(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 048282 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.11.15

(21) Номер заявки
202190168

(22) Дата подачи заявки
2019.07.01

(51) Int. Cl. ***C07K 14/00*** (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 47/55 (2017.01)
A61K 47/64 (2017.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(54) УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ В ИММУНОГЕННЫХ КОНЪЮГАТАХ

(31) **62/693,981**
(32) **2018.07.04**
(33) **US**
(43) **2021.06.07**
(86) **PCT/US2019/040131**
(87) **WO 2020/009993 2020.01.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ВАКСАЙТ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Фэйрман Джеффери, Хейнрикс Джон, Чань Вэй (US)

(74) Представитель:
Угрюмов В.М., Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М., Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В., Лыу Т.Н., Строкова О.В., Парамонова К.В. (RU)

(56) EA-B1-012214
RU-C2-2595845
RU-C2-2634405
LEGASTELOIS Isabelle et al. Non-conventional expression systems for the production of vaccine proteins and immunotherapeutic molecules. HUMAN VACCINES & IMMUNOTHERAPEUTICS, 2017, vol. 13, N. 4, pp. 947-961, страница 955, правая колонка, верхний абзац

(57) В изобретени описаны различные усовершенствования, касающиеся иммуногенных конъюгатов, содержащих полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем.

048282 B1

048282 B1

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США под номером 62/693981, поданной 4 июля 2018 года, описание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Включение электронного текстового файла, поданного вместе с настоящим документом

Содержание текстового файла, поданного в электронном виде вместе с настоящим документом, полностью включено в настоящий документ посредством ссылки: Копия списка последовательностей в машиночитаемом формате (имя файла: STRO_005_01WO_SeqList_ST25.txt, дата записи: 1 июля 2019 г., размер файла ~23 килобайта).

Уровень техники

Иммунный ответ на "слабый" сахаридный антиген можно усилить посредством конъюгирования с известным "сильным" полипептидным антигеном-носителем, например, дифтерийным анатоксином, столбнячным анатоксином, белком D H.influenzae или CRM197. В заявке WO 2018/126229 (SutroVax, Inc., Фостер-Сити, штат Калифорния, США) описаны способы, композиции и методики для продукции конъюгатных вакцинных антигенов с использованием полипептидов-носителей, содержащих неприродные аминокислоты (nnAA). Химические механизмы ортогонального присоединения через nnAA позволяют выполнять конъюгирование антигенов с полипептидами-носителями с целью получения иммуногенных конъюгатов, которые можно применять для иммунизации.

Цель настоящего изобретения - предложить варианты и усовершенствования таких способов, композиций и методик. Варианты и усовершенствования, описанные ниже, можно применять к или комбинировать с любыми способами, композициями или методиками, описанными в WO 2018/126229 или в предварительных заявках на патенты США № 62/693978 и 62/693981, которые поданы 4 июля 2018 г. Вышеупомянутые заявки на патент полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Сущность изобретения

В одном варианте реализации мы обеспечиваем стерильный контейнер (например, флакон), содержащий фармацевтическую композицию, содержащую иммуногенный конъюгат, содержащий полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем. Контейнер может содержать стандартную дозу фармацевтической композиции. Предпочтительными являются стерильные стеклянные контейнеры.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем изделие для доставки (например, шприц, аэродинамический распылитель, аэрозольный баллончик, ингалятор, кожный пластырь и т.д.), содержащее фармацевтическую композицию, содержащую иммуногенный конъюгат, содержащий полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем. Изделие для доставки может содержать стандартную дозу фармацевтической композиции. Изделие для доставки можно применять для введения фармацевтической композиции субъекту-млекопитающему.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем герметизированный контейнер, содержащий фармацевтическую композицию, содержащую иммуногенный конъюгат, содержащий полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем. Подходящие для герметизации контейнеры включают, например, флакон. Содержимое предпочтительно является стерильным на момент герметизации.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем шприц, содержащий 0,25-0,75 мл (например, 0,3-0,75 мл, предпочтительно 0,5 мл) фармацевтической композиции, содержащей два или более различных иммуногенных конъюгатов, каждый из которых содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую два или более различных иммуногенных конъюгатов и адъювант на основе соли алюминия, причем: (i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем; (ii) адъювант на основе соли алюминия представляет собой адъювант на основе гидроксида алюминия или фосфата алюминия; (iii) объем фармацевтической композиции составляет 0,25-0,75 мл (например, 0,3-0,75 мл, предпочтительно 0,5 мл).

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую два или более различных иммуногенных конъюгатов и адъювант на основе фосфата алюминия, причем: (i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем; (ii) концентрация ионов алюминия в композиции составляет < 300 мкг/мл (например, 100-300 мкг/мл). В идеале концентрация ионов алюминия составляет ≤1,7 мг/мл. Конъюгаты в композиции могут быть адсорбированы на адъюванте на основе фосфата алюминия.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую

два или более иммуногенных конъюгата и адъювант на основе фосфата алюминия, причем: (i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем; (ii) полипептид-носитель не содержит SEQ ID NO: 3; и (iii) концентрация ионов алюминия в композиции составляет < 2,5 мг/мл. В идеале концентрация ионов алюминия составляет ≤1,7 мг/мл. Конъюгаты в композиции могут быть адсорбированы на адъюванте на основе фосфата алюминия.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую два или более различных иммуногенных конъюгатов, причем:

(i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем, и (ii) объем фармацевтической композиции составляет 0,25-1,25 мл (например, 0,3-0,7 мл, предпочтительно 0,5 мл). Композиция может содержать адъювант на основе фосфата алюминия, а конъюгаты в композиции могут быть адсорбированы на адъюванте на основе фосфата алюминия.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую два или более различных иммуногенных конъюгатов и консервант, причем каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию без консерванта, содержащую два или более различных иммуногенных конъюгатов, причем каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую два или более различных иммуногенных конъюгатов, причем: (i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем; (ii) осмоляльность композиции составляет 200-400 мосмоль/кг.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую два или более различных иммуногенных конъюгатов и по меньшей мере одно вспомогательное вещество, причем: (i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем, и (ii) указанное по меньшей мере одно вспомогательное вещество выбрано из группы, состоящей из хлорида натрия, янтарной кислоты и полисорбата 80. Она также может содержать адъювант на основе соли алюминия.

Эта композиция может содержать как хлорид натрия, так и полисорбат 80 в качестве вспомогательных веществ.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую n различных иммуногенных конъюгатов, причем: (i) каждый из n иммуногенных конъюгатов содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем; (ii) n представляет собой целое число от 3 до 50; и (iii) общее количество полипептида-носителя в n иммуногенных конъюгатах меньше или равно 3n мкг на дозу фармацевтической композиции.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую n различных иммуногенных конъюгатов, причем: (i) каждый из n иммуногенных конъюгатов содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем; (ii) n представляет собой целое число от 3 до 50; и (iii) общая концентрация полипептида-носителя в n иммуногенных конъюгатах меньше или равна 6n мкг/мл в фармацевтической композиции.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую n различных иммуногенных конъюгатов, причем: (i) каждый из n иммуногенных конъюгатов содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем; (ii) n представляет собой целое число от 3 до 50; и (iii) общее количество сахаридного антигена в n иммуногенных конъюгатах меньше или равно 3n мкг на дозу фармацевтической композиции.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую n различных иммуногенных конъюгатов, причем: (i) каждый из n иммуногенных конъюгатов содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем; (ii) n представляет собой целое число от 3 до 50; и (iii) общая концентрация сахаридного антигена в n иммуногенных конъюгатах меньше или равна 6n мкг/мл в фармацевтической композиции.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую два или более различных иммуногенных конъюгатов, причем: (i) каждый иммуногенный конъюгат со-

держит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем, и (ii) среднее количество полипептида-носителя на конъюгат составляет 1-4 мкг на дозу фармацевтической композиции.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую два или более различных иммуногенных конъюгатов, причем: (i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем, и (ii) средняя концентрация полипептида-носителя на конъюгат составляет 2-8 мкг/мл в фармацевтической композиции.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую два или более различных иммуногенных конъюгатов, причем: (i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем, и (ii) среднее количество сахаридного антигена на конъюгат составляет 1-4 мкг на дозу фармацевтической композиции.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую два или более различных иммуногенных конъюгатов, причем: (i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем, и (ii) средняя концентрация сахаридного антигена на конъюгат составляет 2-8 мкг/мл в фармацевтической композиции.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую n различных иммуногенных конъюгатов, причем: (i) каждый из n иммуногенных конъюгатов содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем; (ii) n представляет собой целое число от 3 до 50; и (iii) композиция не содержит полипептида(ов)-носителя(ей) в неконъюгированной форме, или (iv) композиция содержит полипептид(ы)-носитель(и) в неконъюгированной форме, причем масса полипептида(ов)-носителя(ей) в неконъюгированной форме в композиции составляет < 10% от массы указанного полипептида-носителя в n иммуногенных конъюгатах.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую n различных иммуногенных конъюгатов, причем: (i) каждый из n иммуногенных конъюгатов содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем; (ii) n представляет собой целое число от 3 до 50; и (iii) композиция не содержит сахаридных антигенов в неконъюгированной форме, или (iv) композиция содержит по меньшей мере один сахаридный антиген в неконъюгированной форме, причем общая масса сахаридных антигенов в неконъюгированной форме в композиции составляет < 40% (например, ≤30%, ≤20% или ≤10%) от общей массы сахаридных антигенов в n иммуногенных конъюгатах.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую 14 или более различных иммуногенных конъюгатов, причем: (i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем, и (ii) общее количество полипептида-носителя на дозу составляет < 40 мкг.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую 14 или более различных иммуногенных конъюгатов, причем: (i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем, и (ii) концентрация полипептида-носителя на дозу составляет ≤ 80 мкг/мл.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем процесс получения множества стандартных доз фармацевтической композиции, причем: (i) указанная фармацевтическая композиция содержит иммуногенный конъюгат, содержащий полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем, и (ii) указанный процесс включает этапы получения нефасованной композиции, содержащей иммуногенный конъюгат, и упаковки отдельных стандартных доз нефасованной композиции во множество отдельных контейнеров. Указанный процесс в идеале выполняют асептически. Отдельные контейнеры можно герметизировать после упаковки стандартных доз в них. Отдельные контейнеры в идеале представляют собой шприцы.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую два или более различных иммуногенных конъюгатов, причем: (i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с

полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем; (ii) композиция является лиофилизированной.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем процесс получения фармацевтической композиции, причем указанная фармацевтическая композиция содержит два или более иммуногенных конъюгата и адъювант на основе соли алюминия, причем: (i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, и (ii) сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем; и процесс включает один из этапов (A) раздельной адсорбции каждого из иммуногенных конъюгатов на адъюванте на основе соли алюминия с последующим смешиванием отдельных адсорбированных конъюгатов друг с другом, или (B) последовательной адсорбции каждого из иммуногенных конъюгатов на адъюванте на основе соли алюминия, или (C) получения смеси двух или более из иммуногенных конъюгатов (например, всех из них) и объединения указанной смеси с адъювантом на основе соли алюминия. Адьювант может представлять собой адьювант на основе фосфата алюминия.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем модифицированный полипептид-носитель CRM197, содержащий аминокислотную последовательность, которая: (i) обладает по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1; (ii) не содержит дипептидной последовательности Arg-Arg; и (iii) содержит по меньшей мере один остаток nnAA. Так, например, Arg-192 и/или Arg-193 SEQ ID NO: 1 можно удалить или заменить другой аминокислотой. Остаток(ки) nnAA можно внедрить путем замены аминокислотного остатка в SEQ ID NO: 1, и/или путем инсерции. Модифицированный полипептид-носитель CRM197 можно применять для получения иммуногенных конъюгатов (например, сахаридных антигенов) через остаток(ки) nnAA, содержащиеся в нем.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем модифицированный полипептид-носитель CRM197, содержащий аминокислотную последовательность, которая: (i) обладает по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 и (ii) содержит замену на nnAA одного или более из следующих аминокислотных остатков (пронумерованных согласно SEQ ID NO: 1): Asp-211; Asp-295; Asp-352; Asp-392; Asp-465; Asp-467; Asp-507; Asp-519; Asn-296; Asn-359; Asn-399; Asn-481; Asn-486; Asn-502; Asn-524; Glu-240; Glu-248; Glu-249; Glu-256; Glu-259; Glu-292; Glu-362; Gln-252; Gln-287; Lys-212; Lys-218; Lys-221; Lys-229; Lys-236; Lys-264; Lys-299; Lys-385; Lys-456; Lys-474; Lys-498; Lys-516; Lys-522; Lys-534; Arg-377; Arg-407; Arg-455; Arg-460; Arg-462; Arg-472; Arg-493; Ser-198; Ser-200; Ser-231; Ser-233; Ser-239; Ser-261; Ser-374; Ser-381; Ser-297; Ser-397; Ser-451; Ser-475; Ser-494; Ser-495; Ser-496; Ser-501; Ser-505; Thr-253; Thr-265; Thr-267; Thr-269; Thr-293; Thr-386; Thr-400; Thr-408; Thr-469; и/или Thr-517. Модифицированный полипептид-носитель CRM197 можно применять для получения иммуногенных конъюгатов (например, сахаридных антигенов) черех остаток(ки) nnAA, содержащиеся в нем.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем модифицированный полипептид-носитель CRM197, содержащий аминокислотную последовательность, которая: (i) обладает по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1; (ii) не содержит дипептидной последовательности Arg-Arg; и (iii) содержит замену на nnAA одного или более из следующих аминокислотных остатков (пронумерованных согласно SEQ ID NO: 1): Asp-211; Asp-295; Asp-352; Asp-392; Asp-465; Asp-467; Asp-507; Asp-519; Asn-296; Asn-359; Asn-399; Asn-481; Asn-486; Asn-502; Asn-524; Glu-240; Glu-248; Glu-249; Glu-256; Glu-259; Glu-292; Glu-362; Gln-252; Gln-287; Lys-212; Lys-218; Lys-221; Lys-229; Lys-236; Lys-264; Lys-299; Lys-385; Lys-456; Lys-474; Lys-498; Lys-516; Lys-522; Lys-534; Arg-377; Arg-407; Arg-455; Arg-460; Arg-462; Arg-472; Arg-493; Ser-198; Ser-200; Ser-231; Ser-233; Ser-239; Ser-261; Ser-374; Ser-381; Ser-297; Ser-397; Ser-451; Ser-475; Ser-494; Ser-495; Ser-496; Ser-501; Ser-505; Thr-253; Thr-265; Thr-267; Thr-269; Thr-293; Thr-386; Thr-400; Thr-408; Thr-469; и/или Thr-517. Модифицированный полипептид-носитель CRM197 можно применять для получения иммуногенных конъюгатов (например, сахаридных антигенов) через остаток(ки) nnAA, содержащиеся в нем.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем иммуногенный конъюгат, содержащий полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем (i) полипептид-носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; а (ii) сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через по меньшей мере один остаток nnAA в SEQ ID NO: 4. Кроме того, мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую два или более различных иммуногенных конъюгатов, каждый из которых содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем (i) полипептид-носитель в каждом конъюгате содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; а (ii) сахаридный антиген в каждом конъюгате ковалентно связан с полипептидом-носителем через по меньшей мере один остаток nnAA в SEQ ID NO: 4.

В еще одном варианте реализации мы обеспечиваем шприц, содержащий фармацевтическую композицию, содержащую два или более различных иммуногенных конъюгатов, каждый из которых содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген пневмококка, причем шприц представляет собой несиликонизированный шприц. Фармацевтическая композиция в несиликонизированном шприце в идеале содержит 13 или более пневмококковых конъюгатов, а полипептид-носитель необязательно содержит nnAA, однако вместо этого может представлять собой, например, CRM197. Дополнительная информация

о несиликонизированных шприцах приведена ниже.

Краткое описание чертежа

На фигуре представлено геометрическое среднее титра каждого из 32 указанных серотипов в 32-валентной вакцине согласно настоящему изобретению по отношению к составу полисахаридов/квасцов и Prevnar-13™, описанному в примерах.

Подробное описание изобретения

Различная информация о способах, композициях и методиках продукции конъюгированных антигенов описана в международной патентной публикации № WO2018/126229, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Иммуногенные конъюгаты

Настоящее изобретение в целом относится к иммуногенным конъюгатам. Эти конъюгаты содержат полипептид-носитель, ковалентно присоединенный к антигену. Это присоединение может преобразовать Т-независимый иммуноген (например, сахарид) в Т-зависимый иммуноген, тем самым усиливая вызываемый иммунный ответ (особенно у детей). Конъюгаты, используемые в настоящем документе, включают ковалентные связи, образованные между антигеном и остатком неприродной аминокислоты ("nnAA") в полипептиде-носителе. Эти остатки nnAA могут обеспечивать функциональные группы, облегчающие способность к реакции с представляющим интерес антигеном.

