

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048146**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.10.30**

(21) Номер заявки  
**202290401**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.09.29**

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

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ ПОЛИВАЛЕНТНОЙ ПНЕВМОКОККОВОЙ ВАКЦИНЫ,  
СОДЕРЖАЩИЕ КОНЬЮГАТЫ ПОЛИСАХАРИД-БЕЛОК**

---

(31) **201641033563**

(32) **2016.09.30**

(33) **IN**

(43) **2022.05.31**

(62) **201990838; 2017.09.29**

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

(72) Изобретатель:  
**Срираман Раджан, Чакка  
Девипрасанна, Суредди Сатиям  
Найду, Бурки Раджендар, Ганти  
Сриниваса Рао, Датла Махима, Матур  
Рамеш Венкат, Мантена Нарендер Дев  
(IN)**

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

(56) DI LIN H ET AL.: "Preparation and immunogenicity of capsular polysaccharide-surface adhesin A (PsaA) conjugate of Streptococcus pneumoniae", IMMUNOBIOLOGY, URBAN UND FISCHER VERLAG, DE, vol. 215, no. 7, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 545-550, XP027066167, ISSN: 0171-2985, DOI: 10.1016/J.IMBIO.2009.08.008 [retrieved on 2009-10-31]  
EP-A1-2425856  
US-A1-7955605

(57) Изобретение относится к композициям поливалентных пневмококковых вакцин, содержащим капсульные полисахариды пневмококковых серотипов, каждый из которых по отдельности конъюгирован с белками-носителями. В конъюгированном состоянии комбинация из капсульного полисахарида пневмококкового серотипа и белка-носителя называется конъюгатом полисахарид-белок. Композиция пневмококковой вакцины может дополнительно содержать одно или несколько из следующих веществ: фармацевтически приемлемый носитель, фармацевтически приемлемый разбавитель, буфер, консервант, стабилизатор, адъювант и/или лиофилизирующий эксципиент. Также изобретение относится к способам получения и введения описанных композиций пневмококковых вакцин.

**B1**

**048146**

**048146**

**B1**

### Перекрестная ссылка на родственную заявку

По изобретению испрашивается приоритет временной заявки в Индии № 201641033563, поданной 30 сентября 2016 года и включенной в настоящее изобретение в качестве ссылки в полном объеме.

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям поливалентной пневмококковой вакцины, содержащей конъюгированный с одним или несколькими белками-носителями капсульный пневмококковый полисахарид из одного или более серотипов *Streptococcus pneumoniae*. Если упомянутые капсульный пневмококковый полисахарид и белок-носитель являются конъюгированными, то в настоящем изобретении они имеют название "конъюгаты полисахарид-белок".

### Уровень техники

*Streptococcus pneumoniae* ("пневмококк") представляет собой грамположительную бактерию, вызывающую инфекционные заболевания, такие как пневмония, бактериемия и менингит, и заболевания, связанные с образованием колоний, такие как острый средний отит (например, образование колоний в среднем ухе). Эти вызванные пневмококками болезни являются причиной заболеваемости и смертности, в особенности у детей в возрасте до 2 лет и у взрослых старше 60 лет. Частота пневмококковой пневмонии в США у людей старше 60 лет составляет от 3 до 8 случаев на 100000 человек. Несмотря на лечение антибиотиками, в 20% случаев пневмококковая пневмония приводит к бактериемии и менингиту, при этом совокупный показатель смертности составляет приблизительно 30%.

Проводилось исследование белков, таких как пневмолизин и пневмококковый поверхностный белок A (PspA), в отношении их пригодности к использованию в пневмококковых вакцинах в качестве возможных белков-носителей. Оба эти белка обладают частичной профилактической эффективностью у мышей (см. публикации Paton et al. "Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with *Streptococcus pneumoniae*." *Infect Immun.* 1983 May; 40(2): 548-552, и McDaniel et al. "PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type" *Infect Immun.* 1991 Jan.; 59(1): 222-228), но также имеют недостатки в плане их использования в вакцинах в качестве иммуногенов. Пневмолизин хорошо сохраняется среди пневмококков, но при этом обладает токсическими эффектами в своем нативном состоянии (Alonso De Veiasco et al. "*Streptococcus pneumoniae*: Virulence factors, pathogenesis, and vaccines." *Microbiol. Rev.* 1995 Dec; 59(4): 591-603). С другой стороны, по серологическим и структурным характеристикам PspA представляет собой гетерогенный белок (Crain et al. "Pneumococcal surface protein A is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*." *Infect. Immun.* 1990 Oct; 58(10): 3293-3299). Для использования PspA в составе вакцин потребуется множество типов PspA, что усложнит изготовление вакцины.

Пневмококковый поверхностный белок A адгезии ("PsaA") представляет собой многофункциональный липопротеин, участвующий в адгезии к клетке-хозяину и образовании колоний. Он является высоко консервативным поверхностным белком и на 97% гомологичен известным серотипам *S. pneumoniae*. PsaA обладает иммуногенностью, и известно, что при естественном образовании пневмококковых колоний в носоглотке возрастает титр антител против PsaA.

Пневмококковые вакцины могут использоваться для профилактики инфекций. Современные вакцины включают поливалентные пневмококковые полисахаридные вакцины (содержащие пневмококковые полисахариды двух или нескольких серотипов) и пневмококковые конъюгированные вакцины. Известно, что профилактическая эффективность пневмококковой полисахаридной вакцины обусловлена концентрацией антител, образованных против капсульного полисахарида. Пневмококковые клетки инкапсулированы с полисахаридом, в результате чего возникает более чем 90 различных серотипов пневмококка. Капсула является основным показателем степени вирулентности для пневмококков - она не только защищает внутреннюю поверхность клетки от комплемент-опосредованного клеточного лизиса, но также обладает слабой иммуногенностью.

Вакцина Pneumovax®23 от компании Merck представляет собой поливалентную пневмококковую полисахаридную вакцину, которая содержит неконъюгированные капсульные полисахариды из пневмококков 23 серотипов, 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 вакцине Pneumovax®23, разрешенные к применению современные поливалентные пневмококковые полисахаридные вакцины доказали свою эффективность для профилактики пневмококковой инфекции у взрослых, в частности, у пожилых людей и лиц с высоким риском инфекции. Тем не менее, младенцы и дети младшего возраста проявляют слабую реакцию на эту неконъюгированную пневмококковую полисахаридную вакцину.

Вакцина Prevnar®-7 представляет собой пневмококковую конъюгированную вакцину полисахарид-белок и включает семь наиболее часто выделяемых полисахаридных серотипов (например, 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F, конъюгированных с CRM<sub>197</sub> (белком дифтерийного токсина)). С начала применения вакцины Prevnar®-7 в США в 2000 году наблюдается значительное снижение инфекционных пневмококковых заболеваний (IPD) у детей. Поскольку в некоторых регионах мира вакцина Prevnar®-7 имеет ограниченный охват серотипов, была разработана и одобрена к применению 13-валентная конъюгированная

вакцина Prevenar-13®, содержащая тринадцать серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, конъюгированных с CRM<sub>197</sub>.

Вакцина Synflorix® представляет собой пневмококковую вакцину, включающую десять полисахаридных серотипов: конъюгированные с белком D (PD) серотипы 1, 4, 5, 6B, 7, 9, 14, 23F, конъюгированный со столбнячным анатоксином (TT) серотип 18C, и конъюгированный с дифтерийным анатоксином (DT) серотип 19F. Каждый из этих полисахаридных серотипов конъюгирован с использованием 1-циано-4-диметиламино-пиридиния тетрафторбората (CDAP) при регулируемом уровне pH.

Несмотря на наличие указанных вакцин, существует потребность в дополнительных поливалентных пневмококковых вакцинах, содержащих альтернативные серотипы полисахаридов и белки-носители, а также в простом и эффективном производстве таких вакцин.

Пневмококковые вакцины описаны в дополнительных ссылках. Например, в патенте США № 5360897 раскрыт иммуногенный конъюгат, содержащий продукт восстановительного аминирования интактного капсульного полимера из бактериального патогена *S.pneumoniae*, имеющий по меньшей мере две карбонильные группы, и бактериальный токсин или анатоксин, при этом указанный конъюгат включает сшитый конъюгат, в котором имеется прямая ковалентная связь между капсульным полимером и токсином или анатоксином.

В патенте США № 5693326 предложен обобщенный способ получения конъюгированной вакцины, в котором для активации вирусных, грибковых или бактериальных полисахаридов используется органическое цианирующее вещество, выбранное из группы 1-циано-4-(диметиламино)-пиридиния тетрафторбората, N-цианотриэтил-аммония тетрафторбората, и p-нитрофенилцианата, для образования активированного углевода и последующего соединения с белком или белком-носителем.

В патенте США № 5854416 раскрыты аминокислотные последовательности и ДНК-последовательности белков из *S.pneumonia* размером 37кДа, известные как PsaA (пневмококковые поверхностные белки А адгезии), и в патенте США № 7862823 раскрыта композиция поливалентной конъюгированной вакцины, содержащая пневмококковые капсульные полисахариды и по меньшей мере два разных белка-носителя, такие как DT и TT.

В патенте США № 7955605 описан способ получения иммуногенного конъюгата, включающего серотип 19A, при этом активированный полисахаридный серотип 19A и белок-носитель ресуспендированы в диметилсульфоксиде (ДМСО) с образованием конъюгата.

В патенте США № 8192746 раскрыта композиция 15-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины полисахарид-белок, содержащая капсульные полисахариды серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, конъюгированные с CRM<sub>197</sub>.

Патент США № 8465749 относится к способу получения конъюгированной вакцины путем взаимодействия полисахарида с CDAP и взаимодействия белка с гидразином или дигидразидом адипиновой кислоты в определенном диапазоне pH.

В патенте США № 8557250 B2 раскрыт способ, включающий контактирование смеси, состоящей из множества цианат-активированных полисахаридов с разной иммуногенностью, по меньшей мере с одним гидразид-активированным белком.

В патентах США № 8808708, 7955605 и в патенте США № 8603484 описана 13-валентная иммуногенная композиция, состоящая из конъюгатов полисахарид-белок с серотипами 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, и белка-носителя CRM<sub>197</sub>.

В патентной публикации США № 2009/0017059 A1 раскрыта иммуногенная композиция, в которой серотипы 19A и 19F конъюгированы с различными бактериальными анатоксинами, включая столбнячный анатоксин, дифтерийный анатоксин коклюшный анатоксин, бактериальные цитолизины и/или пневмолизин.

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

В патентной публикации США № 2010/0239604 описана иммуногенная композиция, включающая поливалентные конъюгаты капсульного сахараиды *S.pneumoniae* серотипов 19A и 19F, при этом серотип 19A конъюгирован с первым бактериальным анатоксином и 19F конъюгирован со вторым бактериальным анатоксином и капсульные сахараиды *S.pneumoniae* серотипов 2-9 конъюгированы с белком D.

В патентной публикации США № 2012/321658 A1 раскрыта иммуногенная композиция, в которой серотипы 1, 3, 19A и 19F связаны с белком-носителем (носителями) или напрямую, или опосредованно с помощью химической реакции, отличной от восстановительного аминирования, и один или более других сахаридов выбраны из второй группы, состоящей из серотипов 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C и 23F, которые связаны с белком-носителем (носителями) с помощью восстановительного аминирования.

В патенте IN 140/DEL/2011 рассмотрена вакцина *S. pneumoniae*, содержащая или (a) 7 или больше, или (b) 10 или больше полисахаридов из разных серотипов, конъюгированных по меньшей мере с 2 или с большим количеством белков-носителей, выбранных из группы, включающей DT, дифтерийный анаток-

син, CRM197 и столбнячный анатоксин.

В публикации WO № 2013/191459 A1 раскрыта конъюгированная 15-валентная композиция, содержащая разные серотипы *S.pneumoniae*, полученные из капсульного полисахарида серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, конъюгированного с CRM<sub>197</sub>.

В публикации WO № 2014/092377 A1 раскрыта 13-валентная композиция, в которой 12 серотипов выбраны из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, и оставшийся серотип 12 или 9N конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

В публикации WO № 2014/092378 A1 описана иммуногенная конъюгированная композиция, в которой 12 серотипов выбраны из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F и оставшийся один из серотипов 22F или 33F конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

В документе WO 2016207905 A2 раскрыта композиция поливалентной пневмококковой конъюгированной вакцины (PCV), содержащая: 1) по меньшей мере 12 капсульных полисахаридов, выбранных из серотипов *S.Pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, активированных с помощью CDAР и конъюгированных с белком-носителем CRM<sub>197</sub>, и 2) фармацевтически приемлемый носитель, при этом композиция не содержит капсульный полисахарид из серотипа 6A.

В опубликованной заявке на китайский патент CN 101590224 описана 14-валентная пневмококковая полисахаридно-белковая конъюгированная вакцина, содержащая серотипы 1, 2, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, конъюгированные с CRM<sub>197</sub>.

В опубликованной заявке на китайский патент CN 103623401 раскрыта композиция 14-поливалентного пневмококкового капсульного полисахаридно-белкового конъюгата, в которой указанные 14 различных серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

В опубликованной заявке на китайский патент CN 103656632 раскрыта поливалентная композиция пневмококкового капсульного полисахарида, содержащая серотип 6A, и по меньшей мере один дополнительный серотип, выбранный из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F и 33F, конъюгированный с CRM<sub>197</sub>.

В опубликованной заявке на китайский патент CN 103656631 рассмотрена поливалентная композиция пневмококкового капсульного полисахаридно-белкового конъюгата и способ ее получения. Конъюгированную композицию получают из капсульных полисахаридов пневмококка 24 разных серотипов и белка-носителя путем ковалентной связи, при этом 24 разных серотипа 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 конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

В опубликованной заявке на китайский патент CN 104069488 раскрыты поливалентные пневмококковые капсульные полисахариды 14 разных серотипов и белок-носитель, при этом 14 серотипов включают конъюгированные с CRM<sub>197</sub> серотипы 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F.

Авторы Deborahetal. (1996, том 21, выпуск 1, страницы 17-22) описывают значительную гомологию PsaA и фимбриальных белков адгезии. Иммунизация мышей CBA/CAHnJ XID путем введения PsaA с использованием или полного адъюванта Фрейнда или полного адъюванта TiterMax™ создает мощную защиту мышей от гетерологичного внутривенного заражения пневмококковым штаммом WU2 3-го типа в дозах, превышающих LD<sub>50</sub> до 45 раз.

Авторы Miyaji E.N. et al. (2001, Vaccine, 20 (5-6): 805-12) описывают *S.pneumoniae* как один из наиболее важных патогенов человека. Авторы сконструировали векторы ДНК-вакцины, содержащие или полноразмерный ген PsaA, или усеченный ген PspA. Обе конструкции проявляют транзиторную экспрессию антигенов в клетках позвоночных и индуцированную выраженную реакцию антител на пневмококковые антигены у мышей BALB/c после внутримышечного введения.

