

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047156**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.06.11

(51) Int. Cl. *A61K 39/09* (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
202191638

(22) Дата подачи заявки
2019.10.11

(54) **МУЛЬТИВАЛЕНТНАЯ ВАКЦИНА НА ОСНОВЕ КОНЬЮГАТА ПНЕВМОКОККОВЫЙ ПОЛИСАХАРИД-БЕЛОК**

(31) **201841038835**

(56) **WO-A1-2018064444**

(32) **2018.10.12**

(33) **IN**

(43) **2021.12.27**

(86) **PCT/IN2019/050761**

(87) **WO 2020/075201 2020.04.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАЙОЛОДЖИКАЛ И ЛИМИТЕД (IN)

(72) Изобретатель:
**Бурки Раджендар, Срираман
Раджан, Матур Рамеш Венкат,
Мангена Нарендер Дев, Датла
Махима, Масиламани Баламурали,
Кандималла Вивек Бабу, Сангаредди
Веерапанду (IN)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к поливалентной вакцинной композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, содержащей пневмококковый капсульный полисахарид одного или нескольких серотипов *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с одним или более белками-переносчиками.

047156

B1

047156
B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к поливалентной вакцинной композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, содержащей пневмококковый капсульный полисахарид одного или нескольких серотипов *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с одним или более белками-переносчиками.

Уровень техники

Streptococcus pneumoniae ("пневмококк") представляет собой грамположительную бактерию, которая вызывает инвазивные заболевания, такие как пневмония, бактериемия и менингит, и заболевания, ассоциированные с колонизацией, такие как острый отит среднего уха (например, колонизация среднего уха). Эти индуцируемые пневмококком заболевания приводят к заболеваниям и смертям, в частности, у индивидуумов в возрасте младше 24 месяцев и старше 60 лет. Согласно оценкам, частота пневмококковой пневмонии в США у индивидуумов в возрасте старше 60 лет составляет от 3 до 8 на 100000. В 20% случаев пневмококковая пневмония приводит к бактериемии и менингиту, в совокупности имеющие показатель смертности 30% несмотря на лечение антибиотиками.

Пневмококковые вакцины можно вводить для профилактики инфекций. Современные вакцины включают поливалентные пневмококковые полисахаридные вакцины (содержат пневмококковые полисахариды из двух или более серотипов) и пневмококковые конъюгатные вакцины. Известно, что эффективность защиты у пневмококковой полисахаридной вакцины связана с концентрацией антител, индуцированных против капсульного полисахарида. Пневмококковые клетки инкапсулированы в полисахарид, обеспечивающий более 90 различных серотипов пневмококка. Капсула является основным фактором, определяющим вирулентность пневмококков - она не только защищает внутреннюю поверхность клетки от опосредуемого комплементом лизиса клеток, также она является слабоиммуногенной.

Pneumovax®23 от Merck представляет собой мультивалентную пневмококковую полисахаридную вакцину, и она содержит неконъюгированные капсульные полисахариды из 23 серотипов пневмококка, включая серотипы 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F и 33F. В дополнение к Pneumovax®23, поливалентные пневмококковые полисахаридные вакцины, которые получили лицензию на настоящий момент, оказались полезными для предупреждения пневмококкового заболевания у взрослых, в частности, у пожилых людей и у людей, имеющих высокий риск. Однако младенцы и дети младшего возраста плохо отвечают на эти неконъюгированные пневмококковые полисахаридные вакцины.

Prevnar®-7 представляет собой вакцину на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, и она включает семь наиболее часто выделяемых серотипов полисахарида (например, 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F, конъюгированные с CRM₁₉₇). С начала применения Prevnar®-7 в США в 2000 году произошло значительное снижение частоты инвазивного пневмококкового заболевания (IPD) у детей. 13-валентная конъюгатная вакцина Prevenar-13®, содержащая тринадцать серотипов полисахарида 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, конъюгированных с CRM₁₉₇, была разработана и одобрена вследствие ограниченного охвата серотипов у Prevnar®-7 в определенных регионах мира.

Synflorix® представляет собой пневмококковую вакцину, которая включает десять серотипов полисахарида 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 23F, конъюгированных с белком D (PD), серотип 18C, конъюгированный со столбнячным токсинидом (TT), и серотип 19F, конъюгированный с дифтерийным токсинидом (DT). Полисахарид каждого из серотипов присоединяют с использованием тетрафторбората 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP) в условиях контролируемого pH.

В патенте США № 536097 описаны пневмококковые вакцины, где иммуногенный конъюгат содержит продукт восстановительного аминирования интактного капсульного полимера бактериального патогена *Streptococcus pneumoniae*, имеющий по меньшей мере две карбонильных группы, и бактериальный токсин или токсинид, причем указанный конъюгат содержит сшитый конъюгат, в котором присутствует прямая ковалентная связь между капсульным полимером и токсином или токсинидом.

В патенте США № 5693326 описан обобщенный способ получения конъюгатной вакцины, где для активации вирусных, грибковых или бактериальных полисахаридов используют органический цианилирующий агент, выбранный из группы: тетрафторборат 1-циано-4-(диметиламино)пиридиния, тетрафторборат N-цианотриэтиламмония и п-нитрофенилцианат, для образования активированного углевода, а затем их связывают с белком или белком-переносчиком.

В патенте США № 5854416 описаны аминокислотные последовательности и последовательности ДНК белка массой 37 кДа из *Streptococcus pneumoniae*, известного как PsaA (пневмококковый белок поверхностной адгезии A).

В патенте США № 7862823 описана мультивалентная конъюгатная вакцинная композиция, содержащая пневмококковые капсульные полисахариды по меньшей мере с двумя различными белками-переносчиками, такими как DT и TT.

В патенте США № 8192746 описана 15-валентная вакцинная композиция на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, имеющая капсульные полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, конъюгированные с CRM₁₉₇.

В патенте США № 8557250 B2 описан способ, включающий приведение в контакт смеси нескольких различных активированных цианатом иммуногенных полисахаридов по меньшей мере с одним активированным гидразином белком.

В патенте США № 8808708 и патенте США № 8603484 описана 13-валентная иммуногенная композиция, состоящая из конъюгатов полисахарид-белок, где серотипы состоят из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, и белка-переносчика CRM₁₉₇.

В публикации патента США № 2010/0074922 A1 описана иммуногенная композиция, содержащая 10 или более серотипов, где капсульный сахарид серотипа 19F конъюгирован с DT, капсульный сахарид серотипа 18C конъюгирован со столбнячным токсиндом, и капсульные сахараиды серотипов 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 и 23F конъюгированы с белком D, выделенным из *Haemophilus influenzae*.

В публикации патента США № 2010/0239604 описана иммуногенная композиция, содержащая мультивалентные конъюгаты капсульных сахараидов *Streptococcus pneumoniae* из серотипов 19A и 19F, где сахарид серотипа 19A конъюгирован с первым бактериальным токсиндом и сахарид серотипа 19F конъюгирован со вторым бактериальным токсиндом, и капсульные сахараиды 2-9 *Streptococcus pneumoniae* конъюгированы с белком D.

В публикации патента США № 2012/321658 A1 описана иммуногенная композиция, где сахараиды серотипов 1, 3, 19A и 19F связаны с белком(ами)-переносчиком прямо или непрямо посредством химической реакции, отличной от восстановительного аминирования, и один или более других сахараидов выбран/выбраны из второй группы, состоящей из серотипов 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C и 23F, который связан/связаны с белком(ами)-переносчиком посредством восстановительного аминирования.

В IN 140/DEL/2011 описана вакцина на основе *Streptococcus pneumoniae*, содержащая либо (a) 7, либо более (b) 10 или более полисахаридов серотипов, конъюгированных по меньшей мере с 2 или более белками-переносчиками, выбранными из группы, включающей DT, дифтерийный токсин, CRM₁₉₇ и столбнячный токсин.

В публикации WO № 2013/191459 A1 описана 15-валентная пневмококковая конъюгатная композиция, содержащая капсульные полисахариды, происходящие из различных серотипов *Streptococcus pneumoniae*: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, конъюгированные с CRM₁₉₇.

В публикации WO № 2014/092377 A1 описана 13-валентная пневмококковая конъюгатная композиция, где 12 серотипов выбраны из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, и последний серотип представляет собой либо 2, либо 9N, конъюгированные с CRM₁₉₇.

В публикации WO № 2014/092378 A1 описана иммуногенная пневмококковая конъюгатная композиция, где 12 серотипов выбраны из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, и оставшийся один выбран из 22F или 33F, конъюгированные с CRM₁₉₇.

В публикации WO № 2016/207905 A2 описана поливалентная пневмококковая конъюгатная вакцинная (PCV) композиция, содержащая: 1) по меньшей мере 12 капсульных полисахаридов, выбранных из серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9N, 9V, 15B, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F *Streptococcus pneumoniae*, активированных посредством CDAP и конъюгированных с белком-переносчиком CRM₁₉₇, и 2) фармацевтически приемлемый носитель, где композиция не содержит капсульный полисахарид из серотипа 6A.

В WO 2018/064444A1 заявителя настоящей заявки описана пневмококковая вакцинная композиция, причем композиция содержит два или более серотипа капсульного пневмококкового полисахарида, каждый из которых индивидуально конъюгирован с белком-переносчиком, пневмококковым белком поверхностной адгезии A (PsaA) или комбинацией PsaA и CRM₁₉₇.

В публикации заявки на патент Китая № CN 101590224 описана 14-валентная вакцина на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, включающая полисахариды серотипов 1, 2, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, конъюгированные с CRM₁₉₇.

В публикации заявки на патент Китая № CN 103623401 описана 14-валентная композиция на основе конъюгата пневмококковый капсульный полисахарид - белок, где 14 различных серотипов полисахарида представляют собой 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, конъюгированные с CRM₁₉₇.

В публикации заявки на патент Китая № CN 103656631 описана мультивалентная композиция на основе конъюгата пневмококковый капсульный полисахарид-белок и способ ее получения. Конъюгатную композицию получают из капсульных полисахаридов пневмококка 24 различных серотипов и белка-переносчика, связанных ковалентным образом, где 24 различных серотипов полисахарида представляют собой 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F и 33F, конъюгированные с CRM₁₉₇.

В публикации заявки на патент Китая № CN 103656632 описана мультивалентная композиция на основе пневмококкового капсульного полисахарида, содержащая полисахарид серотипа 6A и по

меньшей мере один дополнительный полисахарид серотипа, выбранного из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6В, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 17F, 18С, 19А, 19F, 20, 22F, 23F и 33F, конъюгированные в CRM₁₉₇.

В публикации заявки на патент Китая № CN 104069488 описана поливалентная вакцина на основе пневмококкового капсульного полисахарида 14 различных серотипов и белка-переносчика, где 14 серотипов полисахарида включают 1, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F, конъюгированные с CRM₁₉₇.

В Nurkka et al. (2004, Ped. Inf. Dis. J., 23:1008-1014) описано исследование иммуногенности и безопасности 11-валентной пневмококковой вакцины на основе конъюгата с белком D, где не наблюдали эффекта примирования для серотипа 3 у младенцев, которым вводили три дозы вакцины с последующей усиливающей дозой либо той же вакцины, либо пневмококковой полисахаридной вакцины.

В вышеупомянутых источниках литературы описаны, среди других композиций, способов и т.п., мультивалентные пневмококковые конъюгатные вакцины, содержащие полисахариды из одного или нескольких серотипов, а также конъюгация этих полисахаридов с белками-переносчиками. Ввиду того, что в различных регионах преобладают различные серотипы, существует потребность в дополнительных поливалентных пневмококковых вакцинах, содержащих новые конъюгаты серотипов полисахаридов с улучшенным иммунным ответом, а также в разработке простого и эффективного способа производства.

Неожиданно поливалентные пневмококковые конъюгатные вакцинные композиции по настоящему изобретению обеспечивают улучшенный иммунный ответ относительно наивных поливалентных пневмококковых вакцин и существующих пневмококковых конъюгатных вакцин.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к 24-валентной вакцинной композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, содержащей один или более полисахаридов серотипов *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированных с одним или несколькими белком(ами)-переносчиком.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к пневмококковой конъюгатной вакцинной композиции, содержащей капсульный полисахарид серотипов *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с одним или более белками-переносчиками, где серотипы включают 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение также относится к пневмококковой конъюгатной вакцинной композиции, содержащей капсульный полисахарид серотипов *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с одним или более белками-переносчиками, где серотипы включают 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В, и белок-переносчик выбран из CRM₁₉₇, или комбинации CRM₁₉₇ и PsaA, или комбинации CRM₁₉₇ и столбнячного токсоида, или комбинации PsaA и столбнячного токсоида, или комбинации CRM₁₉₇, PsaA и столбнячного токсоида, или комбинации CRM₁₉₇, PsaA, белка D, дифтерийного токсоида и столбнячного токсоида.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к пневмококковой конъюгатной вакцинной композиции, содержащей капсульный полисахарид серотипов *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с белком-переносчиком, где серотипы включают 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В, и белок-переносчик представляет собой CRM₁₉₇.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к пневмококковой конъюгатной вакцинной композиции, содержащей капсульный полисахарид серотипов *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с белком-переносчиком, где серотипы включают 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В, и белок-переносчик представляет собой PsaA.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к пневмококковой конъюгатной вакцинной композиции, содержащей капсульный полисахарид серотипов *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с одним или более белками-переносчиками, где серотипы включают 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В, и белок-переносчик представляет собой CRM₁₉₇, PsaA или их комбинацию.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к пневмококковой конъюгатной вакцинной композиции, содержащей капсульный полисахарид серотипов *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с одним или более белками-переносчиками, где серотипы включают 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В, и белок-переносчик представляет собой CRM₁₉₇, PsaA, столбнячный токсид или их комбинацию.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Хроматограмма SEC-ВЭЖХ, иллюстрирующая кинетику реакции конъюгации (А) серотипа 3 и (В) серотипа 6В с PsaA.

