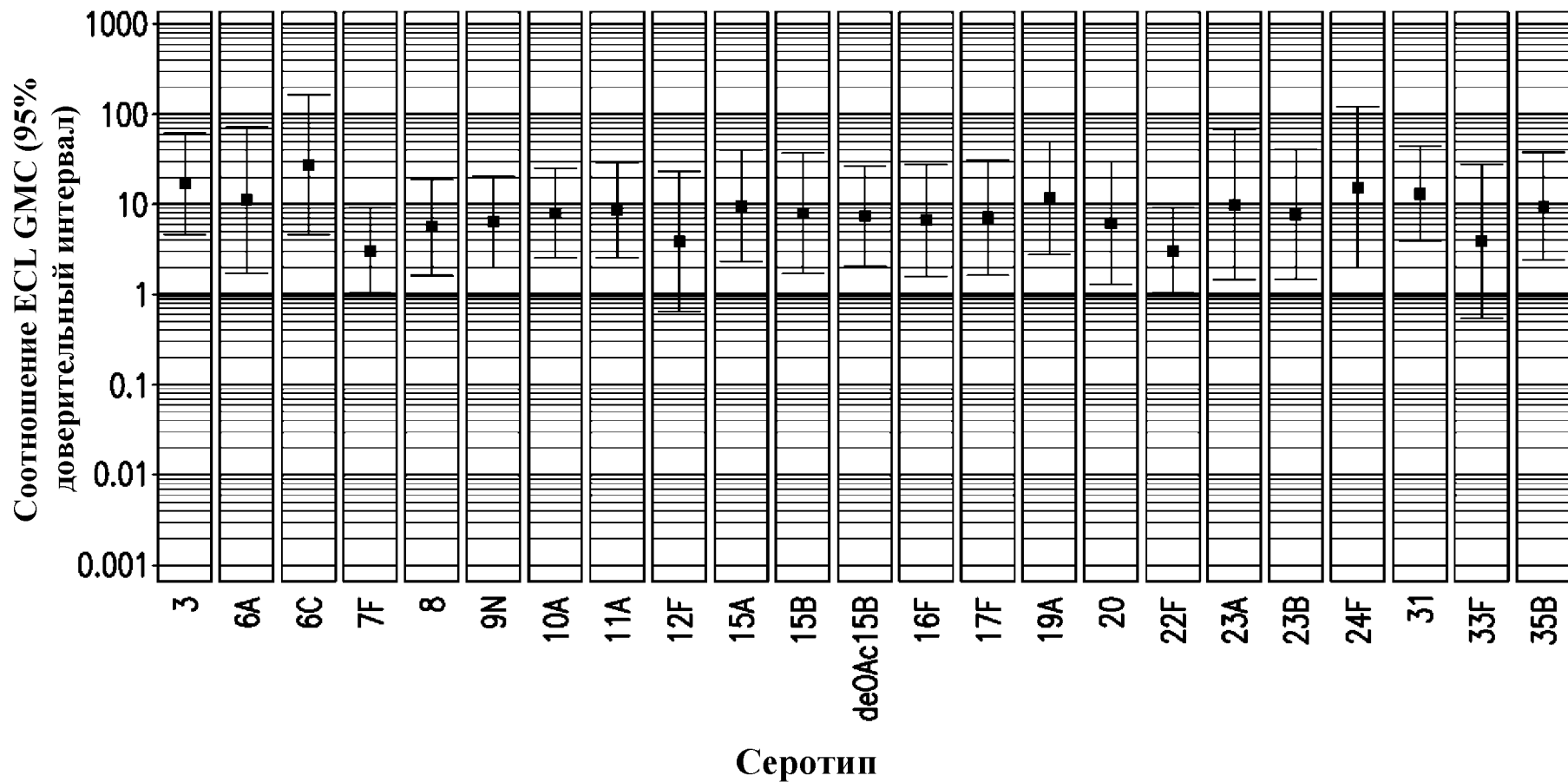
■ PCV21/CLA-SNE (300 мкг CLA) в сравнении с PCV21 (без адьюванта)



