

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390941** (13) **A1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**(43) Дата публикации заявки
2024.10.31(22) Дата подачи заявки
2023.04.20(51) Int. Cl. *A61K 39/09* (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01)
C07K 1/16 (2006.01)
B01D 61/14 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(54) КОМБИНАЦИЯ ПНЕВМОКОККОВЫХ КАПСУЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ЭПИДЕМИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ДЛЯ ЕВРАЗИЙСКОГО РЕГИОНА СЕРОТИПОВ (ВАРИАНТЫ), ВКЛЮЧАЮЩАЯ ЕЁ ПОЛИВАЛЕНТНАЯ ВАКЦИНА (ВАРИАНТЫ) И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКООЧИЩЕННЫХ КАПСУЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИИ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

(96) **2023000066 (RU) 2023.04.20**(71) Заявитель:
**АПАРИН ПЁТР ГЕННАДИЕВИЧ
(RU)**

(72) Изобретатель:

**Анкудинов Игорь Веналиевич,
Апарин Пётр Геннадиевич,
Головина Марина Эдуардовна,
Казаков Игорь Александрович,
Кожина Елена Вадимовна,
Коробова Светлана Вячеславовна,
Курбатова Ирина Юрьевна, Лёдов
Владимир Алексеевич, Лобзин Юрий
Владимирович, Сидоренко Сергей
Владимирович, Соколова Татьяна
Васильевна (RU)**

(74) Представитель:

Банзакова В.П. (RU)

(57) Получены 23- и 14-компонентные комбинации пневмококковых капсульных полисахаридов (КПС) эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов бактерии *S. pneumoniae*, включающие новое сочетание серотипов 6А, 15F и 23А. При этом, в частности, 23-компонентная комбинация обеспечивает увеличение серотипового охвата до 81,6% пневмококков, циркулирующих в Евразийском регионе, обнаруживает отсутствие межмолекулярной антигенной конкуренции, высокую степень безопасности, существенное иммуностимулирующее действие, оказываемое новым сочетанием КПС серотипов 6А, 15F, 23А на иммунный ответ к остальным её компонентам, а также на эффективность киллинга пневмококков серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F антителами иммунных сывороток млекопитающих, иммунизированных заявляемой комбинацией. Разработанные на основе полученных комбинаций неконъюгированные и конъюгированные 23- и 14-валентные вакцины демонстрируют повышение уровней иммуногенности и протективной активности в отношении населения Евразийского региона, высокую степень безопасности, стимуляцию у млекопитающих высокой протективной активности иммунных сывороток вследствие усиления их опсонофаготирующей реакции в отношении нового сочетания КПС серотипов 6А, 15F и 23А, а также снижение содержания белкового носителя в составе конъюгированных вакцин без пропорционального понижения уровней их иммуногенности. Разработан способ получения высокоочищенных КПС бактерии *S. pneumoniae* без примеси С-полисахарида, с неизменной первичной структурой молекулы и неальтерированными антигенными детерминантами. Способ обеспечивает увеличение выхода (до 85%) и чистоты (до 98%) целевых продуктов, снижение их себестоимости за счёт сокращения количества используемых реагентов и модернизации технологической схемы производства, а также повышение экономичности и экологичности производственного процесса.

A1**202390941****202390941****A1**

СРС:	МПК:
A61K 39/092 (2020.02)	A61K 39/09 (2006.01)
A61K 39/385 (2020.02)	A61K 39/385 (2006.01)
A61K 47/6415 (2020.02)	A61K 47/64 (2017.01)
C08B37/00003	C08B 37/00
C12P19/04	C12P 19/04
	C12R 1/46

Комбинация пневмококковых капсульных полисахаридов эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов (варианты), включающая её поливалентная вакцина (варианты) и способ получения высокоочищенных капсульных полисахаридов бактерии *Streptococcus pneumoniae*

Область техники

Изобретение относится к клинической иммунологии и фармакологии, в частности, к комбинациям пневмококковых капсульных полисахаридов эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов и включающим их поливалентным (неконъюгированным и конъюгированным) вакцинам, а также к способу получения высокоочищенных капсульных полисахаридов бактерии *Streptococcus pneumoniae*.

Предшествующий уровень техники

Streptococcus pneumoniae – грамположительная патогенная бактерия, которая является основным возбудителем инфекционных заболеваний, таких, как пневмония, безочаговая бактериемия и менингит. В течение многих лет *S. pneumoniae* рассматривался как ведущий возбудитель респираторных инфекций, обуславливающий наибольшее количество летальных исходов при данной патологии. Эта точка зрения получила очередное подтверждение в исследовании Global Burden of Disease Study (С. Troeger, В. Blacker, I.A. Khalil et al. «Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016». The Lancet Infectious Diseases, 2018, v.18, pp.1191-1210). По приведенным в исследовании расчетам в 2016 г. в мире было выявлено 336 млн эпизодов инфекций нижних дыхательных путей (45,5 случаев на 1000 человек) и 2,4 млн смертей (32,2 случая на 100000 человек). При этом на долю *S.pneumoniae* приходилось 197 млн эпизодов инфекций нижних дыхательных путей (15,3 случая на 1000 человек) и 1,2 млн смертей (16,1 случай на 100000 человек). Наиболее высокие показатели отмечаются среди детей до 5 лет и лиц старше 70 лет. В Российской Федерации из 500000 ежегодных случаев заболевания пневмонией, *S. pneumoniae* является возбудителем в 76% и 90% случаев у взрослых и детей младше 5 лет соответственно. Смертность от пневмонии в 2013 году в России составила 26,7 случаев на 100000 населения, что составляет 51,7% всех смертей от респираторных заболеваний (К. Cigrero, К.А. Zykov, N.I. Briko et

al. «Safety and immunogenicity of a single dose 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in Russian subjects». Hum Vaccin Immunother, 2016, v.12, No.8, pp.2142-2147). Для возбудителя *S. pneumoniae* характерна высокая контагиозность, бессимптомное носительство иногда нескольких серотипов одновременно. Поэтому, учитывая, что многие циркулирующие эпидемические штаммы пневмококков приобрели устойчивость к антибиотикам, основным направлением в борьбе с распространением *S. pneumoniae* является вакцинопрофилактика.

В РФ вакцинация против пневмококковой инфекции была включена в Национальный календарь прививок в 2014 году (Федеральный закон № 368-ФЗ от 21.12.2013 "О внесении изменения в статью 9 Федерального закона "Об иммунопрофилактике инфекционных болезней", Приказ Минздрава России № 125н от 21.03.2014, приложение № 1 «Национальный календарь профилактических прививок РФ»).

Кроме того, в связи с распространением пандемии короновиральной инфекции, заболеваемость внебольничными пневмониями приобрела особую эпидемическую значимость. Рост случаев пневмоний, вызванных пневмококками, помимо нанесения прямого ущерба здоровью граждан России, существенно осложняет диагностику и лечение короновиральных больных. В связи с угрозой патогенетического синергизма короновирала и пневмококка в схемы лечения короновиральной инфекции вводятся фрагменты стандартов диагностики и лечения бактериальных пневмоний.

Разработка пневмококковых вакцин имеет более чем 100-летнюю историю. Первые попытки профилактики пневмококковых инфекций относятся к 1911 г.; они оказались не очень эффективными, поскольку были связаны с использованием убитых культур пневмококка (A. Wright, W. Parry Morgan, L. Colebrook, R.W. Dodgson «Observations on prophylactic inoculation against pneumococcus infections and on the results which have been achieved by it». The Lancet, 1914, v.183, pp.87-95). Полисахаридная капсула является основным фактором вирулентности бактерии *S. pneumoniae* и служит основой для специфической идентификации 97 серотипов. Достаточно быстро было установлено, что основным иммуногенным компонентом пневмококка, обеспечивающим защиту организма человека от инфекции, является капсульный полисахарид. Капсульные полисахариды (КПС) стимулируют выработку сероспецифических антител, которые могут обеспечить защиту от возбудителя *S. pneumoniae* (D. S. Fedson «Pneumococcal vaccine» In S. A. Plotkin and E. A. Mortimer (ed.), Vaccines. The W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1988, pp. 217—299; C.G. Prober, H. Frayha, M. Klein et al. «Immunologic responses of children to serious infections with *Streptococcus Pneumoniae*». J. Infect. Dis., 1983, v.148, No.3, pp.427-435; M. Koksela, M. Leinonen, J. Luotonen «Serum antibody response to pneumococcal otitis media». Pediatr. Infect. Dis., 1982, v.1, No.4, pp.245-252). Однако оказалось, что капсульные полисахариды крайне вариабельны по своей структуре, при этом иммунный ответ и защита от инфекции формируются только в отношении пневмококков того же типа, который был использован для

иммунизации. Таким образом, для создания эффективной вакцины в ее состав необходимо включить полисахариды наиболее важных и распространенных серотипов пневмококков.

Однако решение задачи формирования серотипового состава эффективной вакцины не является очевидным для специалиста и осложняется тем обстоятельством, что серотиповой состав пневмококковых популяций детерминирован как географической локализацией, так и временным диапазоном исследования в связи с перманентно возникающими и обнаруживающимися новыми серотипами. Поэтому для создания обоснованного полисахаридного состава пневмококковых вакцин необходим постоянный мониторинг структуры пневмококковых популяций в различных географических регионах.

Указанные факторы определяют и, несомненно, еще долго будут определять стратегию создания пневмококковых вакцин. Первая полисахаридная вакцина против пневмококковой инфекции включала КПС 4-х серотипов и предотвращала пневмонии, вызываемые именно этими серотипами бактерии *S. pneumonia* (С.М. Macleod, R.G. Hodges, M. Heidelberger, W.G. Bernhard «Prevention of Pneumococcal Pneumonia by Immunization with Specific Capsular Polysaccharides». J. Exp. Med., 1945, v.82, pp.445-465). В дальнейшем, по мере накопления данных о разнообразии серотипов и их роли в патогенезе пневмококковых инфекций, были разработаны 14-, 18- и 23-валентные вакцины (R. Austrian, R.M. Douglas, G. Schiffman et al. «Prevention of pneumococcal pneumonia by vaccination». Trans. Assoc. Am. Physicians, 1976, v.89, pp.184-194).

Проблема адекватности серотипового состава является ключевой как для полисахаридных неконъюгированных, так и для конъюгированных пневмококковых вакцин. Если первая конъюгированная вакцина была 7-валентной, то в последующем были внедрены 10- и 13-валентные препараты (E.D. McIntosh, R.R. Reinert «Global prevailing and emerging pediatric pneumococcal serotypes». Expert Review of Vaccines, 2011, v.10, pp.109-129).

Пневмококковые КПС относятся к классу экзополисахаридов, которые синтезируются на внешней мембране бактериальной клетки и далее экскретируются вовне, образуя прочную внеклеточную капсулу. КПС состоят из повторяющихся, последовательно соединенных олигосахаридных звеньев, в состав которых входят от 2-х до 8-ми моносахаридных остатков. Данные, полученные с помощью различных физико-химических методов, показывают, что молекулярная масса КПС бактерии *S. pneumoniae* может достигать 10^6 Da. Однако в основе этих методов лежит определение скорее размера частиц агрегированных макромолекул КПС, тогда как их истинная молекулярная масса в условиях демицеллирования может оказаться существенно ниже.

Большинство пневмококковых КПС являются полианионитами. Их кислотность обусловлена наличием карбоксил-содержащих фрагментов (остатков уроновых кислот и пировиноградной кислоты) или присоединенных фосфодиэфирными связями остатков фосфорной кислоты. Известно только шесть нейтральных КПС бактерии *S. pneumoniae*. Как кислые, так и нейтральные КПС часто содержат гидрофобные фрагменты – 6-дезоксид- и N-ацетиламиносахара, а также

О-ацетильные группы. Основным методом подтверждения структуры (подлинности) КПС является спектроскопия ЯМР, которая позволяет контролировать также количественное содержание различных группировок неуглеводной природы (О-ацетата, фосфохолина, глицерофосфата). Этот метод играет также главную роль в процессе установления химической структуры макромолекул КПС впервые выделенных серотипов бактерии *S. pneumoniae*. Ближайшими аналогами заявляемой 23-валентной неконъюгированной вакцины и входящей в неё 23-компонентной комбинации пневмококковых капсульных полисахаридных серотипов является лицензированная в РФ неконъюгированная вакцина против пневмококковой инфекции – PNEUMOVAX 23 (Merck Sharp & Dohme, США), содержащая комбинацию очищенных КПС 23-х эпидемически значимых для США и Западной Европы серотипов бактерии *S. pneumoniae* (Пневмовакс 23®), вакцина пневмококковая, поливалентная, вакцина для профилактики пневмококковых инфекций. Регистрационное удостоверение № ЛП003441 от 16.02. 2016 г. Фармакопейная статья № ЛП003441- 020216). Готовая форма вакцины представляет собой 0,5 мл физиологического раствора, содержащего по 25 мкг КПС каждого из следующих 23-х пневмококковых серотипов: 1, 2, 3, 4, 5, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 17F, 18С, 19А, 19F, 20, 22F, 23F, 33F. При этом ФС на данную вакцину не регламентирует содержание в ней «С»-полисахарида (С-ПС, или неспецифичного полисахарида, являющегося примесью, но не активной субстанцией), поскольку известные способы получения вакцины не обеспечивают полную очистку входящих в неё КПС от С-ПС (US 4,686,102; EP 0002404; US 4,242,501). Вакцина PNEUMOVAX 23 не содержит адьюванта, но содержит 0,25% фенола в качестве консерванта. Вакцина была впервые одобрена в США в 1983 году и в настоящее время лицензирована более чем в 75 странах мира. Многолетние наблюдения подтвердили протективную эффективность (от 56 до 81%) и безопасность данной 23-валентной пневмококковой полисахаридной вакцины (К. Ciprero, К.А. Zykov, N.I. Briko et al. «Safety and immunogenicity of a single dose 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in Russian subjects». Hum Vaccin Immunother, 2016, v.12, No.8, pp.2142-2147).

Следует отметить, что конъюгированная форма 23-валентной вакцины, зарегистрированная и представленная на фармацевтическом рынке, неизвестна. Также неизвестны и ближайшие, зарегистрированные и представленные на фармацевтическом рынке, аналоги заявляемой неконъюгированной и конъюгированной 14-валентной вакцины и входящей в неё 14-компонентной комбинации КПС пневмококков.

Однако, как отмечено выше, содержащаяся в вакцине PNEUMOVAX 23 комбинация 23-х капсульных полисахаридов включает серотипы бактерии *S. pneumoniae*, эпидемически значимые для территории США и Западной Европы, и не обеспечивает надлежащего серотипового охвата циркулирующих в Евразийском регионе пневмококков. Поэтому и вакцина, включающая указанную комбинацию полисахаридных серотипов, не может быть в той же степени иммуногенной для населения Евразийского региона, включая Россию.

При этом следует отметить, что масштабных и длительных исследований по выявлению эпидемически значимых для Евразийского региона пневмококковых капсульных полисахаридных серотипов до настоящего времени не проводилось, в связи с чем не было создано комбинаций с обоснованным серотиповым составом и, соответственно, включающих их вакцин, пригодных для эффективной иммунизации населения именно Евразийского региона, включая Россию.

В обзорной статье Трухина В.П. с соавторами «Анализ серотипового пейзажа пневмококков для определения композиционной модели отечественной пневмококковой конъюгированной вакцины» исключительно на основании анализа данных литературы предложен полисахаридный состав новой конъюгированной антипневмококковой вакцины (БИОпрепараты.Профилактика, диагностика, лечение. 2022; 22(2):124–141; <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-124-141>).