Авторы Wuogimaetal. (2001, The Paediatric Infectious Disease Journal, том 20 (3), стр. 272-277), проводили исследование с участием здоровых детей раннего возраста с целью оценки переносимости и иммуногенности 11-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины, в которой в качестве носителей использовали и TT и DT.

Авторы Gatchalian et al. (2001, 17th Annual Meeting of the Eur. Soc. Paed. Inf. Dis. (ESPID), стендовое сообщение № 4, P1A, стендовая сессия 1, Стамбул, Турция) приводят результаты опсонофагоцитарного анализа (OPA) у детей после введения 11-валентной вакцины, без проявления реакции антител на серотип 3 на уровне, который сопоставим с реакциями на другие исследуемые серотипы.

Авторы Anderson et al. (2003, Vaccine, 21 (13-14): 1554-9) описывают сравнительное исследование четырехвалентных конъюгированных вакцин с каждым из полисахаридных типов 6A, 14, 19F и 23F по отдельности, в комбинации со столбнячным анатоксином или дифтерийным CRM<sub>197</sub>, или со смесью из половины доз полисахаридных типов 6A, 14, 19F и 23F по отдельности, в комбинации со столбнячным анатоксином и дифтерийным CRM<sub>197</sub>.

Авторы Nurkkaet al. (2004, Ped. Inf. Dis J., 23: 1008-1014) проводили исследование иммуногенности и безопасности 11-валентной вакцины, конъюгированной с пневмококковым белком D, при этом у серотипа 3 не выявлено примиряющего эффекта в случае введения детям раннего возраста, которые получили три дозы вакцины с последующей бустерной дозой или такой же вакцины или пневмококковой полисахаридной вакцины.

В указанных выше ссылках раскрыты, наряду с другими композициями, способами и т.п., поливалентные пневмококковые вакцины, содержащие полисахариды из одного или более серотипов, а также конъюгирование этих полисахаридов с белками-носителями, такими как CRM<sub>197</sub>, белок D, DT и TT. Учитывая, что в разных регионах преобладают разные серотипы, существует потребность в дополнительных поливалентных пневмококковых вакцинах, содержащих новые конъюгаты полисахаридов из серотипов с улучшенной иммунной реакцией, а также в простом и эффективном способе их производства.

#### **Сущность изобретения**

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококковой вакцины, и указанная композиция содержит два или более капсульных пневмококковых полисахарида из серотипов, и каждый из них по отдельности конъюгирован с пневмококковым поверхностным белком адгезии A (PsaA) или с комбинацией PsaA и CRM<sub>197</sub> в качестве белков-носителей.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения относится к композиции пневмококковой вакцины, которая представляет собой композицию 10-валентной, 14-валентной, 15-валентной, 17-валентной, 18-валентной, 19-валентной, 20-валентной, 22-валентной, 23-валентной, 24-валентной или 25-валентной пневмококковой вакцины.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей пневмококковые полисахариды из каждого из серотипов, выбранных из пневмококковых серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей пневмококковые полисахариды из каждого из серотипов, выбранных из пневмококковых серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45, которые конъюгированы с пневмококковым поверхностным белком A адгезии (PsaA) в качестве белка-носителя.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей пневмококковые полисахариды из серотипов, выбранных из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45, которые конъюгированы с пневмококковым поверхностным белком адгезии A (PsaA) или с комбинацией PsaA и CRM<sub>197</sub> в качестве белков-носителей.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей пневмококковые полисахариды из серотипов, выбранных из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45, при этом по меньшей мере 3 пневмококковых полисахарида конъюгированы с пневмококковым поверхностным белком A адгезии (PsaA).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей пневмококковые полисахариды из серотипов 3, 6A, 6B, конъюгированные с пневмококковым поверхностным белком A адгезии (PsaA).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей по меньшей мере 10 пневмококковых полисахаридов, выбранных из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45, и белки-носители включают PsaA или комбинацию PsaA и CRM<sub>197</sub>.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей по меньшей мере 14 пневмококковых полисахаридных конъюгатов.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей по меньшей мере 17 пневмококковых полисахаридных конъюгатов.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей по меньшей мере 19 пневмококковых полисахаридных конъюгатов.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей по меньшей мере 20 пневмококковых полисахаридных конъюгатов.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей по меньшей мере 22 пневмококковых полисахаридных конъюгатов.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей по меньшей мере 24 пневмококковых полисахаридных конъюгатов.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей белок-носитель и пневмококковые полисахариды из двух или более серотипов, при этом серотипы выбраны из серотипов 3, 5, 6A, 6B, 9V и 18C, и белком-носителем является PsaA.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей белок-носитель и пневмококковые полисахариды из двух или более серотипов, при этом серотипы выбраны из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 19A и 22F, и белком-носителем является PsaA.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к композиции пневмококковой



В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к 22-валентной пневмококковой вакцине, содержащей пневмококковые полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B и 38, при этом по меньшей мере серотипы 3, 6A и 6B конъюгированы с PsaA, и один или более из серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 3 и 38 конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к 22-валентной пневмококковой вакцине, содержащей пневмококковые полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B и 38, при этом серотипы 1, 3, 6, 10, 12F, 15A, 15B, 22F, 34, 35B и 38 конъюгированы с PsaA, и серотипы 14, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F и 33F конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к 24-валентной пневмококковой вакцине, содержащей пневмококковые полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B и 38, при этом по меньшей мере серотипы 3, 6A и 6B конъюгированы с PsaA, и один или более из серотипов 1, 4, 5, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B и 38 конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к 24-валентной пневмококковой вакцине, содержащей пневмококковые полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9B, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B и 38, при этом серотипы 1, 3, 6A, 8, 10A, 12F, 15A, 15B, 16F, 22F, 34, 35 и 38 конъюгированы с PsaA, и один или более из серотипов 14, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F и 33F конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококковой вакцины, полученной в виде стандартной лекарственной формы.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококковой вакцины, полученной в виде стандартной лекарственной формы, при этом стандартная лекарственная форма содержит от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 50 мкг каждого полисахарида, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 10 мкг, или от приблизительно 1 мкг до приблизительно 5 мкг каждого полисахарида, при этом каждый полисахарид по отдельности конъюгирован с белком-носителем, и количество белка-носителя составляет от приблизительно 1,5 мкг до приблизительно 5 мкг.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей фармацевтически приемлемые вещества, такие как разбавитель, буфер, консервант, стабилизатор, адъювант и/или лиофилизирующий эксципиент.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококковой вакцины, полученной в виде стандартной лекарственной формы, которая поставляется как флакон с единичной дозой, флакон с несколькими дозами или предварительно заполненный шприц.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококковой вакцины в виде разовой дозы 0,5 мл, и указанная разовая доза содержит: один или более пневмококковых полисахаридов в количестве от приблизительно 2,2 до 4,4 мкг; PsaA в количестве от приблизительно 1 мкг до приблизительно 10 мкг, конъюгированный с каждым из одного или более пневмококковых полисахаридов; CRM<sub>197</sub> в количестве от приблизительно 1 мкг до приблизительно 10 мкг, конъюгированный с каждым из одного или более пневмококковых полисахаридов; адъювант фосфат алюминия в количестве от приблизительно 0,2 мг до приблизительно 1 мг; и эксципиент.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к 13-валентной пневмококковой вакцине, содержащей пневмококковые полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F и 33F, каждый из которых по отдельности конъюгирован с PsaA или с комбинацией PsaA и CRM<sub>197</sub>, при этом доза композиции пневмококковой вакцины составляет приблизительно 0,5 мл, и композиция получена в виде стерильной жидкости, содержащей каждый полисахарид в количестве от приблизительно 2,2 мкг до приблизительно 4,4 мкг, PsaA и CRM<sub>197</sub> в количестве от приблизительно 25 мкг до приблизительно 30 мкг, хлорид натрия и L-гистидиновый буфер, и элементарный алюминий в количестве приблизительно 0,125 мг в виде приблизительно 0,5 мг фосфата алюминия.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к 14-валентной пневмококковой вакцине, содержащей пневмококковые полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, каждый из которых по отдельности конъюгирован с PsaA или с комбинацией PsaA и CRM<sub>197</sub>, при этом доза композиции пневмококковой вакцины составляет приблизительно 0,5 мл, и композиция получена в виде стерильной жидкости, содержащей каждый полисахарид в количестве от приблизительно 2,2 мкг до приблизительно 4,4 мкг, PsaA и CRM<sub>197</sub> в количестве от приблизительно 30 мкг до приблизительно 35 мкг, хлорид натрия и L-гистидиновый буфер, и элементарный алюминий в количестве приблизительно 0,125 мг в виде приблизительно 0,5 мг фосфата алюминия.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к 14-валентной пневмококковой вакцине, содержащей пневмококковые полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, каждый из которых по отдельности конъюгирован с PsaA или комбинацией PsaA и CRM<sub>197</sub>, при этом доза композиции пневмококковой вакцины составляет приблизительно 0,5 мл, и композиция получена в виде стерильной жидкости, содержащей от приблизительно 2,2 до 4,4 мкг каж-



### Краткое описание фигур

Фиг. 1: хроматограмма эксклюзионной ВЭЖХ показывает кинетику реакции конъюгирования серотипа 7F (A), серотипа 14 (B), серотипа 19F (C), серотипа 3 (D), серотипа 6A (E) и серотипа 6B (F).

Фиг. 2: хроматограмма эксклюзионной ВЭЖХ показывает кинетику реакции конъюгирования серотипа 5 (A), серотипа 9V (B), серотипа 18C (C), серотипа 3 (D), серотипа 6A (E) и серотипа 6B (F).

Фиг. 3: иммунный ответ на различные серотипы у кроликов, иммунизированных с композицией по настоящему изобретению, как описано в примере 3.

Фиг. 4: иммунный ответ на различные серотипы у кроликов, иммунизированных вакциной Prevnar 13®.

Фиг. 5: иммунный ответ на различные серотипы у кроликов, иммунизированных другой композицией настоящего изобретения, описанной в примере 4.

### Подробное описание

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей пневмококковые полисахариды, в которой один или более пневмококковых полисахаридов представляют собой нативные пневмококковые полисахариды.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей пневмококковые полисахариды, в которой один или более пневмококковых полисахаридов фрагментированы, и средняя молекулярная масса каждого из фрагментированных пневмококковых полисахаридов меньше, чем у нативного пневмококкового полисахарида.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей пневмококковые полисахариды, в которой каждый из пневмококковых полисахаридов перед конъюгированием с белком-носителем активирован посредством 1-циано-4-диметиламинопиридиниятетрафторбората (CDAP) с образованием эфира циановой кислоты.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей пневмококковые полисахариды, в которой один или более пневмококковых полисахаридов, присоединены к аминокгруппе белка-носителя напрямую или присоединены к аминокгруппе с помощью спейсера.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей пневмококковые полисахариды, в котором спейсером является цистамин, цистеамин, гександиамин, дигидразид адипиновой кислоты (ADH), EDAC или EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей пневмококковые полисахариды из одного или более серотипов и белок-носитель, при этом белок-носитель PsaA представляет собой модифицированный PsaA и не содержит гидрофобный N-концевой лидерный пептид дикого типа.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей пневмококковые полисахариды из одного или более серотипов и белок-носитель, при этом белок-носитель PsaA содержит 290 аминокислот.

Настоящее изобретение относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей два или более серотипов капсульных пневмококковых полисахаридов, каждый из которых по отдельности конъюгирован с белком-носителем, и в настоящем изобретении это называется конъюгатами полисахарид-белок и/или конъюгатами. Если эти конъюгаты включены в композицию пневмококковой вакцины по изобретению, пневмококковая вакцина является поливалентной вакциной с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок (также называемой в изобретении поливалентной конъюгированной вакциной, конъюгированной вакциной и/или полисахарид-белковой конъюгированной вакциной). В дополнение к поливалентной конъюгированной вакцине, настоящее изобретение относится к способу получения и/или введения такой вакцины пациенту.

В некоторых вариантах осуществления композиция пневмококковой вакцины является поливалентной иммуногенной композицией, содержащей один или более конъюгатов. Например, конъюгаты могут включать два или более пневмококковых полисахаридов, и каждый из пневмококковых полисахаридов выбран из пневмококковых полисахаридов, относящихся к серотипам 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45.

В некоторых вариантах осуществления композиция пневмококковой вакцины является поливалентной и включает пять пневмококковых полисахаридов (5-валентная), десять пневмококковых полисахаридов (10-валентная), одиннадцать пневмококковых полисахаридов (11-валентная), двенадцать пневмококковых полисахаридов (12-валентная), тринадцать пневмококковых полисахаридов (13-валентная), четырнадцать пневмококковых полисахаридов (14-валентная), пятнадцать пневмококковых полисахаридов (15-валентная), шестнадцать пневмококковых полисахаридов (16-валентная), семнадцать пневмококковых полисахаридов (17-валентная), восемнадцать пневмококковых полисахаридов (18-валентная), девятнадцать пневмококковых полисахаридов (19-валентная), двадцать пневмококковых полисахаридов (20-валентная), двадцать один пневмококковый полисахарид (21-валентная), двадцать два пневмококковых

полисахарида (22-валентная), двадцать три пневмококковых полисахарида (23-валентная), двадцать четыре пневмококковых полисахарида (24-валентная), двадцать пять пневмококковых полисахаридов (25-валентная), двадцать шесть пневмококковых полисахаридов (26-валентная), двадцать семь пневмококковых полисахаридов (27-валентная), двадцать восемь пневмококковых полисахаридов (28-валентная), двадцать девять пневмококковых полисахаридов (29-валентная) или тридцать пневмококковых полисахаридов (30-валентная). В других вариантах осуществления композиция пневмококковой вакцины представляет собой композицию 10-валентной, 14-валентной, 15-валентной, 17-валентной, 18-валентной, 19-валентной, 20-валентной, 22-валентной, 23-валентной, 24-валентной или 25-валентной пневмококковой вакцины.

Неожиданно выявлено, что композиции поливалентных пневмококковых конъюгированных вакцин согласно настоящему изобретению дают улучшенный иммунный ответ по сравнению с поливалентными пневмококковыми вакцинами, содержащими пневмококковые полисахариды, не конъюгированные с белками-носителями. Более конкретно, композиции поливалентных пневмококковых конъюгированных вакцин по настоящему изобретению, к удивлению, оказались наиболее эффективными, когда пневмококковые полисахариды из одного или более серотипов *Streptococcus pneumoniae* были конъюгированы с PsaA и/или CRM<sub>197</sub>.