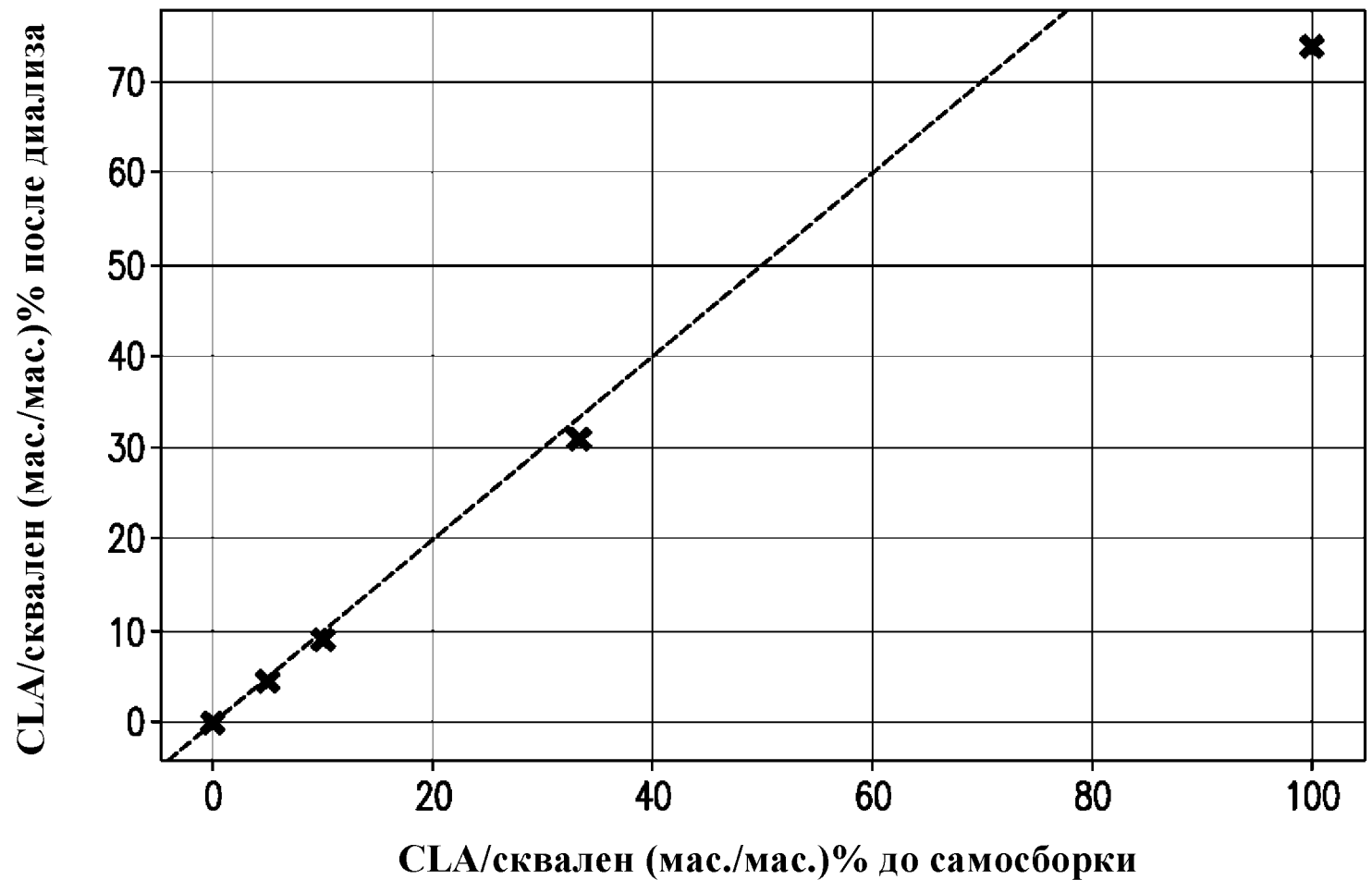
Серотип

Фиг. 14В

■ PCV21/CLA-SNE (300 мкг CLA) в сравнении с PCV21 (без адьюванта)