В состав «модельной композиции» 16-валентной вакцины авторы предлагают включить конъюгаты полисахаридов, входящих в известную 13-валентную конъюгированную вакцину Превинар 13, а также конъюгаты трех дополнительных полисахаридов серотипов 15А, 12F и 22F.

По имеющимся данным, применяемая в настоящее время в составе 13-валентной конъюгированной вакцины Превинар 13 комбинация КПС обеспечивает охват 37 % циркулирующих в России серотипов. Предлагаемая же в составе 16-валентной вакцины комбинация серотипов обеспечивает дополнительно охват до 15,4% серотипов (в основном за счет серотипа 15А), что позволяет охватить немногим более половины (52,4%) циркулирующих в Российской Федерации пневмококков.

В отличие от приведенных данных, заявляемая комбинация из 23-х КПС в целом позволяет охватить до 81,6% серотипов пневмококков, циркулирующих в Евразийском регионе, включая Россию.

Очевидно, что для формирования заявленных комбинаций полисахаридных серотипов с целью последующего приготовления эффективных неконъюгированных и конъюгированных вакцин, необходимо получение соответствующих высокоочищенных, без примеси С-ПС, КПС бактерии *S. pneumoniae* с неизменной первичной структурой молекулы и неальтерированными (нативными) антигенными детерминантами.

Как отмечено в патенте US 5,623,057 крупнейшей в мире фармацевтической, химической и биологической компании Merck, хотя присутствие С-полисахаридного загрязнителя (С-ПС) не влияет на иммунные реакции организма против специфичных пневмококковых полисахаридов, С-ПС может участвовать в реакции конъюгации (при производстве конъюгированной вакцины), делая её менее специфичной и контролируемой для специфичных пневмококковых полисахаридов. Кроме того, продукция анти-С-полисахаридных антител в организме может коррелировать с деструкцией ткани, наблюдаемой при пневмококковых инфекциях.

Известны т.н. спиртовые способы получения пневмококковых КПС. Так, патентные документы US 4,686,102 и US 4,242,501 раскрывают способы получения пневмококковых КПС серотипов 3, 5, 9V, 10A, 11A, 15B, 17F, 19A, 22F, 33F и серотипов 1, 2, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 12F, 14, 18C, 19F, 20, 23F, 25 бактерии *S. pneumoniae* соответственно, включающие до 12 трудоёмких и длительных операций с использованием большого количества как дорогостоящих, так и весьма токсичных реагентов (этилового спирта, ферментов, гексадецилтриметиламмония бромида, активированного древесного угля, глицина и т.п.). Очистку пневмококкового КПС от бактериальной массы осуществляют многократным фракционным спиртовым осаждением, после чего к растворённому в дистиллированной воде осадку, содержащему целевой продукт, добавляют гексадецилтриметиламмония бромид (цетавлон) для удаления примесных бактериальных биополимеров (белков, нуклеиновых кислот, балластного неспецифичного С-ПС). На последнем этапе производят очистку КПС от цетавлона вновь серией спиртовых осадений и диализом. В публикации европейской заявки EP 0002404A1 описан способ получения пневмококковых КПС, включающий добавление заданного количества смешивающегося с водой спирта к жидкой среде, содержащей полисахарид, для осаждения примесей; отделение примесей от жидкой среды и добавление заданного количества смешиваемого с водой спирта к жидкой среде для осаждения полисахарида; ресуспендирование полисахарида в жидкой среде и удаление белков и нуклеиновых кислот из полисахарида.

В публикации международной заявки WO2006082527A2 описан двухстадийный метод очистки бактериальных КПС от примесей белков и нуклеиновых кислот без использования ферментов - ДНКазы, РНКазы и/или протеазы. На первой стадии суспензию, содержащую стрептококковые КПС, белки и нуклеиновые кислоты обрабатывают водной смесью спирта и соли кальция для осаждения биополимеров; после отделения осадка на второй стадии надосадочную водную фракцию обрабатывают катионным детергентом для осаждения КПС.

В публикации международной заявки WO2016174683A1 предложено использование SiO₂ (диоксида кремния) для очистки пневмококковых КПС серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F и 33F.

Способ получения КПС включает получение раствора полисахарида, белков, нуклеиновых кислот, компонентов бактериальной клеточной стенки и других примесей; обработку раствора детергентом для удаления нуклеиновых кислот и прочих примесей; приготовление суспензии SiO₂ в воде или буфере; добавление суспензии SiO₂ к раствору полисахарида; выделение полисахарида. При этом используются такие реагенты, как спирт, цетавлон, древесный уголь и т.п., а обработку раствора полисахарида суспензией SiO₂ проводят при температуре до 60°C.

Следует отметить, что вышеуказанные способы не обеспечивают получения целевого продукта без примеси С-ПС, и чистота продукта в отдельных случаях составляет не более 30 или 89%, а выход продукта составляет не более 10%.

Кроме того, указанные способы включают чрезвычайно длительную и многостадийную обработку КПС (спиртом, детергентами, в частности, цетавлоном и т.п.), в связи с чем могут привести к получению целевого продукта с альтерированными антигенными детерминантами и измененной пространственной структурой антигена, т.е. продукта с пониженной антигенной активностью.

Ближайшими аналогами заявляемому способу являются более щадящие, безопасные и технологичные способы получения пневмококковых КПС с использованием процедуры жидкостной ионообменной хроматографии.

Так, в публикации заявки US5714354A описан бесспиртовой метод очистки пневмококковых КПС серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6В, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 15В, 17F, 18С, 19А, 19F, 20, 22F и 23F с использованием катионных детергентов, в частности, бромида гексадецил-1-триметиламмония для удаления примесных белков, нуклеиновых кислот и С-ПС путем осаждения КПС. При этом отделение загрязняющих веществ от КПС серотипов 7F, 14 и 33F производят с помощью фильтрации на активированном угле, хроматографии на гидроксипатите и анионообменной хроматографии. Однако заявленный способ не обеспечивает получения целевого продукта без примеси С-ПС.

В публикации международной заявки WO2018104889A1 описан способ удаления примесных белков из раствора, содержащего бактериальный КПС *Streptococcus agalactiae*, с помощью колоночной анионообменной хроматографии с использованием стационарной фазы, которая представляет собой полимерную смолу в виде сферических частиц, изготовленную из полистирола, полидивинилбензола, сополимеров дивинилбензола и стирола, или сшитого стирола и дивинилбензола. В указанном способе процедуре анионообменной хроматографии предшествуют стадии осаждения загрязняющих белков и/или нуклеиновых кислот и диафильтрация. Однако данный способ позволяет очистить целевой продукт от бактериальных белков, но не от С-ПС.

В публикации заявки US2019010187A1 раскрыт способ очистки пневмококкового КПС серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 9N, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 17F, 18С, 19А, 19F, 20, 22F, 23F, 24, 33F и 35В, включающий ферментацию бактерий *S. pneumoniae*; осветление культуры бактерий дезоксихолатом натрия; концентрирование и диафильтрацию неочищенного КПС; обработку раствора КПС ферментами (бензоназой, мутанолизин/лизоцимом, β -D-N-ацетилглюкозаминидазой и/или протеиназой К) для удаления примесей белков, нуклеиновых кислот и полисахаридов клеточной стенки, присоединенных к пептидогликану и/или другим структурам клеточной мембраны; осаждение ферментов уксусной кислотой; концентрирование КПС из надосадочной жидкости посредством тангенциальной диафильтрации с использованием мембраны с отсечкой молекулярной массы 50-100 кДа; финальную очистку КПС с помощью анионообменной хроматографии с использованием мультимодальной смолы в проточном режиме, тангенциально-проточную фильтрацию и/или фильтрацию через смолу CAPTO™ Adhere, представляющую собой мультимодальную смолу

с анион-обменными лигандами. При этом в указанном документе представлены доказательства получения целевого продукта без примеси С-ПС, что, по-видимому, обусловлено многовекторной ферментной обработкой раствора КПС.

В публикации международной заявки WO2012127485A1 раскрыт бесспиртовой метод очистки пневмококковых КПС, в котором используется хроматографическое отделение С-ПС от КПС на основе различий в их суммарном поверхностном заряде, и включает следующие этапы: отделение бактериальной массы от надклеточной жидкости, содержащей КПС; концентрирование надклеточной жидкости путем ультрафильтрации с использованием мембраны с отсечкой молекулярной массы 100 кДа; обработку концентрированного раствора, содержащего КПС, нуклеазой; осаждение примесей с использованием обработки сульфатом аммония или дезоксихолатом натрия с последующей диафильтрацией с использованием мембраны с отсечкой молекулярной массы 100 кДа. Для удаления С-ПС и белков из полученного раствора КПС используют одно- или многостадийную хроматографию, которая может включать ионообменную хроматографию как саму по себе, так и в сочетании хроматографией гидрофобного взаимодействия. В качестве носителя для ионообменной хроматографии используют анионообменные смолы. Выход КПС составляет 60-70%, снижение содержания С-полисахарида в КПС составляет от 1 до 5 раз (но не ниже 2%), загрязнение белками и нуклеиновыми кислотами составляет менее 2%.

В публикации заявки CN112646050A описан способ очистки пневмококковых полисахаридов серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 12F, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 17F, 18С, 19А, 19F, 20, 22F, 23F и 33F с использованием ионообменной хроматографии. При этом указанный способ включает процедуру ферментирования с получением культуры бактерий, инактивацию, осветление и концентрирование ультрафильтрацией с использованием мембраны с отсечкой молекулярной массы 100 кДа. Очистку полисахаридов от примесей осуществляют на хроматографической колонке с анионообменной смолой DEAE Sepharose FF. Однако заявленный способ не обеспечивает существенного снижения содержания С-ПС в целевом продукте.

Таким образом, из уровня техники неизвестен способ получения высокоочищенных, без примеси С-ПС, пневмококковых КПС с экспериментально подтвержденными неизменной первичной структурой молекулы и неальтерированными антигенными детерминантами, включающий процедуру катионообменной хроматографии.

Раскрытие изобретений

Задачами заявляемых изобретений являются:

(i) разработка новых комбинаций пневмококковых капсульных полисахаридов бактерии *S. pneumoniae* эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов;

(ii) разработка на основе указанных комбинаций пневмококковых капсульных полисахаридов эффективных и безопасных 23-валентной и 14-валентной вакцин (неконъюгированных и конъюгированных), предназначенных для иммунизации населения Евразийского региона;

(iii) разработка нового способа получения высокоочищенных КПС бактерии *S. pneumoniae*.

Техническими результатами, обеспечиваемыми заявляемыми изобретениями, являются:

а) в части комбинаций пневмококковых капсульных полисахаридов:

- увеличение серотипового охвата до 81,6% и до 64,6% пневмококков, циркулирующих в Евразийском регионе, обеспечиваемое заявляемой 23-компонентной и заявляемой 14-компонентной комбинацией пневмококковых КПС, соответственно;

- существенное иммуностимулирующее действие, оказываемое новым сочетанием КПС эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов 6А, 15F и 23А на иммунный ответ к остальным двадцати КПС заявляемой 23-компонентной комбинации полисахаридов серотипов (1, 2, 3, 4, 5, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F) или к остальным одиннадцати КПС заявляемой 14-компонентной комбинации полисахаридов серотипов (3, 4, 5, 6В, 7F, 11А, 14, 18С, 19А, 19F, 23F);

- отсутствие межмолекулярной антигенной конкуренции - реакций интерференции антигенов в обоих заявляемых вариантах комбинаций КПС пневмококковых серотипов;

- существенное иммуностимулирующее действие, оказываемое новым сочетанием КПС эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов 6А, 15F, 23А на эффективность киллинга *in vitro* пневмококков серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F антителами иммунных сывороток млекопитающих, иммунизированных заявляемой 23-компонентной комбинацией пневмококковых КПС;

- высокая степень безопасности заявляемых комбинаций пневмококковых КПС (заявляемая 23-компонентная комбинация пневмококковых КПС является апиrogenной в дозе до 57,5 мкг/мл на кг веса в тесте пирогенности на кроликах, а заявляемая 14-компонентная комбинация пневмококковых КПС - в дозе до 35 мкг/мл на кг веса, соответственно).

б) в части вакцин:

- повышение уровней иммуногенности и протективной активности заявляемых вариантов неконъюгированных и конъюгированных вакцин в отношении населения Евразийского региона;

- стимуляция у млекопитающих, иммунизированных заявляемыми вариантами неконъюгированных вакцин, высокой протективной активности иммунных сывороток вследствие усиления их опсонофагоцитирующей реакции в отношении нового сочетания КПС эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов 6А, 15F, 23А;

- снижение содержания белкового носителя в составе заявляемых вариантов конъюгированных вакцин без пропорционального понижения уровней их иммуногенности;
- высокая степень безопасности заявляемых вакцин: заявляемая 23-валентная неконъюгированная вакцина является апиrogenной в дозе до 57,5 мкг/мл на кг веса в тесте пирогенности на кроликах; заявляемая 14-валентная неконъюгированная вакцина - в дозе до 35 мкг/мл на кг веса; заявляемая 23-валентная конъюгированная вакцина - в дозе до 9,2 мкг/мл на кг веса с белковым носителем и до 9,6 мкг/мл на кг веса с липидосодержащим носителем; заявляемая 14-валентная конъюгированная вакцина - в дозе до 5,6 мкг/мл на кг веса с белковым носителем и до 7,8 мкг/мл на кг веса с липидосодержащим носителем, соответственно.

с) в части способа получения высокоочищенного КПС бактерии *S. pneumoniae*:

- получение целевого продукта без примеси С-ПС;
- получение целевого продукта с экспериментально подтверждёнными неизменной первичной структурой молекулы и неальтерированными антигенными детерминантами;
- увеличение выхода (до 85%) и чистоты (до 98%) целевого продукта;
- снижение себестоимости целевого продукта за счёт сокращения количества используемых реагентов и модернизации технологической схемы производства;
- повышение экономичности и экологичности заявляемого способа.

Впервые сформирован новый оригинальный серотиповый состав комбинации КПС эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов, включающей 23 серотипа бактерии *S. pneumoniae*: 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15F, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23F, 33F.

Заявляемая комбинация разработана на основании анализа результатов длительных широкомасштабных исследований серотипового состава пневмококков, циркулирующих в Евразийском регионе (Пример 1).

При этом неочевидным для инфекциониста-эпидемиолога обстоятельством явилось обнаружение никогда не используемого ранее в составе известных комбинаций пневмококковых КПС нового сочетания трёх КПС эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов - 6А, 15F и 23А, которые были включены в состав заявляемой 23-компонентной комбинации вместо КПС серотипов 2, 17F и 20, широко представленных в зарубежных пневмококковых вакцинах, включая PNEUMOVAX 23.

Новый серотиповый состав заявляемой комбинации обеспечивает увеличение охвата до 81,6% серотипов, циркулирующих в Евразийском регионе, в то время как содержащаяся в вакцине PNEUMOVAX 23 комбинация - до 63,1% соответственно (Пример 1).

При этом заявляемая комбинация пневмококковых КПС обнаруживает неожиданные для специалиста иммунобиологические свойства, обусловленные межмолекулярными антигенными взаимодействиями нового сочетания КПС трёх эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов 6А, 15F и 23А с комбинацией остальных двадцати КПС серотипов (1, 2, 3, 4, 5, 6В, 7F, 8,

9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F), общих с комбинацией полисахаридов лицензированной вакцины PNEUMOVAX 23. Так, в заявляемой комбинации новое сочетание КПС эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов 6A, 15F и 23A оказывает выраженное иммуностимулирующее действие на иммунный ответ к остальным двадцати КПС серотипов (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F) (Пример 2E).

Поэтому заявляемая комбинация КПС демонстрирует существенное превышение иммуногенности известной комбинации вследствие стимуляции продукции у млекопитающих более высоких уровней сероспецифических IgG и IgM по сравнению с иммунным ответом к известной комбинации (Пример 2F).