Белки-носители представляют собой нетоксичные и не реактогенные белки, которые могут быть получены в достаточном количестве и с достаточной степенью чистоты. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококковой конъюгированной вакцины, содержащей один или более белков-носителей, конъюгированных с одним или несколькими полисахаридами *S. pneumoniae* (которые в настоящем изобретении называются "пневмококковым полисахаридом"). Путем конъюгирования пневмококкового полисахарида с белком-носителем увеличивается иммуногенность этого пневмококкового полисахарида по сравнению с неконъюгированным пневмококковым полисахаридом. Подходящие для настоящего изобретения белки-носители должны быть пригодны для стандартных методик конъюгирования.

Белок CRM<sub>197</sub> представляет собой вариант дифтерийного токсина и является нетоксичным для использования в вакцинах. Можно выделять CRM<sub>197</sub> из культуры штамма C7 (β197) *Corynebacterium diphtheriae*, выращенной в среде на основе казаминокислот и дрожжевого экстракта. Можно получать CRM<sub>197</sub> с помощью рекомбинантной технологии в соответствии со способами, описанными в патенте США № 5614382. В качестве альтернативы, CRM<sub>197</sub> могут быть получены рекомбинантно в соответствии с известными в литературе способами, или в соответствии со способом, описанным в опубликованной заявке РСТ WO 2016/079755. Можно выполнять очистку CRM<sub>197</sub> путем ультрафильтрации, преципитации сульфатом аммония, ионообменной хроматографии или другими способами, хорошо известными в данной области.

В некоторых вариантах осуществления пневмококковые полисахариды согласно настоящему изобретению конъюгированы с одним или несколькими белками-носителями. Например, каждый по отдельности пневмококковый полисахарид конъюгирован с белком-носителем. В других вариантах осуществления пневмококковой полисахарида, в количестве более одного, конъюгирован с белком-носителем. Например, два пневмококковых полисахарида, три пневмококковых полисахарида, четыре пневмококковых полисахарида, пять пневмококковых полисахаридов, шесть пневмококковых полисахаридов, семь пневмококковых полисахаридов, восемь пневмококковых полисахаридов, девять пневмококковых полисахаридов или десять пневмококковых полисахаридов конъюгированы с белком-носителем. В некоторых вариантах осуществления пневмококковый полисахарид конъюгирован более чем с одним белком-носителем. Например, пневмококковый полисахарид конъюгирован с одним белком-носителем, двумя белками-носителями, тремя белками-носителями и/или четырьмя белками-носителями.

В некоторых вариантах осуществления изобретения белок-носитель представляет собой PsaA. В дополнительных вариантах осуществления используется комбинация белков-носителей, которая включает два или более белков-носителей, таких как PsaA и CRM<sub>197</sub>, каждый из которых по отдельности конъюгирован с каждым из пневмококковых полисахаридов. В других вариантах осуществления белком-носителем являются два белка-носителя, включающие PsaA и CRM<sub>197</sub>.

В некоторых вариантах осуществления белок-носитель выбран из одного или более следующих белков-носителей: PsaA, CRM<sub>197</sub>, инактивированные бактериальные токсины, такие как столбнячный анатоксин, коклюшный анатоксин, холерный анатоксин, экзотоксин А из синегнойной палочки, бактериальные белки наружной мембраны, такие как белковый комплекс наружной мембраны (ОМРС), порины, трансферрин-связывающие белки, пневмолизин, PspA, пептидаза C5a из стрептококка группы А или группы В или белок D из *Haemophilus influenzae*, овальбумин, гемоцианин, (гемоцианин лимфы улитки KLN), бычий сывороточный альбумин (БСА) и очищенный белковый дериват туберкулина (PPD).

Кроме того, один или более конъюгатов может включать нативные белки-носители (например, дикого типа), и/или один или более конъюгатов может включать белки-носители, модифицированные из их нативной формы в ненативную форму (например, белки, лишенные одной или нескольких аминокислот генно-инженерным способом). В некоторых вариантах осуществления белки-носители можно конструировать с удалением одного или более белковых доменов, таких как лидерный пептид, или с удалением

других доменов, которые могут иметь нежелательные для конъюгатов согласно настоящему изобретению свойства. Например, PsaA может представлять собой белок-носитель из 290 аминокислот, сконструированный с отсутствием гидрофобного N-концевого лидерного пептида, имеющего индекс гидропатии 2,052.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к вакцинной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которая содержит пневмококковые полисахариды (например, капсульные пневмококковые полисахариды), выбранные из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45. Каждый из выбранных пневмококковых полисахаридов по отдельности конъюгирован с белком-носителем PsaA, или первая часть из выбранных пневмококковых полисахаридов конъюгирована с PsaA, и вторая часть из выбранных пневмококковых полисахаридов конъюгирована с CRM<sub>197</sub>. В любом из этих вариантов осуществления вакцинная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок представляет собой иммуногенную поливалентную композицию с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, такую как 10-валентная, 13-валентная, 14-валентная, 15-валентная, 17-валентная, 18-валентная, 19-валентная, 20-валентная, 22-валентная, 23-валентная, 24-валентная или 25-валентная иммуногенная поливалентная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к вакцинной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которая содержит пневмококковые полисахариды (например, капсульные пневмококковые полисахариды), выбранные из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45. Каждый из выбранных пневмококковых полисахаридов по отдельности конъюгирован с белком-носителем PsaA. В других вариантах осуществления первая часть из выбранных пневмококковых полисахаридов конъюгирована с PsaA, и вторая часть из выбранных пневмококковых полисахаридов конъюгирована с CRM<sub>197</sub>. В любом из этих вариантов осуществления вакцинная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок представляет собой иммуногенную поливалентную композицию с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, такую как 10-валентная, 13-валентная, 14-валентная, 15-валентная, 17-валентная, 18-валентная, 19-валентная, 20-валентная, 22-валентная, 23-валентная, 24-валентная или 25-валентная иммуногенная поливалентная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок.

Еще в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к вакцинной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которая содержит пневмококковые полисахариды (например, капсульные пневмококковые полисахариды), выбранные из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45. В этих вариантах осуществления по меньшей мере три из выбранных пневмококковых полисахаридов по отдельности конъюгированы с белком-носителем PsaA, и каждый из дополнительных пневмококковых полисахаридов по отдельности конъюгирован с белком-носителем CRM<sub>197</sub>. В любом из этих вариантов осуществления вакцинная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок представляет собой иммуногенную поливалентную композицию с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, такую как 10-валентная, 13-валентная, 14-валентная, 15-валентная, 17-валентная, 18-валентная, 19-валентная, 20-валентная, 22-валентная, 23-валентная, 24-валентная или 25-валентная иммуногенная поливалентная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок.

Еще в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к вакцинной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которая содержит пневмококковые полисахариды (например, капсульные пневмококковые полисахариды), выбранные из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45. В этих вариантах осуществления по меньшей мере первые пять из выбранных пневмококковых полисахаридов, каждый по отдельности, конъюгированы с белком-носителем PsaA, и по меньшей мере вторые пять полисахаридов, каждый по отдельности, конъюгированы с белком-носителем CRM<sub>197</sub>. Первые пять из выбранных пневмококковых полисахаридов выбраны из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45, и вторые пять полисахаридов выбраны из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45. В других вариантах осуществления первая часть из выбранных пневмококковых полисахаридов конъюгирована с PsaA, и вторую часть из выбранных пневмококковых полисахаридов конъюгирована с CRM<sub>197</sub>. В любом из этих вариантов осуществления вакцинная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок представляет собой иммуногенную поливалентную композицию с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, такую как 10-валентная, 14-валентная, 15-валентная, 17-валентная, 18-валентная, 19-валентная, 20-валентная, 22-валентная, 23-валентная, 24-валентная или 25-валентная иммуногенная поливалентная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок.



бренные из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45, которые конъюгированы с PsaA. Кроме того, композиция 25-валентной вакцины с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок дополнительно содержит по меньшей мере пять пневмококковых полисахаридов, выбранных из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45, которые конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции 14-валентной вакцины с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которая содержит пневмококковые полисахариды (например, капсульные пневмококковые полисахариды), выбранные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F. По меньшей мере серотип 3 и серотип 6B из выбранных серотипов конъюгированы с PsaA, и каждый из одного или более серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции 14-валентной вакцины с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которая содержит пневмококковые полисахариды (например, капсульные пневмококковые полисахариды), выбранные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F. По меньшей мере серотип 3 и серотип 6A из выбранных серотипов конъюгирован с PsaA, и каждый из одного или более серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции 15-валентной вакцины с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которая содержит пневмококковые полисахариды (например, капсульные пневмококковые полисахариды), выбранные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F. По меньшей мере серотипы 3, 6A и 6B из выбранных серотипов конъюгированы с PsaA, и каждый из одного или более серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции 17-валентной вакцины с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которая содержит пневмококковые полисахариды (например, капсульные пневмококковые полисахариды), выбранные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F и 35B. По меньшей мере серотипы 3, 6A и 6B из выбранных серотипов конъюгированы с PsaA, и каждый из одного или более серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F и 35B конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции 20-валентной вакцины с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которая содержит пневмококковые полисахариды (например, капсульные пневмококковые полисахариды), выбранные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 11, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B и 45. По меньшей мере серотипы 3, 6A и 6B из выбранных серотипов конъюгированы с PsaA, и каждый из одного или более серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B и 45 конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции 22-валентной вакцины с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которая содержит пневмококковые полисахариды (например, капсульные пневмококковые полисахариды), выбранные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B и 38. По меньшей мере серотипы 3, 6A и 6B из выбранных серотипов конъюгированы с PsaA, и каждый из одного или более серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B и 38 конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции 22-валентной вакцины с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которая содержит пневмококковые полисахариды (например, капсульные пневмококковые полисахариды), выбранные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B и 38. Серотипы 1, 3, 6A, 10A, 12F, 15A, 15B, 22F, 34, 35 и 38 из выбранных серотипов конъюгированы с PsaA, и каждый из серотипов 14, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19, 19F, 23F и 33F конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции 24-валентной вакцины с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которая содержит пневмококковые полисахариды (например, капсульные пневмококковые полисахариды), выбранные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B и 38. Серотипы 1, 3, 6A, 8, 10A, 12F, 15A, 15B, 16F, 22F, 34, 35 и 38 из выбранных серотипов конъюгированы с PsaA, и каждый из серотипов 14, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F и 33F конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

Композиции конъюгатов пневмококковый полисахарид-белок по настоящему изобретению дополнительно содержат одно или несколько из следующих веществ: фармацевтически приемлемый носитель, фармацевтически приемлемый разбавитель, буфер, консервант, стабилизатор, адъювант и/или лиофилирующее эксципиент. Например, композиции конъюгатов пневмококковый полисахарид-белок по настоящему изобретению могут содержать фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления композиции конъюгатов пневмококковый полисахарид-белок по настоящему изобретению содержат по меньшей мере 10 пневмококковых полисахаридов, выбранных из серотипов 1, 2, 3, 4,

5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45. Каждый из выбранных серотипов по отдельности конъюгирован с PsaA или с комбинацией PsaA и CRM<sub>197</sub>, и с фармацевтически приемлемым носителем.

В некоторых вариантах осуществления пневмококковые полисахариды, используемые в композициях по настоящему изобретению, могут быть выделены из одного или более микроорганизмов (например, из пневмококков) в соответствии с общепринятыми способами. Например, пневмококковые полисахариды могут быть получены в соответствии с известными методиками. Кроме того, очистку пневмококковых полисахаридов можно выполнять в соответствии с описанным в публикации PCT WO 2016/174683 A1 способом.

Выделенные пневмококковые полисахариды могут быть очищены в соответствии с общепринятыми способами и могут быть использованы в своей нативной форме. В других вариантах осуществления, выделенные и очищенные пневмококковые полисахариды могут быть фрагментированы для получения одного или более фрагментов пневмококковых полисахаридов, и средняя молекулярная масса каждого их фрагментов пневмококкового полисахарида меньше, чем средняя молекулярная масса выделенных и очищенных пневмококковых полисахаридов.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей пневмококковые полисахариды, и размер молекул каждого из пневмококковых полисахаридов находится в диапазоне от приблизительно 150 до 450 кДа.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей один или более серотипов капсульных пневмококковых полисахаридов, каждый из которых по отдельности конъюгирован с белком-носителем, например, в виде конъюгата полисахарид-белок, при этом каждый конъюгат полисахарид-белок имеет молекулярную массу от приблизительно 1500 до приблизительно 15000 кДа.

В других вариантах осуществления выделенные и очищенные пневмококковые полисахариды перед конъюгированием с одним или несколькими белками-носителями могут быть активированы. Например, выделенные и очищенные пневмококковые полисахариды могут быть активированы (например, путем химической реакции) перед конъюгированием с одним или несколькими белками-носителями. Каждый из активированных пневмококковых полисахаридов может быть по отдельности конъюгирован с белком-носителем, с образованием конъюгата полисахарид-белок (например, гликоконъюгата). В других вариантах осуществления один или более из активированных пневмококковых полисахаридов могут быть конъюгированы с отдельным белком-носителем, и/или активированный пневмококковый полисахарид может быть конъюгирован с отдельным белком-носителем. Конъюгаты могут быть получены известными способами.

В некоторых вариантах осуществления пневмококковые полисахариды могут быть активированы химическим способом, а затем конъюгированы с белками-носителями в соответствии с известными способами, например, способами, описанными в патентах США №№ 4365170, 4673574 и 4902506. Например, пневмококковые полисахариды могут быть активированы путем окисления концевой гидроксильной группы до альдегида с помощью окислителя, такого как периодат (например, периодат натрия, периодат калия или периодическая кислота), путем случайного окислительного расщепления одной или нескольких vicинальных гидроксильных групп углеводов и образования одной или нескольких реактивных альдегидных групп.

Пневмококковые полисахариды могут быть также активированы с помощью CDAP (1-циано-4-диметиламино-пиридиний тетрафторбората), с последующим конъюгированием с одним или несколькими белками-носителями, такими как PsaA, CRM<sub>197</sub>, PspA или с их комбинацией. В других вариантах осуществления пневмококковые полисахариды, активированные посредством CDAP для образования цианатного эфира, могут быть напрямую конъюгированы с одним или несколькими белками-носителями, или конъюгированы с помощью спейсера (например, линкера). Спейсер может присоединяться к аминокгруппе на белке-носителе. В некоторых вариантах осуществления спейсером могут быть цистамин или цистеамин, которые образуют тиолированный полисахарид, способный соединяться с белком-носителем посредством тиоэфирной связи с малеимид-активированным белком-носителем (например, с помощью GMBS (N-(g-малеимидобутирилокси)сульфосукцинимидный эфир) или с галоацетилованным белком-носителем (например, с использованием йодацетимида, этил-йодацетимада HCl, SIAB (N-сукцинимидил-(4-йодацетат)-аминобензоат), SIA (N-сукцинимидил-йодацетат), SBAP (N-сукцинимидил-3-(бромацетатамидо)пропионат) и/или N-сукцинимидил-бромацетата. В других вариантах осуществления цианатный эфир присоединяется с помощью гександиамина или дигидразида адипиновой кислоты (ADH), и аминок-дериватизированный сахарид конъюгируется с белком-носителем посредством химической реакции с карбодимидом (например, EDAC или EDC) через карбоксильную группу на белке-носителе. Такие конъюгаты описаны в опубликованной международной патентной заявке № WO 93/15760, опубликованной международной патентной заявке № WO 95/08348, опубликованной международной патентной заявке № WO 96/29094 и в литературе, см. Chu et al., 1983, Infect. Immunity 40:245-256.