Фиг. 2. Хроматограмма SEC-ВЭЖХ, иллюстрирующая кинетику реакции конъюгации (А) серотипа 6А-CRM₁₉₇ и (В) серотипа 6А с PsaA.

Фиг. 3. Хроматограмма SEC-ВЭЖХ, иллюстрирующая кинетику реакции конъюгации (А) серотипа 8-CRM₁₉₇ и (В) серотипа 8-PsaA.

Фиг. 4. Хроматограмма SEC-BЭЖХ, иллюстрирующая кинетику реакции конъюгации (А) серотипа 10А-CRM₁₉₇ и (В) серотипа 10А-PsaA.

Фиг. 5. Хроматограмма SEC-BЭЖХ, иллюстрирующая кинетику реакции конъюгации (А) серотипа 11А-CRM₁₉₇ и (В) серотипа 11А-PsaA.

Фиг. 6. Хроматограмма SEC-BЭЖХ, иллюстрирующая кинетику реакции конъюгации (А) серотипа 12F-CRM₁₉₇ и (В) серотипа 12F-PsaA.

Фиг. 7. Хроматограмма SEC-BЭЖХ, иллюстрирующая кинетику реакции конъюгации (А) серотипа 15А-CRM₁₉₇ и (В) серотипа 15А-PsaA.

Фиг. 8. Хроматограмма SEC-BЭЖХ, иллюстрирующая кинетику реакции конъюгации (А) серотипа 23А-CRM₁₉₇ и (В) серотипа 23А-PsaA.

Фиг. 9. Хроматограмма SEC-BЭЖХ, иллюстрирующая кинетику реакции конъюгации (А) серотипа 23В-CRM₁₉₇ и (b) серотипа 23В-PsaA.

Фиг. 10. Хроматограмма SEC-BЭЖХ, иллюстрирующая кинетику реакции конъюгации (А) серотипа 24F-CRM₁₉₇ и (b) серотипа 24F-PsaA.

Фиг. 11. Хроматограмма SEC-BЭЖХ, иллюстрирующая кинетику реакции конъюгации (А) серотипа 35В-CRM₁₉₇ и (В) серотипа 35В-PsaA.

Фиг. 12А. Сывороточные титры антител у кроликов, иммунизированных составом I.

Фиг. 12В. Сывороточные титры антител у кроликов, иммунизированных составом II.

Определения

В настоящем описании термины в форме единственного числа включают упоминаемые объекты в множественном числе, если контекст явно не указывает на иное. Аналогично, если только слово "или" явно не ограничивается значением только одного из положений, исключая другие положения, когда приводится перечень из двух или более положений, тогда использование "или" в таком перечне следует интерпретировать как включающее (а) любое отдельное положение в перечне, (b) все из положений в перечне, или (с) любую комбинацию положений в перечне. Кроме того, термины "содержащий" и т.п. используют в настоящем описании в значении, включающем по меньшей мере указываемый признак(и), так что любое большее количество того же признака(ов) и/или один или более дополнительных типов признаков не исключены. Указание в настоящем описании на "один вариант осуществления", "вариант осуществления" или сходные формулировки означает, что конкретный признак композиции, композиция, способ или характеристика, описанная согласно варианту осуществления, могут быть включены по меньшей мере в один вариант осуществления настоящей технологии. Таким образом, присутствие таких выражений или формулировок в настоящем описании не обязательно во всех случаях относится к одному и тому же варианту осуществления. Более того, различные конкретные признаки, композиции, способы или характеристики можно комбинировать любым подходящим образом в одном или нескольких вариантах осуществления.

Подразумевается, что настоящее изобретение не является исчерпывающим или ограничивает настоящую технологию конкретными формами, описанными в настоящем описании. Хотя конкретные варианты осуществления описаны в настоящем описании для иллюстративных целей, возможны различные эквивалентные модификации без отклонения от настоящей технологии, как будет понятно специалисту в данной области. В некоторых случаях хорошо известные структуры и функции не показаны и/или не описаны подробно во избежание чрезмерного усложнения описания вариантов осуществления настоящей технологии. Хотя стадии способов могут быть предоставлены в настоящем описании в конкретном порядке, в альтернативных вариантах осуществления стадии могут иметь другой подходящий порядок. Аналогично, определенные варианты осуществления настоящей технологии, описанной в контексте конкретных вариантов осуществления, могут быть скомбинированы или удалены в других вариантах осуществления. Более того, хотя преимущества, ассоциированные с определенными вариантами осуществления, могут быть описаны в контексте этих вариантов осуществления, другие варианты осуществления также могут иметь такие преимущества, и не все варианты осуществления должны обязательно иметь такие преимущества или другие преимущества, описанные в настоящем описании, чтобы входить в объем настоящей технологии. Таким образом, настоящее изобретение и ассоциированная с ним технология могут охватывать другие варианты осуществления, явно не представленные и/или не описанные в настоящем описании.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, обладают тем же значением, которое обычно подразумевает специалист в области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя любые иммуногенные композиции, вакцинные композиции или способы, сходные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем описании, также можно использовать при применении на практике или тестировании вариантов осуществления настоящего изобретения, репрезентативные иллюстративные способы и композиции описаны в настоящем описании.

Когда предусматривается диапазон величин, понятно, что каждая величина между верхним и нижним пределом этого диапазона и любая другая указанная или промежуточная величина этого диапазона охватывается способами и композициями. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов может быть независимо включен в меньшие диапазоны, и также охватывается способами и

композициями, за исключением какого-либо конкретного исключенного предела в указанном диапазоне. Когда указанный диапазон включает один или оба из пределов, диапазоны, исключающие любой или оба из этих включенных пределов, также включены в способы, композиции и комбинации.

В рамках изобретения, термин "капсульный полисахарид" относится к слою полисахарида, находящемуся снаружи, но смежному с клеточной стенкой *Streptococcus pneumoniae* серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B.

Термин "имеющий измененный размер" или "изменение размера", в рамках изобретения, относится к уменьшению размера нативного полисахарида различными способами. Способы могут включать механические способы, такие как гомогенизация. Уменьшение размера нативного полисахарида или "изменение размера" обеспечивает различные преимущества, которые включают: (1) обеспечение более высокой иммуногенности по сравнению с нативными полисахаридами (2) изменение соотношения полисахарида и белка в конъюгате (3) полисахариды с измененным размером могут обеспечивать более высокую стабильность композиции.

Термин "молекулярная масса", или "молекулярный размер", или "средний молекулярный размер", или "средняя молекулярная масса" полисахарида, в рамках изобретения, относится к средневзвешенной молекулярной массе (M_w) полисахарида, измеренной посредством MALLS (многоугловое рассеяние лазерного света).

В рамках изобретения термины "иммуногенная композиция" и "вакцинная композиция" используют взаимозаменяемо.

В рамках изобретения термин "белок-переносчик" относится к любому белку или его фрагменту, с которым связаны, или к которому присоединены, или с которым конъюгированы гаптены (слабые антигены), как правило, для усиления или облегчения обнаружения антигена иммунной системой. Примеры белков-переносчиков включают, но не ограничиваются ими, CRM₁₉₇, PsaA, столбнячный токсин и их фрагменты.

Термин "конъюгат" или "конъюгированный", в рамках изобретения, используют для указания на то, что капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* ковалентно связан с белком-переносчиком.

В рамках изобретения термин "адъювант" относится к неантигенному компоненту вакцины, который усиливает иммунный ответ на антигены вакцины посредством облегчения контакта между антигеном и иммунной системы путем влияния на тип и качество иммунного ответа, индуцируемого против антигена. Адъювант вызывает длительный иммунный ответ против антигена, и также может служить для снижения токсичности определенных антигенов или обеспечивать растворимость определенных антигенов.

В рамках изобретения термин "фармацевтически приемлемый носитель(и)" относится к одному или более необязательным компонентам, которые могут быть добавлены в вакцинный состав для введения антигенов и/или вирусов, который сам по себе не индуцирует продуцирование антител, вредоносных для индивидуума, которому вводят композицию, и которые могут быть введены без чрезмерной токсичности. Подходящими носителями могут быть крупные медленно метаболизирующиеся макромолекулы, такие как белки, полисахариды, полимолочные кислоты, полиглицолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и неактивные вирусные частицы. Термин включает один или более эксципиентов, стабилизаторов, разбавителей, буферов или поверхностно-активных веществ, эксципиентов для лиофилизации или их комбинацию. Под фармацевтически приемлемым или фармакологически приемлемым подразумевают материал, который является нежелательным с биологической или иной точки зрения, т.е. материал может быть введен индивидууму в составе или композиции без возникновения каких-либо нежелательных биологических эффектов или неблагоприятного взаимодействия с любым из компонентов композиции, в которой он содержится.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к 24-валентной вакцинной композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, содержащей полисахарида из 24 различных серотипов *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированные с одним или более белками-переносчиками.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение также относится к пневмококковой конъюгатной вакцинной композиции, содержащей капсульный полисахарид из 24 различных серотипов *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с белком-переносчиком, где серотипы включают 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, где белок-переносчик выбран из CRM₁₉₇, или комбинации CRM₁₉₇ и PsaA, или комбинации CRM₁₉₇ и столбнячного токсина, или комбинации PsaA и столбнячного токсина, или комбинации CRM₁₉₇, PsaA и столбнячного токсина.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к 24-валентной вакцинной композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, где серотип *Streptococcus pneumoniae* выбран из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, причем по меньшей мере тринадцать серотипов конъюгированы с CRM₁₉₇, а остальные серотипы конъюгированы с PsaA.

В предпочтительном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к 24-валентной вакцинной композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, содержащей капсульный полисахарид серотипов *Streptococcus pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, где капсульный полисахарид серотипов 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгирован с белком-переносчиком CRM₁₉₇ и капсульный полисахарид серотипов 3, 6A, 8, 10A, 11A, 12F, 15A, 23A, 23B, 24F и 35B конъюгирован с PsaA.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к 24-валентной вакцинной композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, содержащей капсульный полисахарид из различных серотипов *Streptococcus pneumoniae*, выбранных из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, конъюгированный с белком-переносчиком CRM₁₉₇.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к 24-валентной вакцинной композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, содержащего капсульный полисахарид из различных серотипов *Streptococcus pneumoniae*, выбранных из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, конъюгированный с белком-переносчиком PsaA.

В предпочтительном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к 24-валентной вакцинной композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, содержащей капсульный полисахарид серотипов *Streptococcus pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, где капсульный полисахарид серотипов 3, 6A, 8, 10A, 11A, 12F, 15A, 23A, 23B, 24F и 35B конъюгирован с PsaA и капсульный полисахарид серотипов 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгирован с комбинацией CRM₁₉₇ и столбнячного токсоида.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к пневмококковой вакцинной композиции, содержащей пневмококковые полисахариды, где один или более из пневмококковых полисахаридов представляют собой нативные пневмококковые полисахариды.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к пневмококковой вакцинной композиции, содержащей пневмококковые полисахариды, где один или более из пневмококковых полисахаридов являются фрагментированными, причем каждый фрагментированный пневмококковый полисахарид имеет среднюю молекулярную массу, меньшую чем молекулярная масса нативного пневмококкового полисахарида, и может находиться в диапазоне от 50 до 1000 кДа.