Кроме того, в заявляемой комбинации отсутствуют реакции интерференции антигенов (межмолекулярная антигенная конкуренция полисахаридов) (Пример 2F).

Также установлено иммуностимулирующее действие, оказываемое новым сочетанием КПС эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов 6A, 15F и 23A на эффективность киллинга *in vitro* пневмококков серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F антителами иммунных сывороток млекопитающих, иммунизированных заявляемой комбинацией (Пример 3C).

При этом заявляемая комбинация КПС демонстрирует высокую степень безопасности, являясь апиrogenной в дозе до 57,5 мкг/мл на кг веса в тесте пирогенности на кроликах (Пример 2G).

На основе заявляемой комбинации разработана 23-валентная вакцина для профилактики и/или лечения инфекционных заболеваний, таких, как пневмония, безочаговая бактериемия и менингит, вызываемых бактерией *S. pneumoniae*. Заявляемая вакцина включает профилактически и/или терапевтически эффективное количество комбинации КПС эпидемически значимых для Евразийского региона пневмококковых серотипов: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15F, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23F, 33F.

При этом эффективной дозой для неконъюгированной вакцины является доза 575 мкг в 0,5 мл раствора (Пример 3A).

Очевидно, что иммунобиологические свойства заявляемой вакцины детерминированы соответствующей заявляемой комбинацией пневмококковых КПС. При этом заявляемая 23-валентная вакцина в сравнении с лицензированной вакциной PNEUMOVAX 23 обладает, вследствие своего серотипового состава, большей иммуногенностью и серотиповым охватом в отношении пневмококков, поражающих население Евразийского региона (Пример 1).

Заявляемая вакцина вызывает защиту от бактерии *S. pneumoniae* путём индукции гуморального иммунного ответа у млекопитающих с образованием серотип-специфических IgG и IgM (Пример 2E).

Заявляемая вакцина стимулирует у иммунизированных млекопитающих высокую протективную активность иммунных сывороток вследствие усиления

их опсонифагоцитирующей реакции в отношении нового сочетания КПС эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов 6А, 15F и 23А (Пример 3С).

Предпочтительно заявляемая вакцина не содержит примеси С-ПС, однако в отдельных случаях воплощения изобретения вакцина может содержать менее 2-х мас.% С-ПС.

В заявляемой вакцине примесь белков и нуклеиновых кислот составляет менее 2 мас.%.

Комбинация КПС пневмококковых серотипов в заявляемой вакцине является апирогенной в дозе до 57,5 мкг/кг веса в тесте пирогенности на кроликах (Пример 3Е).

В результате проведенных доклинических исследований острой токсичности на белых аутбредных мышах и кроликах установлено, что при однократном внутримышечном и подкожном введении человеческой дозы (575 мкг в 0,5 мл раствора) отсутствует токсическое действие заявляемой вакцины (Пример 3D). Результаты изучения субхронической токсичности на белых аутбредных крысах и кроликах показали, что внутримышечное и подкожное введение заявляемой вакцины в однократной человеческой (ЧД) и превышающей человеческую в 2 раза дозах, не вызывало нарушений функционального состояния основных органов и систем организма (Пример 3D). При этом заявляемая вакцина не оказывала местнораздражающего действия и не обладала алергизирующими свойствами (анафилактической активностью и реакцией гиперчувствительности замедленного типа) (Пример 3D).

Заявляемая вакцина может содержать фармацевтически приемлемые добавки, в качестве которых могут быть использованы стабилизаторы pH, консерванты, адъюванты, изотонирующие агенты и их комбинации. Предпочтительно заявляемая вакцина содержит фенол в качестве консерванта (Пример 3А). Кроме того, вакцина может включать пневмококковые полисахариды как в неконъюгированной, так и в конъюгированной форме (Примеры 3,4). При этом вакцина, включающая конъюгированную форму КПС пневмококковых серотипов, дополнительно содержит белковый носитель или липидосодержащий носитель (Примеры 4А, 4Е).

Предпочтительно в качестве белкового носителя используется рекомбинантный белок CRM197, в качестве липидосодержащего носителя – дериваты триацильного липида А (содержащего три остатка высших жирных кислот): триацильный липополисахарид (содержащий три остатка высших жирных кислот) (ЕА 031879) или триацильный липоолигосахарид (содержащий три остатка высших жирных кислот) эндотоксичных бактерий рода *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Bordetella*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Klebsiella*, *Chlamydia*, *Corynebacterium* или их комбинаций (Примеры 4А, 4Е).

В патенте ЕА 031879 авторами показана возможность использования триацильных S-LPS эндотоксичных бактерий в качестве иммуностимулирующих носителей для производства вакцины против бактериальных, вирусных или иных инфекций.

Эффективная доза конъюгированной вакцины, в силу адъювантных и/или стимулирующих свойств белкового носителя или липидосодержащего носителя, существенно меньше таковой неконъюгированной вакцины и составляет от 92 до 96 мкг в 0.5 мл раствора (Примеры 4В, 4F).

Комбинация КПС пневмококковых серотипов в заявляемой конъюгированной вакцине является апирогенной в дозе, составляющей 1/10 от эффективной дозы введения до 9,2 мкг/мл на кг веса с белковым носителем и до 9,6 мкг/мл на кг веса с липидосодержащим носителем, в тесте пирогенности на кроликах (Пример 4Н).

Как неконъюгированная, так и конъюгированная заявляемая 23-валентная пневмококковая вакцина имеет лекарственную форму в виде стерильного раствора для инъекций или аэрозоля, спрея, капель, ингаляций для подкожного, внутримышечного, интраназального или ингаляционного введения, или таблеток, капсул, пеллет для энтерального введения (Примеры 3А, 3В, 4В, 4F).

Впервые сформирован новый оригинальный серотиповый состав комбинации КПС эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов, включающей 14 серотипов бактерии *S. pneumoniae*: 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 11А, 14, 15F, 18С, 19А, 19F, 23А, 23F.

Заявляемая 14-компонентная комбинация является вариантом 23-компонентной с редуцированным составом полисахаридов, в которой присутствует новое сочетание трёх КПС эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов - 6А, 15F и 23А и которая обнаруживает аналогичные технические результаты. Новый серотиповый состав заявляемой комбинации обеспечивает охват до 64,6% серотипов, циркулирующих в Евразийском регионе (Пример 1).

В некоторых предпочтительных случаях воплощения и использования заявляемая 14-компонентная комбинация может дополнительно включать по меньшей мере один капсульный полисахарид бактерии *S. pneumoniae*, выбранный из группы, состоящей из полисахаридов серотипов 1, 8, 9N, 9V, 10А, 12F, 15В, 22F и 33F, где указанная комбинация представляет собой 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23-компонентную комбинацию пневмококковых капсульных полисахаридов бактерии *S. pneumoniae*.

Заявляемая 14-компонентная комбинация КПС обнаруживает неожиданные для специалиста иммунобиологические свойства, обусловленные межмолекулярными антигенными взаимодействиями нового сочетания трёх КПС эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов 6А, 15F и 23А с остальными одиннадцатью КПС серотипов (3, 4, 5, 6В, 7F, 11А, 14, 18С, 19А, 19F, 23F).

Обнаружилось, что в заявляемой комбинации новое сочетание КПС эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов 6А, 15F и 23А оказывает выраженное иммуностимулирующее действие на остальные одиннадцать КПС комбинации серотипов (3, 4, 5, 6В, 7F, 11А, 14, 18С, 19А, 19F, 23F) (Пример 2Е).

Кроме того, в заявляемой комбинации отсутствуют реакции интерференции антигенов (межмолекулярная антигенная конкуренция полисахаридов) (Пример 2F).

При этом заявляемая комбинация пневмококковых КПС демонстрирует высокую степень безопасности, являясь апиrogenной для кролика в дозе до 35 мкг/мл на кг веса в тесте пирогенности на кроликах (Пример 2G).

На основе заявляемой комбинации КПС разработана 14-валентная вакцина для профилактики и/или лечения инфекционных заболеваний, таких, как пневмония, безочаговая бактериемия и менингит, вызываемых бактерией *S. pneumoniae*.

Заявляемая вакцина включает профилактически и/или терапевтически эффективное количество 14-компонентной комбинации КПС эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов.

В некоторых предпочтительных случаях воплощения и использования заявляемая 14-валентная вакцина может дополнительно включать по меньшей мере один капсульный полисахарид бактерии *S. pneumoniae*, выбранный из группы, состоящей из полисахаридов серотипов 1, 8, 9N, 9V, 10A, 12F, 15B, 22F и 33F, где указанная вакцина представляет собой 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23-валентную вакцину.

При этом эффективной дозой неконъюгированной вакцины является доза 350 мкг в 0.5 мл раствора (Пример 3A).

Очевидно, что иммунобиологические свойства заявляемой 14-валентной вакцины детерминированы соответствующей заявляемой комбинацией пневмококковых КПС.

Заявляемая вакцина вызывает защиту от бактерии *S. pneumoniae* путём индукции гуморального иммунного ответа у млекопитающих с образованием серотип-специфических IgG и IgM (Пример 2E).

Заявляемая вакцина стимулирует у иммунизированных млекопитающих высокую протективную активность иммунных сывороток вследствие усиления их опсонофагоцитирующей реакции в отношении нового сочетания КПС эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов 6A, 15F и 23A. Предпочтительно заявляемая вакцина не содержит примеси С-ПС, однако в отдельных случаях воплощения изобретения вакцина может содержать менее 2 мас.% С-ПС.

В заявляемой вакцине примесь белков и нуклеиновых кислот составляет менее 2 мас.%.

Комбинация пневмококковых КПС в заявляемой вакцине является апиrogenной для кролика в дозе до 35 мкг/мл на кг веса в тесте пирогенности на кроликах (Пример 3E).

Заявляемая вакцина может содержать фармацевтически приемлемые добавки, в качестве которых могут быть использованы стабилизаторы pH, консерванты, адъюванты, изотонирующие агенты и их комбинации. Предпочтительно заявляемая вакцина содержит фенол в качестве консерванта (Пример 3A).

Кроме того, вакцина может включать пневмококковые полисахариды как в неконъюгированной, так и в конъюгированной форме (Примеры 3, 4).

При этом вакцина, включающая конъюгированную форму пневмококковых КПС, дополнительно содержит белковый носитель или липидосодержащий носитель (Примеры 4А, 4Е). Предпочтительно в качестве белкового носителя используется рекомбинантный белок CRM197, в качестве липидосодержащего носителя – дериваты триацильного липида А (содержащего три остатка высших жирных кислот): триацильный липополисахарид (содержащий три остатка высших жирных кислот) (ЕА 031879) или триацильный липоолигосахарид (содержащий три остатка высших жирных кислот) эндотоксичных бактерий рода *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Bordetella*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Klebsiella*, *Chlamydia*, *Corynebacterium* или их комбинаций (Примеры 4А, 4Е).

Эффективная доза заявляемой конъюгированной вакцины, в силу адьювантных и/или стимулирующих свойств белкового носителя или липидосодержащего носителя, существенно меньше таковой неконъюгированной вакцины и составляет от 56 до 78 мкг в 0,5 мл раствора (Примеры 4В, 4F).

Комбинация КПС пневмококковых серотипов в заявляемой конъюгированной вакцине является апиrogenной в дозе, составляющей 1/10 от эффективной дозы введения до 5,6 мкг/мл на кг веса с белковым носителем и до 7,8 мкг/мл на кг веса с липидосодержащим носителем, в тесте пирогенности на кроликах (Пример 4Н).

Установлена неочевидная для специалиста возможность снижения содержания белкового носителя в составе данной конъюгированной вакцины без пропорционального снижения её иммуногенности, обусловленная, по-видимому, особыми межмолекулярными взаимодействиями полисахарид-белковых конъюгатов в композиции препарата, включающего, в том числе, конъюгаты на основе нового сочетания КПС эпидемически значимых для Евразийского региона серотипов 6А, 15F и 23А (Пример 4D).

Следует отметить, что т.н. "перегрузка", или *overdosing*, вакцинированных пациентов белковым носителем, является хорошо известной проблемой поливалентных конъюгированных вакцин, мишенью для критики препаратов этого класса и, соответственно, ограничением в их применении.

При этом данная проблема представляется особенно важной не только при вакцинации новорожденных, но и при вакцинации аллергиков, иммунокомпроментированных, а также часто болеющих респираторными инфекциями лиц.

Снижение белковой нагрузки для поливалентных конъюгированных пневмококковых вакцин весьма актуально в связи с неизбежным ростом числа валентностей препаратов для лучшего серологического охвата заболеваемости. В этой связи способность заявляемой вакцины, включающей конъюгированные КПС евразийских серотипов, проявлять повышенную иммуногенность при снижении содержания белкового носителя, представляет оригинальный и эффективный подход к решению проблемы белковой перегрузки.

Как неконъюгированная, так и конъюгированная заявляемая 14-валентная вакцина имеет лекарственную форму в виде стерильного раствора для инъекций

или аэрозоля, спрея, капель, ингаляций для подкожного, внутримышечного, интраназального или ингаляционного введения, или таблеток, капсул, пеллет для энтерального введения.

Применение 14-валентных как неконъюгированных, так и конъюгированных вакцин может быть актуальным на территориях с неблагоприятной динамикой заболеваемости данными конкретными серовариантами пневмококковой инфекции. Кроме того, 14-валентные вакцины обладают сниженной антигенной нагрузкой по сравнению с 23-валентными, а потому могут быть рекомендованы для вакцинации иммунокомпроментированных и ослабленных пациентов. Технологические характеристики 14-валентных вакцин (продолжительность производственного цикла, затраты на материалы) и, соответственно, стоимость вакцин также могут быть в 1,5-2 раза ниже по сравнению с 23-валентными препаратами.

Следует отметить, что для получения комбинаций КПС пневмококковых серотипов с целью их использования в заявляемых вакцинах как в неконъюгированной, так и конъюгированной форме, предпочтительно применять заявляемый способ их получения, позволяющий получать высокоочищенный, без примеси С-ПС, целевой продукт с неизменной первичной структурой молекулы и неальтерированными антигенными детерминантами (Примеры 2А, 2С, 2D).

Разработан способ получения высокоочищенного капсульного полисахарида бактерии *S. pneumoniae*, предусматривающий следующие стадии:

- (i) получение культуры бактерий в жидкой фазе;
- (ii) отделение жидкой фазы от бактериальных клеток;
- (iii) удаление из жидкой фазы бактериальных белков и нуклеиновых кислот с получением раствора капсульного полисахарида;
- (iv) осуществление катионообменной хроматографии раствора капсульного полисахарида с получением раствора целевого продукта.

При этом полученный заявляемым способом раствор целевого продукта в буфере может быть непосредственно использован для производства фармацевтического средства для профилактики или лечения заболеваний, вызываемых бактерией *S. pneumoniae*, в такой лекарственной форме, как аэрозоль, спрей, капли, ингаляции, предназначенной для подкожного, внутримышечного, интраназального, ингаляционного и т.п. способов введения (Пример 3В), (NZ 514089 А).

Кроме того, раствор целевого продукта может быть использован и для производства жидкой финальной формы заявляемых неконъюгированных пневмококковых вакцин. С этой целью целевой продукт получают в фосфатно-буферном физиологическом растворе с заданной концентрацией КПС с консервантом или без него при значениях рН в интервале 6.0-8.0, а затем осуществляют его стерильную фильтрацию с получением жидкой финальной формы заявляемой неконъюгированной вакцины.

Для получения сухого целевого продукта заявляемый способ может дополнительно включать диафильтрацию раствора целевого продукта с

последующей лиофилизацией полученного концентрата.