Обычно одиночный полипептид-носитель присоединяют к нескольким молекулам антигена. Антигены могут содержать одиночную связывающую группу на молекулу (например, восстанавливающую концевую группу сахарида) для присоединения полипептида-носителя, или могут содержать несколько связывающих групп (например, несколько альдегидных или цианатных сложноэфирных групп). Если молекула антигена содержит несколько связывающих групп, это обычно приводит к образованию высокомолекулярных перекрестно сшитых или решетчатых конъюгатов, содержащих связи между несколькими полипептидами-носителями через антигены. Перекрестно сшитые конъюгаты являются предпочтительными в настоящем изобретении (особенно для пневмококка), и поэтому антигены с несколькими связывающими группами также являются предпочтительными.

Ковалентные связи образуются между антигеном и остатком nnAA в полипептиде-носителе. Антиген предпочтительно не конъюгирует с остатком лизина в полипептиде-носителе; более предпочтительно, антиген не конъюгирует с остатком природной аминокислоты в полипептиде-носителе.

Пригодные для использования полипептиды-носители содержат Т-клеточный эпитоп. Различные полипептиды-носители такого рода известны в данной области техники, и известно, что в утвержденных вакцинах используют дифтерийный анатоксин (химически обработанный токсин Corynebacterium diphtheriae; 'Dt'), столбнячный анатоксин (химически обработанный тетаноспазмин из Clostridium tetani; 'Tt'), белок D из Haemophilus influenzae ('PD' или 'HiD'), белковый комплекс наружной мембраны менингококка серогруппы B ('OMPC') и мутантный токсин CRM197 C.diphtheriae.

Предпочтительный полипептид-носитель, на котором основываются носители согласно настоящему изобретению, представляет собой CRM197. CRM197 хорошо известен в данной области техники (см., например, Broker et al. 2011 Biologicals 39:195-204) и содержит следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 1), где подчеркнутый остаток (Glu-52) отличается от природного дифтерийного токсина, при этом замена Gly→Glu приводит к утрате токсической ферментативной активности белка:

GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNEN
PLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAE
GSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKT
KTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVN
VAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGF
AAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTP
LPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNGVHANLHVAFHRSSSE
KIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNSKLSLFFEIKS

В настоящем изобретении не используют нативный CRM197. Вместо использования CRM197, содержащего SEQ ID NO: 1, используют модифицированную аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну nnAA. Эти модифицированные полипептиды-носители CRM197 описаны более подробно ниже.

Кроме CRM197, можно использовать другие детоксифицированные формы дифтерийного токсина. Например, в качестве полипептида-носителя в конъюгатах также используют нетоксичный двойной мутант K51E/E148K (Pecetta et al. 2016 Vaccine 34:1405-11), и в последовательность этого двойного мутанта, так же как и в CRM197, можно встроить остатки nnAA.

Еще один рассматриваемый полипептид-носитель представляет собой PD из H.influenzae, который в естественных условиях содержит следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 5):

CSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFAQQADYLEQDLAMTKDGRLVVIHDHFLDGL
TDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFETKDGKQAQVYPNRFPLWKSHFRIHTFEDEIEFIQ
GLEKSTGKKVGIYPEIKAPWFHHQNGKDIAAETLKVLKKYGYDKKTDMVYLQTFDFNELKRIKTELLPQMG
MDLKLVQLIAYTDWKETQEKDPKGYWVNYNYDWMFKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIVYT
PLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPEFFTDVNQMYDALLNKSGATGVFTDFPDTGVEFLKGIK

Вместо нативного PD используют модифицированную аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну nnAA. Например, один или более остатков Lys в SEQ ID NO: 5 можно заменить nnAA. В SEQ ID NO: 5 имеется 36 остатков Lys, поэтому несколько из них можно заменить nnAA и в последующем использовать для конъюгирования. Прогнозирование и распознавание Т-клеточного эпитопа PD описано в работе Hua et al. (2016) Clin Vaccine Immunol 23:155-61.

В более общем случае, любой полипептид, содержащий Т-клеточный эпитоп, можно использовать в качестве полипептида-носителя. Т-клеточный эпитоп может связываться с MHC II класса и взаимодействовать с Т-клеточными рецепторами га поверхности CD4+ Т-клеток, тем самым усиливая ответ на основе антител против антигенов или гаптенов, конъюгированных с ним (например, см. Costantino et al. 2011, Expert Opin DrugDiscov 6:1045-66). В Micoli et al. (2018) Molecules 23, 1451 приведен обзор различных полипептидов-носителей и критерии их выбора. В Tontini et al. (2016) Vaccine 34:4235-42 обсуждаются доклинические исследования 28 полипептидов-носителей, включая проверку их способности индуцировать антитела против сахаридных антигенов. Из различных антигенов патогенного происхождения были сконструированы полиэпитопные полипептиды-носители, содержащие несколько CD4+ Т-клеточных эпитопов человека с широкой реакционной способностью (т.е. иммуногенных в контексте большинства молекул MHC II класса человека) например, N19 и другие полипептиды, описанные в Falugi et al. (2001) Eur J Immunol 31:3816-24, Baraldo et al. (2004) Infect Immun 72:4884-7 и патентах США 6855321 и 7867498. Возможность конструирования полипептидов-носителей демонстрирует возможность для специалистов в данной области техники выявлять подходящие Т-клеточные эпитопы из различных источников и применять их для конструирования эффективных полипептидов-носителей. См. также патентные заявки US2016-0101187. Можно использовать Т-клеточные эпитопы, обнаруженные в известных носителях (например, Tt, PD, CRM197). В качестве носителей успешно используют различные детоксифицированные бактериальные токсины, например, Tt, Dt, экзотоксин P.aeruginosa, токсины A и B C.difficile, etc. Для пневмококковых сахаридов используют многие полипептиды-носители, например, CRM197 в Prevnar™, PD, Tt и Dt в Synflorix™, и различные пептиды в Velasco et al. (1995) Infect Immun 63:961-8. В настоящем изобретении можно использовать любые из этих многочисленных полипептидов-носителей, модифицированных путем включения по меньшей мере одной nnAA с целью усиления иммуногенности рассматриваемых антигенов.

Полипептиды-носители, содержащие nnAA, для использования в настоящем изобретении в общем случае можно получить с использованием методик, описанных в разделе 6 ("Способы продукции белка-носителя") заявки WO2018/126229. Предпочтительные носители содержат nnAAs за пределами по меньшей мере одного Т-клеточного эпитопа носителя. Если области Т-клеточных эпитопов для носителя неизвестны, можно выявить эти эпитопы с использованием стандартных методик, например, см. Reece et al. (1993) IJ Immunol 151:6175-84, Beissbarth et al. (2005) Bioinformatics 21 Suppl 1: i29-37, Maciel Jr et al. (2008) Virol 378:105-17, Fridman et al. (2012) Oncoimmunol 1:1258-70, и т.д. (включая эмпирические и/или прогностические подходы). Кроме того, можно подтвердить, что любая конкретная модификация последовательности полипептида-носителя не устраняет желательного Т-клеточного ответа на конъюгированный антиген, например, сахариды в настоящем документе. Предпочтительная группа носителей не содержит модификаций, включая инсерцию или замену на nnAA, в пределах Т-клеточного эпитопа. Особенно предпочтительные носители содержат по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6 nnAA. Особенно предпочтительные носители также могут содержать максимум 10, 9, 8, 7 или 6 nnAA. Особенно предпочтительные диапазоны nnAA в полипептиде-носителе представляют собой 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7 и 4-6 nnAA.

В иммуногенные конъюгаты, используемые в настоящем документе, можно включать различные антигены. Обычно антиген представляет собой сахарид. Термин "сахарид" включает полисахариды, содержащие 50 или более повторяющихся единиц, и олигосахариды, содержащие менее 50 повторяющихся единиц. Обычно полисахариды содержат от приблизительно 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 повторяющихся единиц до приблизительно 2000 (иногда более) повторяющихся единиц, и необязательно от приблизительно 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 повторяющихся единиц до приблизительно 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800 или 1900 повторяющихся единиц. Олигосахариды обычно содержат от приблизительно 6, 7, 8, 9 или 10 повторяющихся единиц до приблизительно 15, 20, 25, 30 или 35 до приблизительно 40 или 45 повторяющихся единиц.

Сахариды, пригодные для встраивания в иммуногенные конъюгаты, включают сахариды, обнаруженные в бактериях. Они могут представлять собой некапсульные сахариды (например, экзополисахарид, например, экзополисахарид S.aureus), но предпочтительно представляют собой капсульные сахариды бактерий.

Капсульные сахариды бактерий представляют собой высокомолекулярные сахариды, обнаруженные в капсуле грамположительных или грамотрицательных бактерий; их можно использовать в качестве вакцинных антигенов. Такие капсульные сахариды обычно получают из лизатов целых клеток или супернатанта культуры соответствующей бактерии посредством процессов, включающих диафильтрацию, удаление белков, осаждение этанолом, удаление нуклеиновых кислот и лиофильную сушку. Бактериаль-

ные сахариды, используемые в настоящем изобретении, могут представлять собой интактные сахариды в том виде, как они находятся в бактериях, или фрагменты, полученные из интактных сахаридов, например, полученные посредством гидролиза сахаридов, очищенных из бактерий.

Сахаридные антигены, представляющие особый интерес, включают, в числе прочего:

Капсульные сахариды S.pneumoniae. Дополнительная информация о сахаридах капсулы пневмококков, пригодных для использования в качестве антигенов при реализации настоящего изобретения, приведена ниже.

Сахариды Streptococcus pyogenes: Антиген может представлять собой сахарид S.pyogenes. В одном варианте реализации антиген представляет собой капсульный сахарид S. pyogenes, состоящий из гиалуроновой кислоты, высокомолекулярного полимера, где повторяющаяся единица обладает структурой:

$$[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcUA}p\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glc}p\text{NAc-}(\rightarrow]$$

которая, по-видимому, инвариантна между серотипами S. pyogenes. В еще одном варианте реализации антиген представляет собой некапсульный сахарид S. pyogenes, например, сахарид клеточной стенки стрептококков группы A, содержащий каркас из поли-L-рамнопиранозильных единиц, соединенных чередующимися α-L-(1→3)-и α-L-(1→2)-связями, к которым присоединены остатки N-ацетил-β-D-глюкозамина по 3-положению рамнозного каркаса.

Капсульные сахариды Streptococcus agalactiae: Антиген может представлять собой капсульный сахарид S. agalactiae (стрептококка группы B, или GBS). Существует по меньшей мере 10 серотипов GBS с различными повторяющимися единицами капсульных сахаридов (Ia, Ib, II-IX), однако лишь несколько серотипов обычно отвечают за развитие заболевания. Они включают серотипы Ia, Ib, II, III и V, и можно получить конъюгаты капсульных сахаридов этих серотипов.

Капсульные сахариды Haemophilus influenzae: Антиген может представлять собой капсульный сахарид H. influenzae. Существует по меньшей мере 6 серотипов H. influenzae с различной химической структурой капсульных сахаридов (типы a-f). В то же время лишь тип a и тип b считаются "высоковирулентными" штаммами, и предпочтительным типом сахарида капсулы H.influenzae для использования в настоящем изобретении является тип b (Hib).

Капсульные сахариды Neisseria meninsitidis: Антиген может представлять собой капсульный сахарид N.meningitidis. Существует по меньшей мере 13 серогрупп N.meningitidis с различной химической структурой капсульных сахаридов (серогруппы A, B, C, E-29, H, I, K, L, W-135, X, Y, Z и Z'), но только шесть из них (A, B, C, W-135, X, Y) считаются опасными для жизни. Сахаридный антиген обычно получают из любой из серогрупп A, C, W135, X или Y.

Капсульные сахариды Porphyromonas gingivalis: Антиген может представлять собой капсульный сахарид, полученный из одного из шести серотипов K1, K2, K3, K4, K5 и K6 P.gingivalis.

Капсульные сахариды Salmonella typhi: Антиген может представлять собой сахарид Vi. Vi представляет собой капсульный сахарид Salmonella typhi (серовара typhi S.enterica). Сахарид Vi представляет собой линейный гомополимер гексозаминуроновой кислоты - α1,4-N-ацетилгалактозаминуроновой кислоты, на 60-90% ацетилированной по C-3 положению.

Сахариды Staphylococcus aureus: Антиген может представлять собой сахарид S.aureus. Сахарид может представлять собой экзополисахарид S.aureus, который представляет собой поли-N-ацетилглюкозамин (PNAG), или капсульный сахарид S.aureus, который может представлять собой, например, серотип 5, серотип 8 или серотип 336.

Поверхностные сахариды Clostridium difficile: Антиген может представлять собой поверхностный гликан C.difficile, например, PS-I или PS-II.

Глюканы: Антиген может представлять собой глюкан, содержащий β-1,3-связи и/или β-1,6-связи. Эти конъюгированные глюканы можно применять для индукции противогрибкового иммунного ответа, например, против Candida albicans.

Дополнительную информацию об этих сахаридных антигенах можно найти в WO2018/126229.

Антигены часто сами по себе не содержат функциональные группы, подходящие или идеальные для конъюгирования. Таким образом, может потребоваться функционализация антигена перед его конъюгированием с nnAA. Дополнительная информация о такой функционализации приведена ниже.

Капсульные сахариды пневмококка

Предпочтительными антигенами для использования в настоящем изобретении являются капсульные сахариды Streptococcus pneumoniae. S.pneumoniae представляет собой грамположительную бактерию, обладающую капсулой и способную вызывать пневмонию, бактериемию и менингит. Существует по меньшей мере 90 различных документированных серотипов S.pneumoniae (см., например, Kalin, M. Thorax 1998;53:159-162) которые несут капсульные сахариды со структурами из серотип-специфичных повторяющихся единиц. Как должны понимать специалисты в данной области техники, предполагается, что серотип 20 S.pneumoniae фактически представляет собой два близкородственных серотипа, капсульные сахариды которых в значительной степени вызывают перекрестный иммунитет (Calix et al. 2012 J Biol Chem 287:27885-94). Таким образом, как должны принимать во внимание специалисты в данной области техники, серотип 20 относится к сахариду, который ранее классифицировали в данной области

техники как серотип 20, и который поэтому может структурно представлять собой 20A или 20B (из штамма, который ранее в данной области техники относили к серотипу 20, но который генотипически может представлять собой 20A или 20B), в соответствии с описанием в работе Calix et al. Например, штамм, использованный для получения полисахарида серотипа 20 в Pneumovax™ (Merck), в настоящее время считают относящимся к серотипу 20A. В некоторых случаях предпочтительным может являться 20A. В других случаях предпочтительным может являться 20B. Распространенность в целевой популяции может являться основанием для выбора между этими серотипами. Тем не менее, поскольку штаммы, классифицируемые как 20, 20A и 20B, являются серологически сходными, они в значительной степени вызывают перекрестный иммунитет в составе вакцины, и выбор между штаммами может не иметь большого значения.

Антиген, используемый в настоящем изобретении, может представлять собой капсульный сахарид любого из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 7A, 7B, 7C, 8, 9A, 9L, 9N, 9V, 10F, 10A, 10B, 10C, 11F, 11A, 11B, 11C, 11D, 12F, 12A, 12B, 13, 14, 15F, 15A, 15B, 15C, 16F, 16A, 17F, 17A, 18F, 18A, 18B, 18C, 19F, 19A, 19B, 19C, 20, 21, 22F, 22A, 23F, 23A, 23B, 24F, 24A, 24B, 25F, 25A, 27, 28F, 28A, 29, 31, 32F, 32A, 33F, 33A, 33B, 33C, 33D, 34, 35F, 35A, 35B, 35C, 36, 37, 38, 39, 40, 41F, 41A, 42, 43, 44, 45, 46, 47F, 47A или 48 S.pneumoniae (Henrichsen J Clin Microbiol 1995; 33:2759-2762). Однако лишь отдельная подгруппа этих серотипов обычно отвечает за развитие клинически значимой бактериальной инфекции, поэтому антиген может представлять собой капсульный сахарид любого из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F S.pneumoniae. Серотипы 6C, 7C, 15A, 15C, 16F, 20A, 20B, 23A, 23B, 24B, 31, 34, 35B, 35F, 37 и 38 также имеют клиническое значение, поэтому антиген может представлять собой капсульный сахарид одного из этих серотипов S.pneumoniae.