В другом варианте осуществления, изобретение относится к выделенным и очищенным капсульным полисахаридам из серотипов *Streptococcus pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, где каждый полисахарид имеет молекулярную массу приблизительно от 50 до 1000 кДа, предпочтительно, имеет средний размер (Mw) 100-1000, 200-800, 250-600, или 300-400, 70-150, или 75-125 кДа.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к вакцинным композициям на основе конъюгатов пневмококковый полисахарид-белок из 24 различных серотипов *Streptococcus pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, конъюгированных с белком-переносчиком, выбранным из CRM₁₉₇ или комбинации CRM₁₉₇ и PsaA, или комбинации CRM₁₉₇ и столбнячного токсоида, или комбинации PsaA и столбнячного токсоида, или комбинации CRM₁₉₇, PsaA и столбнячного токсоида, где конъюгаты полисахарид-белок имеют молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 500 кДа до приблизительно 5000 кДа; от 1000 кДа до приблизительно 10000 кДа; от приблизительно 1500 кДа до приблизительно 15000 кДа; от приблизительно 2000 кДа до приблизительно 20000 кДа; от приблизительно 2500 кДа до приблизительно 25000 кДа; или от приблизительно 3000 кДа до приблизительно 30000 кДа.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к 24-валентной вакцинной композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок содержащей приблизительно от 2,2 до 2,4 мкг каждого из капсульных полисахаридов серотипов *Streptococcus pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B и приблизительно 4,4 мкг 6B, где каждый из капсульных полисахаридов серотипов 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгирован приблизительно с 30-35 мкг белка-переносчика CRM₁₉₇ и каждый капсульный полисахарид серотипов 3, 6A, 8, 10A, 11A, 12F, 15A, 23A, 23B, 24F и 35B конъюгирован приблизительно с 20-30 мкг PsaA.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к 24-валентной вакцинной композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, содержащей приблизительно от 2,2 до 2,4 мкг каждого из капсульных полисахаридов серотипов *Streptococcus pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, и приблизительно 4,4 мкг 6B, где каждый из капсульных полисахаридов конъюгирован приблизительно с 40-80 мкг PsaA.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к 24-валентной вакцинной композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, содержащей приблизительно от 2,2 до 2,4 мкг каждого из капсульных полисахаридов серотипов *Streptococcus pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B и приблизительно 4,4 мкг 6B, где каждый из капсульных полисахаридов конъюгирован приблизительно с 40-80 мкг CRM₁₉₇.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к выделенному полисахариду *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15A, имеющему среднюю молекулярную массу от 50 до 1000 кДа и содержание глицерина в диапазоне 5-18%.

Присутствие глицеринфосфатных боковых цепей можно определять посредством количественного определения глицерина с использованием высокоэффективной анионообменной хроматографии с импульсной амперометрической детекцией (HPAEC-PAD) после его высвобождения посредством обработки полисахарида хлористоводородной кислотой (HF).

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к выделенному капсульному полисахариду *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35B, имеющему среднюю молекулярную массу от 50 до 1000 кДа и содержание ацетата в диапазоне 2-10%, предпочтительно 2-8%.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к пневмококковой конъюгатной вакцинной композиции, содержащей пневмококковые полисахариды, где каждый из пневмококковых полисахаридов активируют тетрафторборатом 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP) с образованием цианатного сложного эфира перед конъюгацией с белком-переносчиком.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к пневмококковой конъюгатной вакцинной композиции, содержащей пневмококковый полисахариды, где один или более из пневмококковых полисахаридов прямо связаны с аминокислотной группой белка-переносчика или связаны с аминокислотной группой посредством спейсера.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к пневмококковой конъюгатной вакцинной композиции, содержащей пневмококковые полисахариды, где спейсер представляет собой цистамин, цистеамин, гександиамин, адипиновую кислоту дигидразид (ADH), ED AC или EDC.

Белок-переносчик PsaA в соответствии с настоящим изобретением представляет собой модифицированный PsaA и не включает гидрофобный N-концевой лидерный пептид дикого типа.

Настоящее изобретение относится к пневмококковой конъюгатной вакцинной композиции, содержащей пневмококковые полисахариды одного или нескольких серотипов и белок-переносчик, где белок-переносчик PsaA содержит 290 аминокислот.

Пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция, содержащая серотипы капсульного пневмококкового полисахарида, каждый из которых индивидуально конъюгирован с белком-переносчиком, называется в настоящем описании конъюгатами полисахарид-белок и/или конъюгатами. Когда она включена в пневмококковую вакцинную композицию, описанную в настоящем описании, она представляет собой мультивалентную вакцину на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок (также называемую в настоящем описании мультивалентной конъюгатной вакциной, конъюгатной вакциной, и/или вакциной на основе конъюгата полисахарид-белок). В дополнение к мультивалентной конъюгатной вакцине, настоящее изобретение относится процессу получения и/или введения ее индивидууму, нуждающемуся в этом.

Белки-переносчики представляют собой нетоксичные и нереактогенные белки, которые могут быть получены в достаточном количестве и с достаточной чистотой. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к пневмококковой конъюгатной вакцинной композиции, содержащей один или более белков-переносчиков, конъюгированных с одним или более полисахаридами *Streptococcus pneumoniae* (также называемыми в настоящем описании "пневмококковыми полисахаридами"). Посредством конъюгации пневмококкового полисахарида с белком-переносчиком пневмококковый полисахарид имеет увеличенную иммуногенность относительно неконъюгированного пневмококкового полисахарида.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения используется комбинация белков-переносчиков, которая включает два или более белков-переносчиков, таких как PsaA, CRM₁₉₇, белок D, дифтерийный токсин и столбнячный токсин (TT).

В другом варианте осуществления композиции конъюгата пневмококковый полисахарид-белок по настоящему изобретению дополнительно содержат одно или несколько из следующих: фармацевтически приемлемый носитель, фармацевтически приемлемый разбавитель, буфер, консервант, стабилизатор, адъювант, поверхностно-активные вещества, растворители и/или эксципиенты для лиофилизации. Подходящие буферы включают, но не ограничиваясь ими, Tris(триметамин), фосфат, ацетат, борат, цитрат, глицин, гистидин и сукцинат и т.п. Подходящие поверхностно-активные вещества включают, но не ограничиваясь ими, полисорбат-20, полисорбат-40, полисорбат-60 (Tween 60), полисорбат-80 (Tween 80), сополимеры оксида этилена (EO), оксида пропилена (PO) и/или оксида бутилена (BO), полксамер 124, полксамер 188, полксамер 237, полксамер 338 и полксамер 407, октоксидины, сорбитана

триолеат (Span 85) и сорбитана монолаурат и т.п. в концентрации от приблизительно 0,001% до приблизительно 2%.

Композицию по настоящему изобретению составляют в забуференном солевом растворе, имеющем рН в диапазоне от 5,0 до 8,0.

В некоторых вариантах осуществления пневмококковые полисахариды могут быть экстрагированы из одного или нескольких микроорганизмов (например, *Streptococcus pneumoniae*) в соответствии с общепринятыми способами. Например, пневмококковые полисахариды можно получать в соответствии с известными методиками. Более того, очистку пневмококковых полисахаридов можно проводить по методике, описанной в публикации РСТ WO 2016/174683 А1.

Экстрагированные пневмококковые полисахариды можно очищать общепринятыми способами и можно использовать в их нативной форме. В других вариантах осуществления экстрагированные и очищенные пневмококковые полисахариды могут быть фрагментированы для получения одной или нескольких частей пневмококкового полисахарида, причем каждая часть пневмококкового полисахарида имеет среднюю молекулярную массу, меньшую чем у экстрагированных и очищенных пневмококковых полисахаридов.

В других вариантах осуществления экстрагированные и очищенные пневмококковые полисахариды могут быть активированы перед конъюгацией с одним или более белками-переносчиками. Например, экстрагированные и очищенные пневмококковые полисахариды могут быть активированы (например, химически) перед конъюгацией с одним или более белками-переносчиками. Каждый активированный пневмококковый полисахарид может быть индивидуально конъюгирован с белком-переносчиком, образуя конъюгат полисахарид-белок (например, гликоконъюгат). В других вариантах осуществления один или более активированных пневмококковых полисахаридов могут быть конъюгированы с одним белком-переносчиком. Конъюгаты можно получать известными способами.

В некоторых вариантах осуществления пневмококковые полисахариды могут быть химически активированы, а затем конъюгированы с белками-переносчиками в соответствии с известными способами, такими как способы, описанные в патентах США № 4365170, 4673574 и 4902506. Например, пневмококковые полисахариды могут быть активированы посредством окисления концевой гидроксильной группы до альдегида с использованием окислителя, такого как перйодат (например, перйодат натрия, перйодат калия или перйодная кислота), посредством случайного окислительного отщепления одной или нескольких соседних гидроксильных групп углеводов и образования одной или нескольких реактивных альдегидных групп.

Пневмококковые полисахариды также могут быть активированы посредством СДАР (тетрафторборат 1-циано-4-диметиламинопиридиния), а затем конъюгированы с одним или более белками-переносчиками, такими как PsaA, CRM₁₉₇, PspA или их комбинация. В других вариантах осуществления пневмококковые полисахариды, активированные посредством СДАР для образования цианатного сложного эфира, могут быть прямо конъюгированы с одним или более белками-переносчиками или конъюгированы с использованием спейсера (например, линкера). Спейсер может быть связан с аминокислотной группой белка-переносчика. В некоторых вариантах осуществления спейсер может представлять собой цистамин или цистеамин, которые образуют тиолированный полисахарид, который может быть связан с белком-переносчиком через простую тиозфирную связь, соединяющую с активированным малеинимидом белком-переносчиком (например, с использованием GMBS) или галоацетилованным белком-переносчиком (например, с использованием йодацетимида, этилйодацетимида HCl, SIAB, SIA, SBAP и/или N-сукцинимидилбромацетата). В других вариантах осуществления цианатный сложный эфир связан с использованием гександиамина или дигидразида адипиновой кислоты (ADH), и аминокислотный сахарид конъюгирован с белком-переносчиком с использованием карбодиимидной (например, EDAC или EDC) химии через карбоксильную группу на белке-переносчике. Такие конъюгаты описаны в публикации РСТ № WO 93/15760, публикации РСТ № WO 95/08348, публикации РСТ № WO 96/29094, и Chu et al., 1983, *Infect. Immunity* 40:245-256.

Другие подходящие способы активации и/или присоединения для применения с конъюгатами полисахарид-белок и вакцинными композициями по настоящему изобретению включают использование карбодиимидов, гидразидов, активных сложных эфиров, норборнана, п-нитробензойной кислоты, N-гидроксисукцинимиды, S-NHS, EDC, TSTU и других способов, описанных в публикации РСТ № WO 98/42721. Например, конъюгация может вовлекать карбонильный линкер, который может быть образован посредством реакции свободной гидроксильной группы сахара с CDI (См. Bethell et al., 1979, *J. Biol. Chem.* 254:2572-4; Hearn et al., 1981, *J. Chromatogr.* 218:509-18) с последующим связыванием с белком с образованием карбаматной связи. В некоторых вариантах осуществления аномерный конец может быть восстановлен до первичной гидроксильной группы, необязательно подвергнут внесению/удалению защитной группы из первичной гидроксильной группы, реакции первичной гидроксильной группы с CDI с образованием карбаматного промежуточного соединения CDI и присоединению карбаматного промежуточного соединения CDI к аминокислоте на белке.

Например, другие подходящие способы активации и/или присоединения для применения с конъюгатами полисахарид-белок и вакцинными композициями по настоящему изобретению включают следующий способ: подвергнутые изменению размера пневмококковые полисахариды (например, приблизительно 6 мкг подвергнутого изменению размера полисахарида в концентрации приблизительно 10 мг/мл) и СДАР (например, приблизительно 100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) можно смешивать в стеклянном флаконе в соотношении приблизительно 1 к 1 (например, посредством перемешивания в течение приблизительно 1 минуты). рН раствора полисахарида при необходимости можно корректировать (например, приблизительно 9,25 посредством приблизительно 0,2 М триэтиламина и перемешивая в течение 3 мин при комнатной температуре). Кроме того, PsaA (например, приблизительно 4 мкг раствора, имеющего концентрацию приблизительно 15 мг/мл) можно медленно добавлять к активированным пневмококковым полисахаридам (например, в соотношении приблизительно 1 к 1 (Ps:белок-переносчик)). рН реакционной смеси можно корректировать (например, до приблизительно 9,05 с использованием 0,2 М триметиламина) и реакцию можно продолжать (например, посредством перемешивания в течение 5 ч при комнатной температуре). Реакционную смесь можно гасить (например, добавлением избыточной концентрации глицина).

В некоторых вариантах осуществления реакционную смесь можно подвергать диафильтрации с использованием мембраны (например, мембраны из MWCO 100 К), и ее можно очищать эксклюзионной хроматографией. Подвергнутые диафильтрации и очищенные фракции можно анализировать с использованием SEC-MALLS и способа с антроном. Проанализированные фракции, содержащие конъюгаты, можно объединять и подвергать стерильной фильтрации (например, с использованием 0,2-мкм фильтров).

После конъюгации пневмококковых полисахаридов с одним или более белками-переносчиками, конъюгаты полисахарид-белок можно очищать (например, обогащать в отношении количества конъюгата полисахарид-белок) различными способами. Эти способы включают, но не ограничиваются ими процедуры концентрирования/диафильтрации, преципитацию/элюирование, колоночную хроматографию и глубинную фильтрацию. Например, после очистки конъюгатов конъюгаты можно объединять для составления композиций конъюгата пневмококковый полисахарид-белок по настоящему изобретению, которые могут использоваться в качестве вакцин.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата полисахарид-белок пневмококковой вакцинной композиции, описанной в настоящем описании, где способ дополнительно включает составление конъюгата полисахарид-белок в пневмококковую вакцинную композицию, включающую адъювант, эксципиент и буфер.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата полисахарид-белок пневмококковой вакцинной композиции, описанной в настоящем описании, где адъювантом является фосфат алюминия.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу предупреждения или лечения у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему введение пневмококковой вакцинной композиции, описанной в настоящем описании, индивидууму, нуждающемуся в этом.

В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет заболевание, опосредуемое *Streptococcus pneumoniae*, такое как инвазивное пневмококковое заболевание (IPD).