Полученный заявляемым способом сухой целевой продукт может быть использован как для длительного хранения и транспортировки активных фармацевтических субстанций (высокоочищенных КПС), так и непосредственно для производства фармацевтического средства для профилактики или лечения заболеваний, вызываемых бактерией *S. pneumoniae*, в стерильной жидкой лекарственной форме для инъекций или твердой лекарственной форме для энтерального введения (Пример 3А).

Следует отметить, что отделение жидкой фазы от бактериальных клеток можно осуществлять любым известным методом, однако предпочтительно использовать метод тангенциальной микрофльтрации на мембране с пределом отсечки 0,22 мкм с получением фильтрата жидкой фазы.

Последующее удаление из жидкой фазы бактериальных белков и нуклеиновых кислот можно осуществлять также любым известным методом непосредственно из полученного фильтрата жидкой фазы, однако целесообразно удалять указанные примеси после концентрирования полученного фильтрата жидкой фазы с последующей диафльтрацией полученного концентрата 0,2 М раствором хлорида натрия. При этом концентрирование полученного фильтрата жидкой фазы предпочтительно осуществлять методом ультрафльтрации на мембране с пределом отсечки 100 кДа в тангенциальном режиме.

Процедуру удаления из жидкой фазы бактериальных белков и нуклеиновых кислот целесообразно проводить после ферментативной или кислотной обработки подвергнутого диафльтрации концентрата жидкой фазы.

Предпочтительно ферментативную обработку жидкой фазы осуществляют нуклеазами и протеазами. При этом удаление из жидкой фазы гидролизованных бактериальных белков и нуклеиновых кислот можно осуществлять методом тангенциальной ультрафльтрации в границах отсечки 100 кДа с получением концентрированного раствора капсульного полисахарида, который подвергают катионообменной хроматографии с получением раствора целевого продукта. В заявляемом способе для осуществления процедуры катионообменной хроматографии можно использовать любое релевантное оборудование. В качестве препаративной катионообменной хроматографии предпочтительно использовать колоночную хроматографию. При этом целесообразно использовать жидкостную колоночную хроматографию, а именно колоночную хроматографию низкого давления с детектированием продукта.

В качестве сорбента для катионообменной хроматографии предпочтительно использовать гелевые или макропористые катионообменные смолы на основе целлюлозы, сефадексов, сефароз, сефакрилов и TSK-геля.

Заявляемый способ позволяет получать КПС бактерии *S. pneumoniae*, выбранный из группы, включающей серотипы 3, 4, 5, 6А, 6В, 8, 9N, 9V, 10А, 11, 12F, 15F, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А и 23F, с экспериментально подтвержденными неизменной первичной структурой молекулы и неальтерированными антигенными детерминантами (Примеры 2А, 2С, 2D).

Кроме того, заявляемый способ обеспечивает получение целевого продукта без

примеси С-ПС или с содержанием С-ПС менее 2 мас.% (Пример 2А). При этом содержание белков и нуклеиновых кислот в целевом продукте составляет менее 2 мас.%. (Пример 2А).

Из вышеизложенного следует, что отличительным признаком заявляемого способа является использование в технологической схеме производства целевого продукта катионообменной хроматографии, позволяющей, в отличие от известных способов, полностью избавиться от примеси С-ПС.

Дело в том, что катионообменный сорбент, удерживая С-ПС, не взаимодействует с КПС, в то время как в известных способах используется анионообменная хроматография, при которой анионообменный сорбент, удерживая КПС, в свою очередь не взаимодействует с С-ПС. Таким образом, замена анионообменной хроматографии на катионообменную в технологической схеме производства целевого продукта неожиданно для специалиста приводит к достижению неочевидного технического результата – возможности получения целевого продукта без примеси С-ПС.

Кроме того, заявляемый способ позволяет увеличить выход целевого продукта до 85% с чистотой целевого продукта до 98 мас.% (Пример 2А).

Более того, физико-химические и иммунологические исследования, и прежде всего ЯМР- спектроскопия полученного заявляемым способом целевого продукта, подтверждают наличие у него неизменной первичной структуры молекулы и неальтерированных антигенных детерминант (Примеры 2С, 2D), что является особенно ценным свойством КПС при его использовании в составе неконъюгированных вакцин. По-видимому, данный технический результат является следствием использования в технологической схеме производства целевого продукта исключительно щадящих режимов, в частности, катионообменной хроматографии, не оказывающей негативного воздействия на пространственную структуру молекулы КПС.

Также известно, что анионообменники существенно менее стабильны, чем катионообменники и, кроме того, для регенерации требуют значительно большего перечня и количества реагентов, поэтому заявляемый способ в сравнении с известными обеспечивает также снижение себестоимости целевого продукта за счёт сокращения количества используемых реагентов и модернизации технологической схемы производства, что, в свою очередь, приводит к повышению его экономичности и экологичности.

Что касается КПС серотипов 1, 7F, 14 и 33F, входящих в состав заявляемых комбинаций, то, вследствие особенностей химического строения, их получают иными способами (Пример 2В).

Для получения пневмококковых КПС в конъюгированной форме для производства конъюгированных вакцин осуществляют процесс конъюгации полученных высокоочищенных КПС с белковым носителем или липидосодержащим носителем согласно известным способам (Примеры 4А, 4Е). Заявлено также применение 23- и 14-компонентной комбинации пневмококковых КПС серотипов бактерии *S. pneumoniae* для производства фармацевтического средства, предназначенного для профилактики или лечения

заболеваний, вызываемых данной бактерией (Примеры 3А, 3В, 4В, 4F). При этом таким заболеванием может являться пневмония, пневмококковый менингит, средний отит, бактериемия, сепсис или их комбинация. Предпочтительно фармацевтическое средство представляет собой стерильный раствор для инъекций или аэрозоль, спрей, капли, ингаляции для подкожного, внутримышечного, интраназального или ингаляционного введения, или таблетки, капсулы, пеллеты для энтерального введения.

В некоторых предпочтительных случаях заявляемого применения 14-компонентной комбинации пневмококковых КПС, данная комбинация может дополнительно включать по меньшей мере один капсульный полисахарид, выбранный из группы, состоящей из полисахаридов серотипов 1, 8, 9N, 9V, 10A, 12F, 15B, 22F и 33F, где указанная комбинация представляет собой 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23-компонентную комбинацию пневмококковых капсульных полисахаридов бактерии *S.pneumoniae*.

Краткое описание чертежей

Изобретение иллюстрируется следующими фигурами.

На Фиг. 1 представлены диаграммы распределения серотипов пневмококков в Евразийском регионе, выделенных от пациентов с острыми недифференцированными инфекциями дыхательных путей, отитом, пневмонией и менингитом, в 2016, 2017 и 2018 гг.

При этом на оси абсцисс указаны серотипы пневмококков, а на оси ординат – распространённость пневмококковых инфекций, в %.

На Фиг.2 представлена препаративная хроматограмма КПС серотипа Pn6B, выполненная на геле Fractogel EMD COO⁻ (Millipore) в 0,2 М NaCl с детектированием продукта на рефрактометре фирмы KNAUER.

При этом на оси абсцисс указано время элюции в минутах, на оси ординат – интенсивность сигнала, в mV.

На Фиг.3 (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V и W) представлены ¹H-ЯМР-спектры полученных КПС пневмококков 23-х серотипов бактерии *S. pneumoniae*.

При этом на Фиг. 3А представлен спектр КПС серотипа 1; на Фиг. 3В – серотипа 3; на Фиг. 3С – серотипа 4; на Фиг. 3D – серотипа 5; на Фиг. 3Е – серотипа 6А; на Фиг. 3F - серотипа 6В; на Фиг. 3G- серотипа 7F; на Фиг. 3H - серотипа 8; на Фиг. 3I - серотипа 9N; на Фиг.3J - серотипа 9V; на Фиг. 3K - серотипа 10А; на Фиг. 3L - серотипа 11А; на Фиг. 3M - серотипа 12F; на Фиг. 3N - серотипа 14; на Фиг. 3O - серотипа 15B; на Фиг. 3P - серотипа 15F; на Фиг. 3Q - серотипа 18С ; на Фиг. 3R - серотипа 19А; на Фиг. 3S - серотипа 19F; на Фиг. 3Т - серотипа 22F; на Фиг. 3U - серотипа 23А; на Фиг. 3V - серотипа 23F; на Фиг. 3W- серотипа 33F, соответственно.

На Фиг. 4 (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V и W) представлены графики реакции прямого торможения твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) заявляемой 23-компонентной комбинации и 23-х стандартных образцов, каждый из которых содержит один из её 23-х компонентов в той же концентрации, что и заявляемая комбинация, с

соответствующими антителами международных пневмококковых серотип-специфических референс-сывороток Датского государственного сывороточного института (Diagnostica SSI).

При этом на оси абсцисс указано разведение соответствующего образца, а на оси ординат – его оптическая плотность. Сплошная линия представляет собой график изменения оптической плотности, в зависимости от разведения образца заявляемой 23-компонентной комбинации. Пунктирная линия представляет собой график изменения оптической плотности, в зависимости от разведения стандартного образца.

На Фиг. 4А представлен график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 1, с референс-сывороткой против серотипа 1 (SSI Diagnostica, кат. № 16744, лот N111E1); на Фиг. 4В - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 3, с референс-сывороткой против серотипа 3 (SSI Diagnostica, кат. № 16746, лот X311A1); на Фиг. 4С - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 4, с референс-сывороткой против серотипа 4 (SSI Diagnostica, кат. № 16747, лот G4112L10); на Фиг. 4D - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 5, с референс-сывороткой против серотипа 5 (SSI Diagnostica, кат. № 16748, лот M514A1); на Фиг. 4Е - с референс-сывороткой против серотипа 6А (SSI Diagnostica, кат. № 16923, лот S6b12A1); на Фиг. 4F - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 6В, с референс-сывороткой против серотипа 6В (SSI Diagnostica, кат. № 16924, лот V6c11C1); на Фиг. 4G - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 7F, с референс-сывороткой против серотипа 7F (SSI Diagnostica, кат. № 16925, лот F7b11A2); на Фиг. 4H - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 8, с референс-сывороткой против серотипа 8 (SSI Diagnostica, кат. № 16751, лот H811A2); на Фиг. 4I - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 9N, с референс-сывороткой против серотипа 9N (SSI Diagnostica, кат. № 16936, лот S9e11K1); на Фиг. 4J - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 9V, с референс-сывороткой против серотипа 9V (SSI Diagnostica, кат. № 16937, лот N9g22B1); на Фиг. 4K - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 10А, с референс-сывороткой против серотипа 10А (SSI Diagnostica, кат. № 16940, лот T10d11A1); на Фиг. 4L - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего

КПС серотипа 11А, с референс-сывороткой против серотипа 11А (SSI Diagnostica, кат. № 16944, лот N11c13A10); на Фиг. 4М - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 12F, с референс-сывороткой против серотипа 12F (SSI Diagnostica, кат. № 16947, лот Q12b11H1); на Фиг. 4N - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 14, с референс-сывороткой против серотипа 14 (SSI Diagnostica, кат. № 16753, лот G1412L8); на Фиг. 4О - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 15В, с референс-сывороткой против серотипа 15В (SSI Diagnostica, кат. № 16953, лот X15h11B1); на Фиг. 4Р - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 15F, с референс-сывороткой против серотипа 15F (SSI Diagnostica, кат. № 16751, лот T15c11B1); на Фиг. 4Q - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 18С, с референс-сывороткой против серотипа 18С (SSI Diagnostica, кат. № 16960, лот M18e11C1); на Фиг. 4R - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 19А, с референс-сывороткой против серотипа 19А (SSI Diagnostica, кат. № 16963, лот T19c31A2); на Фиг. 4S - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 19F, с референс-сывороткой против серотипа 19F (SSI Diagnostica, кат. №16962, лот T19b22A1); на Фиг. 4Т - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 22F, с референс-сывороткой против серотипа 22F (SSI Diagnostica, кат. №16966, лот X22b11A1); на Фиг. 4U - с референс-сывороткой против серотипа 23А (SSI Diagnostica, кат. №16969, лот H23c12E1); на Фиг. 4V - график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 23F, с референс-сывороткой против серотипа 23F (SSI Diagnostica, кат. № 16968, лот X23b11B1); на Фиг. 4W- график реакции прямого торможения ТИФА заявляемой 23-компонентной комбинации и стандартного образца, содержащего КПС серотипа 33F, с референс-сывороткой против серотипа 33F (SSI Diagnostica, кат. №16981, лот P33b12B1), соответственно.

На Фиг. 5 представлены диаграммы опсонофагоцитарной активности сывороток мышей, иммунизированных заявляемой 23-валентной ППВ и известной вакциной PNEUMOVAX 23, в реакции с пневмококками серотипов 6А, 15F и 23А бактерии *S. pneumoniae*.

При этом на оси абсцисс указана опсонофагоцитарная активность (в % убитых клеток бактерии *S. pneumoniae*), а на оси ординат указаны серотипы бактерии *S. pneumoniae*.

На Фиг. 6 представлены диаграммы опсонофагоцитарной активности сывороток мышей, иммунизированных заявляемой 23-валентной ППВ и известной вакциной PNEUMOVAX 23, в реакции с пневмококками серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F бактерии *S. pneumoniae*.

При этом на оси абсцисс указана опсонофагоцитарная активность (в % убитых клеток бактерии *S. pneumoniae*), а на оси ординат указаны серотипы бактерии *S. pneumoniae*.

Лучшие варианты осуществления изобретений

Пример 1

Обоснование эпидемически значимого для Евразийского региона серотипового состава заявляемой 23-компонентной пневмококковой комбинации КПС, содержащейся в заявляемых 23-валентных пневмококковых вакцинах.

Следует отметить, что для задач заявляемых изобретений термин «Евразийский регион» обозначает прежде всего территорию Российской Федерации и территорию Республики Беларусь, а также территории стран, входящих в состав ЕАЭС.

В настоящее время на мировом фармацевтическом рынке присутствуют известные 23-валентная неконъюгированная пневмококковая полисахаридная вакцина (ППВ), а также 10- и 13-валентные пневмококковые конъюгированные вакцины (ПКВ). Завершается разработка 15- и 20-валентных ПКВ, при этом количество установленных вариантов (серотипов) пневмококков приближается к 100. Все вышеперечисленные вакцины конструировались на основании данных о серотиповом составе пневмококков, циркулирующих в Северной Америке и Западной Европе, и их серотиповой состав приведен в табл. 1.

Однако эффективность применения приведенного в табл.1 серотипового состава известных вакцин на обширной территории Евразийского региона не очевидна, поскольку является предметом специального анализа, основанного как на эпидемиологических, так и иммунобиологических данных.

Таблица 1

Серотиповой состав комбинаций КПС, содержащихся в известных и разрабатываемых ППВ и ПКВ

Известные вакцины			Разрабатываемые вакцины		
ПКВ-10	ПКВ-13	23-валентная ППВ (PNEUMOVAX 23)	ПКВ-15	ПКВ-20	Заявляемые 23-валентные ППВ и ПКВ
4	4	4	4	4	4
6B	6B	6B	6B	6B	6B
9V	9V	9V	9V	9V	9V

14	14	14	14	14	14
18C	18C	18C	18C	18C	18C
19F	19F	19F	19F	19F	19F
23F	23F	23F	23F	23F	23F
1	1	1	1	1	1
5	5	5	5	5	5
7F	7F	7F	7F	7F	7F
-	3	3	3	3	3
-	6A	-	6A	6A	6A
-	19A	19A	19A	19A	19A
-	-	2	-	-	-
-	-	8	-	8	8
-	-	9N	-	-	9N
-	-	10A	-	10A	10A
-	-	11A	-	11A	11A
-	-	12F	-	12F	12F
-	-	-	-	-	15F
-	-	15B	-	15B	15B
-	-	17F	-	-	-
-	-	20	-	-	-
-	-	22F	22F	22F	22F
-	-	-	-	-	23A
-	-	33F	33F	33F	33F

К настоящему времени достигнут значительный прогресс в понимании биологии пневмококков и динамики серотиповой структуры популяции микроорганизмов. Массовая вакцинация известными ППВ и ПКВ обеспечили существенное снижение как инвазивных, так и мукозальных форм пневмококковых инфекций, прежде всего за счет снижения частоты инфекций, вызываемых штаммами «вакцинных» серотипов (К.А. Poehling, B.J. Lafleur, P.G. Szilagyi et al.