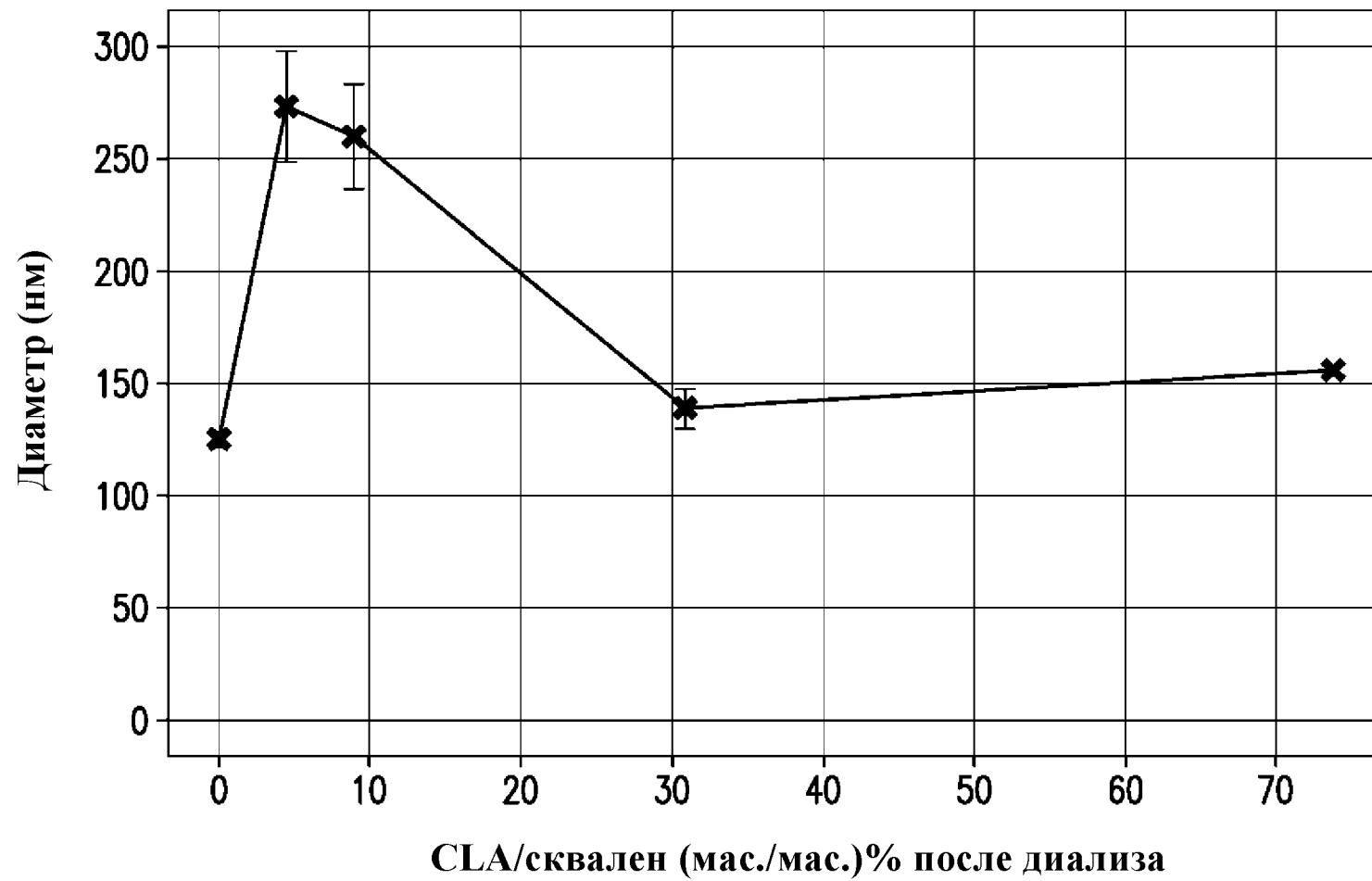


Фиг. 14С