В одном варианте осуществления индивидуумом является человек, такой как младенец (в возрасте менее 1 года), ребенок ясельного возраста (от приблизительно 12 месяцев до приблизительно 24 месяцев), ребенок младшего возраста (от приблизительно 2 лет до приблизительно 5 лет), ребенок старшего возраста (от приблизительно 5 лет до приблизительно 13 лет), подросток (от приблизительно 13 лет до приблизительно 18 лет), взрослый (от приблизительно 18 лет до приблизительно 65 лет) или пожилой (более чем приблизительно 65 лет).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу индукции иммунного ответа, включающему введение иммунологически эффективного количества пневмококковой конъюгатной вакцинной композиции, описанной в настоящем описании, индивидууму.

В одном варианте осуществления способ индукции иммунного ответа включает введение пневмококковой конъюгатной вакцинной композиции, описанной в настоящем описании, индивидууму системно, подкожно и/или мукозальным путем.

В некоторых вариантах осуществления количество каждого конъюгата в дозе вакцины композиции по настоящему изобретению представляет собой количество, достаточное для индукции иммунопротективного ответа, такого как иммунопротективный ответ без значительных неблагоприятных эффектов. В то время как количество каждого конъюгата может варьироваться в зависимости от серотипа пневмококка, каждая доза вакцинных композиций может содержать от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 50 мкг каждого пневмококкового полисахарида, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 10 мкг, или от приблизительно 1 мкг до приблизительно 5 мкг каждого пневмококкового полисахарида, конъюгированного с каждым белком-переносчиком в количестве, составляющем от приблизительно 1,5 мкг до приблизительно 5 мкг белка-переносчика.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к пневмококковой конъюгатной вакцинной композиции, содержащей пневмококковый полисахариды и белки-переносчики, причем пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция имеет процентное соотношение белка и полисахарида (белок/PS) от приблизительно 0,3 до приблизительно 2,0 белка/PS, предпочтительно, от 0,5 до 1,5.

В некоторых вариантах осуществления очищенные полисахариды до конъюгации имеют молекулярную массу от 10 кДа до 2000 кДа. В других таких вариантах осуществления полисахарид имеет молекулярную массу от 50 кДа до 2000 кДа; от 50 кДа до 2000 кДа; от 50 кДа до 1750 кДа; от 50 кДа до 1500 кДа; от 50 кДа до 1250 кДа; от 50 кДа до 1000 кДа; от 50 кДа до 750 кДа; от 50 кДа до 500 кДа; от 100 кДа до 2000 кДа; от 100 кДа до 2000 кДа; от 100 кДа до 1750 кДа; от 100 кДа до 1500 кДа; от 100 кДа до 1250 кДа; от 100 кДа до 1000 кДа; от 100 кДа до 750 кДа; от 100 кДа до 500 кДа.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к вакцинным композициям на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, содержащим один или более конъюгатов полисахарид-белок, имеющих молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1000 кДа до приблизительно 10000 кДа, от приблизительно 1500 кДа до приблизительно 15000 кДа, от приблизительно 2000 кДа до приблизительно 20000 кДа, от приблизительно 2500 кДа до приблизительно 25000 кДа, или от приблизительно 3000 кДа до приблизительно 30000 кДа.

Вакцинные композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок по настоящему изобретению могут быть произведены с использованием известных способов. Например, вакцинные композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок могут быть составлены с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем, например водой или солевым раствором. Кроме того, вакцинные композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок могут дополнительно включать одно или несколько из следующих: буфер, консервант или стабилизатор, полисорбат, адъювант, такой как соединение алюминия, например, гидроксид алюминия, фосфат алюминия или гидроксифосфат алюминия и/или эксципиент лиофилизации. Включение любого из описанных выше соединений в вакцинные композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок по настоящему изобретению может быть выбрано в зависимости от способа и пути введения индивидууму, нуждающемуся в этом, и, кроме того, оно может быть основано на стандартной фармацевтической практике.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится 24-валентной иммуногенной композиции, содержащей пневмококковые капсульные полисахариды серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8,9V, 10A, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 11A, 12F, 15A, 22F, 23A, 23B, 24F, 33F и 35B, каждый из которых индивидуально конъюгирован с CRM₁₉₇, где композиция имеет pH от 4 до 7 и содержит: приблизительно 4,4 мкг/0,5 мл 6B; приблизительно от 2,2 до 4 мкг/0,5 мл всех других полисахаридов; приблизительно от 40 до 80 мкг/0,5 мл CRM₁₉₇; от 0,2 до 2 мг/0,5 мл фосфата алюминия; приблизительно от 1 до 10 мМ сукцинатный буфер; приблизительно 0,5-25% хлорид натрия; от 0,002 до 0,2% полисорбата 80; и 4 мг/мл и 10 мг/0,5 мл 2-феноксизанола.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к 24-валентной иммуногенной композиции, содержащей пневмококковые капсульные полисахариды серотипов 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, конъюгированные с белком-переносчиком CRM₁₉₇ и капсульным полисахаридом серотипов 3, 6A, 8, 10A, 11A, 12F, 15A, 23A, 23B, 24F и 35B, конъюгированным с PsaA, где композиция имеет pH от 4 до 7 и содержит: приблизительно 4,4 мкг/0,5 мл 6B; приблизительно от 2,2 до 4 мкг/0,5 мл всех других полисахаридов; от 20 до 40 мкг/0,5 мл CRM₁₉₇; от 20 до 40 мкг/0,5 мл PsaA; от 0,2 до 2 мг/0,5 мл фосфата алюминия; приблизительно 1-10 мМ натриевый буфер; приблизительно 0,5-25% хлорид натрия; 0,002-0,2% полисорбат 80; и 4 мг/мл и 10 мг/0,5 мл 2-феноксизанола.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к 24-валентной иммуногенной композиции, содержащей пневмококковые капсульные полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8,9V, 10A, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 11A, 12F, 15A, 22F, 23A, 23B, 24F, 33F и 35B, каждый из которых индивидуально конъюгирован с PsaA, где композиция имеет pH от 4 до 7 и содержит: приблизительно 4,4 мкг/0,5 мл 6B; приблизительно 2,2-4 мкг/0,5 мл всех других полисахаридов; от 40 до 80 мкг/0,5 мл PsaA; от 0,2 до 2 мг/0,5 мл фосфата алюминия; приблизительно 1-10 мМ сукцинатный буфер; приблизительно 0,5-25% хлорид натрия; 0,002-0,2% полисорбат 80; и 4 мг/мл и 10 мг/0,5 мл 2-феноксизанола.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения 24-валентной композиции конъюгатов пневмококковый полисахарид-белок, содержащей пневмококковые полисахариды, выбранные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8,9V, 10A, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 11A, 12F, 15A, 22F, 23A, 23B, 24F, 33F и 35B, где белок-переносчик представляет собой CRM₁₉₇. Способ получения 24-валентной композиции конъюгатов пневмококковый полисахарид-белок включает стадии:

(a) конъюгации по отдельности каждого из двадцати четырех активированных пневмококковых полисахаридов с белком-переносчиком CRM₁₉₇,

(b) диафильтрации и очистки конъюгатов с использованием эксклюзионной хроматографии,

(с) анализа очищенных фракций с использованием SEC-MALLS, объединения фракций, содержащих каждый из двадцати четырех конъюгатов, и стерилизации фильтрованием одновалентных фракций конъюгатов, и

(d) составления 24 конъюгатов, полученных на стадии (с), адьюванта, одного или нескольких эксципиентов и буфера с получением 24-валентной композиции конъюгатов пневмококковый полисахарид-белок.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способу получения двадцати-четырёх-валентной композиции конъюгатов пневмококковый полисахарид-белок, содержащей пневмококковые полисахариды, выбранные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В, где капсульный полисахарид серотипов 3, 6А, 8, 10А, 11А, 12F, 15А, 23А, 23В, 24F и 35В конъюгирован с PsaA и капсульный полисахарид серотипов 1, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгирован с CRM₁₉₇. Способ получения 24-валентной композиции конъюгатов пневмококковый полисахарид-белок включает стадии:

(a) конъюгации по отдельности полисахарида серотипов 3, 6А, 8, 10А, 11А, 12F, 15А, 23А, 23В, 24F и 35В с PsaA и капсульным полисахаридом серотипов 1, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F с CRM₁₉₇,

(b) диафильтрации и очистки конъюгатов с использованием эксклюзионной хроматографии,

(с) анализа очищенных фракций с использованием SEC-MALLS, объединения фракций, содержащих каждый из двадцати четырех конъюгатов, и стерилизации фильтрованием одновалентных фракций конъюгатов, и

(d) составления двадцати четырех конъюгатов, полученных на стадии (с), адьюванта, одного или нескольких эксципиентов и буфера с получением двадцати-четырёх-валентной композиции конъюгатов пневмококковый полисахарид-белок.

В некоторых вариантах осуществления двадцати-четырёх-валентная композиция конъюгатов пневмококковый полисахарид-белок может быть фильтрованной (например, в асептических условиях).

В одном варианте осуществления пневмококковые полисахариды активируют с использованием CDAP. В другом варианте осуществления используемым адьювантом является фосфат алюминия.

Каждый конъюгат 24-валентной композиции может быть адсорбирован по отдельности или вместе в качестве смеси на соль алюминия, такую как гидроксид алюминия, фосфат алюминия и т.п., или смесь гидроксида алюминия и фосфата алюминия. Адсорбент можно получать *in situ* или можно добавлять в ходе процесса производства. Получение 24-валентного конъюгата можно проводить добавлением каждого конъюгата в емкость или контейнер последовательно, или получением отдельного раствора, содержащего конъюгаты CRM₁₉₇ (часть 1) и конъюгаты PsaA (часть 2) и добавлением либо части 1 к части 2, либо наоборот.

Композиции по настоящему изобретению можно составлять в виде единичной дозы, например, флакона с единичной дозой, в виде многократной дозы, например, флакона с множеством доз, или предварительно заполненного шприца. Композиции по настоящему изобретению могут далее содержать один или более консервант(ов), выбранный из тиомерсала, 2-феноксиэтанола и т.п. в количестве, которое может находиться в диапазоне от приблизительно 4 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к иммуногенной композиции (например, вакцине), такой как композиция конъюгатов пневмококковый полисахарид-белок, вводимой в качестве однократной дозы приблизительно 0,5 мл, составленной так, чтобы она содержала по меньшей мере следующее: приблизительно 2,2-4,4 мкг пневмококкового полисахарида двух или более серотипов, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 10 мкг PsaA на серотип, от приблизительно 2 мкг до приблизительно 5 мкг CRM₁₉₇ для каждого серотипа, от приблизительно 0,2 мг до приблизительно 1 мг адьюванта (например, фосфата алюминия), и один или более эксципиентов (например, хлорид натрия и/или буфер).

Композиции по настоящему изобретению можно вводить индивидууму, нуждающемуся в этом, посредством любого из ряда общепринятых путей в области вакцин. Например, композиции по настоящему изобретению можно вводить системным путем, например, парентерально (например, подкожно, внутримышечно, внутрикожно и/или внутривенно) или мукозальным путем (например, перорально и/или назально).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к способам индукции иммунного ответа у индивидуума, нуждающегося в этом, на один или более капсульных полисахаридов *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированных с одним или более белками-переносчиками. Способы индукции иммунного ответа включают введение иммунологически эффективного количества композиций, описанных в настоящем описании, индивидууму, нуждающемуся в этом.

В соответствии со способами по настоящему изобретению индивидуумом, которому вводят композиции, описанные в настоящем описании, является человек, такой как младенец (в возрасте менее 1 года), ребенок ясельного возраста (от приблизительно 12 месяцев до приблизительно 24 месяцев), ребенок младшего возраста (от приблизительно 2 лет до приблизительно 5 лет), ребенок старшего возраста (от приблизительно 5 лет до приблизительно 13 лет), подросток (от приблизительно 13 лет до

приблизительно 18 лет), взрослый (от приблизительно 18 лет до приблизительно 65 лет) или пожилой (более чем приблизительно 65 лет).

В рамках изобретения, "эффективное количество" композиций, описанных в настоящем описании, относится к количеству, требуемому для индукции иммунного ответа у индивидуума, которому вводят композицию. Иммунный ответ характеризуется присутствием одного или нескольких антител, специфичных к антигену *Streptococcus pneumoniae*, у хозяина, которые значительно уменьшают вероятность или тяжесть инфекции *Streptococcus pneumoniae* при последующем заражении.

Следующие примеры предоставлены для иллюстрации изобретения, и являются только иллюстративными, и не должны быть истолкованы как ограничивающие объем изобретения.

Пример 1. Получение конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-CRM₁₉₇.

Конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-CRM₁₉₇ для серотипов пневмококка 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F получали по методике, описанной в публикации PCT № WO 2016/207905.

Конъюгаты полисахарида CRM₁₉₇ для серотипов пневмококка 6A, 8, 10A, 11A, 12F, 15A, 23A, 23B, 24F и 35B получали в соответствии с методикой, упомянутой ниже:

а) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 6A с белком CRM₁₉₇ с использованием химии CDAP.

1000 мг (68,5 мл, концентрация 14,6 мг/мл) полисахарида серотипа 6A с механически уменьшенным размером и 5,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:0,5 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 минуты. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 8,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 минуты при комнатной температуре (к.т.). 1000 мг CRM₁₉₇ (66,7 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:1,0 (PnPs:CRM).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 1,0 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 2A) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

б) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 8 с белком CRM₁₉₇ с использованием химии CDAP.