«Population-based impact of pneumococcal conjugate vaccine in young children». *Journal of Pediatrics*, 2004, vol.114, pp.755-761; K.A. Poehling, P.G. Szilagyi, C.G. Grijalva et al. «Reduction of frequent otitis media and pressure-equalizing tube insertions in children after introduction of pneumococcal conjugate vaccine». *Journal of Pediatrics*, 2007, vol.119, pp.707-715; C.G. Grijalva, J.P. Nuorti, P.G. Arbogast et al. «Decline in pneumonia admissions after routine childhood immunisation with pneumococcal conjugate vaccine in the USA: a time-series analysis». *The Lancet*, vol.369, pp.1179-1186). При этом оказалось, что массовая вакцинация оказывает мощное воздействие на серотиповой состав пневмококковых популяций. Этот эффект проявляется в элиминации из циркуляции серотипов пневмококков, входящих в состав вакцин. Параллельно происходят процессы замещения и переключения серотипов. Под замещением понимают широкое распространение в регионе серотипов, выявлявшихся до вакцинации с низкой частотой. Под переключением понимают приобретение генетической линией пневмококков нового, не характерного для нее серотипа. Наиболее важные изменения серотипового состава пневмококковых популяций в различных регионах мира наблюдаются в течение последних 5 – 10 лет, что связано с расширением охвата анти-пневмококковой вакцинацией различных групп населения. Учет этих изменений принципиально необходим для рационального обоснования серотипового состава вакцин в различных географических регионах.

Так, по данным опубликованного в 2017 г. мета-анализа, к 2015 г. благодаря вакцинации распространенность инвазивных пневмококковых инфекций на глобальном уровне снизилась в США на 80%, а в Западной Европе на 30% - 40%. При этом «вакцинные» серотипы полностью не исчезли из циркуляции. Из «невакцинных» наиболее распространёнными среди детей до 7 лет были серотипы 15B, 22F, 15F, 23A; среди взрослых старше 62 лет - 22F, 11A, 10A, 38 (Y.A. Cui, H. Patel, W.M. O'Neil et al. «Pneumococcal serotype distribution: A snapshot of recent data in pediatric and adult populations around the world». *Hum. Vaccin Immunother*, 2017, vol.13, pp.1-13). Однако результаты исследований, проведенных в отдельных странах, существенно отличались. Так, в Великобритании в 2015/ 2016 гг. «вакцинные» серотипы вызывали 10,8% инвазивных инфекций, а среди «невакцинных» самыми распространенными возбудителями были серотипы 12F, 10A, 23B, 33F, 15B/C и 8 (A. Makwana, C. Sheppard, R. Borrow et al. «Characteristics of Children With Invasive Pneumococcal Disease After the Introduction of the 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in England and Wales, 2010-2016». *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2018, vol.37, pp.697-703). Однако уже в 2016 / 2017 гг. среди взрослых был отмечен рост частоты инвазивных инфекций, 40% из которых были вызваны серотипами 8, 12F, и 9N (S.N. Ladhani, S. Collins, A. Djennad et al. «Rapid increase in non-vaccine serotypes causing invasive pneumococcal disease in England and Wales, 2000–17: a prospective national observational cohort study». *The Lancet Infect. Dis.*, 2018, vol.18, pp.441-451). При этом в США такой динамики серотипового состава и роста инвазивных инфекций не было отмечено (T. Pilishvili, R. Gierke, M. Farley et al.

«Direct and Indirect Impact of 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV13) on Invasive Pneumococcal Disease (IPD) Among Children and Adults in the U.S.». *Open Forum Infect. Dis.*, 2017, vol.4, S66-S67. Объяснить столь выраженные различия в странах, сходных по уровню экономики, медицины и культурных традиций, не удастся, что подчеркивает важность эпидемиологических исследований для формирования серотипового состава вакцин против пневмококковых инфекций (Т. Pilishvili, С.Г. Whitney «Use of data to drive pneumococcal conjugate vaccine policy». *The Lancet Infect. Dis.*, 2018, vol.18, pp.366-368). Исследования из Великобритании также свидетельствуют о том, что для эффективной профилактики пневмоний у взрослых необходимо использовать вакцины с существенно бóльшим охватом серотипов, чем это позволяют 10- и 13-валентные конъюгированные вакцины (Н. Pick, Р. Daniel, С. Rodrigo et al. «Pneumococcal serotype trends, surveillance and risk factors in UK adult pneumonia». *Thorax.*, 2020, vol.75, pp.38-49).

Все вышеприведенные факты необходимо учитывать при конструировании полисахаридной вакцины для Евразийского региона. Определенная сложность эпидемиологического и иммунобиологического анализа связана с тем, что массивы релевантных данных создают сложную и порой противоречивую картину.

При обосновании серотипового состава заявляемой комбинации КПС, содержащейся в заявляемых 23-валентных ППВ и ПКВ, прежде всего, использовались самые последние данные за 2021 год. Были проанализированы 600 изолятов пневмококков, полученных от взрослых и детей Российской Федерации и Республики Беларусь, не имеющих клинических признаков бактериальной пневмонии. Определение серотиповой принадлежности выделенных изолятов пневмококков проводили методом мультиплексного ПЦР с использованием множественных пар праймеров (*Streptococcus Laboratory. Conventional PCR serotype deduction protocols. Centers for Disease Control and Prevention July 23, 2021. Available at: <https://www.cdc.gov/streplab/pneumococcus/resources.html>. Accessed : November 6, 2021*).

Процент серотипового охвата для каждого вакцинного препарата вычисляли, анализируя абсолютные данные для каждого определенного серотипа. Следует отметить, что несмотря на начало массовой анти-пневмококковой вакцинации детей 13-валентной ПКВ, среди пневмококков, циркулирующих на территории Евразийского региона, более 32,5% относятся к серотипам, включенным в вышеуказанную 13-валентную вакцину. Следовательно, включение в состав заявляемой комбинации КПС, содержащейся в заявляемых 23-валентных ППВ и ПКВ, полисахаридов всех 13 серотипов известной ПКВ (4, 6В, 9V, 14, 18С, 19F, 23F, 1, 5, 7F, 3, 6А и 19А) является принципиально необходимым. Таким образом, в состав заявляемой комбинации КПС, содержащейся в заявляемых 23-валентных ППВ и ПКВ, кроме КПС серотипа 6В, вводится КПС серотипа 6А, тонкие различия в иммуноспецифичности которых, в силу непонятных причин, не учитываются в зарубежных аналогах комбинации КПС, содержащейся в 23-валентных пневмококковых вакцинах.

Следует отметить, что в патенте US 4,686,102 (с датой приоритета более 40-летней давности) было предложено резервное включение КПС серотипа 6А в состав содержащейся в ППВ комбинации, которое так и не было реализовано при создании препарата зарубежной 23-валентной вакцины.

Представляется также особенно важным включение в состав содержащейся в заявляемых 23-валентных вакцинах заявляемой комбинации КПС пневмококковых полисахаридов серотипов 3 и 19А, отличающихся повышенной патогенностью и антибиотикорезистентностью, соответственно.

Кроме того, установлено, что серотипы 2, 17F и 20, входящие в состав комбинации КПС зарубежной 23-валентной пневмококковой вакцины (PNEUMOVAX 23), на территории Евразийского региона практически не встречаются, что доказывает нецелесообразность их включения в заявляемую 23-компонентную комбинацию пневмококковых КПС.

Международный опыт и проведенные наблюдения свидетельствуют о необходимости включения в состав заявляемой 23-компонентной комбинации пневмококковых КПС полисахаридов серотипов 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15В, 22F и 33F, поскольку пневмококки указанных серотипов проявляют тенденцию к распространению на фоне массового применения 13-ти валентной конъюгированной вакцины.

Существенным отличием заявляемой 23-компонентной комбинации пневмококковых КПС является её новый и оригинальный состав, включающий никогда не используемое ранее сочетание трех пневмококковых полисахаридов серотипов 15F, 23А и 6А и увеличивший серотиповой охват до 81,6%, т.е. почти на 20% по сравнению с серотиповым охватом известной комбинации PNEUMOVAX 23 (63,1%). При этом два компонента из указанного сочетания - полисахариды серотипов 15F и 23А отсутствуют в составе всех известных комбинаций пневмококковых КПС, содержащихся во внедренных и разрабатываемых ППВ и ПКВ.

Установлено, что серотиповый состав заявляемой 14-компонентной комбинации (варианта 23-компонентной комбинации) обеспечивает охват до 64,6% серотипов, циркулирующих в Евразийском регионе.

Включение в состав заявляемых комбинаций нового сочетания пневмококковых КПС серотипов 15F и 23А и 6А не является очевидным техническим решением, а представляет собой оригинальную разработку, основанную на глубоком изучении международного опыта профилактики пневмококковых инфекций, а также многолетнем анализе коллективом авторов популяционной структуры пневмококков, циркулирующих на территории Евразийского региона, и на анализе угроз распространения пневмоний и их предотвращения. Указанные серотипы проявляют устойчивую тенденцию к распространению на территории Евразийского региона (Фиг.1), которая в последние годы только усилилась, но встречается, хотя существенно реже, в других географических регионах.

Проведенный анализ угроз распространения сочетания пневмококков серотипов 15F, 23А и 6А в Евразийском регионе свидетельствует от том, что эпидемиологический мониторинг, санитарно-гигиенические мероприятия не

могут быть признаны достаточными мерами контроля распространения этих бактерий, поэтому введение соответствующих антигенных компонентов в состав заявляемых пневмококковых комбинаций для производства заявляемых пневмококковых вакцин для иммунопрофилактики пневмококковых инфекций данных серотипов представляет собой своевременное, совершенно необходимое и обоснованное техническое решение задачи создания новых, высокоэффективных средств защиты населения от актуальных пневмококковых инфекций.

Пример 2

Получение, физико-химические и иммунологические характеристики компонентов заявляемых комбинаций КПС бактерии *S. pneumoniae*.

А. Получение высокоочищенных КПС бактерии *S. pneumoniae* серотипов 3, 4, 5, 6А, 6В, 8, 9N, 9V, 10А, 11, 12F, 15F, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23F.

Лиофильно высушенные штаммы *S. pneumoniae* серотипов 3, 4, 5, 6А, 6В, 8, 9N, 9V, 10А, 11, 12F, 15F, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23F, выделенные от больных пневмонией, высеивали из ампул с культурой на чашки Петри с агаром, содержащим 5 мас.% лошадиной крови. Рост пневмококков - факультативных анаэробных бактерий - происходил при температуре 36-37 °С и рН 7,2-7,6.

Для получения культуры бактерий в жидкой фазе в ферментер объемом 10 л, содержащий 8 л среды на основе соевого пептона, производили засев выросшей посевной культурой соответствующего штамма. Серотипирование культуры проводили с соответствующей сероспецифичной сывороткой (SSI, Дания).

Культивирование осуществляли при 37°С и постоянном перемешивании в атмосфере, содержащей СО₂, и поддержании рН в интервале значений 7,2-7,6. Культивирование прекращали после добавления фенола для инактивации культуры.

Жидкую фазу, полученную после отделения клеток бактерии *S. pneumoniae*, подвергали тангенциальной микрофильтрации с использованием мембранных модулей с пределом отсечки 0,22 мкм для удаления частиц клеточного материала. Полученный фильтрат концентрировали на мембране с пределом отсечки 100 кДа в тангенциальном режиме и далее концентрат подвергали диафильтрации 0,2 М раствором хлорида натрия.

На следующей стадии из жидкой фазы удаляли бактериальные белки и нуклеиновые кислоты – продукты естественного лизиса клеток в процессе культивирования. При этом обычно использовали ферментативную обработку (нуклеазами, а затем протеазами, предпочтительно протеиназой К). Для этой цели может также применяться обработка жидкой фазы, содержащей неочищенный КПС, кислотами. Расщепленные и осажденные белки и нуклеиновые кислоты отделяли от КПС путем тангенциальной ультрафильтрации раствора в границах отсечки 100 кДа с получением концентрированного раствора целевого продукта.

После удаления из жидкой фазы белков и нуклеиновых кислот получали раствор КПС, который подвергали катионообменной хроматографии для извлечения из него С-ПС с получением раствора целевого продукта. В качестве

носителя для хроматографии могут быть использованы различные катионообменные смолы и, лучше, гелевые катионообменные смолы. При этом используемые катионообменники могут являться сорбентами на основе целлюлозы, сефадексов, сефароз, сефакрилов, TSK-геля и т.п. с различным размером частиц.

В заявляемом способе в качестве препаративной катионообменной хроматографии можно использовать жидкостную хроматографию в сосудах (стеклянных колонках) любого диаметра с различными режимами элюции КПС с хроматографического геля. Например, препаративную катионообменную хроматографию КПС серотипа 6В проводили с использованием хроматографических колонок объемом до 2 литров, наполненных гелем Fractogel EMD COO⁻ (Millipore), водными 0,01 - 0,2 М буферами при скорости элюции от 1 до 10 мл/мин. Для детектирования использовали дифференциальный проточный рефрактометр фирмы KNAUER (Фиг.2). Фракции, содержащие раствор целевого продукта, объединяли.

Для получения сухого целевого продукта, раствор целевого продукта подвергали диафильтрации с водой с последующей лиофилизацией полученного концентрата.

Содержание С-ПС в целевом продукте каждого серотипа зависит от подобранных условий катионообменной хроматографии, а также от строения повторяющегося звена С-ПС, в котором может присутствовать 1 или 2 остатка холина. Во всех случаях при катионообменной хроматографии удается достичь той степени очистки КПС от С-ПС, при которой в спектре Н¹-ЯМР практически не наблюдается хорошо разрешенного сигнала Me₃N-группы холина при 3,2 м.д. или его интегральная интенсивность такова, что подсчитанная степень очистки КПС составляет не менее 98% (С. Jones, F. Currie «Control of components of bacterial polysaccharide vaccines by physical methods». Biologicals, 1991, vol.19, pp.41-47). Расчет, проведенный для каждого КПС (с учетом молекулярной массы повторяющегося звена КПС и С-ПС) показывает, что примесь С-ПС в КПС составляет 0 % для КПС серотипов 3, 6А, 9N, 12F, 15F, 18С, 19А, 23А, 23F и менее 2 мас.% для КПС серотипов 4, 5, 6В, 8, 9V, 10А, 11А, 15В, 19F, 22F, 23F (табл. 2). Так, примесь С-ПС в полученном образце КПС серотипа 6В составила 0,37 мас.%, серотипа 11А – 0,30 мас.% и т.п.