Если в настоящем изобретении используют конъюгаты различных серотипов пневмококка, предпочтительно включать с них сахариды по меньшей мере из 14 различных серотипов S.pneumoniae (например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более). Если композиция содержит 14 или более серотипов, они предпочтительно включают 13 серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F. В дополнение к этим 13 серотипам S.pneumoniae, композиции предпочтительно содержат один или более из серотипов 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20 (в качестве альтернативы, 20A или 20B), 22F и/или 33F. В качестве альтернативы, в дополнение к вышеуказанным 13 серотипам, композиция предпочтительно содержит один или более из серотипов 2, 6C, 8, 9N, 10A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 20, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 24B, 31, 33F, 34, 35B, 35F и 38 S.pneumoniae. Пригодная для использования комбинация 15 или более (например, 16 или более) серотипов включает каждый из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F S.pneumoniae, и также может включать серотип 8. Пригодная для использования комбинация 20 или более (например, 21 или более) серотипов включает каждый из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F S.pneumoniae. Пригодная для использования комбинация 24 или более серотипов включает каждый из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F и 33F S.pneumoniae.

Структуры распространенных повторяющихся единиц капсульных сахаридов серотипов пневмококка описаны в работе Jones et al. (Jones C et al. An Acad Bras Cienc. 2005 Jun;77(2):293-324):

Тип 1

[→3)-D-AAT-α-Gal*p*-(1→4)-α-D-Gal*p*A(2/3OAc)-(1→3)-α-D-Gal*p*A-(1→]

Тип 2

[→4)-β-D-Glcp-(1→3)-[α-D-GlcpA-(1→6)-α-D-Glcp-(1→2)]-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)β-L-Rhap-(1→]

Тип 3

[→3)-β-D-GlcA-(1→4)-β-D-Glc*p*-(1→]

Тип 4

[→3)-β-D-ManpNAc-(1→3)-α-L-FucpNAc-(1→3)-α-D-GalpNAc-(1→4) -α-D-Galp2,3(S)Py-(1→]

Тип 5

[→4)-β-D-Glcp-(1→4)-[α-L-PnepNAc-(1→2)-β-D-GlcpA-(1→3)] -α-L-FucpNAc-(1→3)-β-D-Sugp-(1→]

Тип 6B

[→2)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-Glcp-(1→3)-α-L-Rhap-(1→4)-D-Rib-ol-(5→P→]

Тип 9N

[→4)-α-D-GlcpA-(1→3)-α-D-Glcp-(1→3)-β-D-ManpNAc-(1→4) -β-D-Glcp-(1→4)-α-D-GlcpNAc-(1→]

Тип 9V

[→4)-α-D-GlcpA(2/3OAc)-(1→3)-α-D-Galp-(1→3)-β-D-ManpNAc(4/6OAc)-(1→4) -β-D-Glcp-(1→4)-α-D-Glcp-(1→]

Тип 12F

[→4)-[α-D-Galp-(1→3)]α-L-FucpNAc-(1→3)-β-D-GlcNAc-(1→4)-[α-D-Glc-(1→2) -α-D-Glc-(1→3)]-β-D-ManNAcA-(→]

Тип 14

[→4)-β-D-Glcp-(1→6)-[β-D-Galp-(1→4)]-β-D-GlcpNAc-(1→3)-β-D-Galp-(1→]

Тип 18C

[→4)-β-D-Glcp-(1→4)-[α-D-Glcp(6OAc) (1→2)][Gro-(1→P→3)]-β-D-Galp-(1→4) -α-D-Glcp-(1→3)-β-L-Rhap-(1→]

Тип 19F

[→4)-β-D-ManpNAc-(1→4)-α-D-Glcp-(1→2)-α-L-Rhap-(1→P→]

Тип 23F

[→4)-β-D-Glcp-(1→4)-[α-L-Rhap-(1→2)]-[Gro-(2→P→3)] -β-D-Galp-(1→4)-β-L-Rhap-(1→]

Более развернутое обсуждение сахаридов находится в работе Geno et al. (2015) Clin. Microbiol. Rev. 28:871-99, где в табл. 1 показаны структуры 97 известных серотипов. В этой таблице также описана доля ацетилированных сахаридных остатков при неполном ацетилировании.

Капсульный сахарид может быть О-ацетилированным. В некоторых вариантах реализации капсульный сахарид серотипа 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F содержит сахарид со степенью О-ацетилирования между 10-100%, между 20-100%, между 30-100%, между 40-100%, между 50-100%, между 60-100%, между 70-100%, между 75-100%, 80-100%, 90-100%, 50-90%, 60-90%, 70-90% или 80-90%. В других вариантах реализации степень О-ацетилирования превышает 10%, превышает 20%, превышает 30%, превышает 40%, превышает 50%, превышает 60%, превышает 70%, превышает 80%, превышает 90% или составляет приблизительно 100%. Степень О-ацетилирования сахарида можно определить с помощью протонного ЯМР (см., например, Lemercinier & Jones (1996) Carbohydrate Research 296:83-96; Jones et al. (2002) J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30:1233-1247). Обычно сахарид, используемый для получения конъюгата, сохраняет по меньшей мере 50% (например, 75% или даже 100%) уровня О-ацетилирования, наблюдаемого в исходном сахариде капсулы, очищенном из бактерии.

Капсульные сахариды S.pneumoniae можно получить непосредственно из бактерии с использованием процедур выделения, известных специалисту в данной области техники (см., например, способы, описанные в публикациях патентных заявок США № 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340 и 2008/0102498 и WO 2008/118752). В качестве альтернативы, их можно получить из коммерческого источника (например, ATCC).

Сахаридный антиген капсулы пневмококка, используемый в настоящем изобретении, может обладать молекулярной массой от 10 кДа до 4000 кДа, например, от 50 кДа до 3000 кДа или от 100 кДа до 2000 кДа. Например, молекулярная масса может находиться между 100 кДа и 2000 кДа; между 100 кДа и 1750 кДа; между 100 кДа и 1500 кДа; между 100 кДа и 1250 кДа; между 100 кДа и 1000 кДа; между 100 кДа и 750 кДа; между 100 кДа и 500 кДа; между 200 кДа и 4000 кДа; между 200 кДа и 3500 кДа; между 200 кДа и 3000 кДа; между 200 кДа и 2500 кДа; между 200 кДа и 2000 кДа; между 200 кДа и 2000 кДа; между 200 кДа и 1750 кДа; между 200 кДа и 1500 кДа; между 200 кДа и 1250 кДа; между 200 кДа и 1000 кДа; между 200 кДа и 750 кДа; или между 200 кДа и 500 кДа. Дополнительная информация и руководство по отношению к молекулярной массе доступно в заявке на патент США № 62/693978, ранее включенной в настоящий документ посредством ссылки.

Капсульный сахарид необязательно химически модифицирован по сравнению с сахаридом капсулы, находящимся в естественных условиях. Например, сахарид необязательно является О-дезацетилированным (частично или полностью), N-дезацетилированным (частично или полностью), N-

пропионированным (частично или полностью) и т.д. Дезацетилирование необязательно происходит до, во время или после активации, модификации или конъюгирования, но обычно происходит до конъюгирования.

Некоторые варианты реализации настоящего изобретения включают применение двух или более различных конъюгатов. По отношению к конъюгатам сахарида капсулы пневмококка это означает (при использовании одного типа полипептида-носителя для каждого конъюгата), что каждый "различающийся" конъюгат содержит сахарид своего серотипа пневмококка.

Мультивалентные конъюгаты

Предпочтительные композиции согласно настоящему изобретению включают применение двух или более различных конъюгатов, например, в одной фармацевтической композиции. Эти варианты реализации также называются мультивалентными. Если любые два конъюгата описываются как "различающиеся", или обеспечивают различные валентности в "мультивалентной" композиции, это относится к различию между комбинацией полипептида-носителя и антигена в этих двух конъюгатах. Например, при конъюгировании одного типа модифицированного CRM197 (например, SEQ ID NO: 4) с сахаридом капсулы одного серотипа пневмококка, продукт реакции содержит много различных типов молекул (с различной молекулярной массой, различной картиной связей в каждой молекуле и т.д.), однако в настоящем документе они считаются одним конъюгатом. Специалисты в данной области техники знакомы с этой гетерогенностью на молекулярном уровне и аналогичным образом определяют отдельные конъюгаты вакцины по комбинации антиген-носитель конкретного конъюгата, причем другие свойства (например, молекулярная масса) представляют собой среднее значение в композиции конъюгата. Два "различающихся" конъюгата содержат различные полипептиды-носители (т.е. обладающие различающейся аминокислотной последовательностью) и/или различные антигены (т.е. обладающие различной антигенной структурой).

Например, сахаридные антигены капсулы можно очистить из двух различных серотипов пневмококков. Эти два различных сахарида капсулы можно по отдельности конъюгировать с полипептидом-носителем (который может быть одинаковым или различающимся) с получением двух различных конъюгатов. Таким образом, по отношению к конъюгатам капсульных сахаридов бактерий различие между двумя "различающимися" конъюгатами обычно заключается в том, что один из них содержит капсульный сахарид первого серотипа или сегогруппы вида бактерий, в то время как другой содержит капсульный сахарид второго серотипа или сегогруппы указанного вида бактерий, например, капсульные сахариды различных серотипов S.pneumoniae, или капсульные сахариды различных серотипов N.meningitidis. Два конъюгата также могут быть "различными", если они содержат антигенно различающиеся капсульные сахариды различных видов бактерий, например, конъюгат сахарида Hib и конъюгат сахарида менингококка.

Предпочтительные мультивалентные композиции согласно настоящему изобретению содержат n различных конъюгатов сахаридов, причем сахаридный антиген каждого из n иммуногенных конъюгатов отличается от сахаридного антигена других n-1 иммуногенных конъюгатов. Например, если композиция содержит антигены одного вида бактерий, в ней могут присутствовать капсульные сахариды n различных серотипов или n различных серогрупп этого вида.

Эта номенклатура по отношению к "различным" конъюгатам используется в области конъюгатных вакцин. Например, в Glesby et al. (2015) J Infect Dis 212:18-27 упоминается, что вакцина Prevnar™ PCV13 содержит "13 различных конъюгатов", поскольку она содержит сахаридные антигены 13 различных серотипов пневмококка, по отдельности конъюгированные с CRM197. Аналогичным образом, EP-A-2932979 относится к "иммуногенной композиции, содержащей 13 различных конъюгатов полисахарид-белок".

Так, вакцина PCV7 Prevnar™ содержит 7 различных конъюгатов, вакцина PCV13 Prevnar™ содержит 13 различных конъюгатов, вакцина Menveo™ содержит 4 различных конъюгата, вакцина Menactra™ содержит 4 различных конъюгата, вакцина Nimenrix™ содержит 4 различных конъюгата, вакцина Menitorix™ содержит 2 различных конъюгата, вакцина Menhibrix™ содержит 3 различных конъюгата, вакцина Synflorix™ содержит 10 различных конъюгатов и т.д.

Мультивалентные композиции пневмококковых конъюгатов предпочтительно содержат более 13 различных конъюгатов, например, 14, 15, 20, 21, 24, 25 или более. Выбор подходящих серотипов для этих > 13-валентных композиций обсуждается выше.

По отношению к высоковалентным вакцинам (например, содержащим более 13 различных конъюгатов) иногда может быть желательно использовать более одного полипептида-носителя для снижения возможности супрессии носителя (например, см. WO98/51339 и WO2011/110241). Например, в мультивалентной вакцине, содержащей n различных конъюгатов, первый полипептид-носитель конъюгируют с n-y различными антигенами (например, сахаридами капсулы различных серотипов или серогрупп бактерий), а второй полипептид-носитель конъюгируют с остальными y антигенами. Аналогичным образом, три, четыре или более носителей можно использовать с n антигенами, разделенными между ними. При использовании более одного носителя по меньшей мере первый носитель представляет собой полипеп-

тид-носитель, содержащий nnAA согласно настоящему изобретению. В предпочтительном варианте реализации по меньшей мере первый и второй носители являются полипептидами-носителями, содержащими nnAA согласно настоящему изобретению.

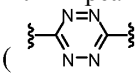
Неприродные аминокислоты

Как упоминалось выше, конъюгаты, использованные в настоящем изобретении, содержат ковалентные связи между антигеном и функциональной группой в остатке nnAA в полипептиде-носителе. Боковые цепи остатков nnAA могут содержать реакционноспособные функциональные группы, которые можно использовать для конъюгирования антигенов с дискретными сайтами полипептида-носителя.

Вообще говоря, nnAA может представлять собой любую аминокислоту, которую можно встроить в полипептид во время трансляции, но которая не является одной из 20 распространенных аминокислот. nnAA можно встроить в полипептид, преобразуя молекулу тРНК таким образом, что ее кодон осуществляет встраивание nnAA вместо аминокислоты, распознаваемой в естественных условиях. Одна методика, позволяющая достичь этого, включает использование "кодона супрессии", т.е. нуклеотидного триплета, встраиваемого в кодирующую последовательность в желательном положении и распознаваемого специфической тРНК, которая может распознавать природный стоп-кодон (например, стоп-кодон "амбер", "охра" или "опал"), но допускает продолжение трансляции со встраиванием nnAA (тем самым подавляя природный стоп-кодон).

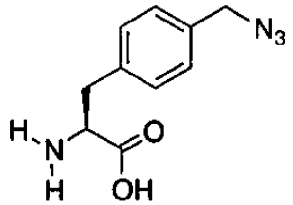
Остаток nnAA может представлять собой любой из остатков nnAA, описанных в настоящем документе, или любой другой остаток, который можно считать совместимым с клеточным или бесклеточным синтезом белка (см., например, Schultz et al. Annu Rev Biochem. 2010;79:413-44, в частности, pp.418-420; и Chin et al. Annu Rev Biochem. 2014;83:5.1-5.30, включенные в настоящий документ посредством ссылок). В идеале nnAA не представляет собой остаток, образующийся в клетке в естественных условиях посредством модификации 20 распространенных аминокислот (например, пролизин, селеноцистеин, фосфотирозин, формилметионин и т.д.).

Особенно предпочтительные nnAA для использования в настоящем изобретении представляют собой остатки, которые можно встроить во время трансляции (в клеточной или бесклеточной системе), содержащие боковую цепь, содержащую функциональную группу, не встречающуюся в боковой цепи любой из 20 природных аминокислот. Известны различные методики встраивания таких аминокислот в полипептиды, например, см. Young & Schultz (2010) J Biol Chem 285:11039-44, Maza et al. (2015) Bioconjugate Chem. 26:1884-9, и Zimmerman et al. (2014) Bioconjugate Chem. 25:351-61. В WO2018/126229 подробно описано, как можно встроить остатки nnAA в полипептиды-носители, например, с использованием бесклеточных экспрессирующих смесей, пар "ортогональная тРНК/аминоацил-тРНК-синтетаза", специфичных по отношению к nnAA, кодонов супрессии и т.д. См. также заявку на патент США US-2017/0267637.

nnAA может содержать химическую группу, подходящую для "клик"-реакции с соответствующей группой рассматриваемого антигена. Подходящие химические группы для "клик"-реакций включают азидную (-N_3), алкиновую (-C≡C-), алкеновую (-C=C-), 1,2,4,5-тетразиновую  и фосфиновую (например, -$P(Ph)_2$) группы, но не ограничиваются ими.

nnAA может представлять собой любую из 2-амино-3-(4-азидофенил)пропановую кислоту (пара-азидо-L-фенилаланин, или pAF), 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановую кислоту (пара-азидоме тил-L-фенилаланин, или pAMF), 2-амино-3-(5-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановую кислоту, 2-амино-3-(4-(азидометил)пиридин-2-ил)пропановую кислоту, 2-амино-3-(6-(азидометил)пиридин-3-ил)пропано вую кислоту или 2-амино-5-азидопентановую кислоту.

Наиболее предпочтительной nnAA для использования в настоящем изобретении является pAMF:

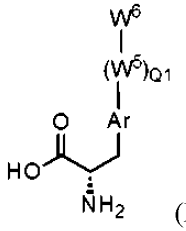


pAMF обеспечивает крайне благоприятную кинетику реакции для получения конъюгатов (например, значительно более быструю, чем при использовании pAF при реакции с алкинсодержащим углеводным антигеном при способе SPAAC).

nnAA может представлять собой 2,3-двузамещенную пропановую кислоту, несущую: заместитель-аминогруппу в 2-положении; азидсодержащий заместитель, 1,2,4,5-тетразинил-содержащий заместитель или этинилсодержащий заместитель в 3-положении. Заместитель в 3-положении предпочтительно представляет собой азидсодержащий заместитель, в частности, азидсодержащий заместитель, содержащий концевую азидную группу, связанную с атомом углерода в 3-положении через линкерную группу. Например, линкерная группа может содержать ариленовую группу, которая является необязательно заме-

щенной и необязательно содержит гетероатом. Например, линкерная группа может содержать 5- или 6-членную ариленовую группу, содержащую от 0 до 4 гетероатомов и от 0 до 4 заместителей, не являющихся атомом водорода в составе кольца.