Другие подходящие способы активации и/или присоединения, предназначенные для использования

с полисахарид-белковыми конъюгатами и вакцинными композициями по изобретению, включают способы с использованием карбодиимидов, гидразидов, активных сложных эфиров, норборана, р-нитробензойной кислоты, N-гидроксисукцинимиды, S-NHS, EDC, TSTU, и другие способы, описанные в опубликованной международной патентной заявке WO 98/42721. Например, для конъюгирования можно задействовать карбонильный линкер, который может быть получен путем реакции свободной гидроксильной группы сахара с GDI (1,1'-карбонилдиимидазол) (см. Bethell et al. J. Biol. Chem. 1979, 254: 2572-4; Hearn et al. J. Chromatogr. 1981, 218: 509-18) и последующего взаимодействия с белком с образованием карбаматной связи. В некоторых вариантах осуществления можно применять восстановление аномерного конца до первичной гидроксильной группы, необязательно введение защиты/снятие защиты первичной гидроксильной группы, взаимодействие первичной гидроксильной группы с CDI с образованием CDI-карбаматного промежуточного соединения и присоединение CDI-карбаматного промежуточного соединения к аминогруппе на белке.

Например, другие подходящие способы активации и/или присоединения, используемые для вакцинных композиций с полисахаридно-белковыми конъюгатами по изобретению, включают следующий способ: сортированные по размеру пневмококковые полисахариды (например, приблизительно 6 мл сортированных по размеру полисахаридов в концентрации приблизительно 10 мг/мл) и CDAP (например, приблизительно 100 мг/мл в ацетонитриле (вес/объем)) можно смешивать в стеклянной пробирке в соотношении приблизительно 1 приблизительно (например, взбалтыванием в течение приблизительно 1 минуты). При необходимости можно регулировать уровень pH раствора полисахарида (например, до приблизительно 9,25 с помощью приблизительно 0,2М триэтиламина, с взбалтыванием в течение 3 мин при комнатной температуре). Дополнительно, к активированным пневмококковым полисахаридам можно медленно добавлять PsaA (например, приблизительно 4 мл раствора в концентрации приблизительно 15 мг/мл) (например, в соотношении приблизительно 1 приблизительно к 1 (полисахарид: белок-носитель)). Можно регулировать уровень pH реакции (например, до приблизительно 9,05 с помощью 0,2 М триметиламина), и можно продолжать реакцию (например, путем взбалтывания в течение 5 ч при комнатной температуре). Реакцию смеси можно подавлять (например, путем добавления глицина в избыточной концентрации).

В некоторых вариантах осуществления реакцию смесь можно подвергать диафильтрации с использованием мембраны (например, мембраны 100 K MWCO с отсечением по молекулярной массе), и можно очищать способом гель-хроматографии. После диафильтрации и очистки можно анализировать фракции путем эксклюзионной хроматографии с детекцией многоугольного лазерного рассеивания (SEC-MALLS) и способом с использованием антрона. После анализа содержащие конъюгаты фракции можно объединять и фильтровать в стерильных условиях (например, с помощью 0,2 мкм фильтров).

После конъюгирования пневмококковых полисахаридов с одним или несколькими белками-носителями конъюгаты полисахарид-белок можно подвергать очистке разными способами (например, обогащать в плане количества конъюгата полисахарид-белок). Эти способы включают без ограничения методики концентрации/диафильтрации, осаждения/элюирования, колоночную хроматографию и глубинную фильтрацию. Например, после очистки конъюгатов из этих конъюгатов можно составлять композиции конъюгированных пневмококковых полисахаридов и белков по изобретению, которые можно применять в качестве вакцин.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата полисахарид-белок для композиции пневмококковой вакцины, описанной в изобретении, и указанный способ дополнительно включает введение конъюгата пневмококковый полисахарид-белок в состав вакцинной композиции, включающей адьювант, буфер и эксципиент.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата полисахарид-белок для композиции пневмококковой вакцины, описанной в изобретении, при этом адьювант представляет собой фосфат алюминия.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения нуждающегося в этом пациента, и указанный способ включает введение описанной в изобретении композиции пневмококковой вакцины нуждающемуся в этом пациенту.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет заболевание, обусловленное *streptococcus pneumoniae*, например, инвазивную пневмококковую инфекцию (IPD).

В одном варианте осуществления пациентом является человек, например, младенец (в возрасте приблизительно меньше 1 года), ребенок раннего возраста (от приблизительно 12 месяцев до приблизительно 24 месяцев), ребенок младшего дошкольного возраста (от приблизительно 2-х лет до приблизительно 5 лет), ребенок старшего дошкольного и младшего школьного возраста (от приблизительно 5 лет до приблизительно 13 лет), подросток (от приблизительно 13 лет до приблизительно 18 лет), взрослый человек (от приблизительно 18 лет до приблизительно 65 лет) или человек старшего возраста (старше 65 лет).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу индукции иммунного ответа на капсульный полисахаридный конъюгат *S.pneumoniae*, и указанный способ включает введение пациенту иммунологически эффективного количества композиции пневмококковой вакцины,

описанной в изобретении.

В одном варианте осуществления способ индукции иммунного ответа на капсульный полисахаридный конъюгат *S.pneumoniae* включает введение пациенту описанной в изобретении композиции пневмококковой вакцины системным, подкожным путем и/или введение в слизистую оболочку.

В некоторых вариантах осуществления количество каждого конъюгата в дозе вакцинных композиций по изобретению представляет собой количество, которое достаточно для индукции иммунопротективного ответа, а именно, иммунопротективного ответа без значительных нежелательных эффектов. Количество каждого конъюгата можно варьировать в зависимости от пневмококкового серотипа, вместе с тем, каждая доза вакцинных композиций может содержать от приблизительно 0,1 до приблизительно 50 мкг каждого из пневмококковых полисахаридов, от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 мкг, или от приблизительно 1 до приблизительно 5 мкг каждого из пневмококковых полисахаридов, конъюгированных с каждым белком-носителем, и содержать белок-носитель в количестве от приблизительно 1,5 до приблизительно 5 мкг.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции пневмококковой вакцины, содержащей пневмококковые полисахариды и белки-носители, и в такой композиции пневмококковой вакцины процентное отношение белка к полисахариду (белок/ПС) составляет от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, и предпочтительное соотношение белок/ПС составляет от 0,7 до 1,2.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к вакцинным композициям с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которые содержат пневмококковые полисахариды с молекулярной массой в диапазоне от приблизительно 100 до приблизительно 400 кДа, от приблизительно 125 до приблизительно 425 кДа, от приблизительно 150 до приблизительно 450 кДа, от приблизительно 175 до приблизительно 475 кДа, от приблизительно 200 до приблизительно 500 кДа, от приблизительно 250 до приблизительно 550 кДа или от приблизительно 300 до приблизительно 600 кДа.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к вакцинным композициям с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, содержащим один или более конъюгатов полисахарид-белок, молекулярная масса которых находится в диапазоне от приблизительно 1000 до приблизительно 10000 кДа, от приблизительно 1500 до приблизительно 15000 кДа, от приблизительно 2000 до приблизительно 20000 кДа, от приблизительно 2500 до приблизительно 25000 кДа или от приблизительно 3000 до приблизительно 30000 кДа.

Вакцинные композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок согласно настоящему изобретению могут быть изготовлены с помощью известных способов. Так, например, можно делать вакцинные композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем, например, с водой или физиологическим раствором. Дополнительно, вакцинные композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок могут дополнительно содержать одно или несколько из следующих веществ: буфер, консервант или стабилизатор, полисорбат, адъювант, такой как соединения алюминия, например, гидроксид алюминия, фосфат алюминия или гидроксифосфат алюминия, и/или лиофилизирующее эксципиент. Можно делать выбор в отношении включения любого из указанных выше соединений в вакцинные композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок по изобретению в зависимости от способа и пути введения такой композиции нуждающемуся в этом пациенту, и дополнительно, можно исходить из стандартной фармацевтической практики.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения четырнадцати-валентной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которая содержит пневмококковые полисахариды, выбранные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, при этом по меньшей мере серотипы 3 и 6B конъюгированы с PsaA, и один или более из серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. Способ получения четырнадцати-валентной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок включает следующие этапы:

(a) раздельное конъюгирование одного или более из четырнадцати пневмококковых полисахаридов (например, активированных посредством CDAP) с иммуногенным белком-носителем, таким как PsaA и/или CRM<sub>197</sub>,

(b) диафильтрация и очистка конъюгатов с помощью эксклюзионной хроматографии,

(c) анализ очищенных фракций способом SEC-MALLS, объединение фракций, содержащих каждый из четырнадцати конъюгатов, и стерилизация посредством фильтрации моновалентных конъюгированных фракций, и

(d) составление композиции из четырнадцати конъюгатов (в количестве каждого серотипа, например, от приблизительно 2,2 до 4,4 мкг, PsaA в количестве от приблизительно 5 мкг до приблизительно 10 мкг, и CRM<sub>197</sub> в количестве от приблизительно 15 мкг до приблизительно 36 мкг), адъюванта (например, фосфата алюминия), вспомогательного вещества и буфера для получения четырнадцати-валентной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок.

В некоторых вариантах осуществления четырнадцати-валентная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок может проходить фильтрацию (например, в асептических условиях).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения четырнадцати-валентной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, и указанная композиция содержит пневмококковые полисахариды, выбранные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, при этом по меньшей мере серотипы 3 и 6A конъюгированы с PsaA, и один или более из серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. Способ получения четырнадцати-валентной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок включает следующие этапы:

(a) раздельное конъюгирование одного или более из четырнадцати пневмококковых полисахаридов (например, активированных посредством CDAP) с иммуногенным белком-носителем, таким как PsaA и/или CRM<sub>197</sub>,

(b) диафильтрация и очистка конъюгатов с помощью эксклюзионной хроматографии,

(c) анализ очищенных фракций способом SEC-MALLS, объединение фракций, содержащих каждый из четырнадцати конъюгатов, и стерилизация посредством фильтрации моновалентных конъюгированных фракций, и

(d) составление композиции из четырнадцати конъюгатов (в количестве каждого серотипа, например, от приблизительно 2,2 до 4,4 мкг, PsaA в количестве от приблизительно 5 мкг до приблизительно 10 мкг, и CRM<sub>197</sub> в количестве от приблизительно 15 мкг до приблизительно 36 мкг), адьюванта (например, фосфата алюминия), вспомогательного вещества и буфера для получения четырнадцати-валентной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок.

В некоторых вариантах осуществления четырнадцати-валентная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок может проходить фильтрацию (например, в асептических условиях).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения пятнадцати-валентной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которая содержит пневмококковые полисахариды, выбранные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, при этом по меньшей мере серотипы 3, 6A и 6B конъюгированы с PsaA, и один или более из серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. Способ получения пятнадцати-валентной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок включает следующие этапы:

(a) раздельное конъюгирование одного или более из пятнадцати пневмококковых полисахаридов (например, активированных посредством CDAP) с иммуногенным белком-носителем, таким как PsaA и/или CRM<sub>197</sub>,

(b) диафильтрация и очистка конъюгатов с помощью эксклюзионной хроматографии,

(c) анализ очищенных фракций способом SEC-MALLS, объединение фракций, содержащих каждый из пятнадцати конъюгатов, и стерилизация посредством фильтрации моновалентных конъюгированных фракций, и

(d) составление композиции из пятнадцати конъюгатов (в количестве каждого серотипа, например, от приблизительно 2,2 до 4,4 мкг, PsaA в количестве от приблизительно 5 мкг до приблизительно 20 мкг, и CRM<sub>197</sub> в количестве от приблизительно 20 мкг до приблизительно 40 мкг), адьюванта (например, фосфата алюминия), вспомогательного вещества и буфера для получения пятнадцати-валентной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок.

В некоторых вариантах осуществления пятнадцати-валентная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок может проходить фильтрацию (например, в асептических условиях).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения семнадцати-валентной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которая содержит пневмококковые полисахариды, выбранные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F и 35B, при этом по меньшей мере серотипы 3, 6A и 6B конъюгированы с PsaA, и один или более из серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F и 35B конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. Способ получения семнадцати-валентной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок включает следующие этапы:

(a) раздельное конъюгирование одного или более из семнадцати пневмококковых полисахаридов (например, активированных посредством CDAP) с иммуногенным белком-носителем, таким как PsaA и/или CRM<sub>197</sub>,

(b) диафильтрация и очистка конъюгатов с помощью эксклюзионной хроматографии,

(c) анализ очищенных фракций способом SEC-MALLS, объединение фракций, содержащих каждый из семнадцати конъюгатов, и стерилизация посредством фильтрации моновалентных конъюгированных фракций, и

(d) составление композиции из семнадцати конъюгатов (в количестве каждого серотипа, например, от приблизительно 2,2 до 4,4 мкг, PsaA в количестве от приблизительно 5 мкг до приблизительно 20 мкг, и CRM<sub>197</sub> в количестве от приблизительно 20 мкг до приблизительно 40 мкг), адьюванта (например, фосфата алюминия), вспомогательного вещества и буфера для получения семнадцати-валентной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок.

В некоторых вариантах осуществления семнадцати-валентная композиция с конъюгатом пневмо-

кокковый полисахарид-белок может проходить фильтрацию (например, в асептических условиях).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения двадцативалентной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которая содержит пневмококковые полисахариды, выбранные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B и 45, при этом по меньшей мере серотипы 3, 6A и 6B конъюгированы с PsaA, и один или более из серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B и 45 конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. Способ получения двадцативалентной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок включает следующие этапы:

(a) раздельное конъюгирование одного или более из двадцати пневмококковых полисахаридов (например, активированных посредством CDAP) с иммуногенным белком-носителем, таким как PsaA и/или CRM<sub>197</sub>,

(b) диафильтрация и очистка конъюгатов с помощью эксклюзионной хроматографии,

(c) анализ очищенных фракций способом SEC-MALLS, объединение фракций, содержащих каждый из двадцати конъюгатов, и стерилизация посредством фильтрации моновалентных конъюгированных фракций, и

(d) составление композиции из двадцати конъюгатов (в количестве каждого серотипа, например, от приблизительно 2,2 до 4,4 мкг, PsaA в количестве от приблизительно 5 мкг до приблизительно 20 мкг, и CRM<sub>197</sub> в количестве от приблизительно 20 мкг до приблизительно 50 мкг), адъюванта (например, фосфата алюминия), вспомогательного вещества и буфера для получения двадцати-валентной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок.