Таблица 2

Характеристики полученных заявляемым способом КПС бактерии *S. pneumoniae*

Серотип	Содержание С-ПС (мас.%)	k _d при аналитической ГПХ на Сефарозе 4В (PBS), pH 7.4	k _d при аналитической ГПХ на Сефарозе 2В (PBS), pH 7.4	k _d при аналитической ГПХ на TSK 65 (SF) (PBS), pH 7.4	Нуклеиновые кислоты (мас.%)	Белки (мас.%)
Pn 1*	0,00	0,15		0,58	0,11	0,38
Pn 3	0,00	0,14		0,33	0,07	0,96

Pn 4	0,73	0,14		0,52	0,22	0,99
Pn 5	1,78		0,55	0,60	0,02	0,21
Pn 6A	0,00		0,45	0,71	0,20	1,12
Pn 6B	0,37		0,35	0,49	0,02	1,13
Pn 7F*	0,00	0,16		0,24	0,02	0,95
Pn 8	1,05	0,15		0,21	0,23	1,60
Pn 9N	0,00	0,18		0,37	0,02	0,71
Pn 9V	1,05		0,40	0,33	0,08	0,93
Pn 10A	1,81		0,62	0,61	0,08	0,93
Pn 11A	0,30		0,40	0,49	0,15	0,40
Pn 12F	0,00	0,22		0,50	0,08	0,74
Pn 14*	1,05	0,28		0,30	0,04	0,87
Pn 15B	0,96		0,45	0,40	0,04	0,89
Pn 15F	0,00		0,55	0,51	0,05	0,99
Pn 18C	0,00	0,10		0,60	0,05	0,61
Pn 19A	0,00	0,43		0,60	0,24	1,04
Pn 19F	1,36	0,17		0,64	0,02	0,80
Pn 22F	1,14		0,51	0,40	0,13	0,40
Pn 23A	0,00	0,12		0,41	0,03	0,90
Pn 23F	0,00	0,15		0,60	0,15	0,85
Pn 33F*	1,44		0,45	0,27	0,14	0,34

*КПС указанных серотипов получены способами согласно Примеру 2В. Для определения молекулярно-массового распределения пневмококковых КПС, полученных как заявляемым способом, так и иными разработанными способами согласно Примеру 2В, применяли метод аналитической колоночной гель-проникающей хроматографии (ГПХ) с использованием гелей: Сефарозы 4В, Сефарозы 2В и TSK 65 (SF) (область деления: $1 \times 10^3 - 1000 \times 10^3$ Da), результаты которого в части установленных значений хроматографических коэффициентов распределения (K_d) приведены табл.2. Из представленных данных следует, что пневмококковые КПС элюируются вблизи фронта и, следовательно, их молекулярная масса определяется в интервале: $1 \times 10^3 - 1000 \times 10^3$ Da.

В. Получение высокоочищенных КПС бактерии *S. pneumoniae* серотипов 1, 7F, 14 и 33F.

В случае КПС серотипа 1, который, в отличие от остальных КПС, содержит в своем составе моносахарид со свободной (не N-ацелированной) аминогруппой, применение катионообменной хроматографии не представляется возможным, так как данный КПС в условиях данной хроматографии связывается с носителем наряду с С-ПС. Необходимая степень очистки от примеси С-ПС может быть достигнута на стадии удаления нуклеиновых кислот и белков, если ультрафильтрацию КПС серотипа 1 проводить 0,2 М раствором хлористого натрия, содержащего 0,01% дезоксихолата натрия, с последующей диалфильтрацией водой с получением раствора целевого продукта. Для

получения сухого целевого продукта, раствор целевого продукта подвергали диафильтрации с водой с последующей лиофилизацией полученного концентрата.

В случае КПС остальных серотипов использование этого подхода не приводит к желаемой степени очистки. Для нейтральных КПС пневмококков серотипов 7F, 14, 33F применима очистка известным методом анионообменной хроматографии, при которой сорбент, за счет своего положительного заряда, фиксирует отрицательно заряженную фосфатную группу С-полисахарида в матрице, а нейтральный КПС остается в растворе. Очистку КПС пневмококков серотипов 7F, 14, 33F после стадии удаления примесей белков и нуклеиновых кислот осуществляли с использованием анионообменной хроматографии на колонках со смолой DEAE-Sepharose с получением раствора целевого продукта. Для получения сухого целевого продукта, раствор целевого продукта подвергали диафильтрации с водой с последующей лиофилизацией полученного концентрата.

С. Структура полученных компонентов заявленных комбинаций КПС пневмококков бактерии *S. pneumoniae*.

Сравнительный анализ ¹H-ЯМР-спектров полученных согласно Примерам 2А и 2В высокоочищенных КПС пневмококков 23-х серотипов позволяет подтвердить вывод о том, что набор сигналов в спектре каждого КПС уникален. Это явление наблюдается даже для КПС, принадлежащих к одной серогруппе и имеющих очень близкие структуры (6А и 6В, 9N и 9V, 15В и 15F, 19А и 19F, 23А и 23F). Таким образом, ¹H-ЯМР-спектроскопический анализ позволяет однозначно идентифицировать каждый из компонентов заявляемых комбинаций по структуре, подтверждая тем самым его подлинность. Результаты ¹H-ЯМР-спектроскопии КПС всех серотипов заявляемых комбинаций представлены на Фиг. 3А – Фиг. 3W. Следует отметить, что ¹H-ЯМР спектры каждого КПС из нового сочетания серотипов - 6А, 15F и 23А совпадали с таковыми, опубликованными в литературе.

Д. Антигенная активность и неальтерированность антигенных детерминант компонентов заявленных комбинаций КПС бактерии *S. pneumoniae*.

Антигенную активность и неальтерированность (сохранность) антигенных детерминант полученных КПС пневмококков серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11, 12F, 14, 15В, 15F, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23F, 33F исследовали в реакциях торможения с международными пневмококковыми референс сыворотками производства Датского государственного сывороточного института (Diagnostica SSI).

Для оценки антигенной активности полученных КПС пневмококков проводились реакции прямого торможения твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА), позволяющие с наибольшей точностью оценить состояние антигенных детерминант КПС в жидком солевом растворе.

Одновременно определяли антигенную активность отдельно взятого стандартного КПС выбранного серотипа и его активность в составе заявляемой 23-компонентной комбинации. Результаты проведенных исследований

представлены на Фиг. 4А – Фиг. 4W.

Полученные данные свидетельствуют, что КПС пневмококков серотипов 3, 4, 5, 6А, 6В, 8, 9N, 9V, 10А, 11, 12F, 15В, 15F 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23F, полученные заявляемым способом согласно Примеру 2А, и КПС пневмококков серотипов 1, 7F, 14 и 33F, полученные иными разработанными способами согласно Примеру 2В, обладают высокой антигенной активностью в реакциях торможения ТИФА и эффективно истощают референс-сыворотки гомологичных серотипов. При этом высокая антигенная активность проявляется как единственным КПС исследуемого серотипа в водно-солевом растворе, так и КПС исследуемого серотипа в составе 23-компонентной комбинации (Фиг. 4А – Фиг. 4W).

Аналогичные данные были получены для КПС пневмококков серотипов 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 11А, 14, 15F, 18С, 19А, 19F, 23А, 23F заявляемой 14-компонентной комбинации.

Таким образом, антигенные детерминанты всех полученных компонентов заявляемых комбинаций КПС серологически активны и способны к связыванию гомологичных пневмококковых антител, что является следствием их неальтерированного (сохранного) состояния.

Е. Иммуногенность компонентов заявляемых комбинаций пневмококковых КПС бактерии *S. pneumoniae*.

В области изучения иммуногенности антигенных препаратов пневмококковых КПС общепризнанным является мнение, что чем выше уровень индуцируемого ими синтеза сероспецифичных антител, тем выше уровень защиты организма от данного конкретного серотипа *S. pneumoniae*. Таким образом, измерение уровней антител после введения антигенных препаратов является установленным в данной области методом оценки эффективности новых комбинаций пневмококковых КПС (Fedson, D. S. «Pneumococcal vaccine». In S. A. Plotkin and E. A. Mortimer (ed.) Vaccines. The W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1988, pp.217-299).

Для оценки иммуногенности компонентов заявляемой 23-компонентной комбинации, содержащей по 25 мкг пневмококковых КПС серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11, 12F, 14, 15В, 15F 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23F, 33F (575 мкг КПС суммарно) в стерильном фенол-фосфатном буфере, и заявляемой 14-компонентной комбинации, содержащей по 25 мкг пневмококковых КПС серотипов 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 11А, 14, 15F, 18С, 19А, 19F, 23А, 23F (350 мкг КПС суммарно) в стерильном фенол-фосфатном буфере, использовали лабораторных мышей линии (СВА×С57BL/6)F1 весом 18-20 г. С целью последующей иммунизации заявляемые комбинации и комбинацию сравнения, содержащуюся в известном препарате PNEUMOVAX 23, с идентичным содержанием эксципиентов, разводили в 25 раз в стерильном изотоническом растворе для получения тестовой дозы, содержащей по 1 мкг КПС каждого серотипа в 0,5 мл. Эту дозу для мышей определяли с использованием формулы, рекомендованной Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) (S. Reagan-

Shaw, M. Nihal, N.Ahmad «Dose translation from animal to human studies revisited». FASEB J., 2008, vol.22, pp.659-661), и она превышает эквивалентную для человека дозу в 10 раз, что является допустимым. Именно такая доза комбинации сравнения, содержащаяся в препарате PNEUMOVAX 23 (ПНЕВМО 23), используется во многих исследованиях на мышах (P. Dullforce, D.C. Sutton, A.W. Heath «Enhancement of T cell-independent immune responses in vivo by CD40 antibodies». Nat. Med., 1998, vol.4, No.1, pp.88-91; L. Moens, A. Jeurissen, S. Nierkens et al. «Generation of antibody responses to Pneumococcal capsular polysaccharides is independent of CD1 expression in mice». Infect. Immun., 2009, vol.77, No.5, pp. 1976-1980).

Исследуемые препараты вводили 10 мышам внутрибрюшинно (в/б) в объёме 0,5 мл. Кровь забирали через 7 дней после иммунизации. Уровень сывороточных сероспецифичных антител определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), предварительно сорбируя на 96-луночных планшетах (Greiner #762061) КПС (50 мкг/мл) каждого серотипа, входящего в исследуемую комбинацию. Результаты проведенных исследований представлены в табл. 3. Из табл. 3 следует, что заявляемая 23-компонентная комбинация содержит более иммуногенные компоненты КПС серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 33F по сравнению с таковыми, содержащимися в комбинации сравнения; заявляемая 14-компонентная комбинация содержит более иммуногенные компоненты КПС серотипов 3, 4, 5, 6В, 7F, 11А, 14, 18С, 19А, 19F, 23F по сравнению с таковыми, содержащимися в комбинации сравнения.

Введение в заявляемые комбинации нового сочетания КПС серотипов 6А, 15АF и 23А не подавляет иммунный ответ на остальные серотипы, т.е. не индуцирует межмолекулярную антигенную конкуренцию, а, напротив, стимулирует иммуногенность всех остальных, общих с комбинацией сравнения, серотипов пневмококков.

Таблица 3

Иммуногенность компонентов заявляемых комбинаций КПС и комбинации сравнения, содержащейся в препарате PNEUMOVAX 23

Серотип <i>S. pneumoniae</i>	Препарат/ кратность подъема титра антител иммунных сывороток					
	23-компонентная комбинация сравнения PNEUMOVAX 23		Заявляемая 23-компонентная комбинация		Заявляемая 14-компонентная комбинация	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
1	-	3 ± 0,3	2 ± 0,1	4 ± 0,25	НО	НО
3	-	2 ± 0,08	3 ± 0,2	3 ± 0,1	2 ± 0,1	3 ± 0,25
4	-	-	4 ± 0,2	4 ± 0,15	3 ± 0,3	4 ± 0,1
5	-	2 ±	-	3 ± 0,2	2 ± 0,1	4 ± 0,4

		0,15				
6A	НО	НО	$2 \pm 0,05$	$6 \pm 0,8$	$2 \pm 0,2$	$5 \pm 0,3$
6B	$2 \pm 0,1$	$2 \pm 0,1$	-	$2 \pm 0,05$	-	$2 \pm 0,1$
7F	-	$2 \pm 0,1$	-	$3 \pm 0,2$	-	$3 \pm 0,4$
8	$2 \pm 0,08$	$2 \pm 0,04$	$5 \pm 0,5$	8 ± 1	НО	НО
9N	-	$4 \pm 0,5$	$5 \pm 0,4$	$6 \pm 0,4$	НО	НО
9V	-	$2 \pm 0,15$	$5 \pm 0,2$	$6 \pm 0,4$	НО	НО
10A	-	$2 \pm 0,1$	$2 \pm 0,08$	$4 \pm 0,2$	НО	НО
11A	-	$2 \pm 0,1$	-	$4 \pm 0,15$	$2 \pm 0,15$	$4 \pm 0,2$
12F	-	$3 \pm 0,25$	-	$6 \pm 0,5$	НО	НО
14	-	$3 \pm 0,2$	$3 \pm 0,15$	$4 \pm 0,2$	$2 \pm 0,4$	$5 \pm 0,2$
15F	НО	НО	$6 \pm 0,4$	$6 \pm 0,4$	$4 \pm 0,25$	$6 \pm 0,3$
15B	-	$2 \pm 0,08$	$3 \pm 0,1$	$5 \pm 0,45$	НО	НО
18C	-	-	$2 \pm 0,1$	$6 \pm 0,5$	$2 \pm 0,2$	$5 \pm 0,1$
19A	-	$4 \pm 0,5$	-	$6 \pm 0,5$	-	$6 \pm 0,1$
19F	-	$2 \pm 0,1$	$3 \pm 0,15$	$8 \pm 0,8$	$2 \pm 0,2$	$8 \pm 0,5$
22F	-	-	$4 \pm 0,2$	$6 \pm 0,4$	НО	НО
23A	НО	НО	$5 \pm 0,4$	$6 \pm 0,25$	$4 \pm 0,3$	$6 \pm 0,2$
23F	-	$2 \pm 0,15$	$4 \pm 0,25$	$4 \pm 0,2$	$3 \pm 0,2$	$5 \pm 0,4$
33F	-	-	$8 \pm 1,2$	$8 \pm 0,85$	НО	НО

НО – не определяли

Г. Межмолекулярное антигенное взаимодействие компонентов заявляемых комбинаций пневмококковых КПС бактерии *S. pneumoniae*.

Исследование межмолекулярного взаимодействия антигенов в комплексных антигенных системах, включающих множественные компоненты, представляет собой особый вид анализа синергизма или подавления (интерференции) иммуногенности каждого из антигенных компонентов системы. Интерференция антигенов в поливалентных препаратах является феноменом, описанным для ряда антигенов, включая вакцинные, который может возникать и характеризоваться подавлением иммунного ответа на отдельные антигены (R. Dagan, J. Poolman, C.A. Siegrist «Glycoconjugate vaccines and immune interference:

a review». Vaccine, 2010, vol.28, pp.5513-5523).

Для исследования антигенного взаимодействия введённого в заявляемые 23-компонентную и 14-компонентную комбинации нового сочетания КПС серотипов 6А, 15F и 23А использовали в качестве препаратов сравнения 20-компонентную экспериментальную комбинацию, содержащую по 25 мкг пневмококковых КПС серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 33F (общих с серотипами комбинации известного препарата PNEUMOVAX 23) в первом случае и 11-компонентную экспериментальную комбинацию, содержащую по 25 мкг пневмококковых КПС серотипов 3, 4, 5, 6В, 7F, 11А, 14, 18С, 19А, 19F, 23F (общих с серотипами комбинации известного препарата PNEUMOVAX 23) - во втором.

Исследуемые препараты в дозе, содержащей по 1 мкг КПС каждого серотипа, вводили мышам (СВА×С57BL/6) F1 в/б в 0,5 мл стерильного изотонического раствора. Кровь забирали через 7 дней после иммунизации. Уровень сывороточных сероспецифических антител определяли с помощью ИФА, предварительно сорбируя на 96-луночных планшетах КПС (50 мкг/мл) каждого из исследуемых серотипов.