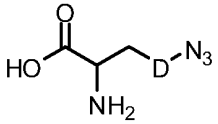
nnAA может обладать структурой согласно формуле XII:



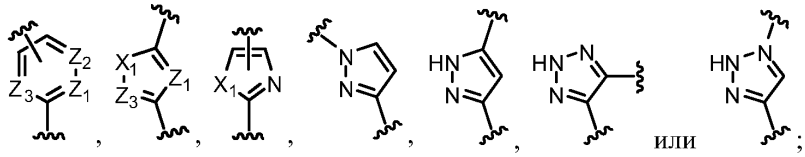
(XII)

где: Ar содержит 5-членное или 6-членное ароматическое кольцо, необязательно содержащее по меньшей мере один гетероатом; W^5 выбрана из C_1-C_{10} алкилена, -NH-, -O-и -S-; Q1 равно нулю или 1; а W^6 выбрана из азидной группы, 1,2,4,5-тетразинильной группы, необязательно С-замещенной низшей алкильной группой, и этинилльной группы. В некоторых вариантах реализации Ar не содержит гетероатомов, и в этом случае предпочтительный линкер представляет собой незамещенную фениленовую группу (т.е. Ar представляет собой -C_6H_4-). В других вариантах реализации Ar содержит гетероатом азота и по меньшей мере один дополнительный гетероатом, выбранный из N, O и S. Типичные азотсодержащие гетероциклы описаны ниже, и Ar может представлять собой, например, пиридин или пиридазин. В особенно предпочтительном варианте реализации Q1 равно 1, W^5 представляет собой низший алкилен, а W^6 представляет собой азидную группу.

nnAA может представлять собой азидсодержащую nnAA, например, nnAA согласно формуле I:

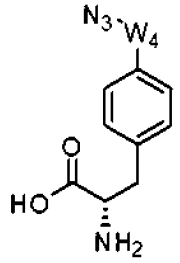


где: D представляет собой -Ar-W3- или -W1-Y1-C(O)-Y2-W2-; каждая из W1, W2 и W3 независимо от других представляет собой одинарную связь или низший алкилен; каждая X_1 независимо от других представляет собой -NH-, -O- или -S-; каждая Y1 независимо от других представляет собой одинарную связь, -NH- или -O-; каждая Y2 независимо от других представляет собой одинарную связь, -NH-, -O- или N-связанный или C-связанный пирролидинилен; Ar представляет собой



и одна из Z_1, Z_2 и Z_3 представляет собой -N-, а другие из Z_1, Z_2 и Z_3 независимо от других представляют собой -CH-.

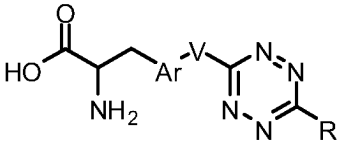
В других вариантах реализации nnAA характеризуется формулой II:



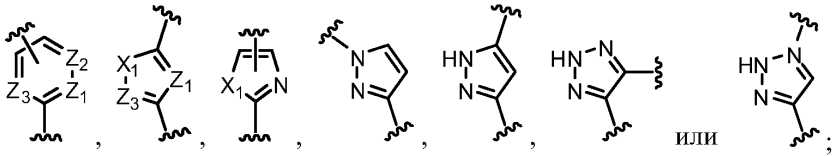
где W_4 представляет собой C_1-C_{10} алкилен.

Получение азидсодержащих аминокислот согласно формулам I и II описано, например, в работе Stafford et al. US2014-0066598A1, в частности, в абзацах [0331)]-[0333], которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Данный процесс включает замену гидроксильных групп в производных соответствующих ароматических аминокислот хлоридом с использованием тионилхлорида с последующим нуклеофильным вытеснением хлорида азидом. Подходящие аминокислоты, содержащие арильные боковые цепи, также приобретают коммерческим путем.

nnAA может представлять собой 1,2,4,5-тетразин-содержащую nnAA. Например, формула III:



где: Ar представляет собой



V представляет собой одинарную связь, низший алкилен или -W1-W2-; одна из W1 и W2 отсутствует или представляет собой низший алкилен, а другая представляет собой -NH-, -O- или -S-; каждая из Z_1, Z_2 и Z_3 независимо от других представляет собой -CH- или -N-; X_1 независимо от других представляет собой -NH-, -O- или -S-; а R представляет собой низший алкил.

Получение 1,2,4,5-тетразин-содержащих аминокислот согласно формуле III описано, например, в работе Yang et al. US2016/0251336, в частности, в абзацах [0341]-[0377], которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Данный процесс включает присоединение Негиши аминопиридилбромида к производному (R)-2-амино-3-иодпропановой кислоты, защищенному амино/карбоксильной группой, с целью внедрения Ar, с последующей реакцией с метилтио-1,2,4,5-тетразиновым производным с целью внедрения тетразиновой группы в аминокислоту.

nnAA может представлять собой алкинсодержащую nnAA. В одном варианте реализации алкин представляет собой пропаргиловую группу. Большое количество пропаргилсодержащих аминокислот, в том числе их синтез, описано в работах Beatty et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 7364-7; Beatty et al. J. Am. Chem. Soc. 2005(127): 14150-1; Nguyen et al. JACS2009 (131):8720-1. Такие пропаргилсодержащие аминокислоты подходят для внедрения в белки с использованием клеточных систем. В некоторых вариантах реализации пропаргилсодержащая nnAA выбрана из группы, состоящей из гомопропаргилглицина, этинилфенилаланина и N6-[(2-пропинилокси)карбонил]-L-лизина.

nnAA, используемые в настоящем документе, обычно представляют собой α-аминокислоты с хиральным центром при α-атоме углерода, и предпочтительно представляют собой L-стереоизомеры.

Полипептид-носитель, используемый в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере один остаток nnAA. В предпочтительном случае полипептид-носитель должен содержать несколько nnAA, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 остатков nnAA (или иногда больше). Предпочтительными являются полипептиды-носители, содержащие менее 10 остатков nnAA. Таким образом, полипептид может содержать 2-9 остатков nnAA, и предпочтительно содержит 4-6 остатков nnAA.

Если полипептид-носитель содержит несколько остатков nnAA, предпочтительно, чтобы он содержал nnAA только одного вида (например, единственная nnAA в составе носителя представляет собой pAMF). Это позволяет использовать одни и те же химические механизмы конъюгирования одновременно для каждой nnAA. Предпочтительным является присоединение двух различных антигенов к одной молекуле носителя, этого можно достичь, используя различные разновидности nnAA в одном носителе, и конъюгируя каждый антиген со своей nnAA, однако конъюгирование с одной разновидностью nnAA в составе носителя является предпочтительным. Кроме того, при использовании нескольких различных конъюгатов (например, различных серотипов пневмококка) иногда предпочтительно, чтобы каждый конъюгат содержал одну и ту же разновидность nnAA. Кроме того, если композиция содержит несколько различных конъюгатов (например, различных серотипов пневмококка), иногда предпочтительно, чтобы каждый конъюгат содержал один и тот же полипептид-носитель.

nnAA моэно встраивать в полипептид-носитель путем замены ли инсерции (или путем удлинения по С-концу или N-концу). В одном варианте реализации остаток(ки) nnAA встраивают путем замены. Целесообразной является замена остатка лизина в нативном полипептиде на nnAA. Например, в CRM197 замена может иметь место в одном или более из положений K24, K33, K37, K39, K212, K214, K227, K244, K264, K385, K522 и K526 в SEQ ID NO: 1 или 2. Замена на nnAA (например, pAMF) в каждом из положений K33, K212, K244, K264, K385 и K526 (а в одном варианте реализации - ни в каких других положениях) является предпочтительной.

Замены с целью встраивания nnAA не ограничиваются положениями лизина; кроме этого, можно выполнять замену на nnAA других аминокислот, например, Phe, Asp, Asn, Glu, Gln, Arg, Ser и/или Thr.

nnAA в полипептиде-носителе в идеале представляют собой поверхностные доступные остатки. Оценку этого можно выполнить с использованием 3D-структуры полипептида или посредством выполнения полной замены природных аминокислот nnAA с последующими проверками конъюгирования с целью оценки целесообразности использования каждого сайта.

Для сохранения функции полипептида-носителя предпочтительно не выполнять встраивание nnAA в пределах эпитопа полипептида-носителя, активирующего Т-клетки. Использование nnAA допускает селективное размещение сайтов конъюгирования и, таким образом, можно избегать использования эпитопов полипептида-носителя, активирующих Т-клетки, в качестве сайтов конъюгирования антигена. Как упоминалось выше, эти эпитопы легко выявить. Например, исследования CRM197 в работах Raju et al., Bixler et al., Leonard et al. и Pillai et al. например, Eur J Immunol. 1995 Dec;25(12):3207-14, WO89/06974) позволило выявить различные Т-клеточные эпитопы, например, в области остатков P271-D290, V321-

G383 и Q411-I457. Таким образом, предпочтительно избегать встраивания nnAA в эти области SEQ ID NO: 1.

Конъюгирование

Конъюгирование включает образование ковалентной связи между остатком nnAA и антигеном. Для этого требуется наличие реакционноспособной функциональной группы как в nnAA, так и в составе антигена. nnAA для полипептида-носителя обычно выбирают исходя из наличия подходящей функциональной группы (например, азидогруппы в pAMF), однако антигены часто сами по себе не содержат функциональные группы, подходящие или идеальные для конъюгирования. Таким образом, может потребоваться функционализация антигена перед его конъюгированием с nnAA.

Подробная техническая информация о конъюгировании находится в Bioconjugate Techniques (Greg T Hermanson, 3rd edition, 2013). В WO2018/126229 подробно описано, как можно функционализировать антигены и затем конъюгировать их с nnAA. Как отмечалось выше, nnAA, которые можно использовать, содержат функциональную группу (например, азидогрупу), подходящую для "клик"-реакции с функциональной группой антигена. Таким образом, функционализированный антиген в идеале содержит группу, подходящую для таких "клик"-реакций.

Вообще говоря, конъюгирование происходит посредством процесса, включающего 3 стадии: (a) активация антигена; (b) необязательная модификация активированного антигена (, например, путем присоединения линкера или нуклеофильной группы) с целью внедрения реакционноспособной функциональной группы, обычно отсутствующей в составе антигена; и (c) конъюгирование антигена с полипептидом-носителем через группу, внедренную на этапе (a) или, при его наличии, этапе (b). В некоторых вариантах реализации этап (a) включает первый этап удаления блокирующей группы с антигена, таким образом, чтобы определенные функциональные группы (например, гидроксильных, аминных, тиоловых) были более доступны для активации. Иногда этапы (a)-(c) могут происходить по существу одновременно (например, при добавлении к антигену реакционноспособной группы, например, N-гидроксисукцинимида), однако в других вариантах реализации два или более из этапов (a)-(c) являются дискретными, причем между этапами необязательно имеет место очистка.

Как отмечалось выше, перекрестно сшитые конъюгаты являются предпочтительными, поэтому также предпочтительно внедрять несколько реакционноспособных групп на молекулу антигена. Например, при активации молекулы сахарида можно внедрить несколько альдегидных иди цианатных сложноэфирных групп. Эти группы затем можно модифицировать, например, с целью внедрения реакционноспособного циклооктина, который может реагировать с азидогруппами в nnAA.

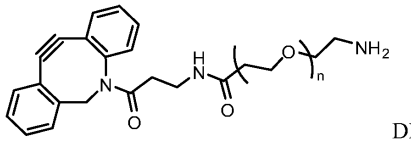
Антиген можно активировать с использованием различных химических механизмов, включая периодатное окисление (например, с целью окисления гидроксильных групп при соседних атомах углерода с получением реакционноспособных альдегидных групп), например, как описано в WO2011/110531; цианилирование, например, с использованием тетрафторбората 1-циан-4-диметиламинопиридиния (CDAP); активацию гидроксильных групп 1,1'-карбонилдиимидазолом (CDI) с последующим нуклеофильным присоединением; или демаскировку исходно присутствующей в соединении альдегидрой группы (например, восстанавливающей концевой группы сахарида), но не ограничиваясь ими.

Периодатное окисление и цианилирование CDAP представляют собой две предпочтительных методики активации. Показано, что периодатное окисление можно использовать для активации, в числе прочего, серотипов пневмококка 1, 2, 3, 7F, 8, 9N и 11A. Показано, что цианилирование CDAP можно использовать для активации, в числе прочего, серотипов пневмококка 3, 7F и 10A.

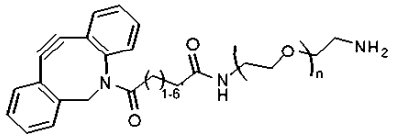
Активированный антиген можно конъюгировать непосредственно с nnAA, однако обычно активированную группу модифицируют с целью внедрения функциональной группы, демонстрирующей лучшую реакционную способность по отношению к функциональной группе nnAA. Например, можно внедрить алкинильную группу. Бифункциональный реагент, содержащий аминогруппу или алкиновую группу, может вступать в реакцию с альдегидной группой, внедренной в антиген (например, путем восстановительного аминирования), тем самым оставляя боковую алкиновую группу, которая может реагировать с nnAA. Например, можно использовать бифункциональные реагенты, содержащие аминогруппу и функциональные группы DBCO.

В одном варианте реализации nnAA реагирует с алкинильной группой в составе антигена (например, пропаргильной группой). Алкиновая группа в составе антигена является идеальной для реакции с азидогруппой в nnAA, например, с использованием реакций, известных в данной области техники как азид-алкиновое циклоприсоединение, катализируемое медью (CuAAC), азид-алкиновое циклоприсоединение, катализируемое рутением (RuAAC), или азид-алкиновое 1,3-диполярное циклоприсоединение Хьюзгена. Алкинильная группа может находиться в молекулярном контексте, усиливающем ее реакционную способность, например, она может находиться внутри кольца. Например, алкилен может находиться внутри циклооктинового кольца (необязательно содержащего гетероатом), например, циклооктинового кольца, напряженного диарильной группой (например, DBCO). Эта реакция может представлять собой [3+2]-циклоприсоединение, называемое в данной области техники азид-алкиновым циклоприсоединением, стимулированным напряжением (SPAAC). Реагенты на основе DIFO и DBCO для осуществления этих реакций являются легкодоступными.

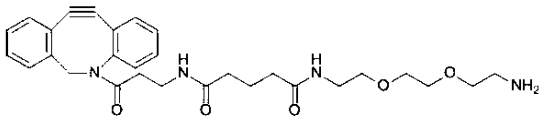
Алкинсодержащие кольца, которые можно использовать в реакциях SPAAC, включают дифторированный циклооктин (DIFO) и дибензоциклооктины. Они доступны с боковыми функциональными группами для присоединения к активированным антигенам (например, с боковой аминогруппой для присоединения к альдегидной или цианатной сложноэфирной группе), например, с использованием любого из следующих реагентов:

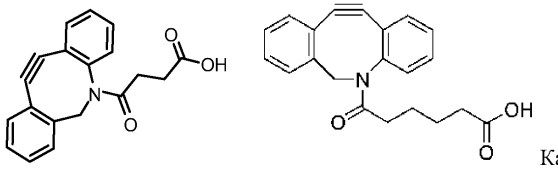


DBCO-PEGn-NH_2

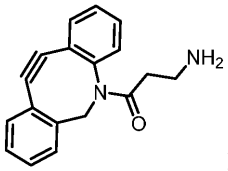


DBCO-PEGn-NH_2

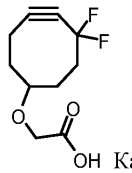




Карбоновые кислоты DBCO



DBCO-NH_2



Карбоновая кислота DIFO

Значение "n" в 'PEGn' представляет собой количество оксиэтиленовых повторяющихся единиц. Значение n находится в диапазоне 1-20, например, 2-18, 3-16 или 4-14. Так, n может быть равно, например, любому числу из 4, 5, 11, 12 или 13.

Другие "клик"-реакции, которые можно использовать для конъюгирования антигена и nnAA, включают тетразин-алкеновое лигирование и лигирование Штаудингера между фосфином и азидом, но не ограничиваются ими.

Конъюгат согласно настоящему изобретению может обладать молекулярной массой, составляющей по меньшей мере приблизительно 750 кДа, по меньшей мере приблизительно 1000 кДа или по меньшей мере приблизительно 1500 кДа или более. В некоторых вариантах реализации конъюгат обладает молекулярной массой от приблизительно 750 кДа до приблизительно 5000 кДа. В некоторых вариантах реализации конъюгат обладает молекулярной массой от приблизительно 800 кДа до приблизительно 2800 кДа. В некоторых вариантах реализации конъюгат обладает молекулярной массой от приблизительно 850 кДа до приблизительно 2800 кДа. В некоторых вариантах реализации конъюгат обладает молекулярной массой от приблизительно 900 кДа до приблизительно 2800 кДа. В некоторых вариантах реализации конъюгат обладает молекулярной массой от приблизительно 950 кДа до приблизительно 2800 кДа. В некоторых вариантах реализации конъюгат обладает молекулярной массой от приблизительно 1000 кДа до приблизительно 2800 кДа. Молекулярную массу конъюгата рассчитывают с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) в комбинации с многоугловым рассеянием лазерного излучения (MALS).