В некоторых вариантах осуществления двадцативалентная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок может проходить фильтрацию (например, в асептических условиях).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения двадцати двух валентной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которая содержит один или более пневмококковых полисахаридов, выбранных из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B и 38, при этом по меньшей мере серотипы 3, 6A и 6B конъюгированы с PsaA, и один или более из серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B и 38 конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. Способ получения двадцати двух валентной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок включает следующие этапы:

(a) раздельное конъюгирование одного или более из двадцати двух пневмококковых полисахаридов (например, активированных посредством CDAP) с иммуногенным белком-носителем, таким как PsaA и/или CRM<sub>197</sub>,

(b) диафильтрация и очистка конъюгатов с помощью эксклюзионной хроматографии,

(c) анализ очищенных фракций способом SEC-MALLS, объединение фракций, содержащих каждый из двадцати двух конъюгатов, и стерилизация посредством фильтрации моновалентных конъюгированных фракций, и

(d) составление композиции из двадцати двух конъюгатов (в количестве каждого серотипа, например, от приблизительно 2,2 до 4,4 мкг, PsaA в количестве от приблизительно 5 мкг до приблизительно 20 мкг, и CRM<sub>197</sub> в количестве от приблизительно 20 мкг до приблизительно 50 мкг), адъюванта (например, фосфата алюминия), вспомогательного вещества и буфера для получения двадцати-валентной композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок.

В некоторых вариантах осуществления двадцати двух валентная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок может проходить фильтрацию (например, в асептических условиях).

Композиции по настоящему изобретению могут быть представлены в виде единичной дозы, например, во флаконе с единичной дозой, в виде многократной дозы, например, во флаконе с множеством доз, или в виде предварительно заполненного шприца. Композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать один или более консервантов, выбранных из тиомерсала, 2-феноксиэтанола и т.п., в количестве, которое может составлять от приблизительно 4 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к иммуногенной композиции (например, к вакцине), например, к композиции с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которую вводят в виде однократной дозы приблизительно 0,5 мл и делают таким образом, чтобы в ней содержалось по меньшей мере следующее: пневмококковые полисахариды из двух или более серотипов в количестве от приблизительно 2,2 до 4,4 мкг, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 10 мкг PsaA на каждый серотип, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 10 мкг CRM<sub>197</sub> на каждый серотип, от приблизительно 0,2 мг до приблизительно 1 мг адъюванта (например, фосфата алюминия), и одно или несколько вспомогательных веществ (например, хлорид натрия и/или буфер).

В других вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к тринадцативалентной иммуногенной композиции (например, к вакцине) в стерильной жидкой композиции, такой как тринадцативалентная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которую вводят в виде однократной дозы приблизительно 0,5 мл и готовят таким образом, чтобы в ней содержалось по меньшей мере следующее: пневмококковые полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F и 33F, каждый из которых по отдельности конъюгирован с PsaA или с комбинацией PsaA и

CRM<sub>197</sub>.

Дополнительно, композицию тринадцати-валентной вакцины можно делать в виде одной или нескольких доз объемом приблизительно 0,5 мл на дозу, при этом в каждой дозе 0,5 мл содержится каждый из тринадцати серотипов в количестве от приблизительно 2,2 мкг до приблизительно 4,4 мкг, PsaA и CRM<sub>197</sub> в количестве от приблизительно 25 мкг до приблизительно 30 мкг, приблизительно 0,125 мг адьюванта (например, элементарного алюминия, то есть, приблизительно 0,5 мг фосфата алюминия), хлорид натрия и L-гистидиновый буфер.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к четырнадцати-валентной иммуногенной композиции (например, к вакцине) в стерильной жидкой композиции, такой как четырнадцати-валентная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которую вводят в виде однократной дозы приблизительно 0,5 мл и готовят таким образом, чтобы в ней содержалось по меньшей мере следующее: пневмококковые полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, каждый из которых по отдельности конъюгирован с PsaA или с комбинацией PsaA и CRM<sub>197</sub>.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к четырнадцати-валентной иммуногенной композиции (например, к вакцине) в стерильной жидкой композиции, такой как четырнадцати-валентная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которую вводят в виде однократной дозы приблизительно 0,5 мл и готовят таким образом, чтобы в ней содержалось по меньшей мере следующее: пневмококковые полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, каждый из которых по отдельности конъюгирован с PsaA или с комбинацией PsaA и CRM<sub>197</sub>.

Дополнительно, композицию четырнадцати-валентной вакцины можно делать в виде одной или нескольких доз объемом приблизительно 0,5 мл на дозу, при этом в каждой дозе 0,5 мл содержится каждый из четырнадцати серотипов в количестве от приблизительно 2,2 мкг до приблизительно 4,4 мкг, PsaA и CRM<sub>197</sub> в количестве от приблизительно 20 мкг до приблизительно 35 мкг, приблизительно 0,125 мг адьюванта (например, элементарного алюминия, то есть, приблизительно 0,5 мг фосфата алюминия), хлорид натрия и L-гистидиновый буфер.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к пятнадцати-валентной иммуногенной композиции (например, к вакцине) в стерильной жидкой композиции, такой как пятнадцати-валентная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которую вводят в виде однократной дозы приблизительно 0,5 мл и готовят таким образом, чтобы в ней содержалось по меньшей мере следующее: пневмококковые полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, каждый из которых по отдельности конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

Дополнительно, композицию пятнадцати-валентной вакцины можно делать в виде одной или нескольких доз объемом приблизительно 0,5 мл на дозу, при этом в каждой дозе 0,5 мл содержится каждый из пятнадцати серотипов в количестве от приблизительно 2,2 мкг до приблизительно 4,4 мкг, PsaA в количестве от приблизительно 5 мкг до приблизительно 20 мкг, CRM<sub>197</sub> в количестве от приблизительно 20 мкг до приблизительно 40 мкг, приблизительно 0,125 мг адьюванта (например, элементарного алюминия, то есть, приблизительно 0,5 мг фосфата алюминия), хлорид натрия и L-гистидиновый буфер.

В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к семнадцати-валентной иммуногенной композиции (например, к вакцине) в стерильной жидкой композиции, такой как семнадцати-валентная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которую вводят в виде однократной дозы приблизительно 0,5 мл и готовят таким образом, чтобы в ней содержалось по меньшей мере следующее: пневмококковые полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F и 35B, каждый из которых по отдельности конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

Дополнительно, композицию семнадцати-валентной вакцины можно делать в виде одной или нескольких доз объемом приблизительно 0,5 мл на дозу, при этом в каждой дозе 0,5 мл содержится каждый из семнадцати серотипов в количестве от приблизительно 2,2 мкг до приблизительно 4,4 мкг, PsaA в количестве от приблизительно 5 мкг до приблизительно 20 мкг, CRM<sub>197</sub> в количестве от приблизительно 20 мкг до приблизительно 40 мкг, приблизительно 0,125 мг адьюванта (например, элементарного алюминия, то есть, приблизительно 0,5 мг фосфата алюминия), хлорид натрия и L-гистидиновый буфер.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к двадцати-валентной иммуногенной композиции (например, к вакцине) в стерильной жидкой композиции, такой как двадцати-валентная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которую вводят в виде однократной дозы приблизительно 0,5 мл и готовят таким образом, чтобы в ней содержалось по меньшей мере следующее: пневмококковые полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B и 45, при этом по меньшей мере каждый из серотипов 3, 6A и 6B по отдельности конъюгирован с PsaA, и один или более из серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 11, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B и 45, каждый по отдельности, конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

Дополнительно, композицию двадцати-валентной вакцины можно делать в виде одной или нескольких доз объемом приблизительно 0,5 мл на дозу, при этом в каждой дозе 0,5 мл содержится каждый из двадцати серотипов в количестве от приблизительно 2,2 мкг до приблизительно 4,4 мкг, PsaA в коли-

честве от приблизительно 5 мкг до приблизительно 20 мкг, CRM<sub>197</sub> в количестве от приблизительно 20 мкг до приблизительно 50 мкг, приблизительно 0,125 мг адьюванта (например, элементарного алюминия, то есть, приблизительно 0,5 мг фосфата алюминия), хлорид натрия и L-гистидиновый буфер.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к двадцати двухвалентной иммуногенной композиции (например, к вакцине) в стерильной жидкой композиции, такой как двадцати двухвалентная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которую вводят в виде однократной дозы приблизительно 0,5 мл и готовят таким образом, чтобы в ней содержалось по меньшей мере следующее: пневмококковые полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B и 38, при этом по меньшей мере каждый из серотипов 3, 6A и 6B по отдельности конъюгирован с PsaA, и один или более из серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35 и 38, каждый по отдельности, конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

Дополнительно, композицию двадцати двухвалентной вакцины можно делать в виде одной или нескольких доз объемом приблизительно 0,5 мл на дозу, при этом в каждой дозе 0,5 мл содержится каждый из двадцати двух серотипов в количестве от приблизительно 2,2 мкг до приблизительно 4,4 мкг, PsaA в количестве от приблизительно 5 мкг до приблизительно 20 мкг, CRM<sub>197</sub> в количестве от приблизительно 20 мкг до приблизительно 50 мкг, приблизительно 0,125 мг адьюванта (например, элементарного алюминия, то есть, приблизительно 0,5 мг фосфата алюминия), хлорид натрия и L-гистидиновый буфер.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к двадцати четырехвалентной иммуногенной композиции (например, к вакцине) в стерильной жидкой композиции, такой как двадцати четырехвалентная композиция с конъюгатом пневмококковый полисахарид-белок, которую вводят в виде однократной дозы приблизительно 0,5 мл и готовят таким образом, чтобы в ней содержалось по меньшей мере следующее: пневмококковые полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B и 38, при этом по меньшей мере каждый из серотипов 3, 6A и 6B по отдельности конъюгирован с PsaA, и один или более из серотипов 1, 4, 5, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 3 и 38, каждый по отдельности, конъюгирован с CRM<sub>197</sub>.

Дополнительно, композицию двадцати четырехвалентной вакцины можно делать в виде одной или нескольких доз объемом приблизительно 0,5 мл на дозу, при этом в каждой дозе 0,5 мл содержится каждый из двадцати четырех серотипов в количестве от приблизительно 2,2 мкг до приблизительно 4,4 мкг, PsaA в количестве от приблизительно 5 мкг до приблизительно 20 мкг, CRM<sub>197</sub> в количестве от приблизительно 20 мкг до приблизительно 50 мкг, приблизительно 0,125 мг адьюванта (например, элементарного алюминия, то есть, приблизительно 0,5 мг фосфата алюминия), хлорид натрия и L-гистидиновый буфер.

Композицию по настоящему изобретению можно вводить нуждающемуся в этом пациенту с помощью любого числа общепринятых путей введения, применяемых в области вакцинации. Например, композиции по настоящему изобретению можно вводить системно, например, парентерально (например, подкожно, внутримышечно, внутривенно и/или интравенно) или через слизистую оболочку (например, перорально и/или интраназально).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к способам индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом пациента на один или более капсульных полисахаридов *S.pneumoniae*, конъюгированных с одним или несколькими белками-носителями. Способы индукции иммунного ответа включают введение нуждающемуся в этом пациенту иммунологически эффективного количества композиций, описанных в изобретении.

В соответствии со способами настоящего изобретения, пациентом, для которого предназначены описанные в изобретении композиции, является человек, например, младенец (в возрасте приблизительно меньше 1 года), ребенок раннего возраста (от приблизительно 12 месяцев до приблизительно 24 месяцев), ребенок младшего дошкольного возраста (от приблизительно 2-х лет до приблизительно 5 лет), ребенок старшего дошкольного и младшего школьного возраста (от приблизительно 5 лет до приблизительно 13 лет), подросток (от приблизительно 13 лет до приблизительно 18 лет), взрослый человек (от приблизительно 18 лет до приблизительно 65 лет) или человек старшего возраста (старше 65 лет).

Согласно изобретению, "эффективное количество" описанных композиций относится к количеству, необходимому для индукции иммунного ответа у пациента, которому вводят эту композицию. Иммунный ответ характеризуется наличием в организме-хозяине одного или более антител, специфичных к антигену *S.pneumoniae*, что значительно уменьшает вероятность инфицирования или степень тяжести инфекции *S.pneumoniae* во время последующего заражения.

#### Примеры

Следующие примеры приведены для иллюстрации раскрытия и предназначены исключительно для иллюстративной цели, и не должны считаться ограничением объема изобретения.

Пример 1. Конъюгирование отдельных пневмококковых полисахаридов с белком-носителем с образованием конъюгатов полисахарид-PsaA.

A. Приготовление PsaA.

Выполняли ПЦР-амплификацию гена *PsaA* из пневмококка серотипа 4 с удаленной гидрофобной лидерной пептидной последовательности. Последовательность гена верифицировали и для повышения экспрессии клонировали в *E. coli* с помощью вектора, сконструированного авторами (pVE66).

Глицериновую стоковую культуру, кодирующую ген *PsaA*, обновляли на 20 мл среды LB, содержащей 1 мл стокового глицерина в конической колбе объемом 150 мл. Культуру инкубировали в течение приблизительно 6 ч при температуре 37°C при 200 оборотах в минуту до конечной оптической плотности 3,5 OD при OD<sub>600</sub> нм. Обновленную культуру переносили в 1 л посевной культуры в конической колбе объемом 5 л. Культуру выращивали в течение приблизительно 10 ч при 37°C при 200 оборотах в у до конечной OD 3 при 600 нм.

Культуру для посева переносили асептически в 20-литровый ферментер, содержащий среды из следующих компонентов: NuPeptone 6 г/л, дрожжевой экстракт 12 г/л, дикалий гидроортофосфат 13,5 г/л, двуосновной фосфат аммония 4 г/л, лимонная кислота 1,7 г/л, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1,2 г/л, глюкоза 4 г/л, тиамин гидрохлорид 10 мг/л, а также микроэлементы 1 мл/л (например, микроэлементы для 100 мл композиции: FeCl<sub>3</sub> 2,7 г, ZnCl<sub>2</sub> 0,2 г, COCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0,2 г, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0,2 г, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0,1 г, борная кислота 0,05 г, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0,1 г, конц., HCl 10 мл). Первоначальная ферментация начиналась при оптической плотности 0,2 при OD 600 нм. Показатели pH поддерживали на уровне 7 ± 0,2 в течение ферментации путем добавления 20% ортофосфорной кислоты и 12,5% гидроксида аммония.