1000 мг (200,0 мл, концентрация 5,0 мг/мл) полисахарида серотипа 8 с механически уменьшенным размером и 4,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:0,4 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 минуты. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 7,7 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 минуты при комнатной температуре (к.т.). 800 мг CRM₁₉₇ (53,33 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:0,8 (PnPs:CRM).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 1,5 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 3A) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

в) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 10A с белком CRM₁₉₇ с использованием химии CDAP.

1000 мг (142,8 мл, концентрация 7,0 мг/мл) полисахарида серотипа 10A с механически уменьшенным размером и 8,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:0,8 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 минуты. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 13,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 минуты при комнатной температуре (к.т.). 900 мг CRM₁₉₇ (60,0 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:0,9 (PnPs:CRM).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 2,5 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 4A) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством

SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

d) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 11A с белком CRM₁₉₇ с использованием химии CDAP.

1000 мг (125,0 мл, концентрация 8,0 мг/мл) полисахарида серотипа 11A с механически уменьшенным размером и 5,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:0,5 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 минуты. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 10,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 минуты при комнатной температуре (к.т.). 1000 мг CPM₁₉₇ (66,7 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:1,0 (PnPs:CRM).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 2,5 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 5A) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

e) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 12F с белком CRM₁₉₇ с использованием химии CDAP.

1000 мг (100,0 мл, концентрация 10,0 мг/мл) полисахарида серотипа 12F с механически уменьшенным размером и 5,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:0,5 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 минуты. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 10,6 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 минуты при комнатной температуре (к.т.). 800 мг CPM₁₉₇ (53,3 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:0,8 (PnPs:CRM).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 1,0 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 6A) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

f) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 15A с белком CRM₁₉₇ с использованием химии CDAP.

1000 мг (66,7 мл, концентрация 10,0 мг/мл) полисахарида серотипа 15A с механически уменьшенным размером и 10,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:1,0 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 минуты. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 18,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 минуты при комнатной температуре (к.т.). 1000 мг CPM₁₉₇ (53,3 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:0,8 (PnPs:CRM).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 1,0 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 7A) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

g) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 23A с белком CRM₁₉₇ с использованием химии CDAP.

1000 мг (83,3 мл, концентрация 15,0 мг/мл) полисахарида серотипа 23A с механически уменьшенным размером и 10,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:1,0 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 минуты. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 14,9 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 минуты при комнатной температуре (к.т.). 800 мг CPM₁₉₇ (53,3 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:0,8 (PnPs:CRM).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 1,7 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 8A) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

h) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 23В с белком CRM₁₉₇ с использованием химии CDAP.

1000 мг (100,0 мл, концентрация 10,0 мг/мл) полисахарида серотипа 23В с механически уменьшенным размером и 2,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:0,2 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 минуты. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 3,5 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 минуты при комнатной температуре (к.т.). 1000 мг СРМ₁₉₇ (66,7 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:1,0 (PnPs:CRM).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 2,2 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 9А) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

i) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 24F с белком CRM₁₉₇ с использованием химии CDAP.

1000 мг (100,0 мл, концентрация 10,0 мг/мл) полисахарида серотипа 24F с механически уменьшенным размером и 5,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:0,5 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 минуты. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 10,6 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 минуты при комнатной температуре (к.т.). 800 мг СРМ₁₉₇ (53,3 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:0,8 (PnPs:CRM).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 1,0 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 10А) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

j) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 35В с белком CRM₁₉₇ с использованием химии CDAP.

1000 мг (100,0 мл, концентрация 10,0 мг/мл) полисахарида серотипа 35В с механически уменьшенным размером и 5,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:0,5 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 минуты. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 5,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 минуты при комнатной температуре (к.т.). 1000 мг СРМ₁₉₇ (66,7 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:1,0 (PnPs:CRM).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 1,6 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 11А) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

Пример 2. Получение конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-PsaA.

А) Получение PsaA:

Ген PsaA амплифицировали посредством ПЦР из *Streptococcus pneumoniae* серотипа 4 без его гидрофобной лидерной пептидной последовательности. Последовательность гена подтверждали и клонировали в *Escherichia coli* с использованием вектора, сконструированного в самостоятельно (pBE66), для более высокой экспрессии.

Исходную культуру в глицерине, кодирующую ген PsaA, возобновляли на 20 мл среды LB, содержащей 1 мл исходной культуры в глицерине, в 150-мл конической колбе. Культуру инкубировали в течение приблизительно 6 ч при 37°C при 200 об/мин до конечной OD_{600 нм} 3,5 OD. Восстановленную культуру переносили в 1 л затравочной культуры в 5-л конической колбе. Культуру выращивали в течение

приблизительно 10 ч при 37°C при 200 об/мин до конечной $OD_{600\text{ нм}}$ 3. Затравочную культуру переносили в асептических условиях в 20-л ферментер, содержащий следующие компоненты среды: NuPertone 6 г/л, дрожжевой экстракт 12/л, гидрофосфат калия 13,5 г/л, двухосновный фосфат аммония 4 г/л, лимонная кислота 1,7 г/л, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,2 г/л, глюкоза 4 г/л, тиамин HCl 10 мг/л вместе с 1 мл/л микроэлементов (например, микроэлементы для 100 мл композиции: $FeCl_3$ 2,7 г, $ZnCl_2$ 0,2 г, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,2 г, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,2 г, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,1 г, борная кислота 0,05 г, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,1 г, конц. HCl 10 мл). Первоначальная ферментация начиналась при $OD_{600\text{ нм}}$ 0,2 OD . pH поддерживали на уровне $7 \pm 0,2$ посредством ферментации с 20% ортофосфорной кислотой и 12,5% гидроксидом аммония. Когда уровень глюкозы падал ниже 0,5 г/л начинали подпитку при стационарной скорости 3-4 г/л/ч, $DO\%$ поддерживали $>20\%$ на протяжении ферментации с обогащением кислородом. Клетки выращивали в ферментере и клеточный осадок собирали центрифугированием. Клетки лизировали с использованием устройства для разрушения клеток (Panda). Лизат центрифугировали при 10000 g, отделенный от примесей супернатант подвергали очистке.

Очистку PsaA проводили аналогично методике, описанной Larentis et al., 2011 (Protein expression and Purification 78 (2011) 38). Очистку далее оптимизировали с использованием хроматографии смешанного режима (Ceramic Hydroxyapatite Type-II) после DEAE для достижения более высокой чистоты PsaA.

Анионообменная хроматография: 30 мл смолы DEAE Sepharose (GE) наполняли колонку XK16/20. Смолу промывали 5 объемами колонки стерильной дистиллированной воды, а затем 10 объемами колонки 20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 (буфер для уравнивания). 30 мл супернатанта разбавляли до 100 мл буфером для уравнивания, и загружали в колонку и элюат собирали. Колонку промывали 5 объемами буфера для уравнивания. PsaA элюировали посредством 12 объемов линейного градиента (0-100%B). (Буфер А, содержащий 20 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0; буфер В-20 mM Tris, 1 mM EDTA, 250 mM NaCl pH 8,0.) После этого следовало промывание колонок 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 M NaCl pH 8,0.

Хроматография смешанного режима: 25 мл керамического гидроксипатита типа II (СНТ-II) наполняли колонку. Смолу промывали объемами стерильной дистиллированной воды, а затем 10 объемами 20 mM Tris pH 6,8. Элюированные со смолы DEAE фракции, которые продемонстрировали отчетливую основную видимую полосу на уровне приблизительно 37 кДа, соответствующую высокой концентрации PsaA, на SDS PAGE объединяли и загружали на смолу СНТ-II. Элюат собирали и колонку промывали 5 объемами колонки буфера для уравнивания. Белок элюировали 5 объемами колонки пошаговых градиентов (15%B, 20%B, 50%B и 100%B). Буфер А содержал 20 mM Tris pH 6,8, в то время как буфер В содержал 250 mM фосфатный буфер, pH 6,8.

Все элюированные фракции, демонстрирующие отчетливую полосу ожидаемого размера для PsaA объединяли, концентрировали посредством кассеты с MWCO 10 кДа и подвергали диафильтрации против 20 mM фосфатного буфера, pH 7,5. Очищенный белок наносили на гель SDS-PAGE для оценки чистоты.

В) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 3 с PsaA.

Полисахарид серотипа 3 уменьшенного размера (концентрация 5 мг/мл) и 1,5 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1:0,5 (PS: CDAP) и перемешивали в течение 1 минуты. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 3,5 мл 0,2 M триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (к.т.). К активированному полисахариду медленно добавляли 210 мг PsaA (14,0 мл, концентрация 15,0 мг/мл) в соотношении 1:0,7 (PnPs: PsaA).

pH реакционной смеси доводили приблизительно до 9,01 посредством 0,7 мл 0,2 M триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 5 ч при комнатной температуре, а затем проводили гашение реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 mM). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 1А) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции. Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MALLS, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

С) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 6А с PsaA.

Полисахарид серотипа 6А уменьшенного размера (концентрация 14,6 мг/мл) и 400 мкл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1:1 (PS: CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. pH раствора полисахарида доводили до 9,5 посредством 800 мкл 0,2 M триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (к.т.). К активированному полисахариду медленно добавляли 40 мг PsaA (3,78 мл, концентрация 11,0 мг/мл) в соотношении 1:1 (PnPs: PsaA).

pH реакционной смеси доводили приблизительно до 9,01 посредством 0,7 мл 0,2 M триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 5 ч при комнатной температуре, а затем проводили гашение реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 mM). Мониторинг кинетики

реакций конъюгации (фиг. 2В) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции. Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MALLS, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

Д) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 6В с PsaA.

Полисахарид серотипа 6В уменьшенного размера (концентрация 14,97 мг/мл) и 4,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1:2 (PS: CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. pH раствора полисахарида доводили до 9,1 посредством 8,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (к.т.). К активированному полисахариду медленно добавляли 340 мг PsaA (22,66 мл, концентрация 15,0 мг/мл) в соотношении 1:1,7 (PnPs: PsaA).

pH реакционной смеси доводили приблизительно до 9,01 посредством 0,7 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 5 ч при комнатной температуре, а затем проводили гашение реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 1В) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции. Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MALLS, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

Е) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 8 с PsaA.

1000 мг (200,0 мл, концентрация 5,0 мг/мл) полисахарида серотипа 8 с механически уменьшенным размером и 4,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:0,4 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 8,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (к.т.). 800 мг PsaA (53,3 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:0,8 (PnPs: PsaA).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 0,1 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 3В) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

Ф) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 10А с PsaA.

1000 мг (142,8 мл, концентрация 7,0 мг/мл) полисахарида серотипа 10А с механически уменьшенным размером и 6,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:0,6 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 8,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (к.т.). 800 мг PsaA (53,3 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:0,8 (PnPs: PsaA).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 1,3 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 4В) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

Г) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 11А с PsaA.

1000 мг (100,0 мл, концентрация 10,0 мг/мл) полисахарида серотипа 11А с механически уменьшенным размером и 8,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:0,8 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 8,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (к.т.). 800 мг PsaA (53,3 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:0,8 (PnPs: PsaA).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 1,3 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 5В) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

Н) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 12F с PsaA.

1000 мг (142,8 мл, концентрация 7,0 мг/мл) полисахарида серотипа 12F с механически уменьшенным размером и 4,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:0,4 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 9,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (к.т.). 700 мг PsaA (46,6 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:0,7 (PnPs: PsaA).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 1,7 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 6B) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

И) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 15A с PsaA.

1000 мг (71,4 мл, концентрация 14,0 мг/мл) полисахарида серотипа 15A с механически уменьшенным размером и 10,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:1,0 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 20,5 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (к.т.). 1000 мг PsaA (66,6 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:1,0 (PnPs: PsaA).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 0,9 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 7B) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

Ж) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 23A с PsaA.

1000 мг (83,3 мл, концентрация 12,0 мг/мл) полисахарида серотипа 23A с механически уменьшенным размером и 10,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:1,0 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 20,3 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (к.т.). 600 мг PsaA (40,0 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:0,6 (PnPs: PsaA).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 1,1 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 8B) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

К) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 23B с PsaA.

1000 мг (100,0 мл, концентрация 10,0 мг/мл) полисахарида серотипа 23B с механически уменьшенным размером и 2,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:0,2 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 3,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (к.т.). 1000 мг PsaA (66,6 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:1,0 (PnPs: PsaA).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 2,4 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 9B) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством

SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

L) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 24F с PsaA.

1000 мг (125,0 мл, концентрация 8,0 мг/мл) полисахарида серотипа 24F с механически уменьшенным размером и 3,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:0,3 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 10,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (к.т.). 600 мг PsaA (40,0 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:0,6 (PnPs: PsaA).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 3,5 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 10B) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

M) Активация и конъюгация пневмококкового полисахарида серотипа 35B с PsaA.