Конъюгаты согласно настоящему изобретению содержат антиген (например, сахарид) и полипептид-носитель, и соотношение массы этих двух компонентов можно использовать в качестве параметра, определяющего конъюгат. Более высокие соотношения массы антиген:носитель для конъюгатов сахарид-носитель позволяет выполнять доставку большего количестве сахаридного антигена при меньшем количестве полипептида-носителя. Для пневмококковых конъюгатных вакцин это соотношение обычно находится в диапазоне 0,3-3,0, однако может варьировать в зависимости от серотипа и аспектов химии конъюгирования (Annex 2: Recommendations for the production and control of pneumococcal conjugate vaccines; WHO Technical Report Series, No. 927, 2005). Это соотношение для коммерческой вакцины Prevnar-13™ составляет 0,9. Для композиций, содержащих конъюгаты нескольких серотипов пневмококков (например, более 13 серотипов), это соотношение для всей композиции в идеале превышает 1,0 (т.е. избыток массы сахаридного антигена пневмококка) и предпочтительно составляет 1,5 или более (например, в диапазоне 1,5-3,0, или, предпочтительно, 1,5-2,0).

Модифицированные полипептиды-носители CRM197

Как упоминалось выше, основные полипептиды-носители, рассматриваемые в настоящем документе, представляют собой модифицированные формы CRM197. Таким образом, предпочтительные полипептиды-носители для использования в настоящем изобретении содержат аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью последовательности (например, ≥85%, ≥90%, ≥95%, ≥96%, ≥97%, или, предпочтительно, ≥98%) с SEQ ID NO: 1. Например, полипептид-носитель может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, за исключением присутствия до 10 nnAA, как обсуждалось выше.

SEQ ID NO: 1 содержит дипептидную последовательность Arg-Arg в положениях 192-193. Эта последовательность при некоторых обстоятельствах может подвергаться протеолитическому расщеплению. При желании этот сайт можно модифицировать для предотвращения расщепления и увеличения выхода. Таким образом, в некоторых вариантах реализации модифицированный полипептид-носитель CRM197, используемый в настоящем документе, не содержит дипептидной последовательности Arg-Arg. Например, Arg-192 и/или Arg-193 SEQ ID NO: 1 можно удалить или заменить другой аминокислотой. Таким образом, предпочтительный полипептид-носитель содержит аминокислотную последовательность, которая (i) обладает по меньшей мере 80% (например, ≥85%, ≥90%, ≥95%, ≥96%, ≥97%, или, предпочтительно, ≥98%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1; (ii) не содержит дипептидной последовательности Arg-Arg; и (iii) содержит по меньшей мере один (например, по меньшей мере 2, а предпочтительно - больше, как обсуждалось выше) остаток nnAA.

Одна из таких аминокислотных последовательностей представляет собой SEQ ID NO: 2, которая отличается от SEQ ID NO: 1 наличием замены Arg→Asn в положении 193:

GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGY
SVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDG
ASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRNSV
GSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPEL
SELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNT
EEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFL
HDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNGR
KIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDH
TKVNSKLSLFFEIKS

В любых вариантах реализации настоящего изобретения или в WO2018/126229 при упоминании SEQ ID NO: 1 вместо нее можно использовать SEQ ID NO: 2.

Таким образом, мы обеспечиваем полипептид-носитель, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, причем SEQ ID NO: 2 модифицирована путем включения 1-10 (например, 3-9 или 2-8, или 2-6, или 3-6, или 4-6) остатков nnAA. Эти модификации с использованием остатков nnAA можно внедрить в SEQ ID NO: 2 в виде инсерций и/или замен (например, SEQ ID NO: 4, которая содержит 6 замен Lys→nnAA). Остаток Asn-193 SEQ ID NO: 2 предпочтительно не замещают nnAA. Этот полипептид-носитель можно применять для получения иммуногенных конъюгатов (например, сахаридных антигенов) через остаток(ки) nnAA, содержащиеся в нем.

В некоторых вариантах реализации эти полипептиды-носители содержат аминокислотные последовательности до и/или после SEQ ID NO: 1 или 2. Так, например, они могут содержать остаток метионина до N-концевого аминокислотного остатка SEQ ID NO: 1 или 2. Этот остаток метионина может быть формилированным. Остаток метионина не присутствует в данном положении в CRM197 дикого типа, однако его можно включить туда для инициации трансляции (например, в бесклеточной системе синтеза полипептидов), не требующей полной нативной лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации полипептид-носитель не содержит (i) аминокислот до N-конца SEQ ID NO: 1 или 2, за исключением необязательного метионина, и (ii) не содержит аминокислот после C-конца SEQ ID NO: 1 или 2.

Предпочтительно по меньшей мере один остаток Lys в SEQ ID NO: 1 или 2 замещен остатком nnAA. Предпочтительным является замена более чем одного остатка в SEQ ID NO: 1 или 2 на nnAA и, в идеале, только одну разновидность остатков в SEQ ID NO: 1 замещают nnAA, например, замещают только остатки Lys. При замене более чем одного остатка в SEQ ID NO: 1 на nnAA предпочтительным является использование одной и той же nnAA в каждом положении, например, pAMF в каждом положении замены. Как отмечалось выше, в некоторых вариантах реализации выполняют замену остатков, не являющихся Lys.

Предпочтительными являются полипептиды-носители, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 2, содержащую 2-9 замен на остатки nnAA (например, замен Lys→nnAA, предпочтительно Lys→pAMF), и, в идеале, содержащую 2-8, 2-6, 3-8, 3-6, 4-9, 4-8 или 4-6 замен на nnAA, например, 4, 5 или 6 остатков nnAA. Это позволяет выполнять присоединение большего количества антигена к носителю, чем при использовании одной nnAA, тем самым увеличивая соотношение антиген:носитель и избегая избыточного искажения нативной последовательности и структуры, приводящего к нерастворимости.

Структурные исследования CRM197 выявили два основных 3D-области, содержащие SEQ ID NO: 1

или 2: первая область располагается с N-конца до Asn-373; а вторая область - от Ser-374 до С-конца. Первая из этих областей грубо соответствует доменам, известным как "С" и "Т" (каталитическому и трансмембранному), а вторая - домену "R" (рецептор-связывающему). В идеале полипептид-носитель содержит по меньшей мере одну nnAA в первой области и по меньшей мере одну nnAA во второй области, например, по меньшей мере 2 nnAA в каждой области или по меньшей мере 3 nnAA в каждой области. Это позволяет пространственно разнести конъюгированные антигены при присоединении к носителю. Можно использовать носитель с 3 nnAA в первой области и 3 nnAA во второй области.

Первая область содержит 27 остатков Lys, а вторая область - 12 остатков Lys. Таким образом, один или более (например, 3) из остатков Lys в области N-концевых 374 аминокислот и один или более (например, 3) из остатков Lys в области С-концевых 162 аминокислот SEQ ID NO: 1 или 2 можно заменить на nnAA, например, pAMF.

Предпочтительные варианты реализации nnAA-содержащих носителей на основе CRM197 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, в которой один или более из остатков K24, K33, K37, K39, K212, K214, K227, K264, K385, K522 и K526 замещен nnAA (например, pAMF). Одной из таких последовательностей является SEQ ID NO: 3, в которой каждый X представляет собой nnAA (предпочтительно одну и ту же nnAA, например, pAMF):

MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQXGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAG
YSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGD
GASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRS
VGSSLSCINLDWDVIRDXTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAXQYLEEFHQTALEHPE
LSELXTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHN
TEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHXTQPF
LHDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNG
RKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVD
HTKVNSXLSLFFEIKS (SEQ ID NO: 3)

Еще одной такой последовательностью является SEQ ID NO: 4, в которой каждый X представляет собой nnAA (предпочтительно одну и ту же nnAA, например, pAMF):

MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQXGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAG
YSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGD
GASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRNS
VGSSLSCINLDWDVIRDXTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAXQYLEEFHQTALEHPE
LSELXTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHN
TEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHXTQPF
LHDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNG
RKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVD
HTKVNSXLSLFFEIKS (SEQ ID NO: 4)

SEQ ID NOs: 3 и 4 могут очень хорошо экспрессироваться в системе бесклеточного синтеза белка, сохраняя хорошую растворимость и обеспечивая хорошие иммуногенные реакции при конъюгировании с сахаридами капсулы пневмококка. В SEQ ID NO: 4 отсутствует нативный дипептид Arg-Arg.

Полипептид, состоящий из SEQ ID NO: 4, в котором каждый X представляет собой pAMF, является еще одним предпочтительным полипептидом-носителем для использования в настоящем изобретении.

В WO2018/126229 описаны несколько аминокислотных остатков, подходящих для замены на nnAA (например, остатки, Lys-24, Lys-33, Lys-37, Lys-39, Lys-212, Lys-214, Lys-227, Lys-244, Lys-264, Lys-385, Lys-522, Lys-526, Phe-12, Phe-53, Phe-123, Phe-127, Phe-140, Phe-167, Phe-250, Phe-389, Phe-530 или Phe-531, пронумерованные согласно SEQ ID NO: 1 в настоящем документе). Другие остатки, которые можно подвергать замене, представляют собой: Asp-211; Asp-295; Asp-352; Asp-392; Asp-465; Asp-467; Asp-507; Asp-519; Asn-296; Asn-359; Asn-399; Asn-481; Asn-486; Asn-502; Asn-524; Glu-240; Glu-248; Glu-249; Glu-256; Glu-259; Glu-292; Glu-362; Gln-252; Gln-287; Lys-212; Lys-218; Lys-221; Lys-229; Lys-236; Lys-264; Lys-299; Lys-385; Lys-456; Lys-474; Lys-498; Lys-516; Lys-522; Lys-534; Arg-377; Arg-407; Arg-455; Arg-460; Arg-462; Arg-472; Arg-493; Ser-198; Ser-200; Ser-231; Ser-233; Ser-239; Ser-261; Ser-374; Ser-381; Ser-297; Ser-397; Ser-451; Ser-475; Ser-494; Ser-495; Ser-496; Ser-501; Ser-505; Thr-253; Thr-265; Thr-267; Thr-269; Thr-293; Thr-386; Thr-400; Thr-408; Thr-469; и/или Thr-517.

Кроме того, мы обеспечиваем полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая (i) обладает по меньшей мере 80% (например, ≥85%, ≥90%, ≥95%, ≥96%, ≥97%, или, предпочтительно, ≥98%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1; (ii) не содержит дипептидной последовательности Arg-Arg; и (iii) содержит по меньшей мере один остаток nnAA; причем указанный полипептид содержит N-концевой метионин и/или находится в мономерной форме.

Эти полипептиды-носители на основе CRM197 можно использовать для конъюгирования таким же образом, как используют в данной области техники CRM197 (например, см. Broker et al. 2011 supra, WO2015/117093 и т.д.), однако с усовершенствованием, допускающим сайт-специфическое конъюгирование через остаток(ки) nnAA. Их обычно используют в мономерной форме, а не в ассоциации с другими CRM197 или субъединицами на основе CRM197 с образованием полипептидных мультимеров. Анало-

гичным образом, они обычно содержат по меньшей мере один дисульфидный мостик, например, между Cys-186 и Cys-201 (пронумерованными согласно SEQ ID NO: 1) и, необязательно, между Cys-461 и Cys-471.

Кроме того, мы обеспечиваем иммуногенный конъюгат, содержащий любые из этих полипептидов-носителей, конъюгированные с сахаридным антигеном через по меньшей мере одну из nnAA. Эти полипептиды-носители в особенности полезны для конъюгирования с сахаридами капсулы пневмококка через остаток(ки) nnAA, содержащиеся в них. Иммуногенные конъюгаты, полученные таким образом, можно объединять с образованием мультивалентных композиций, как обсуждалось в настоящем документе.

Таким образом, мы обеспечиваем иммуногенный конъюгат, содержащий полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем (i) полипептид-носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, где каждый X представляет собой pAMF; а (ii) сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через по меньшей мере один остаток nnAA в SEQ ID NO: 4. Кроме того, мы обеспечиваем мультивалентную фармацевтическую композицию, содержащую два или более различных иммуногенных конъюгатов.

Таким образом, мы обеспечиваем фармацевтическую композицию, содержащую несколько различных конъюгатов (например, различных серотипов пневмококка), в которой каждый конъюгат содержит полипептид-носитель, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Кроме того, мы обеспечиваем иммуногенный конъюгат, содержащий полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем (i) полипептид-носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; (ii) сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через по меньшей мере один остаток nnAA в SEQ ID NO: 4; и (iii) сахаридный антиген представляет собой капсульный сахарид любого из серотипов пневмококка 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. Эти отдельные конъюгаты можно объединять для получения мультивалентных фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению.

Кроме того, мы обеспечиваем полинуклеотид, кодирующий полипептид-носитель, описанный в настоящем документе. В еще одном варианте реализации настоящего изобретения предложен экспрессирующий вектор, содержащий указанный полинуклеотид. В еще одном варианте реализации настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая экспрессирующий вектор.

Адъюванты

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать адъювант на основе соли алюминия. Этот адъювант может усиливать иммуногенность конъюгатов в фармацевтической композиции. Конъюгаты в композиции могут быть адсорбированы на адъюванте на основе соли алюминия.

Пригодные для использования адъюванты на основе соли алюминия включают адъюванты на основе гидроксида алюминия и адъюванты на основе фосфата алюминия, но не ограничиваются ими. Эти адъюванты описаны, например, в главах 8 и 9 Vaccine Design (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.

Адъюванты, широко известные как "гидроксид алюминия", обычно представляют собой соли оксигидроксида алюминия, которые обычно являются по меньшей мере частично кристаллическими. Оксигидроксид алюминия, который можно представить формулой AlO(OH), можно отличить от других соединений алюминия, например, $Al(OH)_3$, с помощью инфракрасной (ИК) спектроскопии, в частности, по наличию полосы поглощения при 1070 $см^{-1}$ и выраженного плеча при 3090-3100 $см^{-1}$ (глава 9, Powell & Newman). Степень кристаллизации адъюванта на основе гидроксида алюминия определяют по ширине полосы дифракции на половине высоты (WHH), причем частицы с плохой кристалличностью демонстрируют большее расширение линии вследствие меньшего размера кристаллических блоков. Площадь поверхности увеличивается с увеличением WHH, и адъюванты с более высокими значениями WHH демонстрируют более выраженную способность к адсорбции антигена. Волокнистая морфология (например, видимая на просвечивающих электронных микрофотографиях) типична для адъювантов на основе гидроксида алюминия, например, содержащих иглоподобные частицы диаметром приблизительно 2 нм. pI адъювантов на основе гидроксида алюминия обычно составляет приблизительно 11, т.е. адъювант сам по себе обладает положительным поверхностным зарядом при физиологических значениях pH. Для адъювантов на основе гидроксида алюминия зарегистрирована адсорбционная емкость, составляющая 1,8-2,6 мг белка на мг Al^{+++} при pH 7,4.

Адъюванты, широко известные как "фосфат алюминия", обычно представляют собой гидроксифосфаты алюминия, часто также содержащие небольшое количество сульфата (т.е. сульфат-гидроксифосфат алюминия). Их можно получить осаждением, и условия реакции и концентрации во время осаждения влияют на степень замещения фосфата гидроксилом в составе соли. Гидроксифосфаты обычно характеризуются молярным соотношением PO_4/Al между 0,3 и 1,2. Гидроксифосфаты можно отличить от чистого $AlPO_4$ по наличию гидроксильных групп. Например, полоса ИК-спектра при 3164 $см^{-1}$ (например, при нагревании до 200°C) указывает на наличие структурных гидроксильных групп (глава 9, Powell & Newman).

Молярное соотношение PO_4/Al^{3+} в адъюванте на основе фосфата алюминия обычно составляет ме-

жду 0,3 и 1,2, предпочтительно между 0,8 и 1,2, и более предпочтительно 0,95+0,1. Фосфат алюминия, в особенности гидроксифосфат, обычно является аморфным. Типичный адъювант представляет собой аморфный гидроксифосфат алюминия с молярным соотношением PO_4/Al между 0,84 и 0,92 при 0,6 мг Al^{3+}/мл. Фосфат алюминия обычно представлен в форме частиц (например, с пластиноподобной морфологией, видимой на просвечивающих электронных микрофотографиях, причем размер первичных частиц находится в области 50 нм). Типичный диаметр частиц после адсорбции антигена находится в диапазоне 0,5-20 мкм (например, приблизительно 5-10 мкм). Для адъювантов на основе фосфата алюминия зарегистрирована адсорбционная емкость, составляющая 0,7-1,5 мг белка на мг Al^{+++} при pH 7,4.