При падении уровня глюкозы ниже 0,5 г/л начинали периодическую ферментацию с подпиткой с постоянной скоростью 3-4 г/л в час, и в течение ферментации содержание растворенного кислорода %DO поддерживали на уровне > 20% с кислородным обогащением.

Клетки выращивали в ферментере, и осадок клеток собирали центрифугированием. Клетки лизировали с помощью устройства для разрушения клеток (Panda). Лизат центрифугировали при 10000g, и прозрачный супернатант подвергали очистке.

Очистку *PsaA* проводили аналогично процедуре, описанной авторами Larentis et al., 2011 (Protein expression and Purification 78 (2011) 38). Очистку дополнительно оптимизировали с помощью хроматографии со смешанным режимом (керамический гидроксипатит типа LL) после диэтиламиноэтилцеллюлозы (ДЭАЭ) для достижения более высокой чистоты *PsaA*.

Анионообменная хроматография: 30 мл смолы ДЭАЭ сефарозы(GE) вносили в колонку XK16/20. Смолу промывали стерильной дистиллированной водой в объеме 5 колонок, а затем 20 Мм Трис, 1 мМЭДТА, pH 8,0 (уравновешивающий буфер) в объеме 10 колонок. 30 мл супернатанта разводили до 100 мл уравновешивающего буфера, наносили на колонку и собирали проточную фракцию. Колонку промывали 5 объемами уравновешивающего буфера. *PsaA* элюировали с помощью 12 объемов линейного градиента (0-100% буфер В). (Буфер А содержит 20 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0; буфер В содержит 20 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА, 250 мМ NaCl, pH 8,0). Затем выполняли промывание колонки 20 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА, 1 М NaCl, pH 8,0.

Хроматография со смешанным режимом: 25 мл керамического гидроксипатита (типа II СНТ-II) вносили в колонку. Смолу промывали объемами стерильной дистиллированной воды, а затем 10 объемами 20 мМ Трис, pH 6,8. Элюированные фракции из смолы ДЭАЭ, которые показали четкую основную видимую полосу приблизительно 37 кДа хорошей концентрации *PsaA* в SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) объединяли и наносили на смолу СНТ-II. Проточную фракцию собирали и колонку промывали уравновешивающим буфером в объеме 5 колонок. Белок элюировали с помощью линейных градиентов в объеме 5 колонок (15% В, 20% В, 50% В и 100% В). Буфер А содержит 20 мМ Трис, pH 6,8, а буфер В содержит 250 мМ фосфатного буфера, pH 6,8.

Все элюированные фракции, показывающие чистую полосу предполагаемого размера *PsaA*, объединяли, концентрировали на кассете 10 кДа MWCO и подвергали диафильтрации против 20 мМ фосфатного буфера, pH 7,5. Очищенный белок наносили на SDS-PAGE гель для оценки чистоты.

В. Активация и конъюгирование пневмококкового полисахарида из серотипа 3 с *PsaA*.

Полисахарид из серотипа 3 с уменьшенным размером (в концентрации 5 мг/мл) и 1,5 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (вес/объем)) смешивали в стеклянной посуде в соотношении 1: 0,5 (ПС: CDAP) и взбалтывали в течение 1 мин. Уровень pH раствора полисахарида довели до 9,0 с помощью 3,5 мл 0,2 М триэтиламина и взбалтывали в течение 1 мин при комнатной температуре (КТ). *PsaA* в количестве 210 мг (14,0 мл в концентрации 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1: 0,7 (ПС: белок-носитель).

Значение pH реакционной смеси довели до приблизительно 9,01 с помощью 0,7 мл 0,2 М триэтиламина, и продолжали реакцию при взбалтывании в течение 5 ч при комнатной температуре с последующей остановкой реакции путем добавления глицина (100 мМ) в избыточной концентрации. Кинетику реакций конъюгирования контролировали с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC) в каждый час реакции.

Затем реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрировали с помощью мембраны 100 кДа MWCO TFF. Концентрат очищали с помощью эксклюзионной хроматографии. Фракции анализировали с помощью SEC-MALLS и способа с использованием антрона, и содержащие конъюгаты фракции

объединяли и стерилизовали путем фильтрации с помощью 0,2 мкм фильтров.

С. Активация и конъюгирование пневмококкового полисахарида из серотипа 6А с PsaA.

Полисахарид тип 6А с уменьшенным размером (в концентрации 14,6 мг/мл) и 400 мкл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (вес/объем)) смешивали в стеклянной посуде в соотношении 1:1 (ПС: CDAP) и взбалтывали в течение 1 мин. Уровень pH раствора полисахарида доводили до 9,5 с помощью 800 мкл 0,2 М триэтиламина и взбалтывали в течение 1 мин при комнатной температуре (КТ). PsaA в количестве 40 мг (3,78 мл в концентрации 11,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1:1 (ПС: белок-носитель).

Значение pH реакционной смеси доводили до приблизительно 9,01 с помощью 0,7 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при взбалтывании в течение 5 ч при комнатной температуре с последующей остановкой реакции путем добавления глицина (100 мМ) в избыточной концентрации. Кинетику реакций конъюгирования контролировали с помощью SEC-HPLC в каждый час реакции.

Затем реакционную смесь подвергали диафильтрации концентрировали с помощью мембраны 100 кДа MWCO TFF. Концентрат очищали с помощью эксклюзионной хроматографии. Фракции анализировали путем SEC-MALLS и способа с использованием антрона, и содержащие конъюгаты фракции объединяли и стерилизовали путем фильтрации через 0,2 мкм фильтры.

Д. Активация и конъюгирование пневмококкового полисахарида из серотипа 6В с PsaA.

Полисахарид типа 6В с уменьшенным размером (в концентрации 14,97 мг/мл) и 4,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (вес/объем)) смешивали в стеклянной посуде в соотношении 1:2 (ПС: CDAP) и взбалтывали в течение 1 мин. Уровень pH раствора полисахарида доводили до 9,1 путем добавления 8,0 мл 0,2 М триэтиламина и взбалтывали в течение 1 мин при комнатной температуре (КТ). PsaA в количестве 340 мг (22,66 мл в концентрации 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1:10,7 (ПС: белок-носитель).

Значение pH реакционной смеси доводили до приблизительно 9,01 путем добавления 0,7 мл 0,2 М триэтиламина и реакцию продолжали при взбалтывании в течение 5 ч при комнатной температуре с последующей остановкой реакции путем добавления глицина (100 мМ) в избыточной концентрации. Кинетику реакций конъюгирования контролировали с помощью SEC-HPLC в каждый час реакции.

Затем реакционная смесь подвергали диафильтрации концентрировали с использованием мембраны 100 кДа MWCO TFF. Концентрат очищали с помощью эксклюзионной хроматографии. Фракции анализировали путем SEC-MALLS и способа с использованием антрона, и содержащие конъюгаты фракции объединяли и стерилизовали путем фильтрации через 0,2 мкм фильтры.

Выполняли SEC-ВЭЖХ для определения кинетики реакции конъюгирования серотипов 3 (D), 6А (E) и 6В (F). Для всех трех хроматограмм использовали следующие символы: полисахарид (сплошная линия), PsaA (пунктирная линия), 3 или 5 ч реакции (точечная линия). Как показано на фигуре 2 для всех хроматограмм, поглощение PsaA указано, исходя из сокращения или исчезновения принадлежащего PsaA пика при времени удерживания приблизительно 19 мин. Конъюгирование подтверждается по формированию нового пика от приблизительно 13,5 мин до приблизительно 14 мин.

Конъюгаты PsaA с пневмококковыми полисахаридами из серотипов 5, 9V, 10A, 15B, 18C и 45 были получены с помощью аналогичной вышеописанной методики. Выполняли эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию для определения кинетики реакции конъюгирования серотипов 5 (A), 9B (B) и 18C (C). Все три хроматограммы показаны на фиг. 2: полисахарид (сплошная линия), PsaA (пунктирная линия), 3 или 5 ч реакции (точечная линия). Во всех хроматограммах поглощение PsaA указано, исходя из сокращения или исчезновения принадлежащего PsaA пика при времени удерживания приблизительно 19 мин. Конъюгирование подтверждается по формированию нового пика от приблизительно 13,5 мин до приблизительно 14 мин.

Пример 2. Получение конъюгатов пневмококкового капсульного полисахарида и CRM<sub>197</sub>.

А. Активация полисахарида и конъюгирование с белком-носителем.

Сортированные по размеру полисахариды (6,0 мл ПС, концентрация 10 мг/мл) и CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (вес/объем)) смешивали в стеклянной пробирке в соотношении 1:1 и перемешивали в течение 1 мин. Уровень pH раствора полисахарида доводили до 9,25 с помощью 0,2 М триэтиламина и взбалтывали в течение 3 мин при комнатной температуре (КТ). К активированному полисахариду медленно добавляли CRM<sub>197</sub> (4,0 мл, в концентрации 15,0 мг/мл) в соотношении 1:1 (ПС: белок-носитель).

Значение pH реакции доводили до приблизительно 9,05 путем добавления 0,2 М триэтиламина, и реакцию продолжали при взбалтывании в течение 5 ч при комнатной температуре, и в итоге реакцию останавливали путем добавления глицина в избыточной концентрации.

Затем реакционную смесь подвергали диафильтрации с использованием мембраны 100 К MWCO и очищали путем эксклюзионной хроматографии. Фракции анализировали с помощью SEC-MALLS, способом с антроном, и содержащие конъюгаты фракции объединяли и стерилизовали путем фильтрации через 0,2 мкм фильтры. Этот материал называется одновалентным нерасфасованным конъюгатом.

На фиг. 1 показана кинетика реакции конъюгатов, полученных из серотипов 7F (A), 14 (B) и 19F (C) с CRM<sub>197</sub>. На всех трех хроматограммах использованы следующие обозначения: полисахарид (сплошная линия), CRM<sub>197</sub> (пунктирная линия), 5 ч реакции (точечная линия). Во всех хроматограммах поглощение

CRM<sub>197</sub> указано, исходя из сокращения или исчезновения принадлежащего CRM<sub>197</sub> пика при времени удерживания приблизительно 19 мин. Конъюгирование подтверждается по формированию нового пика от приблизительно 13,5 мин до приблизительно 14 мин.

На фиг. 1 показана кинетика реакции конъюгатов, полученных из серотипов 3 (D), 6A (E) и 6B (F) с CRM<sub>197</sub>. На всех трех хроматограммах использованы следующие обозначения: полисахарид (сплошная линия), CRM<sub>197</sub> (пунктирная линия), 5 ч реакции (точечная линия). Во всех хроматограммах поглощение CRM<sub>197</sub> указано, исходя из сокращения или исчезновения принадлежащего CRM<sub>197</sub> пика при времени удерживания приблизительно 19 мин. Конъюгирование подтверждается по формированию нового пика от приблизительно 13,5 мин до приблизительно 14 мин.

Пример 3. Приготовление конъюгированной вакцины из пневмококкового капсульного полисахарида и белка.

Композиция 15-валентной конъюгированной вакцина была получена в виде 0,5 мл дозы, содержащей 2,2 мкг каждого из пневмококковых полисахаридов серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, конъюгированных с белком CRM<sub>197</sub> в количестве приблизительно 28 мкг, и 2,2 мкг каждого полисахарида из серотипов 3, 6A и 6B, конъюгированных с белком PsaA в количестве приблизительно 7 мкг. Все конъюгаты были адсорбированы на геле фосфата алюминия в количестве, эквивалентном 0,5 мг Al<sup>3+</sup> на дозу 0,5 мл. В качестве разбавителя и носителя использовали 9% вес/объем физиологический раствор, и уровень pH конечной композиции доводили до pH 6 с помощью 1N хлористоводородной кислоты. Для эффективной адсорбции после регулирования pH состав перемешивали в течение 2 ч. при постоянном взбалтывании. Через 2 ч. смешивания сформированной смесью асептически заполняли стерильные несиликонизированные 3 мл флаконы в количестве 0,58 мл на флакон, закрывали стерильными резиновыми пробками 13 мм и герметично упаковывали 13 мм стерильным обжимным алюминиевым колпачком розового цвета, с последующим оптическим контролем и маркировкой заполненных флаконов. Несколько флаконов из партии случайным образом выбирали и отправляли для анализа по следующим показателям: внешний вид, уровень pH, осмоляльность, общее содержание полисахарида и белка (мкг/SHD=безопасная человеческая доза), % адсорбции, содержание алюминия (мг/SHD).

Пример 4. Приготовление конъюгированной вакцины из пневмококкового капсульного полисахарида и белка.

Композиция 15-валентной конъюгированной вакцина была получена в виде 0,5 мл дозы, содержащей 2,2 мкг каждого полисахарида из серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, конъюгированных с белком PsaA в количестве приблизительно 14 мкг. Все конъюгаты были адсорбированы на геле фосфата алюминия в количестве, эквивалентном 0,5 мг Al<sup>3+</sup> на дозу 0,5 мл. В качестве разбавителя и носителя использовали 9% вес/объем физиологический раствор, и уровень pH конечной композиции доводили до pH 6 с помощью 1N хлористоводородной кислоты. Для эффективной адсорбции после регулирования pH состав перемешивали в течение 2 ч при постоянном взбалтывании. Через 2 часа смешивания сформированной смесью асептически заполняли стерильные несиликонизированные 3 мл флаконы в количестве 0,58 мл на флакон, закрывали стерильными резиновыми пробками 13 мм и герметично упаковывали 13 мм стерильным обжимным алюминиевым колпачком розового цвета, с последующим оптическим контролем и маркировкой заполненных флаконов. Несколько флаконов из партии случайным образом выбирали и отправляли для анализа по следующим показателям: внешний вид, уровень pH, осмоляльность, общее содержание полисахарида и белка (мкг/SHD=безопасная человеческая доза), % адсорбции, содержание алюминия (мг/SHD).

А. Иммунизация кроликов изготовленной вакциной.

Здоровые кролики весом от 1,5 до 2 кг были выведены и выращены в условиях без специфических патогенов. Кроликов иммунизировали вышеуказанным препаратом по следующей схеме.

Группа 1 состояла из 7 кроликов, иммунизированных 15-валентной конъюгированной вакциной (пример 3). 15-валентная вакцина состоит из 2 мкг каждого из полисахаридов *S.pneumoniae* из серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, конъюгированных с CRM<sub>197</sub>, и из 2,2 мкг каждого из полисахаридов *S.pneumoniae* из серотипов 3, 6A и 6B, конъюгированных с PsaA. Кроликов иммунизировали в дни 1, 15 и 29; образцы крови собирали в дни 0, 15 и 36. Из образца крови отделяли сыворотку и хранили при -80°C.

Группа 2 состояла из 7 кроликов, иммунизированных 13-валентной конъюгированной вакциной Prevnar13®. Кроликов иммунизировали в дни 1, 15 и 29; образцы крови собирали в дни 0, 12, 26 и 40. Данные, полученные на 12-й день и 40-й день, были использованы для графика сравнения с исследованием PsaA (фиг. 4). Из образца крови отделяли сыворотку и хранили при -80°C.