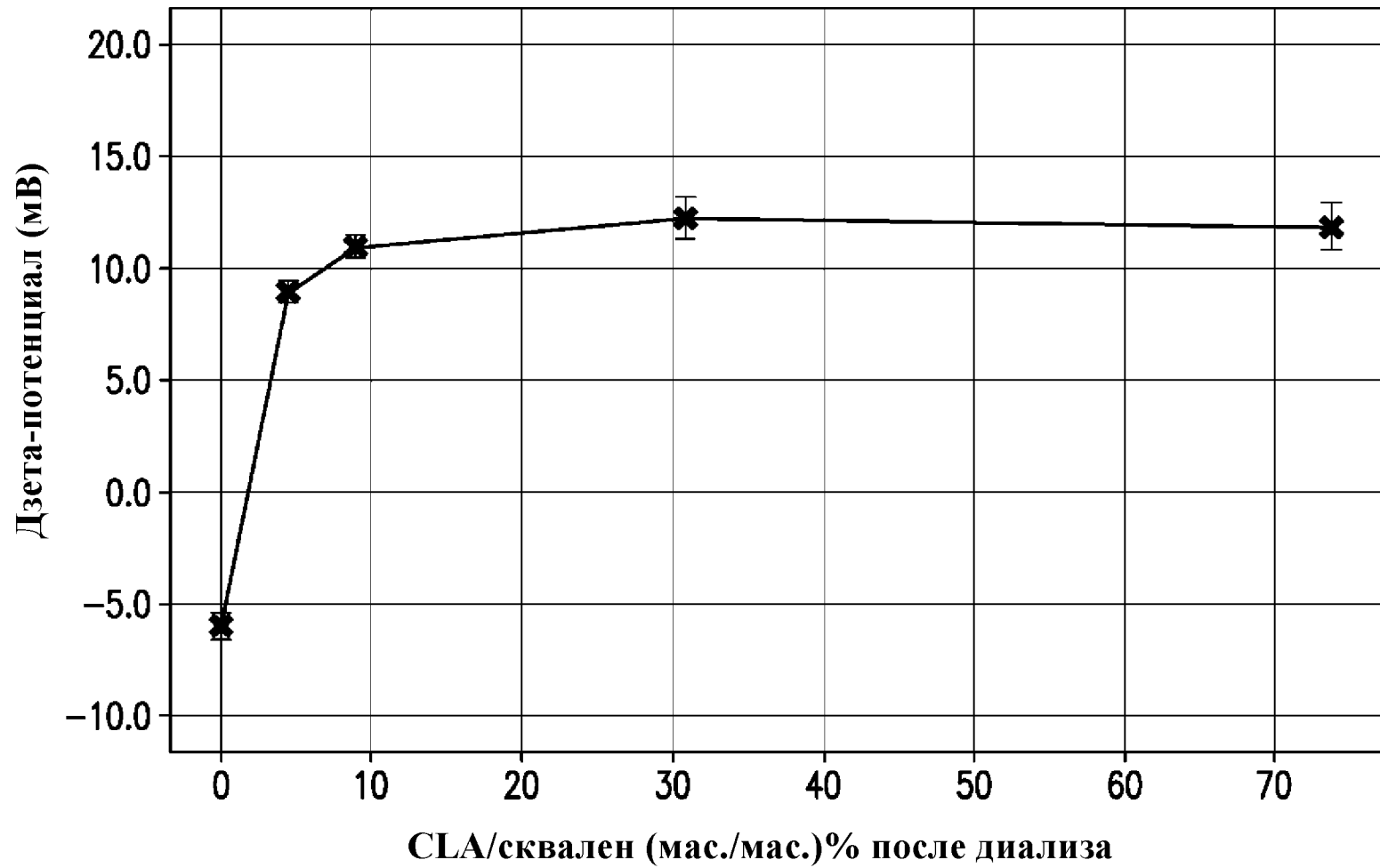


Фиг. 15А