Точка нулевого заряда (PZC) фосфата алюминия находится в обратной зависимости от степени замещения фосфата на гидроксильную группу, и эта степень замещения может зависеть от условий реакции и концентрации реагентов, использованных для получения соли посредством осаждения. На PZC также влияют изменения концентрации свободных ионов фосфата в растворе (больше фосфата = более кислое значение PZC) или добавление буфера, например, гистидинового буфера (сдвигает PZC в щелочную сторону). Фосфаты алюминия, используемые согласно настоящему изобретению, обычно обладают PZC между 4,0 и 7,0, более предпочтительно между 5,0 и 6,5, например, приблизительно 5,7.

Концентрация ионов алюминия в композиции для введения пациенту предпочтительно составляет менее 2,5 мг/мл, например, <2 мг/мл, <1 мг/мл и т.д. Предпочтительная максимальная концентрация составляет <1,7 мг/мл. Диапазон Al^{+++} в композиции согласно настоящему изобретению может составлять 0,3-1 мг/мл или 0,3-0,5 мг/мл. Предпочтительное максимальное количество составляет 0,85 мг/дозу.

Адъюванты на основе как фосфата алюминия, так и гидроксида алюминия в растворе имеют тенденцию образовывать стабильные пористые агрегаты диаметром 1-10 мкм. Композиция может содержать смесь адъюванта на основе гидроксида алюминия и адъюванта на основе фосфата алюминия.

Если композиция содержит несколько конъюгатов и каждый из них адсорбирован на адьюванте на основе соли алюминия, каждый конъюгат можно по отдельности адсорбировать на соли алюминия и затем перемешать, или последовательно добавить к соли алюминия, тем самым образуя смешанную композицию конъюгатов. Можно использовать смесь обоих указанных подходов.

Вспомогательные вещества для фармацевтических композиций

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению обычно содержат одно или более из фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Исчерпывающее обсуждение таких вспомогательных веществ находится в Handbook of Pharmaceutical Excipients (ed. Rowe et al.), 6th edition 2009.

Фармацевтические композиции предпочтительно находятся в водной форме, в частности, на момент введения, но они могут быть представлены и в высушенной форме (например, в виде лиофилизатов и т.д.), которую можно преобразовать в водные формы для введения.

Фармацевтическая композиция может содержать буфер или агент, регулирующий pH. Буфер можно выбрать из группы, состоящей из фосфатного буфера, ацетатного буфера, гистидинового буфера, цитратного буфера, сукцинатного буфера, трис-буфера, HEPES-буфера и т.д. Содержание буферных солей обычно находится в диапазоне 5-20 мМ.

Фармацевтические композиции могут содержать физиологическую соль, например, соль натрия, например, для контроля тоничности. Обычно используют хлорид натрия (NaCl), который может присутствовать в диапазоне 1-20 мг/мл, например, 10+2 мг/мл или 9 мг/мл. Другие соли, которые могут присутствовать в композиции, включают хлорид калия, дигидрофосфат натрия, дегидрат фосфата натрия, хлорид магния, хлорид кальция и т.д. Другие соли, которые можно использовать, могут содержать катионы натрия, калия или аммония и анионы хлорида, цитрата, аскорбата, бората, фосфата, бикарбоната, сульфата, тиосульфата или бисульфита.

Фармацевтические композиции могут содержать органическую кислоту, например, уксусную кислоту или янтарную кислоту. Она может входить в состав буферной системы.

Фармацевтические композиции могут содержать сахароспирт, например, маннит или сорбит. Фармацевтические композиции могут содержать углевод, например, сахарозу или глюкозу.

Фармацевтические композиции могут содержать поверхностно-активное вещество. Подходящие поверхностно-активные вещества включают полисорбат 20, полисорбат 80 и додецилсульфат натрия (ДСН), но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах реализации поверхностно-активный агент присутствует в концентрации от 0,0003% до 0,3% (мас./мас.), например, 0,01-0,03%). Полисорбат 80 является предпочтительным поверхностно-активным веществом.

Фармацевтические композиции могут содержать консервант, например, тиомерсал или 2-феноксиэтанол. В предпочтительном случает композиция по существу не должна содержать (например, в концентрации < 10 мкг/мл) ртутьсодержащего материала, например, тиомерсала. Более предпочтительными являются композиции, не содержащие ртути. Включение консерванта может быть особенно полезным, если композиция содержит адъювант на основе соли алюминия, поскольку его нерастворимость означает, что композиция в основном представляет собой суспензию и является визуально мутной, что может максировать рост загрязняющих бактерий. Консервант также особенно полезен, если планируется более чем однократное использование композиции, например, во флаконе, содержащем несколько доз. В

то же время часто фармацевтическая композиция может не содержать консервантов.

Осмоляльность фармацевтических композиций может составлять от 200 мосмоль/кг до 400 мосмоль/кг, например, 240-360 мосмоль/кг или 290-310 мосмоль/кг.

pH фармацевтических композиций обычно составляет от 5,0 до 9,5, например, от 5,0 до 8,0 или от 6,0 до 8,0.

Фармацевтические композиции предпочтительно являются апирогенными, например, содержат < 1 ЭЕ (эндотоксиновой единицы, стандартная мера) на дозу, и предпочтительно < 0,1 ЭЕ на дозу.

Осмоляльность фармацевтических композиций может составлять от 200 до 400 мосмоль/кг, например, 240-360 мосмоль/кг или 280-320 мосмоль/кг.

Фармацевтические композиции предпочтительно не содержат глютена.

Фармацевтические композиции подходят для введения пациентам-животным (и, в частности, людям); таким образом, изобретение включает как медицинское, так и ветеринарное применение.

Фармацевтические композиции можно получать в виде лекарственной формы. В некоторых вариантах реализации объем лекарственной формы может составлять 0,1-1,0 мл, например, приблизительно 0,25 мл или, предпочтительно, приблизительно 0,5 мл. Такие объемы идеальны для инъекций человеку.

Уровни конъюгата

Фармацевтическая композиция может содержать несколько иммуногенных конъюгатов. Лицензированные в настоящее время менингококковые конъюгатные вакцины содержат капсульные сахариды 4 различных серотипов, а лицензированные пневмококковые конъюгатные вакцины содержат капсульные сахариды 7, 10 или 13 различных серотипов. Таким образом, композиция согласно настоящему изобретению может содержать, например, от 3 до 50 различных конъюгатов (например, 14, 15, 20, 21, 24, 25 или более). Например, каждый из этих конъюгатов может содержать капсульный сахарид одного и того же вида бактерий (например, нескольких серогрупп менингококка или нескольких серотипов пневмококка).

Если фармацевтическая композиция содержит n различных иммуногенные конъюгатов, общее количество полипептида-носителя в этих n конъюгатах может быть меньше или равно 3n мкг на дозу. Другими словами, среднее количество полипептида-носителя на конъюгат составляет менее 3 мкг. Общее количество может, например, составлять n-2,5n мкг на дозу.

Если фармацевтическая композиция содержит n различных иммуногенных конъюгатов, общее количество сахаридного антигена в этих n конъюгатах может быть меньше или равно 4,4n мкг на дозу. Другими словами, среднее количество сахарида на конъюгат составляет менее 4,4 мкг. Общее количество может, например, составлять 0,4n-4,4n мкг на дозу, например, 1,1n-2,2n.

Если фармацевтическая композиция содержит n различных иммуногенные конъюгатов, общая концентрация полипептида-носителя для этих n конъюгатов может быть меньше или равна 6n мкг/мл. Другими словами, среднее количество полипептида-носителя на конъюгат составляет менее 6 мкг/мл. Общая концентрация может, например, составлять n-4n мкг/мл.

Если фармацевтическая композиция содержит n различных иммуногенных конъюгатов, общая концентрация сахаридного антигена для этих n конъюгатов может быть меньше или равна 8,8n мкг/мл. Другими словами, средняя концентрация сахарида на конъюгат составляет менее 8,8 мкг/мл. Общая концентрация может, например, составлять 0,8n-8,8n мкг/мл, например, 2,2n-4,4n мкг/мл.

В некоторых вариантах реализации общее количество полипептида-носителя в стандартной дозе мультивалентной фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению может составлять 4-128 мкг, например, 8-64 мкг или 16-48 мкг. Концентрация конъюгированного полипептида-носителя в мультивалентной фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению может составлять 8-128 мкг/мл, например, 16-128 мкг/мл или 32-96 мкг/мл.

В некоторых вариантах реализации общее количество конъюгированного сахаридного антигена в стандартной дозе мультивалентной фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению может составлять 10-120 мкг, например, 20-90 мкг или 30-60 мкг. Концентрация конъюгированного сахаридного антигена в мультивалентной фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению может составлять 20-240 мкг/мл, например, 40-180 мкг/мл или 60-120 мкг/мл.

Неконъюгированные компоненты

Как отмечалось выше, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать несколько иммуногенных конъюгатов, например, от 3 до 50 различных конъюгатов (например, 14, 15, 20, 21, 24, 25 или более). Например, каждый из этих конъюгатов может содержать капсульный сахарид одного и того же вида бактерий.

В некоторых вариантах реализации композиция не содержит полипептида(ов)-носителя(ей) конъюгатов в неконъюгированной форме. В других вариантах реализации присутствует низкий уровень неконъюгированного(ых) полипептида(ов)-носителя(ей) при условии, что масса неконъюгированного(ых) полипептида(ов)-носителя(ей) в композиции составляет < 10% (например, < 5% или < 2%) от массы полипептида(ов)-носителя(ей) в n иммуногенных конъюгатах композиции в целом.

В некоторых вариантах реализации композиция не содержит сахаридов конъюгатов в неконъюгированной форме. В других вариантах реализации присутствует низкий уровень неконъюгированного сахарида при условии, что масса неконъюгированного сахарида в композиции составляет < 10% (напри-

мер, < 5% или < 2%) от общей массы сахаридов в n иммуногенных конъюгатах композиции.

Контейнеры, устройства доставки и т.д.

Фармацевтические композиции, содержащие иммуногенные конъюгаты, можно упаковать в стерильные контейнеры, устройства доставки и т.д. Стерильность можно поддерживать путем герметизации контейнера, делающей его воздухонепроницаемым. Подходящие контейнеры включают флаконы, шприцы, аэродинамические распылители, аэрозольные баллончики, ингаляторы, кожные пластыри и т.д. Предпочтительными являются флаконы и шприцы.

Иммуногенные композиции часто содержатся во флаконах. Флакон предпочтительно сделан из пластмассы или, предпочтительно, из стекла. Флакон закупоривают после заполнения, и вскрывают в момент использования. Флакон предпочтительно стерилизуют перед внесением в него композиции, а затем закупоривают. Во избежание проблем у пациентов, чувствительных к латексу, флаконы можно закупоривать пробками, не содержащими латекса, кроме того, предпочтительным является отсутствие латекса во всех упаковочных материалах. В идеале флакон содержит одну стандартную дозу композиции, но иногда может содержать более одной дозы ("многодозовый" флакон), например, 10 доз. Предпочтительные флаконы изготовлены из бесцветного стекла.

Флакон может быть оснащен колпачком (например, с разъемом Люэра), приспособленным таким образом, что в колпачок можно вставить шприц для облегчения переноса материала между флаконом и шприцем (в обоих направлениях). После извлечения шприца из флакона можно присоединить иглу и ввести композицию субъекту. Колпачок предпочтительно находится под пробкой или крышкой, так что пробку или крышку следует удалить перед тем, как можно будет получить доступ к колпачку. Флакон может быть оснащен колпачком, допускающим асептическое извлечение содержимого, в частности, для флаконов, содержащих несколько доз.

Композиции могут содержаться в устройствах для доставки, готовых для введения субъекту. Композицию можно перенести в устройство для доставки в момент использования (например, из флакона), или поместить в устройство для доставки на стадии производства (например, в форме предварительно заполненного шприца).

Шприц, использованный в настоящем изобретении, может быть изготовлен из стекла или пластмассы (например, из циклоолефинового полимера или циклоолефинового сополимера). Шприц (в частности, стеклянный шприц) может представлять собой силиконизированный шприц. Кроме того, можно использовать несиликонизированные шприцы, например, с использованием системы i-Coating™ производства Terumo, которая доступна для их шприцев PLAJEX™, или с использованием шприцев Daikyo CZ™, содержащих сополимер этилен-тетрафторэтилена (ETFE), или с использованием шприца TriboGlide™, содержащего перфторполиэфир (PFPE). Вместо силиконизирования можно использовать углеродные пленки (например, см. JP2001190665). Шприцы, не содержащие силикона, также описаны в JP2011212183. Можно использовать несиликонизированные шприцы, включающие уплотнитель поршня, описанные в EP-A-0375778, т.е. шприцы, в которых поршень содержит слой термопластического эластомера, по меньшей мере частично покрытый слоем термопластической смолы с низким динамическим коэффициентом трения.

Если композиция содержится в шприце, шприц может содержать присоединенную иглу для инъекции содержимого шприца в организм субъекта или в контейнер. Шприц может поставляться с уже присоединенной иглой. Если игла не присоединена, в комплект для сборки и использования шприца может входить отдельная игла, или иглу можно получить из отдельного источника. Такая игла должна быть стерильной на момент использования и может находиться в футляре. Можно использовать безопасные иглы. Обычными являются 1-дюймовые иглы 23 калибра, 1-дюймовые иглы 25 калибра и иглы 25 калибра длиной 5/8 дюйма. Можно использовать иглы 22-25 калибра длиной $^{1}/_{2}$-$1^{1}/_{2}$ дюйма. Если шприц и игла упакованы раздельно, игла может быть предпочтительно оснащена футляром из бутилкаучука.

Шприцы могут быть снабжены отрывными этикетками, на которых могут быть напечатаны номер партии и дата истечения срока годности содержимого для облегчения ведения записей. Поршень шприца может быть оснащен ограничителем хода, предотвращающим случайное извлечение поршня во время аспирации. Шприцы могут содержать колпачок и/или поршень из латексного каучука, но можно использовать каучук, не содержащий латекса, например, хлорбутиловый каучук, не содержащий латекса, или изопреновый бромбутиловый каучук, не содержащий латекса. Шприц обычно содержит колпачок наконечника для герметизации колпачка перед присоединением иглы, и колпачок наконечника предпочтительно изготовлен из бутилкаучука, например, изопренового бромбутилового каучука, не содержащего латекса. Шприцы, которые можно использовать, представляют собой, например, шприцы, продаваемые под торговым названием "Tip-Lok"™.

Контейнеры могут быть маркированы с указанием объема половины дозы, например, для облегчения доставки детям. Например, шприц, содержащий дозу объемом 0,5 мл, может содержать метку, указывающую объем 0,25 мл. Объем самого шприца может быть больше объема дозы, например, можно использовать 1-мл шприц, содержащий дозу фармацевтической композиции объемом 0,5 мл. Одноразовые или предварительно заполненные шприцы обычно содержат разовую дозу вакцины.

При использовании стеклянного контейнера (например, шприца или флакона) предпочтительно, чтобы он был изготовлен из боросиликатного стекла, а не натрий-кальциевого стекла.

Контейнер может быть упакован (например, в одну и ту же коробку) вместе с листком-вкладышем, содержащим подробную информацию о вакцине (например, инструкцию по введению, информацию об антигенах в составе вакцины и т.д. Инструкция может содержать предупреждающие указания, например, держать наготове раствор адреналина на случай анафилактической реакции после вакцинации и т.д. Несколько контейнеров могут быть упакованы вместе друг с другом, например, в одну и ту же коробку.

Фармацевтическая композиция может быть представлена в виде лекарственной формы в разовой дозе на контейнер (например, на шприц или флакон). Вместо производства каждой лекарственной формы по отдельности получают нефасованную композицию, выделяют стандартные дозы и по отдельности упаковывают их в контейнеры. Так, например, из нефасованного препарата выделяют большое количество стандартных доз, и каждую стандартную дозу помещают в отдельный контейнер, например, в шприц или флакон.

Стимуляция иммунного ответа

Иммуногеннный конъюгат можно вводить субъекту-млекопитающему, вызывая защитный иммунный ответ против антигена, содержащегося в этом конъюгате. Его можно вводить в форме фармацевтической композиции. Композиция может содержать несколько иммуногенных конъюгатов, описанных в настоящем документе, так что можно одновременно вызвать защитный иммунный ответ против многих антигенов.