1000 мг (142,8 мл, концентрация 7,0 мг/мл) полисахарида серотипа 35B с механически уменьшенным размером и 6,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (мас./об.)) смешивали в стеклянной бутылке в соотношении 1,0:0,6 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 посредством 8,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (к.т.). 1000 мг PsaA (66,6 мл, концентрация 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:1,0 (PnPs:PsaA).

pH реакционной смеси доводили до 9,0 посредством 2,2 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 ч при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением избыточной концентрации глицина (100 мМ). Мониторинг кинетики реакций конъюгации (фиг. 11B) проводили с использованием SEC-ВЭЖХ каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием мембраны из TFF с MWCO 100 кДа. Концентрат очищали гель-фильтрацией. Фракции анализировали посредством SEC-MAEES, способа с антроном, и фракции, содержавшие конъюгаты, объединяли и подвергали стерильной фильтрации с использованием 0,2-мкм фильтров.

Пример 3. 24-валентная вакцинная композиция на основе конъюгата пневмококковый капсульный полисахарид-белок (состав I).

24-валентную конъюгатную вакцину (0,5 мл), содержащую 2,2 мкг каждого из пневмококковых полисахаридов серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F и 4,4 мкг серотипа 6B, конъюгированных с приблизительно 35 мкг CRM₁₉₇; и 2,2 мкг каждого из пневмококковых полисахаридов серотипов 3, 6A, 8,10A, 11A, 12F, 15A, 23A, 23B, 24F и 35B, конъюгированных приблизительно с 25 мкг PsaA, приготавливали в 5 мМ янтарной кислоте и приблизительно 0,07% мас./об. полисорбате 20 добавлением каждого конъюгата последовательно в емкость для смешения. В смешанный раствор добавляли гель фосфата алюминия, эквивалентный 0,5 мг Al³⁺ на дозу 0,5 мл. pH состава доводили до 6,0 с использованием 1 Н хлористоводородной кислоты и при постоянном перемешивании. После перемешивания в течение 2 ч составленной смесью в асептических условиях заполняли в объеме заполнения 0,58 мл на флакон 3-мл стерильные не силиконизированные флаконы, закрывали стерильными 13-мм резиновыми пробками и запечатывали 13-мм стерильными розовыми отгибающимися алюминиевыми колпачками, а затем проводили визуальное исследование и маркирование заполненных флаконов. Некоторые флаконы из партии отбирали случайным образом и отправляли для анализа внешнего вида, pH, осмолярности, общего полисахарида и белка (мкг/SHD), % адсорбции, содержание алюминия (мг/SHD) (однократная доза для человека).

Таблица I

Охарактеризация состава (I)

pH	Внешний вид	Общее содержание Ps (пг/SHD)	% адсорбция	Белок (пг/SHD)
6,1	Беловатая суспензия, в которой минеральный носитель имеет тенденцию к медленному оседанию	52	76	56

Осмолярность (мосмоль/кг)	Янтарная кислота (мг/SHD)	Полисорбат 20 (мкг/SHD)	Содержание алюминия (мг/SHD)
299	260	300	0,52

Пример 4. 24-валентная вакцинная композиция на основе конъюгата пневмококковый капсульный полисахарид-белок (состав II).

24-валентную конъюгатную вакцину (0,5 мл), содержащую 2,2 мкг каждого из пневмококковых полисахаридов серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B и 4,4 мкг 6B, конъюгированных с приблизительно 60 мкг CRM₁₉₇, приготавливали в 5 мМ янтарной кислоте и приблизительно 0,07% мас./об. полисорбате 20 добавлением каждого конъюгата последовательно в емкость для смешения. В смешанный раствор добавляли гель фосфата алюминия, эквивалентный 0,5 мг Al³⁺ на дозу 0,5 мл. pH состава доводили до 6,0 с использованием 1 Н хлористоводородной кислоты и при постоянном перемешивании. После перемешивания в течение 2 часов составленной смесью в асептических условиях заполняли в объеме заполнения 0,58 мл на флакон 3-мл стерильные не силиконизированные флаконы, закрывали стерильными 13-мм резиновыми пробками и запечатывали 13-мм стерильными розовыми отгибающимися алюминиевыми колпачками, а затем проводили визуальное исследование и маркирование заполненных флаконов. Некоторые флаконы из партии отбирали случайным образом и отправляли для анализа внешнего вида, pH, осмолярности, общего полисахарида и белка (мкг/SHD), % адсорбции, содержание алюминия (мг/SHD) (однократная доза для человека).

Таблица II

pH	Внешний вид	Общее содержание Ps (мг/SHD)	% адсорбция	Белок (мг/SHD)
6,1	Беловатая суспензия, в которой минеральный носитель имеет тенденцию к медленному оседанию	50	78	52

Осмолярность (мосмоль/кг)	Янтарная кислота (мг/SHD)	Полисорбат 20 (мкг/SHD)	Содержание алюминия (мг/SHD)
293	275	285	0,51

Пример 5. Иммунный ответ у кроликов, иммунизированных двумя конъюгатными вакцинами, содержащими различные белки-переносчики.

Для оценки иммуногенности кроликов иммунизировали составом I и II. Схема исследования состояла из двух групп по 7 кроликов в каждой. Животных иммунизировали тремя дозами каждого состава. Схема взятия крови и иммунизации, а также детали групп, представлены в таблице ниже:

Таблица III

Оценка иммунного ответа у кроликов на состав обычного и уменьшенного антигена

Состав/ компаратор	Размер группы	Схема иммунизации	Схема взятия крови
Состав I	7	1, 15 и 29	0, 14, 28 и 36
Состав II	7		

Взятие сыворотки от иммунизированных кроликов проводили с указанным интервалом. Титры серотип-специфических IgG оценивали в ELISA, адаптированного из рекомендованного ВОЗ ELISA для оценки сывороточных титров антител в сыворотке человека. Титры антител оценивали как максимальное разведение сыворотки, которое давало величину OD_{450 нм} выше порогового значения. Величину титра IgG у животного до вакцинации использовали для вычисления геометрического среднего кратного повышения (GMFR) сывороточного титра IgG. Величины GMFR титра наносили на график (фиг. 12A и 12B).

Титр оценивают как максимальное сывороточное разведение, которое обеспечивало OD_{450 нм} (оптическая плотность при длине 450 нм) в ELISA выше пороговой величины (2×OD_{450 нм}, наблюдаемая в сыворотке до иммунизации; величина OD приблизительно 0,1). Геометрическое среднее кратное повышение (GMFR) для каждого серотипа наносили на график. Сыворотки, полученные после иммунизации 3 дозами (после 3 дозы) использовали для оценки иммуногенности. Сплошные черные столбики указывают на пневмококковые полисахариды, конъюгированные с CRM₁₉₇, в то время как окрашенные столбики указывают на пневмококковые полисахариды, конъюгированные с PsaA.

Было обнаружено, что сывороточные титры IgG у кроликов, вакцинированных либо PCV24 (состав I), либо PCV24 (состав II) были очень сходными. За исключением серотипов 23A и 23B в составе I, иммунизированная группа имела несколько более низкий ответ GMFR по сравнению с составом II. Наиболее важно, что все кролики, иммунизированные либо полисорбатом, содержащим один белок-переносчик (CRM₁₉₇; состав II), либо два белка-переносчика (CRM₁₉₇+PsaA; состав I) обеспечили более чем четырехкратное повышение GMFR. Четырехкратное повышение концентрации антител является

критерием соответствия, установленным ВОЗ для пневмококковой вакцины. Таким образом, исследования показывают, что отсутствует негативное влияние на иммунный ответ присутствия другого белка-переносчика в вакцинном составе.

Подразумевается, что настоящее изобретение не является исчерпывающим или ограничивает настоящую технологию конкретными формами, описанными в настоящем описании. Хотя конкретные варианты осуществления описаны в настоящем описании для иллюстративных целей, возможны различные эквивалентные модификации без отклонения от настоящей технологии, как будет понятно специалисту в данной области. В некоторых случаях хорошо известные структуры и функции не показаны и/или не описаны подробно во избежание чрезмерного усложнения описания вариантов осуществления настоящей технологии. Хотя стадии способов могут быть предоставлены в настоящем описании в конкретном порядке, в альтернативных вариантах осуществления стадии могут иметь другой подходящий порядок. Аналогично, определенные варианты осуществления настоящей технологии, описанной в контексте конкретных вариантов осуществления, могут быть скомбинированы или удалены в других вариантах осуществления. Более того, хотя преимущества, ассоциированные с определенными вариантами осуществления, могут быть описаны в контексте этих вариантов осуществления, другие варианты осуществления также могут иметь такие преимущества, и не все варианты осуществления должны обязательно иметь такие преимущества или другие преимущества, описанные в настоящем описании, чтобы входить в объем настоящей технологии. Таким образом, настоящее изобретение и ассоциированная с ним технология могут охватывать другие варианты осуществления, явно не представленные и/или не описанные в настоящем описании.

Из вышеуказанного, будет понятно, что конкретные варианты осуществления изобретения описаны в настоящем описании для целей иллюстрации, но что различные модификации могут быть внесены без отклонения от объема изобретения.

Преимущества изобретения

Поливалентные пневмококковые конъюгатные вакцинные композиции по настоящему изобретению обеспечивают улучшенный иммунный ответ относительно наивных поливалентных пневмококковых вакцин и существующих пневмококковых конъюгатных вакцин.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. 24-валентная пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция, содержащая капсульный полисахарид серотипов *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с белком-переносчиком, где серотипы включают 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, причем полисахарид каждого серотипа индивидуально конъюгирован с белком-носителем, выбранным из PsaA и CRM₁₉₇.

2. Пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция по п.1, где вакцинная композиция представляет собой 24-валентную вакцинную композицию на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, где по меньшей мере тринадцать серотипов конъюгированы с CRM₁₉₇, и остальные серотипы конъюгированы с PsaA.

3. Пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция по п.2, где капсульный полисахарид серотипов 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгирован с CRM₁₉₇ и капсульный полисахарид серотипов 3, 6A, 8, 10A, 11A, 12F, 15A, 23A, 23B, 24F и 35B конъюгирован с PsaA.

4. Пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция по п.3, где пневмококковая конъюгатная вакцина содержит приблизительно 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида из серотипов *Streptococcus pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, и приблизительно 4,4 мкг полисахарида из серотипа 6B, и где каждый капсульный полисахарид серотипов 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгирован с белком-переносчиком CRM₁₉₇, и каждый капсульный полисахарид серотипов 3, 6A, 8, 10A, 11A, 12F, 15A, 23A, 23B, 24F и 35B конъюгирован с PsaA.

5. Пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция по п.1, где пневмококковая конъюгатная вакцина содержит приблизительно от 2,2 до 2,4 мкг каждого капсульного полисахарида из серотипов *Streptococcus pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, и приблизительно 4,4 мкг 6B, где каждый капсульный полисахарид конъюгирован с белком-носителем, выбранным из PsaA и CRM₁₉₇.

6. Пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция по любому из пп.1-5, где:

(a) один или более пневмококковых полисахаридов фрагментированы, причем каждый фрагментированный пневмококковый полисахарид имеет среднюю молекулярную массу, меньшую, чем у нативного пневмококкового полисахарида, и находящуюся в диапазоне от 50 до 1000 кДа, предпочтительно имеют средний размер (M_w) 100-1000, 200-800, 250-600 или 300-400, 70-150 или 75-125 кДа;

(b) конъюгаты полисахарид-белок имеют молекулярную массу в диапазоне от 500 до 5000 кДа; от 1000 до 10000 кДа; от 1500 до 15000 кДа; от 2000 до 20000 кДа; от 2500 до 25000 кДа или от 3000 до 30000 кДа;

(с) процентное соотношение белка и полисахарида (белок/PS) составляет от 0,3 до 2,0 белок/PS, предпочтительно от 0,5 до 1,5;

(d) пневмококковая вакцинная композиция содержит один или более консервант(ов), выбранных из тиомерсала, 2-феноксизтанола, в количествах в диапазоне от приблизительно 4 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл; и/или

пневмококковая вакцинная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, фармацевтически приемлемый разбавитель, буфер, консервант, стабилизатор, адъювант и/или эксципиент лиофилизации.

7. Пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция по п.4 или 5, где содержание глицерина для серотипа 15А находится в диапазоне 5-18% и содержание глицерина для серотипа 35В находится в диапазоне 2-10%, предпочтительно 2-8%.

8. Пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция по п.6, где адъювант представляет собой фосфат алюминия.

9. Способ получения 24-валентной пневмококковой конъюгатной вакцинной композиции по любому из пп.1-8, где способ включает стадии:

(a) конъюгации по отдельности каждого из двадцати четырех активированных пневмококковых полисахаридов с белком-переносчиком, выбранным из CRM₁₉₇ или PsaA,

(b) диафильтрации и очистки конъюгатов с использованием эксклюзионной хроматографии,

(c) анализа очищенных фракций с использованием SEC-MALLS, объединения фракций, содержащих каждый из двадцати четырех конъюгатов, и стерилизации фильтрованием одновалентных фракций конъюгатов, и

(d) составления 24 конъюгатов, полученных на стадии (с), адъюванта, одного или нескольких эксципиентов и буфера с получением 24-валентной композиции конъюгатов пневмококковый полисахарид-белок.

10. Пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция по п.1, где пневмококковые капсульные полисахариды серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8,9V, 10А, 14, 18С, 19А, 19F, 23F, 11А, 12F, 15А, 22F, 23А, 23В, 24F, 33F и 35В каждый индивидуально конъюгирован с CRM₁₉₇ или PsaA, где композиция имеет рН от 4 до 7 и содержит: приблизительно 4,4 мкг/0,5 мл 6В; приблизительно от 2,2 до 4 мкг/0,5 мл всех других серотипов; приблизительно от 40 до 80 мкг/0,5 мл CRM₁₉₇ или PsaA; от 0,2 до 2 мг/0,5 мл фосфата алюминия; приблизительно 1-10 мМ сукцинатный буфер; приблизительно от 0,5 до 2,5% мас./об. хлорида натрия; от 0,002 до 0,2% мас./об. полисорбата 80; и 4 мг/мл и 10 мг/0,5 мл 2-феноксизтанола.

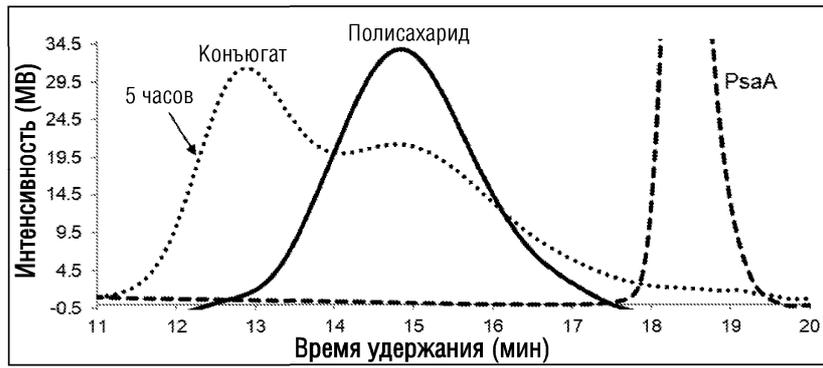
11. Пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция по п.3, где пневмококковые капсульные полисахариды серотипов 1, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇ и капсульный полисахарид серотипов 3, 6А, 8, 10А, 11А, 12F, 15А, 23А, 23В, 24F и 35В конъюгирован с PsaA, и где композиция имеет рН от 4 до 7 и содержит: приблизительно 4,4 мкг/0,5 мл 6В; приблизительно от 2,2 до 4 мкг/0,5 мл всех других серотипов; от 20 до 40 мкг/0,5 мл CRM₁₉₇; от 20 до 40 мкг/0,5 мл PsaA; от 0,2 до 2 мг/0,5 мл фосфата алюминия; приблизительно 1-10 мМ сукцинатный буфер; приблизительно от 0,5 до 2,5% мас./об. хлорида натрия; от 0,002 до 0,2% мас./об. полисорбата 80; и 4 мг/мл и 10 мг/0,5 мл 2-феноксизтанола.

12. Пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция по любому из пп.1-11, где вакцина является пригодной для профилактики или лечения заболевания, опосредуемого *Streptococcus pneumoniae*, такого как инвазивное пневмококковое заболевание (IPD);

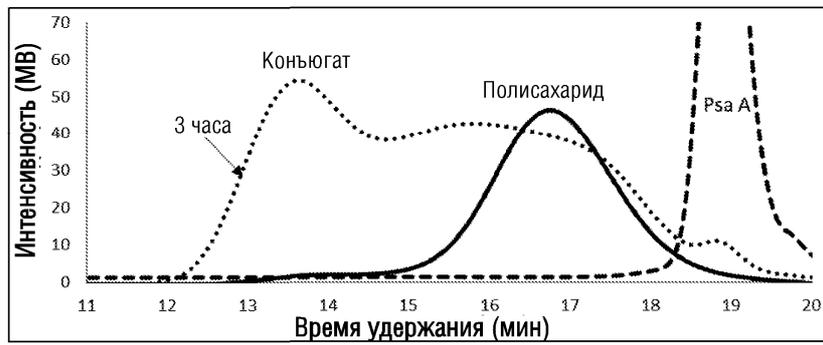
где индивидуумом является человек, такой как младенец (в возрасте менее 1 года), ребенок ясельного возраста (от приблизительно 12 месяцев до приблизительно 24 месяцев), ребенок младшего возраста (от приблизительно 2 лет до приблизительно 5 лет), ребенок старшего возраста (от приблизительно 5 лет до приблизительно 13 лет), подросток (от приблизительно 13 лет до приблизительно 18 лет), взрослый (от приблизительно 18 лет до приблизительно 65 лет) или пожилой (более чем приблизительно 65 лет); и

где пневмококковую конъюгатную вакцинную композицию вводят индивидууму парентерально (например, подкожно, внутримышечно, внутривенно и/или внутривенно) или мукозальным путем (например, перорально и/или назально).

(A)

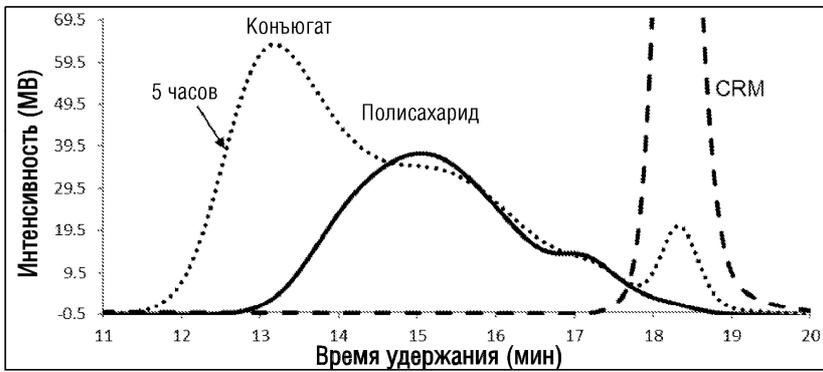


(B)

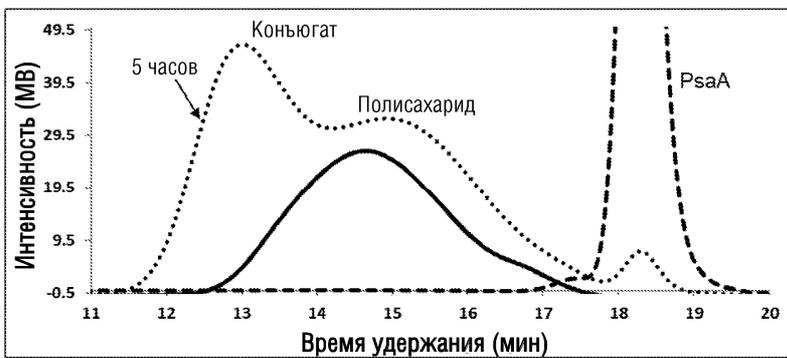


Фиг. 1

(A)

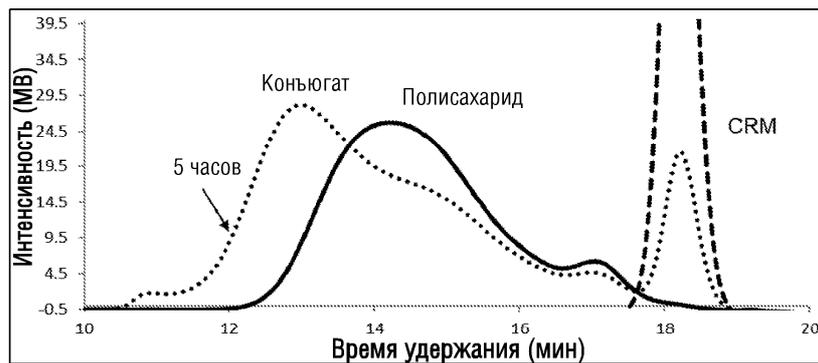


(B)

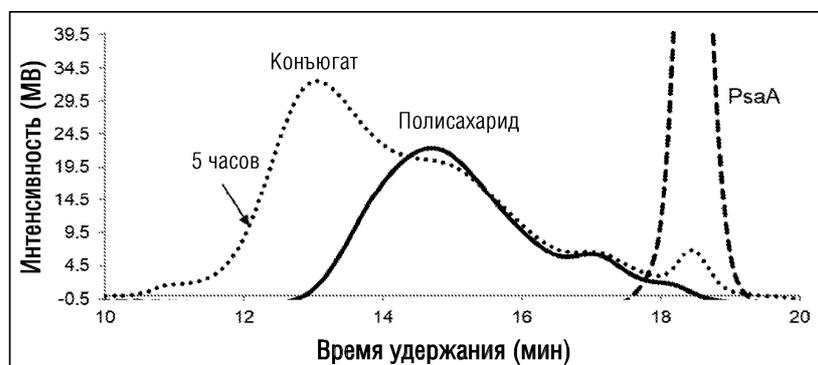


Фиг. 2

(A)

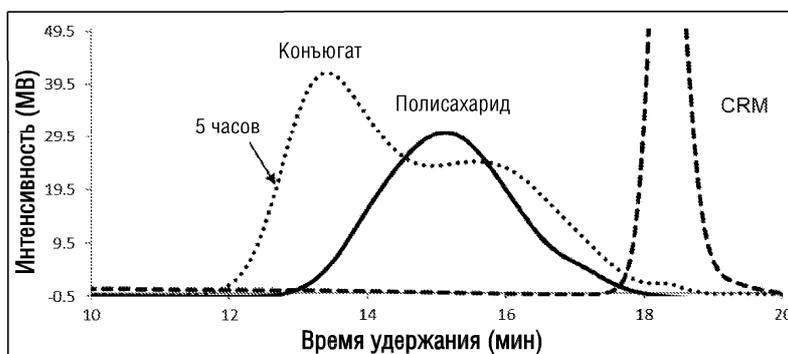


(B)

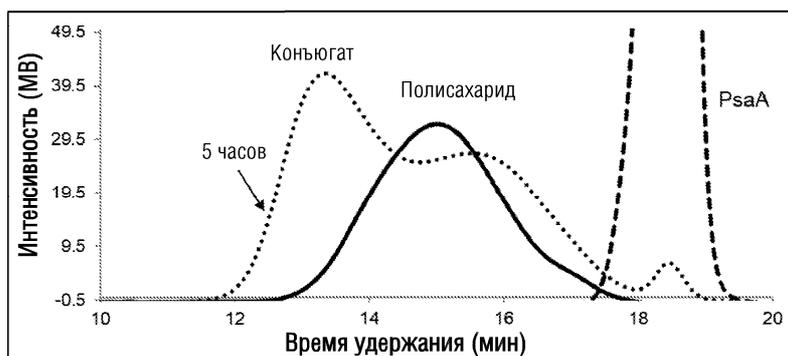


Фиг. 3

(A)

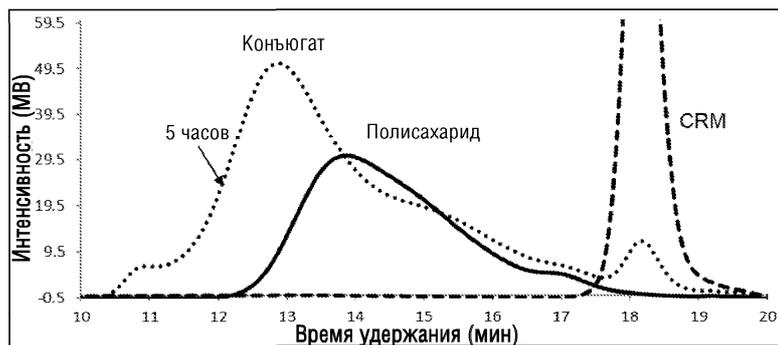


(B)

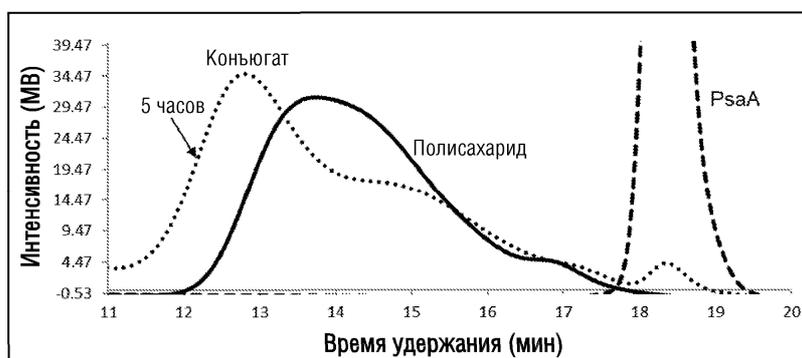


Фиг. 4

(A)

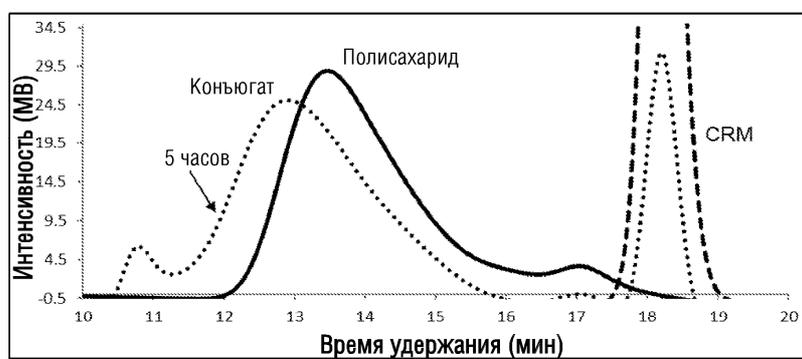


(B)