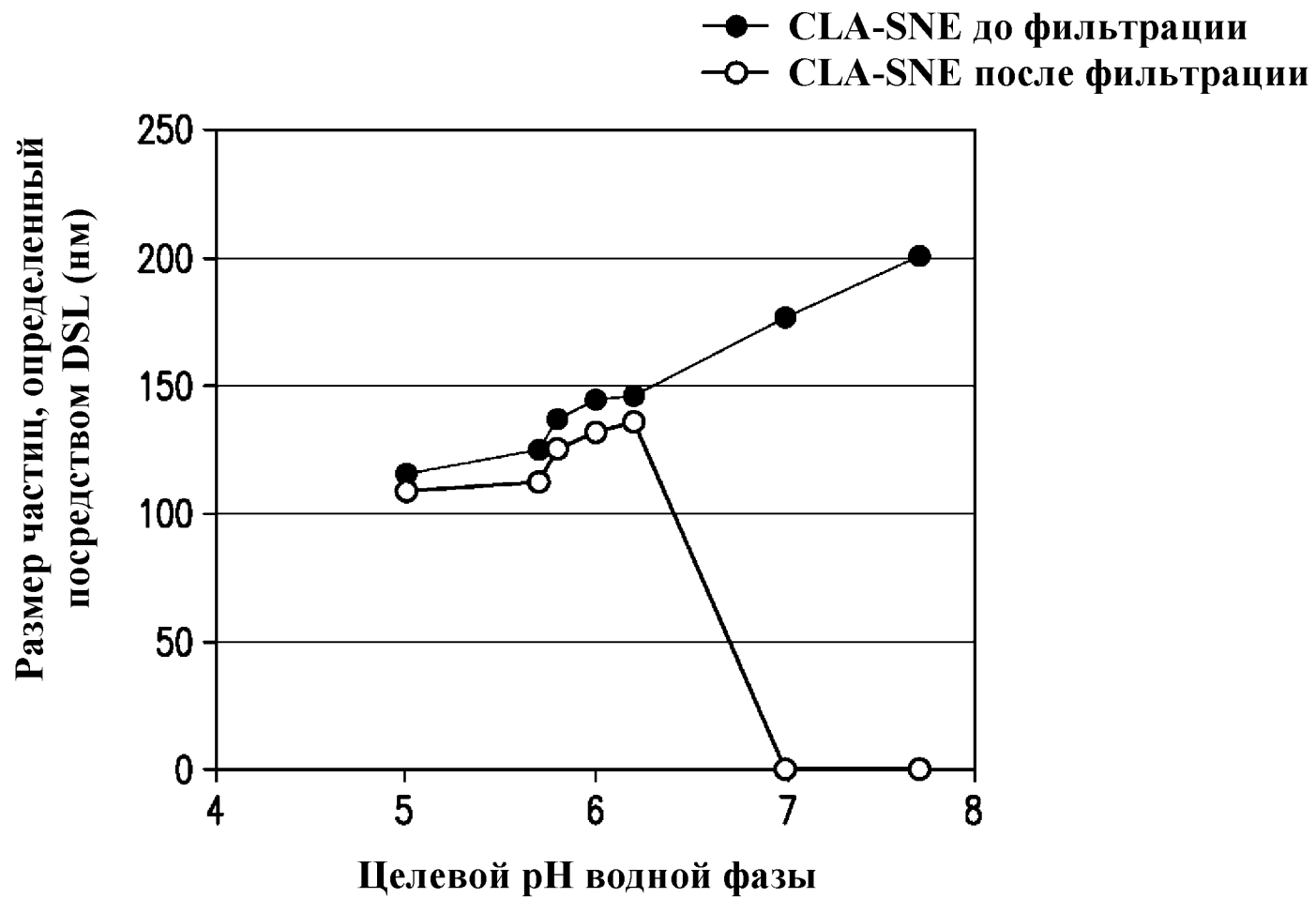




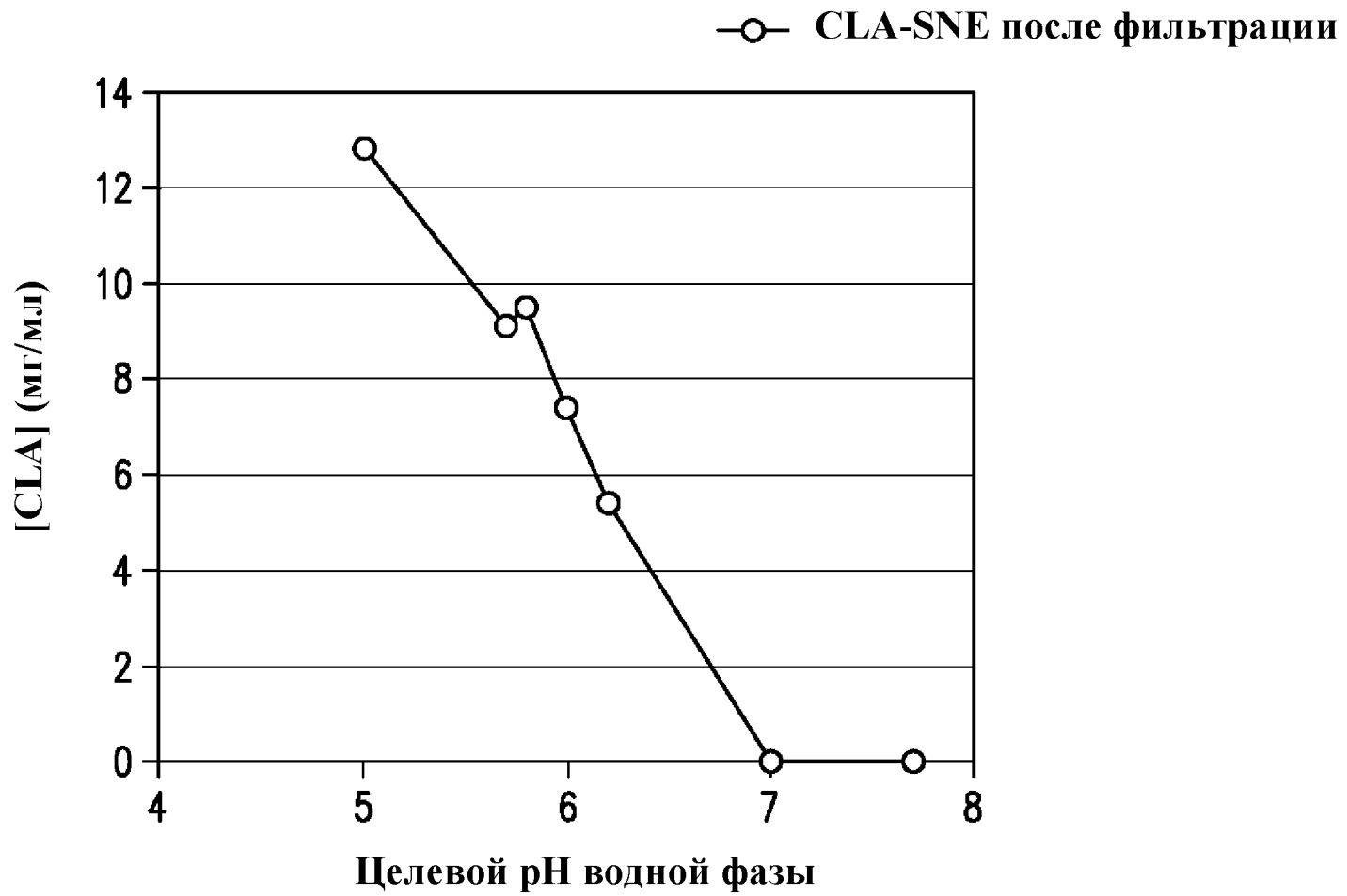
Фиг. 15В



Фиг. 15С



Фиг. 16



Фиг. 17