Таким образом, мы обеспечиваем способ стимуляции ответа на основе протективных антител против одного или более антигенов у субъекта-млекопитающего путем введения субъекту конъюгата антигена(ов).

Кроме того, мы обеспечиваем конъюгат, описанный в настоящем документе, для применения при стимуляции ответа на основе протективных антител.

Кроме того, мы обеспечиваем применение конъюгата, описанного в настоящем документе, при производстве медикамента для стимуляции ответа на основе протективных антител.

Кроме того, мы обеспечиваем: (i) способ стимуляции ответа на основе протективных антител против нескольких антигенов у субъекта-млекопитающего путем введения субъекту мультивалентной композиции согласно настоящему изобретению, (ii) мультивалентную композицию согласно настоящему изобретению для применения при стимуляции ответа на основе протективных антител и (iii) применение нескольких конъюгатов, описанных в настоящем документе, при производстве мультивалентной фармацевтической композиции для стимуляции ответа на основе протективных антител против нескольких антигенов.

Способность вызывать защитный иммунный ответ означает, что конъюгаты можно использовать, например, для активной иммунизации в целях профилактики инвазивного заболевания, вызванного S.pneumoniae, для профилактики среднего отита, вызванного S.pneumoniae, для профилактики пневмонии, вызванной S.pneumoniae, для активной иммунизации субъектов, подвергающихся риску воздействия N.meningitidis с целью профилактики инвазивного заболевания и т.д.

Фармацевтические композиции можно получать в различных формах. Например, композиции можно получать в виде инъекционных форм, например, в виде жидких растворов или суспензий. Обычными являются инъекционные формы для внутримышечного введения. Для людей предпочтителен объем инъекции приблизительно 0,5 мл. Таким образом, предпочтительный объем стандартной дозы составляет приблизительно 0,5 мл. Типичным является введение внутримышечной инъекции, например, в переднебоковую сторону бедра младенцам или в дельтовидную мышцу плеча дошкольникам, детям и взрослым.

Конъюгаты обычно вводят в соответствии со схемой введения многократных доз. Многократные дозы можно использовать в соответствии со схемой первичной иммунизации и/или схемой повторной иммунизации. Введение более чем одной дозы (обычно двух доз) особенно полезно для иммунологически наивных пациентов. Многократные дозы обычно вводят с интервалом по меньшей мере 1 неделю (например, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 6 недель, приблизительно 8 недель, приблизительно 10 недель, приблизительно 12 недель и т.д.).

Общие сведения

Термин "содержащий" охватывает термин "включающий", а также "состоящий", например, композиция, "содержащая" X, может состоять исключительно из X или может включать что-то еще, например, X + Y.

Термин "приблизительно" по отношению к численному значению x является необязательным и означает, например, x+10%.

Фраза "по существу" не исключает "полностью", например, композиция, "по существу не содержащая" Y, может полностью не содержать Y. При необходимости фразу "по существу" можно опустить из определения согласно настоящему изобретению.

Термин "идентичность последовательности" в контексте двух аминокислотных последовательностей относится к двум последовательностям, которые являются одинаковыми при сравнении и выравнивании для выявления максимального соответствия в окне сравнения, измеренного с помощью алгоритма

сравнения последовательностей (например, BLASTP). Процент идентичности определяют по сравнению с полноразмерной эталонной последовательностью, описанной в настоящем документе, например, эталонной последовательности, заданной в SEQ ID NO: 1 или 2. Способ расчета идентичности последовательности, предложенный в настоящем изобретении, представляет собой программу BLASTP с параметрами по умолчанию, заданными следующим образом: длина слова (W) равна 3, математическое ожидание (E) равно 10, матрица оценки BLOSUM62 (см., например, Henikoff & Henikoff, 1989, Proc Natl Acad Sci USA 89:10915). См., например, инструмент выравнивания BLAST, доступный во всемирной сети по адресу blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi или в другом месте.

В настоящем документе термин "низший алкил", если не указано иное, относится к насыщенному линейному или разветвленному углеводороду, содержащему от одного до шести атомов углерода, т.е. C_1-C_6-алкилу. В некоторых вариантах реализации низшая алкильная группа представляет собой первичный, вторичный или третичный углеводород. Этот термин включает как замещенные, так и незамещенные группы. См. также US-2014/0066598. Термин "низший алкилен" относится к алкиленовому радикалу низшего алкила.

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в настоящем документе, имеют общепринятые значения. Практикам в особенности рекомендуется см. Green & Sambrook (eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012), Ausubel, F. M., et al., Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 99), John Wiley & Sons, New York (2012), и Plotkin, S.A., Orenstein, W.A., & Offit, P.A., Vaccines, 6th ed, Elsevier, London (2013).

Способы бесклеточного синтеза описаны в Spirin & Swartz (2008) Cell-free Protein Synthesis, Wiley-VCH, Weinheim, Germany. Способы встраивания неприродных аминокислот в белки с использованием бесклеточного синтеза описаны в Shimizu et al. (2006) FEBS Journal, 273, 4133-4140, а также в Chong (2014) Curr Protoc Mol Biol. 108:16.30.1-11.

В некоторых вариантах реализации изобретение не охватывает композицию, в которой SEQ ID NO: 3 используют в качестве полипептида-носителя для конъюгатов каждого из 24 серотипов пневмококка 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 (как приведено в качестве примера в WO2018/126229). В более общем случае в некоторых вариантах реализации изобретение не охватывает композицию, в которой SEQ ID NO: 3 используют в качестве полипептида-носителя для каждого конъюгата в мультивалентной композиции.

Пронумерованные варианты реализации

Вариант реализации I-1. Стерильный контейнер, содержащий фармацевтическую композицию, содержащую иммуногенный конъюгат, содержащий полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем.

Вариант реализации I-2. Герметизированный контейнер, содержащий фармацевтическую композицию, содержащую иммуногенный конъюгат, содержащий полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем. Подходящие для герметизации контейнеры включают, например, флакон. Содержимое предпочтительно является стерильным на момент герметизации.

Вариант реализации I-3. Контейнер согласно варианту реализации I-1 или I-2, отличающийся тем, что он представляет собой стерильный стеклянный контейнер, например, флакон.

Вариант реализации I-4. Устройство для доставки, содержащее фармацевтическую композицию, содержащую иммуногенный конъюгат, содержащий полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем.

Вариант реализации I-5. Контейнер согласно варианту реализации I-1 или I-2, или устройство для доставки согласно варианту реализации I-4, которое представляет собой шприц.

Вариант реализации I-6. Фармацевтическая композиция, содержащая два или более различных иммуногенных конъюгатов и адъювант на основе соли алюминия, причем: (i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем; и (ii) адъювант на основе соли алюминия представляет собой адъювант на основе гидроксида алюминия или фосфата алюминия.

Вариант реализации I-7. Фармацевтическая композиция, содержащая два или более различных иммуногенных конъюгатов и адъювант на основе фосфата алюминия, причем: (i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем, и (ii) концентрация ионов алюминия в композиции на составляет < 2,5 мг/мл.

Вариант реализации I-8. Фармацевтическая композиция, содержащая два или более различных иммуногенных конъюгатов, причем: (i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через

остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем, и (ii) объем фармацевтической композиции составляет 0,25-1,25 мл.

Вариант реализации I-9. Фармацевтическая композиция, содержащая два или более различных иммуногенных конъюгатов и консервант, причем каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем.

Вариант реализации I-10. Фармацевтическая композиция без консерванта, содержащая два или более различных иммуногенных конъюгатов, причем каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем.

Вариант реализации I-11. Фармацевтическая композиция, содержащая два или более различных иммуногенных конъюгатов, причем: (i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем; (ii) осмоляльность композиции составляет 200 - 400 мосмоль/кг.

Вариант реализации I-12. Фармацевтическая композиция, содержащая два или более различных иммуногенных конъюгатов и по меньшей мере одно вспомогательное вещество, причем: (i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем, и (ii) указанное по меньшей мере одно вспомогательное вещество выбрано из группы, состоящей из хлорида натрия, янтарной кислоты и полисорбата 80.

Вариант реализации I-13. Фармацевтическая композиция, содержащая n различных иммуногенных конъюгатов, причем:

(i) каждый из n иммуногенных конъюгатов содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем;

(ii) n является целым числом от 3 до 50; и

(iii) общее количество полипептида-носителя в n иммуногенных конъюгатах меньше или равно 3n мкг на дозу;

(iv) общая концентрация полипептида-носителя в n иммуногенных конъюгатах меньше или равна 6n мкг/мл;

(v) общее количество сахаридного антигена в n иммуногенных конъюгатах меньше или равно 3n мкг на дозу;

(vi) общая концентрация сахарида в n иммуногенных конъюгатах меньше или равна 6n мкг/мл;

(vii) среднее количество полипептида-носителя на конъюгат составляет 1-4 мкг на дозу;

(viii) средняя концентрация полипептида-носителя на конъюгат составляет 2-8 мкг/мл;

(ix) среднее количество сахаридного антигена на конъюгат составляет 1-4 мкг на дозу;

(x) средняя концентрация сахаридного антигена на конъюгат составляет 2-8 мкг/мл;

(xi) композиция не содержит полипептида(ов)-носителя(ей) в неконъюгированной форме;

(xii) композиция содержит полипептид(ы)-носитель(и) в неконъюгированной форме, причем масса полипептида(ов)-носителя(ей) в неконъюгированной форме в композиции составляет < 10% от массы указанного полипептида-носителя в n иммуногенных конъюгатах;

(xiii) композиция не содержит сахаридные антигены в неконъюгированной форме; и/или

(xiv) композиция содержит по меньшей мере один из сахаридных антигенов в неконъюгированной форме, причем общая масса сахаридных антигенов в неконъюгированной форме в композиции составляет < 10% от общей массы сахаридных антигенов в n иммуногенных конъюгатах.

Вариант реализации I-14. Процесс получения множества стандартных доз фармацевтической композиции, причем (i) указанная фармацевтическая композиция содержит иммуногенный конъюгат, содержащий полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем, и (ii) указанный процесс включает этапы получения нефасованной композиции, содержащей иммуногенный конъюгат, и упаковки отдельных стандартных доз нефасованной композиции во множество отдельных контейнеров.

Вариант реализации I-15. Процесс получения фармацевтической композиции, причем указанная фармацевтическая композиция содержит два или более иммуногенных конъюгата и адъювант на основе соли алюминия, причем (i) каждый иммуногенный конъюгат содержит полипептид-носитель и сахаридный антиген, и (ii) сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через остаток неприродной аминокислоты, содержащийся в нем; и процесс включает этап (A) раздельной адсорбции каждого из иммуногенных конъюгатов на адъюванте на основе соли алюминия с последующим смешиванием отдельных адсорбированных конъюгатов друг с другом, или (B) последовательной адсорбции каждого из иммуногенных конъюгатов на адъюванте на основе соли алюминия.

Вариант реализации I-16. Полипептид-носитель, содержащий аминокислотную последовательность,

которая (i) обладает по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1; (ii) не содержит дипептидной последовательности Arg-Arg; и (iii) содержит по меньшей мере один остаток nnAA.

Вариант реализации I-17. Полипептид-носитель, содержащий аминокислотную последовательность, которая (i) обладает по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 и (ii) содержит замену на nnAA одного или более из следующих аминокислотных остатков (пронумерованных согласно SEQ ID NO: 1): Asp-211; Asp-295; Asp-352; Asp-392; Asp-465; Asp-467; Asp 507; Asp 519; Asn 296; Asn 359; Asn 399; Asn 481; Asn 486; Asn 502; Asn 524; Glu 240; Glu 248; Glu 249; Glu 256; Glu 259; Glu 292; Glu 362; Gln 252; Gln 287; Lys 212; Lys 218; Lys 221; Lys 229; Lys 236; Lys 264; Lys 299; Lys 385; Lys 456; Lys 474; Lys 498; Lys 516; Lys 522; Lys 534; Arg 377; Arg 407; Arg 455; Arg 460; Arg 462; Arg 472; Arg 493; Ser 198; Ser 200; Ser 231; Ser 233; Ser 239; Ser 261; Ser 374; Ser 381; Ser 297; Ser 397; Ser 451; Ser 475; Ser 494; Ser 495; Ser 496; Ser 501; Ser 505; Thr 253; Thr 265; Thr 267; Thr 269; Thr 293; Thr 386; Thr 400; Thr 408; Thr-469; и/или Thr 517.

Вариант реализации I-18. Полипептид-носитель согласно варианту реализации I-16 или I-17, отличающийся тем, что Arg-193 SEQ ID NO: замещен другой аминокислотой, например, Asn.

Вариант реализации I-19. Иммуногенный конъюгат, содержащий полипептид-носитель согласно варианту реализации I-16, I-17 или I-18, конъюгированный через остаток nnAA, содержащийся в нем, с антигеном.

Вариант реализации I-20. Иммуногенный конъюгат, содержащий полипептид-носитель и сахаридный антиген, причем (i) полипептид-носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; а (ii) сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через по меньшей мере один остаток nnAA в SEQ ID NO:

Вариант реализации I-21. Фармацевтическая композиция, содержащая два или более различных иммуногенных конъюгатов согласно варианту реализации I-20.

Вариант реализации I-22. Контейнер, устройство, композиция, процесс, полипептид или конъюгат согласно любому предшествующему варианту реализации, отличающиеся тем, что полипептид-носитель содержит от 4 до 9 остатков nnAA.

Вариант реализации I-23. Контейнер, устройство, композиция, процесс, полипептид или конъюгат согласно любому предшествующему варианту реализации, отличающиеся тем, что по меньшей мере один остаток лизина в нативной последовательности полипептида-носителя замещен nnAA.

Вариант реализации I-24. Контейнер, устройство, композиция, процесс, полипептид или конъюгат согласно любому предшествующему варианту реализации, отличающиеся тем, что полипептид-носитель обладает по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1.

Вариант реализации I-25. Контейнер, устройство, композиция, процесс, полипептид или конъюгат согласно любому предшествующему варианту реализации I-24, отличающиеся тем, что по меньшей мере один из K24, K33, K37, K39, K212, K214, K227, K244, K264, K385, K522 и/или K526 в SEQ ID NO: 1 или 2 замещен на nnAA.

Вариант реализации I-26. Контейнер, устройство, композиция, процесс, полипептид или конъюгат согласно любому предшествующему варианту реализации, отличающиеся тем, что полипептид-носитель содержит аминокислотную последовательности SEQ ID NO: 14.

Вариант реализации I-27. Контейнер, устройство, композиция, процесс, полипептид или конъюгат согласно любому предшествующему варианту реализации, отличающиеся тем, что nnAA представляет собой 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановую кислоту.

Вариант реализации I-28. Контейнер, устройство, композиция, процесс, полипептид или конъюгат согласно любому предшествующему варианту реализации, отличающиеся тем, что антиген содержит алкиновую группу, конъюгированную с nnAA через азидную группу.

Вариант реализации I-29. Контейнер, устройство, композиция, процесс, полипептид или конъюгат согласно любому предшествующему варианту реализации, отличающиеся тем, что антиген представляет собой капсульный сахарид бактерии; например, капсульный сахарид бактерии, выбранной из группы, состоящей из Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae и Porphyromonas gingivalis.

Вариант реализации I-30. Контейнер, устройство, композиция, процесс, полипептид или конъюгат согласно любому предшествующему варианту реализации, отличающиеся тем, что антиген представляет собой капсульный сахарид серотипа S.pneumoniae, выбранного из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F.

Вариант реализации I-31. Контейнер, устройство, композиция, процесс, полипептид или конъюгат согласно любому предшествующему варианту реализации, отличающиеся тем, что соотношение сахарида к полипептиду-носителю (мас./мас.) в конъюгате(ах) превышает 1.

Вариант реализации I-32. Контейнер, устройство, композиция, процесс, полипептид или конъюгат согласно любому предшествующему варианту реализации, отличающиеся тем, что полипептид-носитель содержит 3 или более остатков nnAA, а молекулярная масса конъюгата составляет по меньшей мере 500 кДа.

Вариант реализации I-33. Контейнер, устройство, композиция, процесс, полипептид или конъюгат согласно любому предшествующему варианту реализации, отличающиеся тем, что молекулярная масса конъюгата составляет между 900 кДа и 5 МДа.