Как следует из табл. 4, введенное в состав заявляемых 23-компонентной и 14-компонентной комбинаций новое сочетание КПС серотипов 6А, 15F и 23А не подавляет иммунный ответ на остальные 20 и 11 КПС соответственно, что свидетельствует об отсутствии интерференции антигенов в обеих заявляемых комбинациях.

Таблица 4

Иммуногенность компонентов заявляемых и экспериментальных комбинаций КПС бактерии *S. pneumoniae*

Серотип <i>S.pneumoniae</i>	Препарат/ кратность подъёма титра антител иммунных сывороток							
	Экспериментальная 20-компонентная комбинация		Заявляемая 23-компонентная комбинация		Экспериментальная 11-компонентная комбинация		Заявляемая 14-компонентная комбинация	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
1	2 ± 0,1	3 ± 0,2	2 ± 0,1	4 ± 0,4	НО	НО	НО	НО
3	2 ± 0,1	3 ± 0,25	3 ± 0,2	4 ± 0,3	-	2 ± 0,1	2 ± 0,2	4 ± 0,1
4	2 ± 0,1	2 ± 0,1	2 ± 0,1	5 ± 0,4	2 ± 0,2	3 ± 0,1	3 ± 0,4	6 ± 0,25
5	-	3 ± 0,4	-	6 ± 0,4	2 ± 0,3	3 ± 0,2	2 ± 0,1	6 ± 0,3
6А	НО	НО	2 ± 0,1	6 ± 0,5	НО	НО	2 ± 0,2	5 ± 0,4
6В	2 ± 0,1	3 ± 0,4	2 ± 0,2	4 ± 0,2	-	2 ± 0,15	2 ± 0,1	3 ± 0,2

7F	-	3 ± 0,4	2 ± 0,1	4 ± 0,3	2 ± 0,1	2 ± 0,1	2 ± 0,3	4 ± 0,2
8	2 ± 0,1	4 ± 0,2	4 ± 0,4	7 ± 0,6	НО	НО	НО	НО
9N	2 ± 0,2	4 ± 0,25	5 ± 0,5	8 ± 0,8	НО	НО	НО	НО
9V	2 ± 0,1	4 ± 0,5	4 ± 0,3	6 ± 0,5	НО	НО	НО	НО
10A	2 ± 0,1	3 ± 0,25	2 ± 0,1	4 ± 0,4	НО	НО	НО	НО
11A	-	3 ± 0,2	2 ± 0,1	4 ± 0,2	2 ± 0,1	3 ± 0,4	2 ± 0,2	4 ± 0,1
12F	2 ± 0,1	4 ± 0,4	3 ± 0,2	6 ± 0,5	НО	НО	НО	НО
14	2 ± 0,2	5 ± 0,8	3 ± 0,1	6 ± 0,4	2 ± 0,1	4 ± 0,1	4 ± 0,2	6 ± 0,25
15F	НО	НО	4 ± 0,2	7 ± 0,8	НО	НО	4 ± 0,4	8 ± 0,6
15B	2 ± 0,1	4 ± 0,5	3 ± 0,2	5 ± 0,4	НО	НО	НО	НО
18C	-	3 ± 0,5	2 ± 0,1	5 ± 0,2	-	2 ± 0,2	2 ± 0,15	4 ± 0,1
19A	-	5 ± 0,45	-	6 ± 0,5	2 ± 0,1	4 ± 0,4	2 ± 0,1	6 ± 0,2
19F	2 ± 0,1	3 ± 0,15	3 ± 0,1	6 ± 0,4	2 ± 0,2	4 ± 0,2	4 ± 0,2	7 ± 0,5
22F	2 ± 0,1	4 ± 0,2	4 ± 0,4	6 ± 0,2	НО	НО	НО	НО
23A	НО	НО	4 ± 0,5	6 ± 0,5	НО	НО	4 ± 0,4	6 ± 0,3
23F	2 ± 0,1	3 ± 0,2	3 ± 0,1	4 ± 0,2	2 ± 0,15	2 ± 0,1	2 ± 0,1	4 ± 0,4
33F	3 ± 0,2	4 ± 0,5	5 ± 0,4	8 ± 1	НО	НО	НО	НО

НО – не определяли

Регистрируемые у мышей (СВА×С57BL/6) F1, иммунизированных в/б заявляемыми 23-компонентной и 14-компонентной комбинациями КПС в дозе, содержащей по 1 мкг КПС каждого серотипа в 0,5 мл стерильного изотонического раствора, уровни сероспецифических IgG и IgM были выше для всех серотипов по сравнению с препаратами экспериментальной 20-компонентной и 11-компонентной комбинации КПС соответственно. Именно введение в состав комбинаций эпидемически значимого для Евразийского региона сочетания КПС серотипов 6А, 15F и 23А обуславливает повышение иммуногенности всей совокупности компонентов заявляемой 23-компонентной

комбинации и всей совокупности компонентов заявляемой 14-компонентной комбинации по сравнению с 20- и 11-компонентными экспериментальными комбинациями за счёт повышения уровней антител для каждого отдельного серотипа. При этом особо высокие подъемы IgG и IgM зарегистрированы для КПС серотипов 5, 6А, 8, 9N, 9V, 12F, 14, 15F, 19А, 19F, 22F, 33F в составе заявляемой 23-компонентной комбинации и для КПС серотипов 4, 5, 14, 15F, 19А, 19F в составе заявляемой 14-компонентной комбинации; при этом можно полагать, что в отношении данных серотипов иммуностимулирующее действие введенного сочетания КПС серотипов 6А, 15F и 23А является максимальным. Таким образом, межмолекулярные антигенные взаимодействия КПС в составе заявляемых комбинаций не могут быть охарактеризованы как интерференция между введенным новым сочетанием КПС серотипов 6А, 15F, 23А и КПС серотипов, общих с комбинацией препарата PNEUMOVAX 23. Напротив, обнаружен синергетический эффект, возникающий при объединении КПС «новых» и известных, «классических» серотипов, в части усиления иммуногенности всей совокупности компонентов заявляемых комбинаций.

Г. Пирогенность заявляемых 23-компонентной и 14-компонентной комбинаций пневмококковых КПС бактерии *S. pneumoniae*.

Определение пирогенности заявляемых 23-компонентной и 14-компонентной комбинаций пневмококковых КПС проводили в соответствии с требованиями ГФ XIV, ОФС.1.2.4.0005.15 «Пирогенность» [iv]. С этой целью высокоочищенные, согласно Примеру 2, 23- и 14-компонентные комбинации КПС разводили в 20 раз в апиrogenном физиологическом растворе (0,9% -ном хлориде натрия) до концентрации 57,5 мкг/мл и 35 мкг/мл соответственно (по 2,5 мкг/мл КПС каждого серотипа).

Исследуемые препараты вводили внутривенно трём кроликам породы Шиншилла массой 2,3-2,6 кг из расчёта 1 мл испытуемого раствора комбинации на 1 кг массы животного. Согласно установленным нормам, препарат считается апиrogenным, если он не вызывает подъем температуры ни у одного из трех подопытных кроликов более, чем на 0,5 °С по сравнению с исходной температурой, а сумма подъемов температур у трех подопытных кроликов не превышает 1,2 °С («Пирогенность» [iv]). При проверке пирогенности *in vivo* все исследуемые препараты были апиrogenны и не вызывали подъема температуры ни у одного из трех подопытных кроликов более, чем на 0,2°С по сравнению с исходной температурой, а сумма подъемов температур у трех подопытных кроликов не превышала ± 0,4 С (табл. 5), что соответствует критериям апиrogenности.

Таблица 5

Пирогенность заявляемых комбинаций пневмококковых КПС бактерии *S. pneumoniae*

Препарат	Показатели температуры
----------	------------------------

Заявляемая 23-компонентная комбинация	$(+ 0,1^{\circ}\text{C}; 0^{\circ}\text{C}; + 0,1^{\circ}\text{C}) + 0,2^{\circ}\text{C}$
Заявляемая 14-компонентная комбинация	$(-0,1^{\circ}\text{C}; +0,1^{\circ}\text{C}; -0,1^{\circ}\text{C}) \pm 0,3^{\circ}\text{C}$

Пример 3.

Пневмококковые полисахаридные неконъюгированные вакцины, включающие заявляемые комбинации КПС бактерии *S. pneumoniae* (ППВ).

А. Применение заявляемых комбинаций КПС для производства неконъюгированных вакцин (фармацевтического средства).

Полученные согласно Примеру 2А и 2В сухие целевые продукты – компоненты заявляемой комбинации из КПС пневмококков 23-х серотипов, химическая структура которых была подтверждена методом ^1H -ЯМР-спектроскопии согласно Примеру 2С, растворяли в фосфатном буфере (рН 7.0 – 7,6) с добавлением консерванта фенола (не более 1,25 мг/доза) и стерильно разливали в ампулы по 0,5 мл раствора с получением 1 дозы финальной формы заявляемой 23-валентной неконъюгированной вакцины (ППВ), содержащей 575 мкг КПС (по 25 мкг каждого серотипа).

Полученные согласно Примеру 2А и 2В сухие целевые продукты – компоненты заявляемой комбинации из КПС пневмококков 14-ти серотипов, химическая структура которых была подтверждена методом ^1H -ЯМР-спектроскопии согласно Примеру 2С, растворяли в фосфатном буфере (рН 7.0 – 7,6) с добавлением консерванта фенола (не более 1,25 мг/доза) и стерильно разливали в ампулы по 0,5 мл раствора с получением 1 дозы финальной формы заявляемой 14-валентной неконъюгированной вакцины (ППВ), содержащей 350 мкг КПС (по 25 мкг каждого серотипа).

В. Применение заявляемых комбинаций КПС для производства вакцин в лекарственной форме ингаляций, аэрозоля, спрея, капель (фармацевтического средства); иммуногенность произведенных вакцин.

Полученные в результате осуществления процедуры катионообменной хроматографии согласно Примеру 2А и полученные согласно Примеру 2В растворы целевых продуктов – компонентов заявляемых комбинаций из КПС пневмококков 23-х или 14-ти серотипов, химическая структура которых была подтверждена методом ^1H -ЯМР-спектроскопии согласно Примеру 2С, разводили фенол-фосфатным буфером, полученным согласно Примеру 3А, до концентрации 50 мкг/мл каждого серотипа, объединяли и стерильно фильтровали на картридже с мембраной с пределом отсечки 0,22 мкм с получением стерильных растворов 23- или 14-валентной вакцины для интраназального, ингаляционного и т.п. способов введения.

Применение полученных растворов заявляемых неконъюгированных вакцин возможно в форме ингаляций, аэрозоля, спрея, капель. Одна человеческая доза (ЧД) вакцины содержит по 0,025мг КПС каждого компонента (для 23-валентной вакцины доза составляет 0,575мг). Для интраназальных форм дозировка

однократного введения может быть увеличена до нескольких ЧД в 1- 2 мл раствора.

Моделирование интраназальной иммунизации раствором неконъюгированной ППВ проводили на мышах. Самки мышей (СВА х С57 В1/6) F1 весом 18-20 г. были иммунизированы 23-валентной ППВ, содержащей по 2,5 мкг КПС каждого серотипа (общая доза 57,5 мкг). Иммунизацию осуществляли специальной иглой интраназально, двукратно с интервалом в 14 дней. Через 14 дней после повторной иммунизации мыши умерщвлялись и проводилась торакотомия по грудинной линии с последующим выделением бронхолёгочного аппарата. Бронхолёгочный аппарат измельчали и помещали в 2 мл охлаждённого физиологического раствора. Для определения антител на слизистых мышей использовали бронхолёгочный лаваж. Контрольные смывы получали от интактных животных.

Аналогичным образом мышам вводили стерильный раствор конъюгированной 23-валентной вакцины ПКВ-Ас₃-ЛПС с липидосодержащим адьювантом Ас₃-ЛПС бактерии *S. sonnei* в дозе 25 мкг, полученный соответствующим разведением фенол-фосфатным буфером финальной формы конъюгированной вакцины, полученной согласно Примеру 4F. Результаты проведенных экспериментов представлены в табл.6.

Таблица 6

Кратность подъёма титра серотип-специфического IgA в легких при интраназальном введении мышам растворов заявленных ППВ и ПКВ

Серотип <i>S.pneumoniae</i>	Заявляемая 23-валентная ППВ	Заявляемая 23-валентная ПКВ-Ас ₃ -ЛПС
1	2 ± 0,1	3 ± 0,1
3	2 ± 0,1	3 ± 0,1
4	2 ± 0,1	2 ± 0,2
5	2 ± 0,1	3 ± 0,1
6A	2 ± 0,2	2 ± 0,2
6B	2 ± 0,2	3 ± 0,2
7F	2 ± 0,2	2 ± 0,1
8	3 ± 0,2	4 ± 0,4
9N	2 ± 0,2	2 ± 0,3
9V	2 ± 0,2	2 ± 0,1
10A	2 ± 0,1	4 ± 0,4
11	2 ± 0,1	3 ± 0,2
12F	3 ± 0,4	3 ± 0,1
14	2 ± 0,1	3 ± 0,5
15F	2 ± 0,1	2 ± 0,1
15B	2 ± 0,2	3 ± 0,2
18C	2 ± 0,1	2 ± 0,1
19A	3 ± 0,1	2 ± 0,2

19F	3 ± 0,1	2 ± 0,2
22F	2 ± 0,1	4 ± 0,4
23A	2 ± 0,3	2 ± 0,1
23F	2 ± 0,1	3 ± 0,2
33F	2 ± 0,2	3 ± 0,2

У двукратно вакцинированных интраназально мышей определялись титры серотип-специфических антител класса IgA. При введении мышам вакцины ПКВ-Ас₃-ЛПС, кроме того, отмечалось повышение иммунного ответа для ряда серотипов.

С. Опсонофагоцитарная активность антител, полученных после иммунизации мышей заявляемой пневмококковой полисахаридной 23-валентной неконъюгированной вакциной (ППВ).

Моделирование патологических процессов на животных и исследование опсонофагоцитарной реакции позволяют определить функциональные антитела (G. Viðarsson, I. Jónsdóttir, S. Jónsson, H. Valdimarsson «Opsonization and antibodies to capsular and cell wall polysaccharides of streptococcus pneumoniae». J. Infect. Dis., 1994, vol.170, pp.592-599; P. Anderson, J.C. Whitin, H.L. Keyserling «Standardization of an opsonophagocytic assay for the measurement of functional antibody activity against». Microbiology, 1997, vol.4, pp.415-422), необходимые для активации фагоцитоза – основного защитного механизма от бактерии *S. pneumoniae* (J.C. Guckian, G.D. Christensen, D.P. Fine « The role of opsonins in recovery from experimental pneumococcal pneumonia», J. Infect. Dis., 1980, vol.142, pp.175-190; J.A. Winkelstein, R.E. Moxon «The role of complement in the host's defense against *Haemophilus influenzae*», J. Infect. Dis., 1992, vol. 165, pp.62-65). Результаты, полученные при исследовании опсонофагоцитарной реакции, позволяют прогнозировать эффективность применения пневмококковых антигенных препаратов в клинической практике.