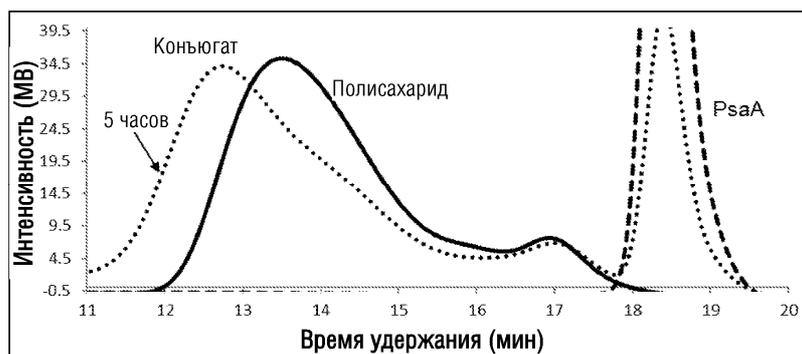


Фиг. 5

(A)

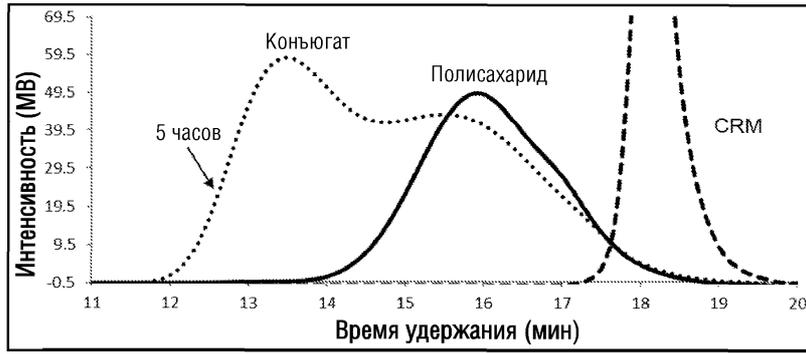


(B)

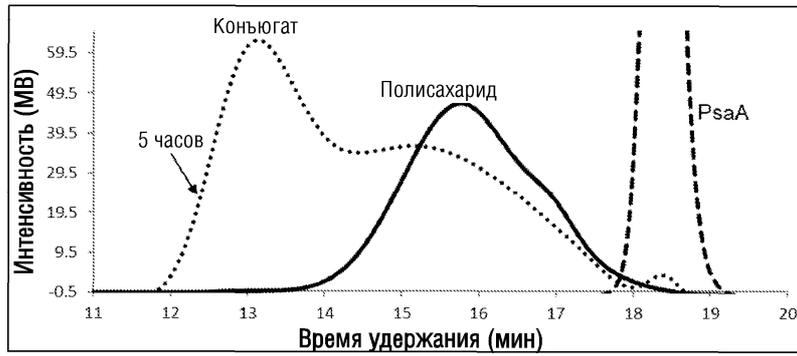


Фиг. 6

(A)

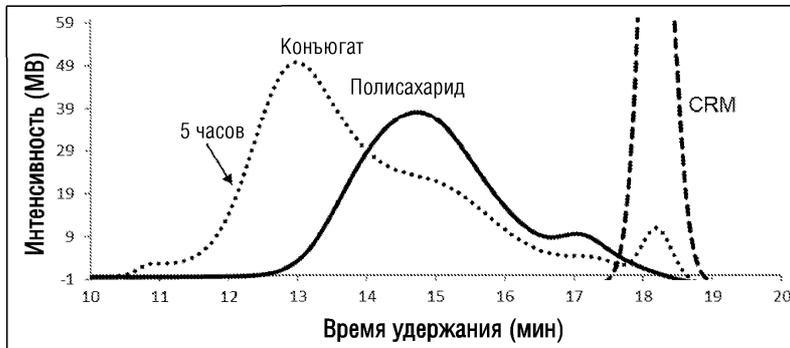


(B)

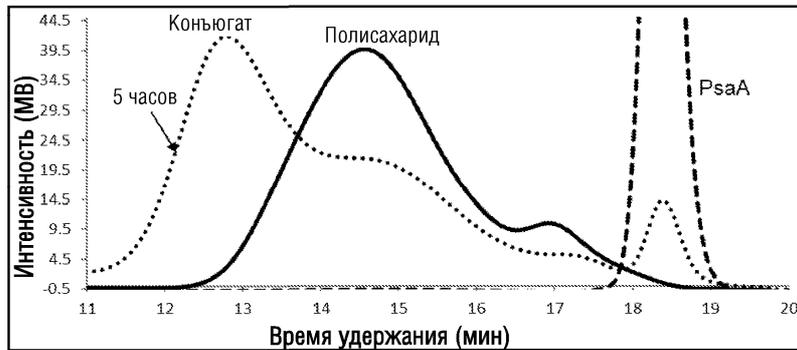


Фиг. 7

(A)

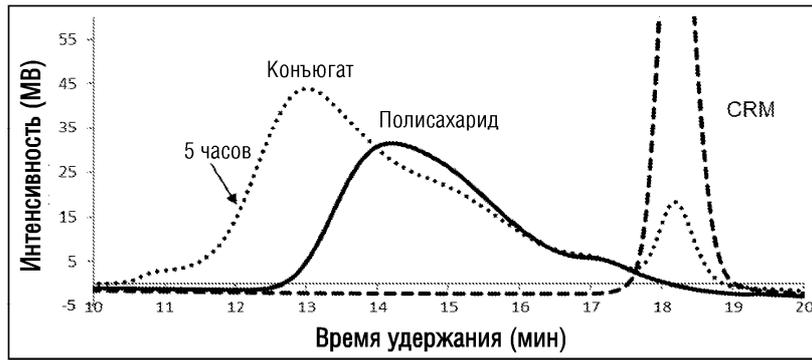


(B)

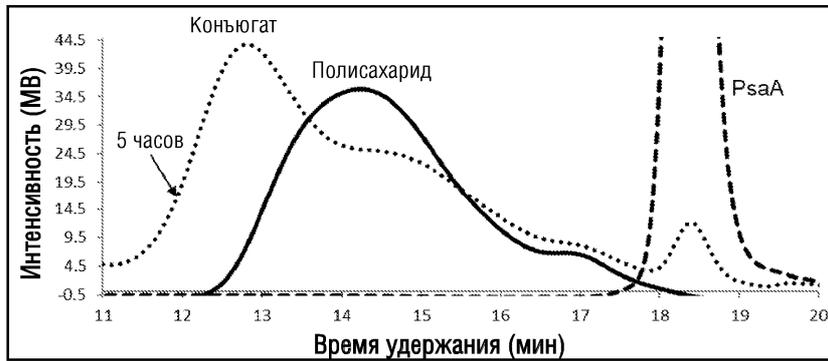


Фиг. 8

(A)

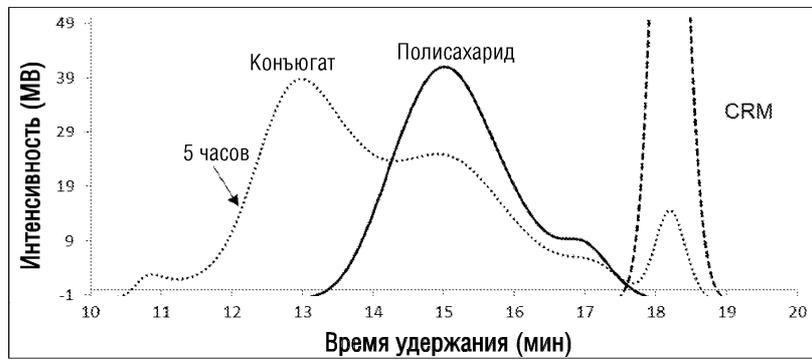


(B)

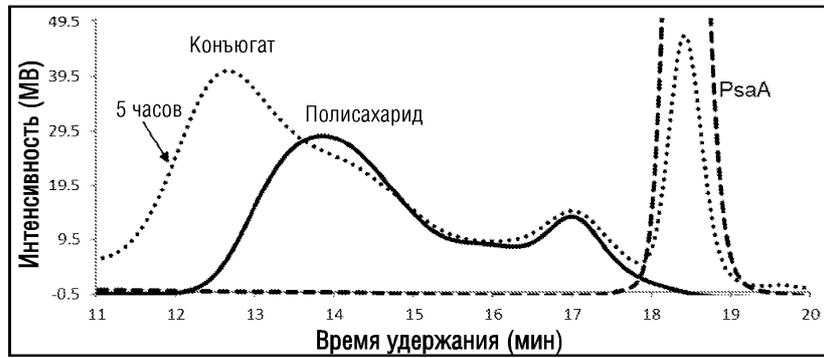


Фиг. 9

(A)

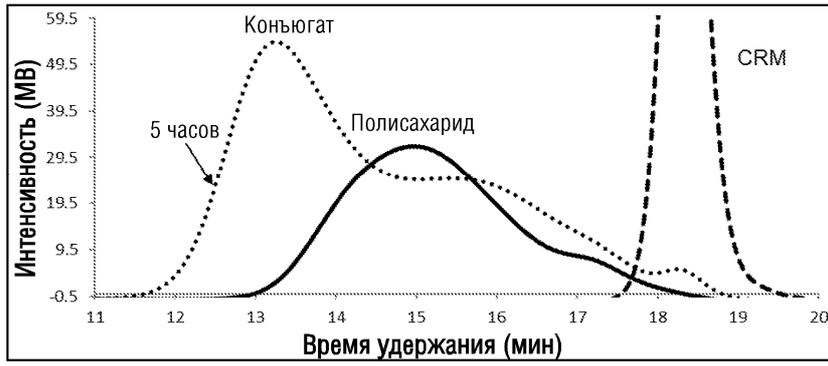


(B)

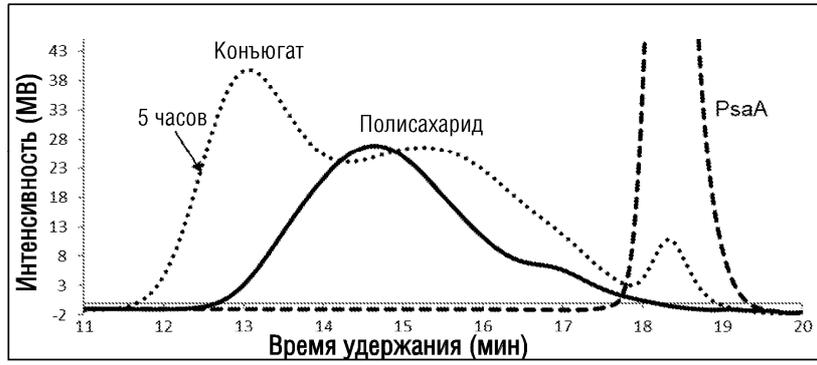


Фиг. 10

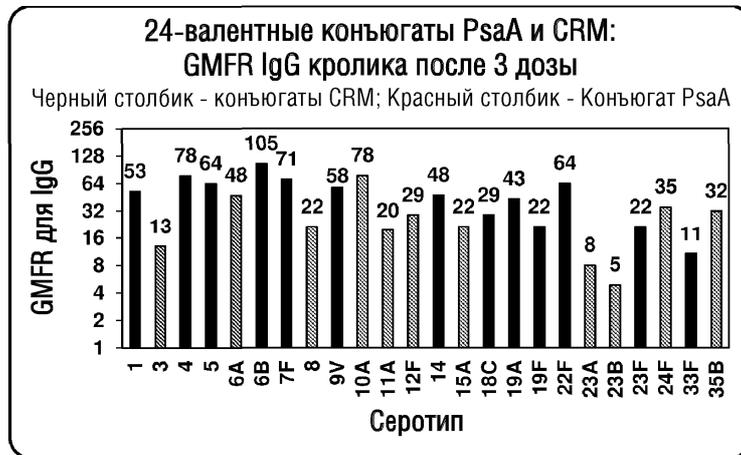
(A)



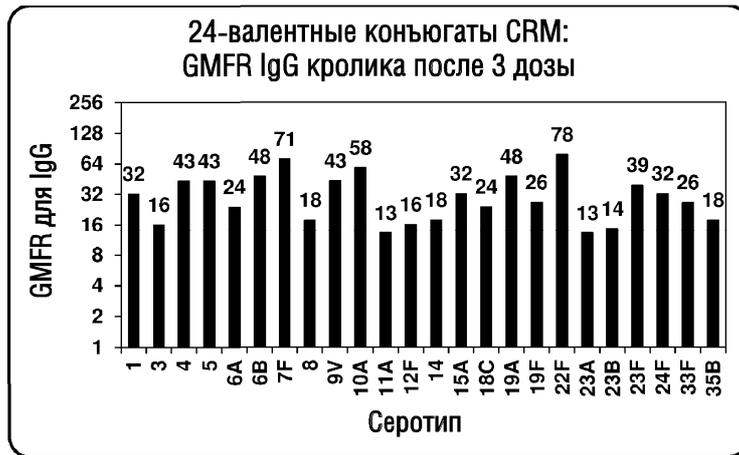
(B)



Фиг. 11



Фиг. 12А



Фиг. 12В