Группа 3 состояла из 7 кроликов, иммунизированных 15-валентной конъюгированной вакциной (пример 4). 15-валентная вакцина состоит из 2,2 мкг каждого из полисахаридов серотипов 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, конъюгированных с белком CRM<sub>197</sub> в количестве приблизительно 28 мкг, и из 4,4 мкг каждого из полисахаридов серотипов 3, 6A и 6B, конъюгированных с белком PsaA в количестве приблизительно 14 мкг. Кроликов иммунизировали в дни 1, 15 и 29; образцы крови собирали в дни 0, 15 и 36. Из образца крови отделяли сыворотку и хранили при -80°C. Полученную из иммунизированных кроликов сыворотку анализировали на серотип-специфичный иммунный ответ с помощью

иммуноферментного анализа ELISA.

Анализ ELISA выполняли в соответствии с протоколом, предложенным ВОЗ. Коротко, ELISA-планшеты Maxisorp™ покрывали пневмококковыми полисахаридами заданного серотипа (1 мкг/50 мкл/на лунку с использованием фосфатно-буферного раствора (ФБР); стерильные без эндотоксинов, с 0,02% азидом натрия). Планшеты помещали в коробку с увлажненными бумажными полотенцами для увлажнения воздуха, и инкубировали при  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 5 ч, после этого планшеты сохраняли при  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  до использования.

Исследуемые сыворотки предварительно адсорбировали на CWPS Mlti™ для устранения фоновой реактивности, производимой клеточной стенкой полисахарида. Для получения 2 мкл исследуемой сыворотки и образца для положительного контроля сыворотку разводили применяемым перед адсорбцией раствором 998 мкл (1 мл-1 мкл CWPS Mlti™ в 999 мкл 10% SuperBlock™ в фосфатно-солевом буфере с твином PBST) для достижения конечного разведения 1:500. Разведенные образцы инкубировали при комнатной температуре ( $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ) в течение 1 ч при непрерывном встряхивании. Несвязанные пневмококковые полисахариды были удалены пощелкиванием планшета и свободные участки в лунки блокировали путем добавления 200 мкл блокирующего вещества (20% SuperBlock™ в ФБР). Планшет инкубировали при комнатной температуре ( $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ) в течение 1 ч без встряхивания.

В. Добавление исследуемых и контрольных образцов.

Добавляли 50 мкл разбавителя (10% SuperBlock™ в PBST) во все лунки, кроме лунок от А1 до А12. Вслед за этим в лунки А1-А10 добавляли предварительно адсорбированные исследуемые образцы сыворотки в объеме 100 мкл/на лунку, и в лунки А11 и А12 добавляли контрольные образцы сыворотки. Проводили двукратное серийное разведение исследуемых образцов путем переноса 50 мкл из 1 во 2 лунку и так далее, т.е. от А1 - А10 до Н1-Н10. Аналогичным образом проводили серийное разведение контрольных образцов (007SP) от А11 и 12 до Е11 и Е12. Лунки F11 и F12 до Н11 и Н12 без разведения были оставлены в качестве холостой пробы.

Планшеты инкубировали при комнатной температуре ( $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ) в течение 2 ч без встряхивания. После этапа инкубации содержимое удаляли и планшеты промывали трижды раствором PBST (примерно 250 мкл/на лунку) вручную или с помощью машины для мойки планшетов.

С. Добавление первичного антитела.

Во все лунки добавляли 50 мкл/на лунку рекомбинантный белок А/Г пероксидазу (разведенный 1:20000 с использованием 10% SuperBlock™ в PBST) и планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре ( $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ) без встряхивания. После этого планшеты трижды промывали PBST (250 мкл/на лунку) вручную или с помощью машины для мойки планшетов.

Д. Продолжение реакции и считывание.

Хромогенная реакция была продолжена путем добавления 50 мкл/на лунку ТМВ-субстрата и инкубацией в течение 15 мин при комнатной температуре ( $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ) без встряхивания. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл/на лунку 1,25 М серной кислоты. Оптическую плотность измеряли при 450 нм.

Е. Оценка Титра.

Титр антител у иммунизированных животных рассчитывали, как обратный коэффициент разведения. Наибольшее разведение, которое показывало  $OD_{450\text{nm}}$  в два раза выше, чем титр перед иммунизацией (приблизительно 0,2), указывалось, как титр. Титр сывороточных антител к каждому серотипу показывали в виде диаграммы и сравнивали с показателями в разных группах исследования.

Результаты иммунного ответа животных из группы 1 показывают дозозависимое повышение серотип-специфичного повышения титра антител в сыворотке крови, т.е. уровень титра антител у вакцинированных животных возрастал с каждой последующей дозой. Иммунный ответ на серотип 3 (фиг. 5) составил приблизительно 1:10000, когда животные были иммунизированы конъюгатами PsaA, содержащими 4,4 мкг полисахарида (группа 3). Дополнительно, титр сывороточных антител к серотипам 3, 6А и 6В был по меньшей мере в два раза выше по сравнению с иммунным ответом, полученным от кроликов, иммунизированных вакциной Prevnar®13. Титр сывороточных IgG после первой иммунизации у кроликов вакциной Prevnar®13 не показывает это повышение в той же степени, как это выявлено при использовании 15-валентной композиции по настоящему изобретению (фиг. 3 и 4). Даже при том, что концентрация полисахарида для серотипа 6В в вакцине Prevnar®13 в два раза больше (4,4 мкг), по сравнению с концентрацией полисахарида серотипа 3, конъюгированного с PsaA (фиг. 3), уровень ответа IgG в два раза выше. Титр антител серотипа 3 едва достигает 8000 в композициях, содержащих 2,2 мкг серотипа 3, конъюгированного с CRM<sub>197</sub>. Этот титр показывает заметное улучшение (16000) при конъюгировании с 4,4 мкг PsaA. Это улучшение иммунного ответа обусловлено конъюгированием PsaA и полисахаридов из серотипов 3, 6А и 6В. Титр сывороточных антител к серотипу 14 у животных, вакцинированных Prevnar®13, были ниже по сравнению с результатами композиций по настоящему изобретению. Ответ IgG на другие серотипы у животных, вакцинированных или вакцинными композициями по изобретению, или вакциной Prevnar®13, были сходными. Титры серотипов 3, 6А и 6В были улучшены при конъюгировании с PsaA даже при концентрации 2,2 мкг.

Используемые в настоящем изобретении численные значения указаны в качестве приближений от

минимальных до максимальных значений в пределах указанных диапазонов, и им предшествует слово "приблизительно", если конкретно не указано иное. Раскрытые в изобретении диапазоны следует считать непрерывными диапазонами, включающими каждое значение между указанными минимальным и максимальным значениями, а также любые диапазоны, которые могут быть образованы с использованием этих значений. Численные значения, представленные в настоящем изобретении, являются различными вариантами осуществления настоящего изобретения.

Используемые в изобретении термины в единственном числе включают в себя множественное число, если из контекста явно не следует иное. Аналогичным образом, если слово "или" явным образом ограничивает обозначение только единственного элемента, эксклюзивно от других элементов при ссылке на перечень из двух или более элементов, то использование "или" в таком списке следует толковать как включение (а) любого одного элемента из перечня, (b) всех элементов из перечня или (с) любого сочетания элементов в перечне. Дополнительно, термины "содержащий" и подобные, используемые в настоящем изобретении, означают включение по меньшей мере перечисленного признака (признаков) таким образом, что не исключается наличие любого превышающего количества того же признака (тех же признаков) и/или одного или более дополнительных типов признаков. Указание на "один вариант осуществления", "вариант осуществления" или аналогичные формулировки означает, что конкретный признак композиции, композиция, способ или характеристика, описанные в связи с этим вариантом осуществления, могут быть включены по меньшей мере в один вариант осуществления данного уровня техники. Таким образом, появление таких фраз или формулировок в настоящем документе не обязательно относится к одному и тому же варианту осуществления. Кроме того, можно объединять различные конкретные признаки, композиции, способы или характеристики любым подходящим образом в одном или нескольких вариантах осуществления.

Настоящее изобретение не является исчерпывающим или не предназначено ограничивать данный уровень техники описанными в изобретении конкретными формами. В иллюстративных целях в изобретении описаны конкретные варианты осуществления, но вместе с тем, возможны различные эквивалентные модификации без отхода от данного уровня техники, что будет очевидно специалистам в данной области. В некоторых случаях не были показаны и/или описаны подробно общеизвестные элементы и действия, чтобы избежать излишнего ограничения описания вариантов осуществления данного уровня техники. Несмотря на определенный порядок представления в настоящем изобретении этапов способов, в альтернативных вариантах осуществления этапы могут иметь другой подходящий порядок. Аналогичным образом, некоторые варианты осуществления данного уровня техники, раскрытые в контексте конкретных вариантов осуществления, могут быть объединены или исключены в других вариантах осуществления. Кроме того, связанные с некоторыми вариантами осуществления преимущества могут быть описаны в контексте этих вариантов осуществления, но вместе с тем, другие варианты осуществления могут также демонстрировать такие преимущества, но не во всех вариантах осуществления, входящих в объем уровня техники, должны обязательно демонстрироваться такие преимущества или другие преимущества, раскрытые в настоящем изобретении. Таким образом, настоящее раскрытие и связанные с ними уровни техники могут включать другие варианты осуществления, не показанные и/или не описанные в настоящем изобретении явным образом.

Из вышеизложенного следует понимать, что конкретные варианты осуществления настоящего изобретения были описаны в иллюстративных целях, но при этом можно делать различные модификации без отклонения от объема изобретения. Таким образом, настоящее изобретение не ограничено ничем, кроме прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины, содержащая пневмококковый капсульный полисахарид двух или более серотипов, выбранных из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45, каждый из которых индивидуально конъюгирован с белком-носителем, причем белок-носитель содержит пневмококковый поверхностный белок А адгезии (PsaA), и причем указанная поливалентная пневмококковая вакцина содержит пневмококковый капсульный полисахарид из по меньшей мере двух разных серотипов, конъюгированный с PsaA, и конъюгаты адсорбированы на геле фосфата алюминия,

и причем в PsaA отсутствует гидрофобный N-концевой лидерный пептид дикого типа.

2. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по п.1, причем композиция пневмококковой вакцины является 10-валентной, 13-валентной, 14-валентной, 15-валентной, 17-валентной, 18-валентной, 19-валентной, 20-валентной, 22-валентной, 23-валентной, 24-валентной или 25-валентной композицией пневмококковой вакцины.

3. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1, 2, в которой процентное отношение белка-носителя к пневмококковому капсульному полисахариду (белок/ПС) составляет от 0,5 до 2,0 белок/ПС.

4. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-3, причем композиция пневмококковой вакцины дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

5. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-4, где указанная композиция вакцины включает пневмококковые капсульные полисахариды из по меньшей мере 10 серотипов, причем серотипы выбраны из 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 6С, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 16F, 17F, 18С, 19F, 19А, 20А, 20В, 22F, 23А, 23В, 23F, 24В, 24F, 31, 33F, 34, 35В, 35F, 38, 39 и 45.

6. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-5, причем композиция поливалентной пневмококковой вакцины содержит пневмококковые капсульные полисахариды из по меньшей мере 14 серотипов.

7. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-5, причем композиция поливалентной пневмококковой вакцины содержит пневмококковые капсульные полисахариды из по меньшей мере 17 серотипов.

8. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-5, причем композиция поливалентной пневмококковой вакцины содержит пневмококковые капсульные полисахариды из по меньшей мере 19 серотипов.

9. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-5, причем композиция поливалентной пневмококковой вакцины содержит пневмококковые капсульные полисахариды из по меньшей мере 20 серотипов.

10. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-5, причем композиция поливалентной пневмококковой вакцины содержит пневмококковые капсульные полисахариды из по меньшей мере 22 серотипов.

11. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-5, причем композиция поливалентной пневмококковой вакцины содержит пневмококковые капсульные полисахариды из по меньшей мере 24 серотипов.

12. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-5, причем композиция поливалентной пневмококковой вакцины является 13-валентной композицией пневмококковой вакцины, содержащей пневмококковый капсульный полисахарид, выбранный из серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 22F и 33F.

13. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-5, причем композиция поливалентной пневмококковой вакцины является 14-валентной композицией пневмококковой вакцины, которая содержит пневмококковые капсульные полисахариды, выбранные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F.

14. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-5, причем композиция поливалентной пневмококковой вакцины является 14-валентной композицией пневмококковой вакцины, которая содержит пневмококковые полисахариды, выбранные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F.

15. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-5, где два или более серотипов выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19F, 22F и 19А, и белок-носитель представляет собой PsaA.

16. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-5, где два или более серотипов выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 10А, 12F, 14, 15а, 15b, 18С, 19F, 19А, 22F, 23F, 33F, 34, 35, 38 и 45, и белок-носитель представляет собой PsaA.

17. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-5, где два или более серотипов выбраны из 3, 5, 6А, 6В, 9V, 12F, 10А, 15В, 18С и 45, и белок-носитель представляет собой PsaA.

18. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-17, причем композиция поливалентной пневмококковой вакцины составлена в стандартную лекарственную форму.

19. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-18, где стандартная лекарственная форма содержит от 0,1 до 50 мкг каждого из пневмококковых полисахаридов, от 0,1 до 10 мкг или от 1 до 5 мкг каждого из пневмококковых полисахаридов, причем каждый из пневмококковых полисахаридов по отдельности конъюгирован с белком-носителем, и количество белка-носителя составляет от 1,5 до 5 мкг.

20. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-19, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый разбавитель, буфер, консервант, стабилизатор, адъювант и/или лиофилизирующий эксципиент.

21. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-20, где стандартная лекарственная форма представлена в виде флакона с разовой дозой, флакона с несколькими дозами или предварительно заполненного шприца.

22. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-21, причем композиция поливалентной пневмококковой вакцины представлена в виде разовой дозы 0,5 мл, которая содержит:

от 2,2 до 4,4 мкг одного или более пневмококковых полисахаридов;

от 1 до 10 мкг PsaA, конъюгированного с каждым из одного или более пневмококковых полисахаридов;

от 0,2 до 1 мг адьюванта фосфата алюминия; и  
эксципиент.

23. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-5, 18-22, причем композиция поливалентной пневмококковой вакцины представляет собой 13-валентную композицию пневмококковой вакцины, которая содержит:

пневмококковый капсульный полисахарид, выбранный из серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F и 33F,

причем доза пневмококковой вакцинной композиции составляет 0,5 мл в лекарственной форме стерильной жидкости, содержащей:

от 2,2 до 4,4 мкг каждого из пневмококковых полисахаридов,

от 25 до 30 мкг PsaA,

0,125 мг элементарного алюминия в форме фосфата алюминия в количестве 0,5 мг,

хлорид натрия, и

L-гистидиновый буфер.

24. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-5, 18-22, причем композиция поливалентной пневмококковой вакцины представляет собой 14-валентную композицию пневмококковой вакцины, которая содержит:

пневмококковый капсульный полисахарид, выбранный из серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F,

причем доза пневмококковой вакцинной композиции составляет 0,5 мл в лекарственной форме стерильной жидкости, содержащей:

от 2,2 до 4,4 мкг каждого из пневмококковых полисахаридов,

от 25 до 30 мкг PsaA,

0,125 мг элементарного алюминия в форме фосфата алюминия в количестве 0,5 мг,

хлорид натрия, и

L-гистидиновый буфер.

25. Композиция поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-5, 18-22, причем композиция поливалентной пневмококковой вакцины представляет собой 14-валентную композицию пневмококковой вакцины, которая содержит:

пневмококковые капсульные полисахариды, выбранные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F,

причем доза пневмококковой вакцинной композиции составляет 0,5 мл в лекарственной форме стерильной жидкости, содержащей:

от 2,2 до 4,4 мкг каждого из пневмококковых полисахаридов,

от 20 до 35 мкг PsaA,

0,125 мг элементарного алюминия в форме фосфата алюминия в количестве 0,5 мг,

хлорид натрия, и

L-гистидиновый буфер.

26. Способ получения композиции поливалентной пневмококковой вакцины, где указанный способ включает:

а) индивидуальную конъюгацию пневмококковых капсульных полисахаридов двух или более серотипов, выбранных из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 и 45, с иммуногенным белком-носителем для получения индивидуальных конъюгатов, где белком-носителем является PsaA;

б) диафильтрацию и очистку индивидуальных конъюгатов;

в) объединение фракций, содержащих индивидуальные конъюгаты двух или более серотипов; и

д) составление объединенных конъюгатов с адьювантом, эксципиентом и буфером для получения композиции поливалентной пневмококковой вакцины,

и причем в PsaA отсутствует гидрофобный N-концевой лидерный пептид дикого типа.

27. Способ по п.26, в котором пневмококковые капсульные полисахариды конъюгируют с иммуногенным белком-носителем с использованием СДАР-химии.

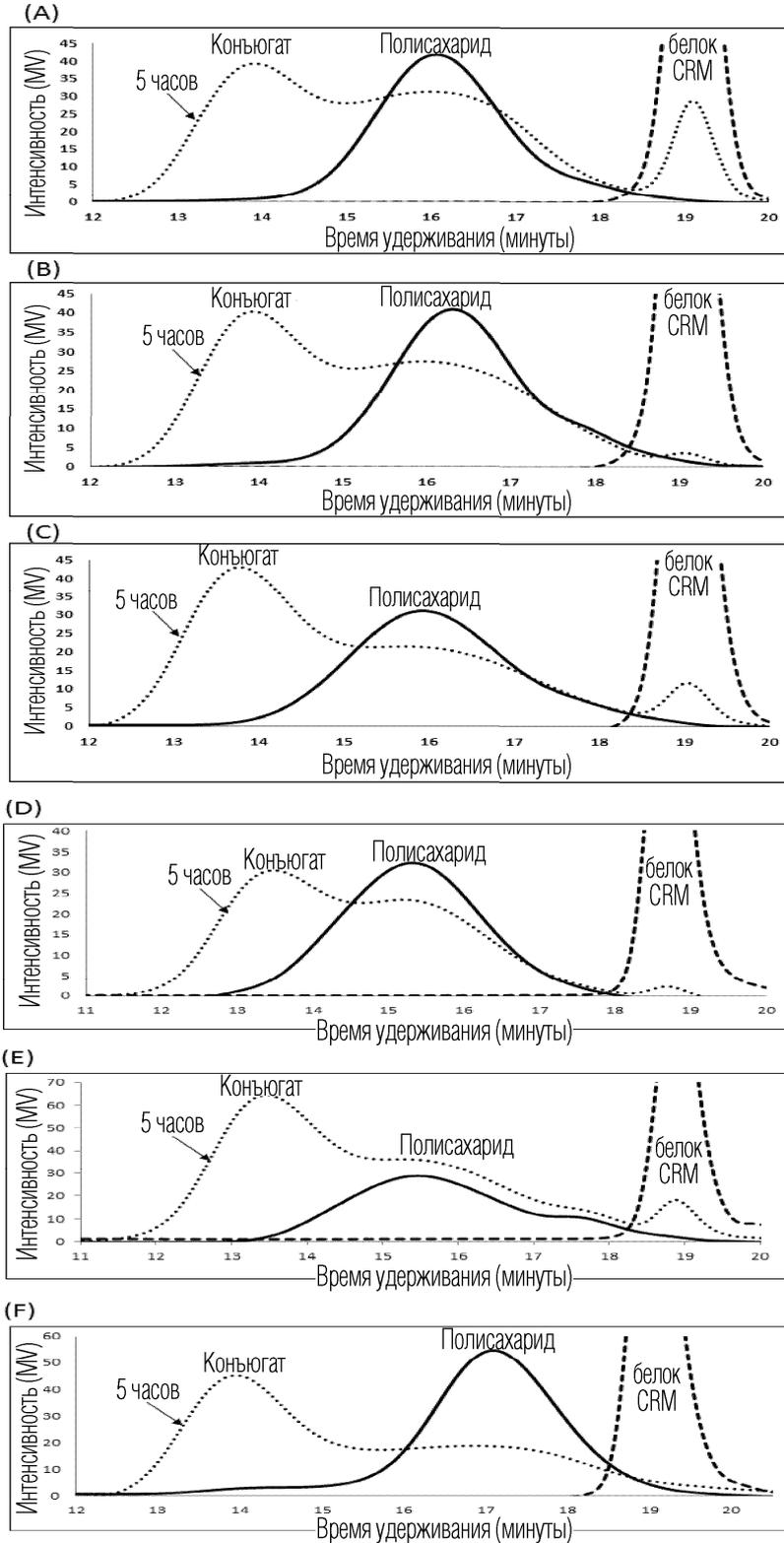
28. Применение композиции поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-25 в получении лекарственного средства для лечения заболевания, опосредуемого *Streptococcus pneumoniae*, у пациента, представляющего собой человека, причем заболевание, опосредуемое *Streptococcus pneumoniae*, представляет собой инвазивную пневмококковую инфекцию (IPD).

29. Применение по п.28, в котором человеком является младенец (в возрасте меньше 1 года), ребенок раннего возраста (от 12 месяцев до 24 месяцев), ребенок младшего дошкольного возраста (от 2 лет до 5 лет), ребенок старшего дошкольного и младшего школьного возраста (от 5 лет до 13 лет), подросток (от 13 лет до 18 лет), взрослый человек (от 18 лет до 65 лет) или человек старшего возраста (старше 65 лет).

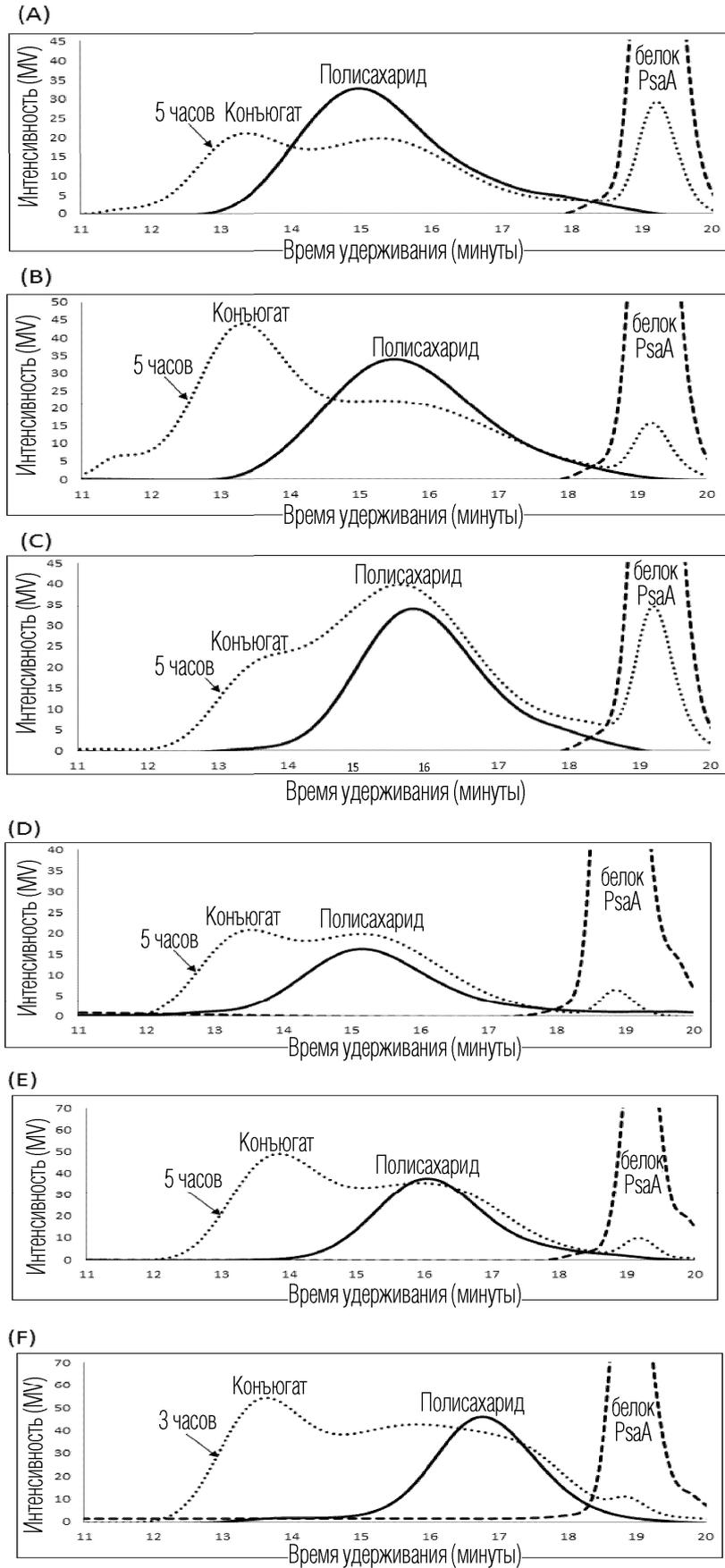
30. Применение композиции поливалентной пневмококковой вакцины по любому из пп.1-25 в получении лекарственного средства для индукции иммунного ответа на конъюгат капсульного полисахарида *S.pneumoniae*.

31. Применение по п.30, дополнительно включающее составление конъюгата полисахарид-белок в композицию пневмококковой вакцины, которая содержит адъювант, эксципиент и буфер.

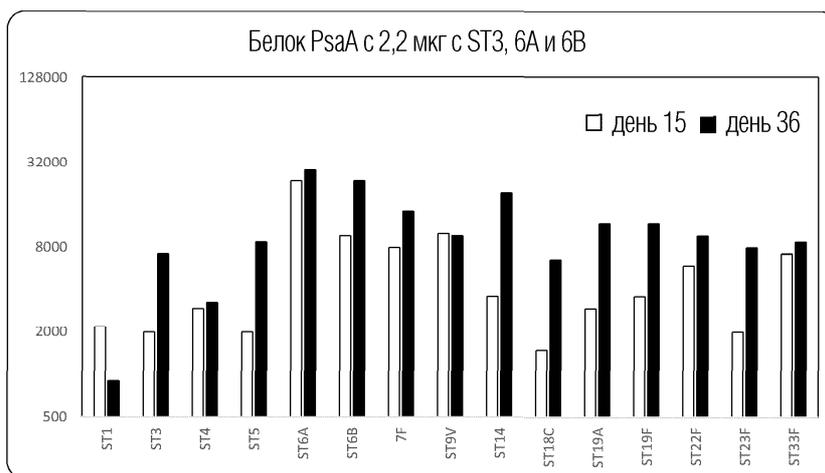
32. Применение по п.31, в котором адъювант представляет собой фосфат алюминия.



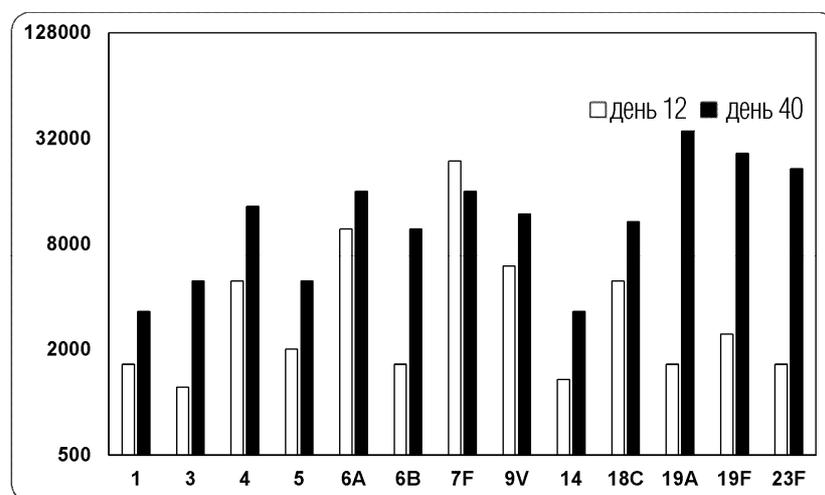
Фиг. 1



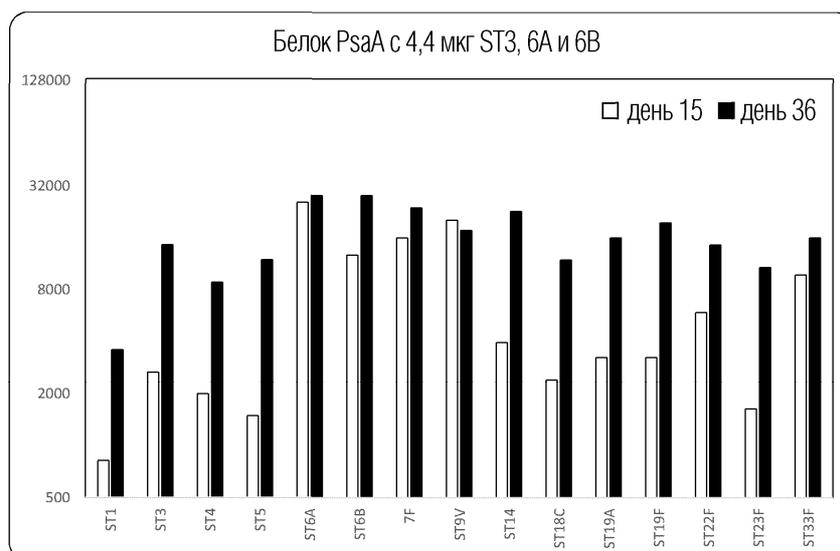
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2