Вариант реализации I-34. Контейнер, устройство, композиция или процесс согласно любому из вариантов реализации от I-1 до I-15 или вариантов реализации от I-21 до I-33, отличающиеся тем, что фармацевтическая композиция содержит:

конъюгаты капсульных сахаридов 2 или более различных серотипов пневмококка, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F;

конъюгаты капсульных сахаридов 14 или более различных серотипов пневмококка, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F;

конъюгаты капсульных сахаридов 15 или более различных серотипов пневмококка, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F;

конъюгаты капсульных сахаридов 20 или более различных серотипов пневмококка, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F;

конъюгаты капсульных сахаридов 21 или более различных серотипов пневмококка, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F;

конъюгаты капсульных сахаридов 24 или более различных серотипов пневмококка, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F;

конъюгаты капсульных сахаридов 25 или более различных серотипов пневмококка, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F;

конъюгаты капсульных сахаридов 4 или более различных серогрупп менингококка, выбранных из группы, состоящей из серогрупп A, C, W135, X и Y; или конъюгаты капсульных сахаридов 2 или более различных серотипов P.gingivals, выбранных из группы, состоящей из серотипов K1, K2, K3, K4, K5 и K6.

Вариант реализации I-35. Способ стимуляции ответа на основе иммунопротективных антител против антигена у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции согласно любому из вариантов реализации от I-6 до I-13 или вариантов реализации от I-21 до I-34, или иммуногенного конъюгата согласно любому из вариантов реализации от I-19 до I-33 во вспомогательном веществе, подходящем для парентерального введения.

Примеры

Настоящее изобретение проиллюстрировано следующими примерами. Материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не должны рассматриваться в качестве ограничивающих. Специалисты могут осуществить различные модификации, изменения и замены без выхода за рамки настоящего изобретения. Примеры осуществляют с использованием стандартных методик, хорошо известных специалистам в данной области техники, за исключением случаем, подробно описанных иным образом.

Примеры из WO2018/126229

В примерах заявки WO2018/126229 подробно описан синтез фрагментов eCRM, содержащих один сайт (например, K11TAG). Эти фрагменты экспрессировали в экстракте для бесклеточного синтеза белка (CFPS), и pAMF встраивали вместо естественного остатка Lys.

Варианты CRM, содержащие несколько nnAA на полипептид, также экспрессировали, выполняя различное количество замен Lys→pAMF на белок. В целом обнаружено, что большее количество замен позволяло получить носители, которые приводили к получению конъюгатов с большей молекулярной массой, однако эти носители обладали меньшей растворимостью. Носители, содержащие шесть остатков pAMF, в общем случае обеспечивали как хорошую растворимость (>>50 мг/мл), так и иммуногенность. Высокая растворимость представляла собой неожиданное явление, поскольку замена заряженных остатков Lys в нативной последовательности гидрофобными остатками pAMF увеличивала гидрофобность CRM197, а для этого белка уже сообщалось о влиянии гидрофобности на растворимость. Таким образом, показана возможность поддержания тех же сайтов присоединения, которые используются в известных конъюгатах CRM197 (а именно остатков Lys) без появления нерастворимости при утрате заряженных остатков.

Особенно полезный набор замен 6 Lys→pAMF наблюдали при использовании K34, K213, K245, K265, K386 и K527 (пронумерованных согласно SEQ ID NO: 3). Эта комбинация сайтов для замены на pAMF являлась неожиданно эффективной, в частности, из-за того, что отдельные замены в положениях

K245 и K527 привели к относительно низкому уровню экспрессии.

Этот набор из шести замен можно комбинировать с нарушением дипептида Arg-Arg, соответствующего остаткам 192-193 SEQ ID NO: 1 (RR→RN) с получением SEQ ID NO: 4, где каждый X представляет собой pAMF.

В примерах из WO2018/126229 дополнительно описаны общие протоколы активации сахаридов мета-периодатом натрия, модификации окисленного периодатом полисахарида DBCO, активации сахарида CDAP и конъюгирования сахарида-DBCO с eCRM. См. также патент США № 62/693978, ранее включенный в настоящий документ посредством ссылки

Мультивалентная иммуногенная композиция

Комбинацию конъюгатов каждого из 24 серотипов пневмококка 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 получали с использованием производного CRM197 SEQ ID NO: 4 (где X = pAMF) в качестве полипептида-носителя в каждом конъюгате. Иммуногенность этой мультивалентной композиции подтверждали с использованием схемы из 3 доз в группе из 7 кроликов посредством внутримышечной инъекции 0,25 мл вакцины. Каждая доза содержала 24 мкг сахарида (1 мкг на серотип), что давало концентрацию 96 мкг/мл.

Затем получали комбинацию конъюгатов каждого из 32 серотипов пневмококка 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23A, 23B, 23F, 31, 33F и 35B и подтверждали ее иммуногенность аналогичным образом.

Для целей сравнения также тестировали 13-валентную конъюгатную вакцину Prevnar™ вместе с 24-валентной неконъюгированной вакциной, полученной из 23-валентной вакцины Pneumovax™ с добавлением неконъюгированного сахарида серотипа 6A. Эти три композиции характеризуются эквивалентными дозами полисахаридов на серотип (за исключением 6B, для которого Prevnar™ содержит двойную дозировку), что предусматривало разбавление Prevnar™ и Pneumovax™. Все три композиции содержали адъювант на основе фосфата алюминия (60 мкг Al^{+++} на дозу), что предусматривало добавление адъюванта к Pneumovax™. Композиции не содержали консервантов.

24-валентная композиция конъюгатов содержала меньшие количества полипептида-носителя по сравнению с утвержденной вакциной Prevnar-13™, даже несмотря на то, что она также содержала капсульные сахариды 11 дополнительных серотипов. Общее массовое соотношение сахарида капсулы к полипептиду-носителю в 24-валентной композиции конъюгатов приблизительно вдвое превышало такое соотношение в Prevnar™.

IgG и OPA-реакции измеряли у кроликов. После третьей дозы обе эти реакции были значительно повышены у кроликов, получавших две конъюгатные вакцины, по сравнению с кроликами, получавшими неконъюгированную вакцину. Кроме того, IgG и OPA-реакции при использовании 24-валентной композиции были сопоставимы с реакциями, полученными при использовании Prevnar™ для 13 серотипов, охватываемых утвержденной вакциной, однако, кроме того, превосходили ее в отношении 11 серотипов, не входящих в Prevnar™. Как ни странно, доказательства супрессии эпитопов, вызванной носителем, при использовании 24-валентной композиции отсутствовали.

На фигуре представлено геометрическое среднее титра каждого из 32 серотипов в 32-валентной композиции конъюгатов по отношению к составу полисахаридов/квасцов и Prevnar-13™.

Мультивалентную композицию конъюгатов можно упаковать в предварительно заполненный стерильный шприц, который можно распространять в качестве лекарственной формы, а затем ввести в месте применения без необходимости переноса содержимого флакона в шприц для инъекций и т.д.

Замещаемые положения в CRM197

На основании работы, описанной в WO2018/126229, ряд остатков Asp, Asn, Glu, Gln, Lys, Arg, Ser и Thr в нативной последовательности CRM197 (SEQ ID NO: 1) по отдельности замещали pAMF путем мутирования их кодонов с преобразованием в TAG и экспрессии белка при 25°C в бесклеточной системе, где этот кодон распознает тРНК, встраивающая nnAA. Мутантные полипептиды экспрессировали с N-концевым метионином и гексагистидиновым маркером, присоединенным через трипептидный линкер Gly-Ser-Gly после рассматриваемой последовательности. Использования остатков в области Asn270-Ile289, Ala320-Glu349 и Phe410-His-449 избегали из-за наличия распознанных Т-клеточных эпитопов в этих областях (см. выше).

Эффективность экспрессии оценивали путем проверки встраивания ^{14}C-Leu в мутантные белки с учетом как общего, так и растворимого белка. В целом мутации в каталитическом домене CRM197 приводили к пониженным уровням экспрессии по сравнению с немодифицированной последовательностью CRM197, а мутанты с наилучшим уровнем экспрессии обычно включали замены после Arg-193, которые можно использовать для обозначения конца каталитического домена.

Наилучшие 72 мутанта демонстрировали повышенные уровни экспрессии как общего, так и растворимого белка, и содержали замены по следующим остаткам, пронумерованным согласно SEQ ID NO: 1: Ser-198, Ser-200, Asp-211, Lys-212, Lys-218, Lys-221, Lys-229, Ser-231, Ser-233, Lys-236, Ser-239, Glu-240, Glu-248, Glu-249, Gln-252, Thr-253, Glu-256, Glu-259, Ser-261, Lys-264, Thr-265, Thr-267, Thr-269, Gln-287, Glu-292, Thr-293, Asp-295, Asn-296, Ser-297, Lys-299, Asp-352, Asn-359, Glu-362, Ser-374, Arg-377,

Ser-381, Lys-385, Thr-386, Asp-392, Ser-397, Asn-399, Thr-400, Arg-407, Thr-408, Ser-451, Arg-455, Lys-456, Arg-460, Arg-462, Asp-465, Asp-467, Thr-469, Arg-472, Lys-474, Ser-475, Asn-481, Asn-486, Arg-493, Ser-494, Ser-495, Ser-496, Lys-498, Ser-501, Asn-502, Ser-505, Asp-507, Lys-516, Thr-517, Asp-519, Lys-522, Asn-524 и Lys-534.

Варианты реализации, описанные в настоящем документе, предложены исключительно для примера, и различные альтернативные варианты реализации не исключаются при осуществлении вариантов реализации, описанных в настоящем документе.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO: 1 (нативный CRM197)

GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNE
NPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPF
AEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIR
DKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAA
WAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGEL
VDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKI
TAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNGVHANLHVA
FHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNSKLSLFFEIKS

SEQ ID NO: 2 (CRM197 с заменой Arg-Asn)

GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNE
NPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPF
AEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRNSVGSSLSCINLDWDVIR
DKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAA
WAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGEL
VDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKI
TAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNGVHANLHVA
FHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNSKLSLFFEIKS

SEQ ID NO: 3 (CRM197 с 6 предпочтительными сайтами nnAA и N-концевым Met)

MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQXGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDN
ENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLP
FAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVI
RDXTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAXQYLEEFHQTALEHPELSELXTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGE
LVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHXTQPFLHDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIK
ITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNGVHANLHV
AFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNSXLSLFFEIKS

SEQ ID NO: 4 (CRM197 с заменой Arg-Asn ", 6 предпочтительными сайтами nnAA и N-концевым Met)

MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQXGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDN
ENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLP
FAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRNSVGSSLSCINLDWDVI
RDXTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAXQYLEEFHQTALEHPELSELXTVTGTNPVFAGANYA
AWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGE
LVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHXTQPFLHDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIK
ITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNGVHANLHV
AFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNSXLSLFFEIKS

SEQ ID NO: 5 (белок D H.influenzae)

CSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFAQQADYLEQDLAMTKDGRLVVIHDHFLDG
LTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFETKDGKQAQVYPNRFPLWKSHFRIHTFEDEIEF
IQGLEKSTGKKVGIYPEIKAPWFHHQNGKDIAAETLKVLKKYGYDKKTDMVYLQTFDFNELKRIKTELLP
QMGMDLKLVQLIAYTDWKETQEKDPKGYWVNYNYDWMFKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDN
IVYTPLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPEFFTDVNQMYDALLNKSGATGVFTDFPDTGVEFLKGIK

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированный полипептид-носитель, содержащий аминокислотную последовательность, которая: (i) обладает по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1; (ii) не содержит дипептидной последовательности Arg-Arg; и (iii) содержит остатки неприродной аминокислоты (nnAA), замещающие K33, K212, K244, K264, K385 и/или K526 в SEQ ID NO: 1.

2. Модифицированный полипептид-носитель по п.1, отличающийся тем, что Arg-193 SEQ ID NO: 1 замещен другой аминокислотой, такой как Asn.

3. Модифицированный полипептид-носитель по п.1 или 2, причем полипептид-носитель обладает по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 98% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1.

4. Модифицированный полипептид-носитель по любому из пп.1-3, причем полипептид-носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

5. Модифицированный полипептид-носитель по любому из пп.1-4, причем остатки nnAA включают функциональную группу, подходящую для "клик"-реакции с функциональной группой антигена.

6. Модифицированный полипептид-носитель по любому из пп.1-5, причем nnAA представляет собой 2-амино-3-(4-(азидометил)фенил)пропановую кислоту.

7. Иммуногенный конъюгат, содержащий модифицированный полипептид-носитель по любому из пп.1-6, конъюгированный через остаток nnAA, содержащийся в нем, с антигеном.

8. Иммуногенный конъюгат по п.7, причем антиген содержит алкиновую группу, конъюгированную с nnAA через азидную группу.

9. Иммуногенный конъюгат, содержащий модифицированный полипептид-носитель по любому из пп.1-6 и сахаридный антиген, причем: (i) полипептид-носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; а (ii) сахаридный антиген ковалентно связан с полипептидом-носителем через по меньшей мере один остаток nnAA в SEQ ID NO: 4.

10. Иммуногенный конъюгат по любому из пп.7-9, причем антиген представляет собой капсульный сахарид бактерии; например, капсульный сахарид бактерии, выбранной из группы, состоящей из Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae и Porphyromonas gingivalis.

11. Иммуногенный конъюгат по любому из пп.7-10, причем антиген представляет собой капсульный сахарид серотипа S.pneumoniae, выбранного из группы, состоящей из 1,2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F, или где антиген представляет собой капсульный сахарид серотипа S.pneumoniae, выбранного из группы, состоящей из 6C, 7C, 15A, 15C, 16F, 20, 20A, 20B, 23A, 23B, 24B, 31, 34, 35B, 35F, 37 и 38.

12. Иммуногенный конъюгат по любому из пп.7-11, причем конъюгат имеет молекулярную массу по меньшей мере 500 кДа.

13. Иммуногенный конъюгат по п.12, причем конъюгат имеет молекулярную массу от 900 кДа до 5 МДа.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая два или более различных иммуногенных конъюгатов по любому из пп.7-13.

15. Фармацевтическая композиция по п.14, причем иммуногенные конъюгаты представляют собой конъюгаты пневмококковых серотипов, и при этом соотношение пневмококкового сахарида к полипептиду-носителю (мас./мас.) для композиции превышает 1.

16. Фармацевтическая композиция по п.14 или 15, отличающаяся тем, что фармацевтическая композиция содержит:

конъюгаты капсульных сахаридов из 2 или более различных серотипов пневмококка, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F;

конъюгаты капсульных сахаридов из 14 или более различных серотипов пневмококка, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F;

конъюгаты капсульных сахаридов из 15 или более различных серотипов пневмококка, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F;

конъюгаты капсульных сахаридов из 20 или более различных серотипов пневмококка, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F;

конъюгаты капсульных сахаридов из 21 или более различных серотипов пневмококка, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F;

конъюгаты капсульных сахаридов из 24 или более различных серотипов пневмококка, выбранных

из группы, состоящей из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F;

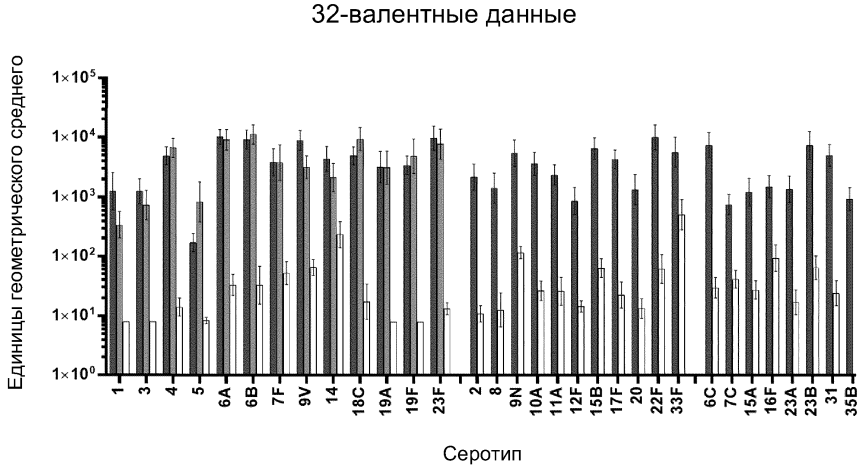
конъюгаты капсульных сахаридов из 25 или более различных серотипов пневмококка, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 и 33F;

конъюгаты капсульных сахаридов из 4 или более различных серогрупп менингококка, выбранных из группы, состоящей из серогрупп A, C, W135, X и Y; или

конъюгаты капсульных сахаридов из 2 или более различных серотипов P.gingivals, выбранных из группы, состоящей из серотипов K1, K2, K3, K4, K5 и K6.

17. Способ стимуляции ответа, основанного на иммунопротективных антителах, против антигена у субъекта, включающий введение указанному субъекту фармацевтической композиции по любому из пп.14-16, или иммуногенного конъюгата по любому из пп.7-13 во вспомогательном веществе, подходящем для парентерального введения.

18. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.14-16 или иммуногенного конъюгата по любому из пп.7-13 для стимуляции ответа, основанного на иммунопротективных антителах против антигена у субъекта, причем указанную фармацевтическую композицию или иммуногенный конъюгат вводят субъекту во вспомогательном веществе, подходящем для парентерального введения.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2