Для определения опсонофагоцитарной активности антител были изучены инактивированные нагреванием сыворотки мышей, полученные при иммунизации животных заявляемой 23-валентной ППВ и известной вакциной PNEUMOVAX 23, в эквивалентных дозах, содержащих по 1 мкг КПС каждого серотипа. Сыворотки в разведении 1:10 в опсонофагоцитарном буфере - ОПФБ (раствор Хэнкса с солями Mg и Ca, 1% желатин, 5% FBS) вносили в количестве 40 мкл в лунки 96-луночного планшета. Затем в каждую лунку добавляли по 10 мкл комплемента морской свинки («Микроген», Россия), 10 мкл бактерий *S. pneumoniae* (1000 КОЕ в ОПФБ) и помещали на шейкере в СО₂-инкубатор на 30 минут при +37°C, 5% СО₂. По истечении срока инкубации в каждую лунку планшета вносили по 40 мкл 2x10⁵ дифференцированных диметилформамидом клеток HL-60 (подтвержденных микроскопией после окраски по Романовскому-Гимзе) и снова инкубировали 60 минут в тех же условиях. По истечении срока инкубации 10 мкл смеси из каждой лунки пересевали на чашки Петри с кровяным агаром и инкубировали в СО₂-инкубаторе в течение 24 ч при +37°C, 5% СО₂. В контрольные лунки добавляли сыворотки интактных мышей. Впервые установлена высокая опсонофагоцитарная активность сывороток

мышей, иммунизированных заявляемой 23-валентной ППВ, в отношении нового сочетания серотипов 6А, 15F, 23А. Иммунные сыворотки мышей демонстрировали эффективный киллинг эпидемически значимых для Евразийского региона штаммов пневмококков – до 50-70 % убитых клеток. Известная вакцина PNEUMOVAX 23, индуцировала фоновые уровни опсонофагоцитарной активности порядка 5-10 %, что объясняется отсутствием КПС нового сочетания серотипов в составе известной вакцины (Фиг.5). Было проведено также сравнительное исследование опсонофагоцитарной активности сывороток мышей, иммунизированных заявляемой 23-валентной ППВ и известной вакциной PNEUMOVAX 23, в отношении общих в составе исследуемых вакцин комбинаций серотипов *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F (Фиг.6). Результаты исследования показали, что иммунизация мышей заявляемой 23-валентной ППВ приводит к инаktivации в опсонофагоцитарной реакции от 40 до 80% колоний живых клеток *S.pneumoniae*. При этом сыворотки мышей после введения заявляемой 23-валентной ППВ существенно эффективнее нейтрализуют серотипы бактерии *S. pneumoniae* 4, 6В, 8, 9V, 11А, 19А, 23F и 33F, причем процент убитых клеток бактерий на 7 % и более, выше по сравнению с аналогичными показателями для сывороток мышей, иммунизированных известной вакциной PNEUMOVAX 23. По отношению же к остальным, общим для двух исследуемых вакцин серотипам пневмококков, заявленная 23-валентная ППВ демонстрирует опсонофагоцитарную активность и, следовательно, протективные свойства, сравнимые с таковыми известной вакцины PNEUMOVAX 23.

Д. Исследования токсичности заявляемой пневмококковой полисахаридной 23-валентной неконъюгированной вакцины (ППВ).

Схема определения параметров острой токсичности.

Полученную согласно Примеру 3А финальную форму заявляемой 23-валентной неконъюгированной вакцины (ППВ) вводили внутримышечно и подкожно половозрелым белым аутбредным мышам сток SHK (n=20) и половозрелым кроликам (n=20) однократно в человеческой дозе (ЧД или 575 мкг КПС в 0,5 мл). После однократного введения препарата период наблюдения составил 14 дней. На 15-й день эксперимента животные подвергались эвтаназии помещением в CO₂- камеру с замещением воздуха углекислым газом со скоростью 20% от объема камеры в минуту в течение 10-20 секунд, после чего животные были направлены на вскрытие и патоморфологическое исследование внутренних органов.

В результате проведенных вышеуказанных доклинических исследований острой токсичности установлено, что при однократном внутримышечном и подкожном введении человеческой дозы (575 мкг в 0,5 мл раствора) отсутствует токсическое действие заявляемой вакцины.

Схема изучения субхронической токсичности.

Первая часть исследований выполнялась на следующих группах белых аутбредных крыс сток Wistar (n=120):

1. Контроль (0,9% раствор NaCl), в/м, (10 самцов+10 самок);
2. 23-валентная ППВ, в/м, 1 ЧД (10 самцов +10 самок);
3. 23-валентная ППВ, в/м, 2 ЧД (10 самцов + 10 самок);
4. Контроль (0,9% раствор NaCl), п/к, (10 самцов +10 самок);
5. 23-валентная ППВ, п/к, 1 ЧД (10 самцов + 10 самок);
6. 23-валентная ППВ, п/к, 2 ЧД (10 самцов +10 самок).

Вторая часть исследований выполнялась на следующих группах кроликов (n=72):

1. Контроль (0,9% раствор NaCl), в/м, (6 самцов + 6 самок);
2. 23-валентная ППВ, в/м, 1 ЧД (6 самцов + 6 самок);
3. 23-валентная ППВ, в/м, 2 ЧД (6 самцов +6 самок);
4. Контроль (0,9% раствор NaCl), п/к, (6 самцов + 6 самок);
5. 23-валентная ППВ, п/к, 1 ЧД (6 самцов + 6 самок);
6. 23-валентная ППВ, п/к, 2 ЧД (6 самцов +6 самок).

Тестируемые образцы препарата и стандартный образец (контроль) вводились внутримышечно и подкожно однократно, период наблюдения после отмены препарата составил 21 день.

Через 14 суток после введения и через 7 суток после отмены препарата животные были подвергнуты эвтаназии помещением в CO₂-камеру с замещением воздуха углекислым газом. Эвтаназия проводилась на 15-й и 22-й день эксперимента, после чего животные были направлены на вскрытие и патоморфологическое исследование внутренних органов.

На протяжении эксперимента отмечали:

- общее состояние (динамика массы тела у крыс и кроликов, ректальная температура крыс). Внешний вид, потребление воды и корма оценивались при ежедневном осмотре животных. Взвешивание, измерение ректальной температуры выполнялись раз в неделю (фон, через 7, 14 и 21 дней после введения препарата);
- поведение крыс (двигательная и исследовательская активность в тесте «открытое поле») (фон, через 7, 14 и 21 дней после введения препарата);
- гематологические показатели крыс и кроликов: количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, уровень гемоглобина, лейкоцитарная формула, СОЭ (фон, через 7, 14 и 21 дней после введения препарата);
- биохимические показатели и активность ферментов сыворотки крови крыс и кроликов: общий белок, альбумин, креатинин, мочевины, глюкоза, холестерин, триглицериды, билирубин общий, активность щелочной фосфатазы, аспартат- и аланинаминотрансфераз, содержание кальция, калия, натрия (фон, через 7, 14 и 21 дней после введения препарата);
- функциональное состояние сердечно-сосудистой системы крыс: ЭКГ-исследование во II-м стандартном отведении, систолическое давление, ЧСС (фон, через 7, 14 и 21 дней после введения препарата);
- функциональное состояние респираторной системы крыс: частота дыхания (фон, через 7, 14 и 21 дней после введения препарата);
- функциональная активность почек крыс и кроликов: анализ мочи (фон, через 7, 14 и 21 дней после введения препарата);

- патоморфологическое исследование (через 14 дней введения препарата, 7 дней после отмены препарата), включающее: некропсию, макроскопическое исследование, взвешивание органов для определения массовых коэффициентов, гистологическое исследование внутренних органов.

Результаты изучения субхронической токсичности на белых аутбредных крысах и кроликах показали, что внутримышечное и подкожное введение заявляемой вакцины в человеческой и превышающей человеческую в 2 раза дозах, не вызывало нарушений функционального состояния основных органов и систем организма

Схема изучения местнораздражающего действия.

Местнораздражающее действие на крысах и кроликах изучалось в патоморфологических исследованиях; места введения препарата – мышцы бедра и кожи спины (макро- и микроскопическое описание) на 15-е сутки после применения препарата в 1 ЧД и 2 ЧД. Изучение местнораздражающего действия было совмещено с изучением субхронической токсичности.

Установлено, что заявляемая вакцина не вызывала местнораздражающего действия у крыс и кроликов при введении в дозах 1 ЧД и 2 ЧД.

Схема и методы изучения аллергизирующего действия.

Схема и методы определения анафилактической активности препарата в реакции общей анафилаксии (анафилактический шок).

Сенсибилизация.

В опытных группах морским свинкам вводили препарат 23-валентной ППВ в 1ЧД (0,5 мл) 3 раза. Первая сенсибилизирующая доза вакцины вводилась подкожно, две последующие вводились внутримышечно через день в область бедра. В контрольной группе отрицательного контроля 0,9% раствор NaCl вводили в соответствующем объеме, аналогично схеме введения сенсибилизирующих доз вакцины в опытных группах. В контрольной группе положительного контроля использовался эталонный аллерген - 0,6% раствор белка куриного яйца (БКЯ), основным аллергическим компонентом которого является овальбумин. Морских свинок иммунизировали БКЯ перорально в течение 3-х дней.

Разрешающие дозы.

В опытной группе и контрольной группе животных (-), которым ввели только 0,9% раствор NaCl, на 14-ый день эксперимента вводили внутримышечно разрешающую инъекцию препарата 23-валентной ППВ. Разрешающая доза равна суммарной сенсибилизирующей дозе. В контрольной группе (+) животным, сенсибилизированным овальбумином, вводили внутрисердечно овальбумин в дозе 1 мг на 300 г массы тела.

Исследовались следующие группы животных (36 морских свинок по 18 самок и 18 самцов):

1. Контроль (-): 0,9% раствор NaCl, n=12 (6 самцов и 6 самок);
2. Контроль (+): 0,6 % раствор БКЯ в дозе 1 мг на 300 г массы тела, n=12 (6 самцов и 6 самок);
3. 23-валентная ППВ: 1ЧД, n=12 (6 самцов и 6 самок).

Учет интенсивности анафилактического шока проводился в индексах I_w по Weigle (Weigle W.O., Cochrane C.G., Dixon F.J., 1960) по следующей формуле (2):

$$I_w = \frac{(N \times 4) + (N_1 \times 3) + (N_2 \times 2) + (N_3 \times 1) + (N_4 \times 0)}{N + N_1 + N_2 + N_3 + N_4}, \quad (2)$$

где N — число морских свинок, у которых наступила смерть;

N_1 — число морских свинок, у которых развился тяжелый шок;

N_2 — число морских свинок, у которых развился умеренный шок;

N_3 — число морских свинок, у которых развился слабый шок;

N_4 — морские свинки, у которых не наступило шока.

При гибели всех животных в группе индекс Weigle составляет 4(++++)). При тяжелом шоке — 3(+++), при умеренном шоке — 2(++), при слабом шоке — 1(+).

При изучении анафилактогенной активности финальной формы заявляемой 23-валентной неконъюгированной вакцины (ППВ) на морских свинках гибели животных от анафилактического шока либо признаков развития шока не было зарегистрировано.

Схема и методы определения аллергенности в тесте реакции гиперчувствительности замедленного типа.

Исследуемый препарат 23-валентной ППВ растворяли в растворе Хенкса таким образом, чтобы сенсibilизирующая доза на 1 животное содержалась в 30 мкл конечного раствора (с рабочей концентрацией 0,35%).

Сенсibilизирующая доза готовилась из препарата ППВ с рабочей концентрацией смешиванием в соотношении 1:1 с иммуностимулятором — полным адьювантом Фрейнда (ПАФ) при их тщательном совместном эмульгировании. Опытным животным вводили по 60 мкл сенсibilизирующей дозы препарата в ПАФ, контрольным — 60 мкл смеси ПАФ с растворителем (без исследуемого препарата ППВ).

Сенсibilизацию животных проводили однократно, внутрикожным введением в основание хвоста эмульсии препарата ППВ в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ).

Разрешающую дозу вводили на 6-й день после сенсibilизации (группа животных $n=10$) инъекцией в подушечку задней лапы в объеме 40 мкл.

Исследовались следующие группы животных (36 мышей C57BL/6, по 18 самок и 18 самцов):

1. Контроль 1, раствор Хенкса, $n=12$ (6 самцов и 6 самок);
2. Контроль 2, ПАФ, $n=12$ (6 самцов и 6 самок);
3. 23-валентная ППВ в ПАФ, $n=12$ (6 самцов и 6 самок).

Через 6, 22 и 24 часа производили измерение величины отека с помощью плетизмометра (Открытая наука, Россия). Интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа оценивалась по величине отека в виде разницы в толщине обеих лапок.

Установлено, что заявляемая вакцина не обладала алергизирующими свойствами и не индуцировала развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа при сенсibilизации мышей совместно с адьювантом.

Е. Пирогенность заявляемых пневмококковых полисахаридных неконъюгированных вакцин (ППВ).

Определение пирогенности заявляемых неконъюгированных 23-валентной и 14-валентной ППВ проводили в соответствии с требованиями ГФ XIV, ОФС.1.2.4.0005.15 «Пирогенность» [iv]. С этой целью полученные и высокоочищенные, согласно Примеру 2А и 2В, 23- и 14-компонентные комбинации КПС разводили в 20 раз в апиrogenном физиологическом растворе (0,9% -ном хлориде натрия) до концентрации 57,5 мкг/мл и 35 мкг/мл соответственно (по 2,5 мкг/мл КПС каждого серотипа).

Исследуемые препараты вводили внутривенно трём кроликам породы Шиншилла массой 2,3-2,6 кг из расчёта 1 мл испытуемого раствора комбинации КПС на 1 кг массы животного. Согласно установленным нормам, препарат считается апиrogenным, если он не вызывает подъем температуры ни у одного из трех подопытных кроликов более, чем на 0,5 °С по сравнению с исходной температурой, а сумма подъемов температур у трех подопытных кроликов не превышает 1,2 °С («Пирогенность» [iv]). При проверке пирогенности *in vivo* все исследуемые препараты были апиrogenны и не вызывали подъема температуры ни у одного из трех подопытных кроликов более, чем на 0,2°С по сравнению с исходной температурой, а сумма подъемов температур у трех подопытных кроликов не превышала $\pm 0,4^{\circ}\text{C}$ (табл. 7), что соответствует критериям апиrogenности.

Таблица 7

Пирогенность заявляемых пневмококковых полисахаридных неконъюгированных вакцин (ППВ)

Препарат	Показатели температуры
Заявляемая 23-валентная ППВ	(+ 0,1°С; 0°С; + 0,1°С) + 0,2 °С
Заявляемая 14-валентная ППВ	(-0,1°С; +0,1°С; -0,1°С) $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$

Пример 4

Заявляемые пневмококковые конъюгированные вакцины (ПКВ).

А. Получение компонентов заявляемой 23-валентной и 14-валентной ПКВ-CRM₁₉₇ – конъюгатов КПС с белком-носителем.

Использование белков-носителей в качестве адьювантов в препаратах пневмококковых вакцин диктуется необходимостью усиления иммунизационного потенциала входящих в них КПС, формирования адаптивного иммунитета, продления срока эффективной защиты после введения вакцин. В качестве таких адьювантов предлагается использовать бактериальные производные, такие как рекомбинантный белок CRM₁₉₇, который является нетоксичным вариантом дифтерийного токсина, полученного путем единичной аминокислотной замены глютаминовой кислоты на глицин. Белок CRM₁₉₇ полностью охарактеризован, является предпочтительным носителем для полисахаридов и гаптенных, повышая их иммуногенность, и используется в

составе вакцин против менингококков и пневмококков, в частности, в вакцине Превенар-13 (PHIZER, Inc., США).

Конъюгаты компонентов заявляемой 23-валентной и 14-валентной ПКВ-CRM₁₉₇ были получены по известной методике (D.E. Shafer, B.Toll, R.F. Schuman, B.L. Nelson, J.J. Mond, A. Lees «Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP) for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. II. Selective crosslinking of proteins to CDAP-activated polysaccharides». Vaccine, 2000, vol. 18, pp. 1273-1281), основанной на активации полисахарида 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторборатом (CDAP) с образованием эфира цианата с последующей конъюгацией с аминогруппой на белке-носителе CRM₁₉₇.

Для получения конъюгатов каждого из компонентов заявляемой 23-валентной и 14-валентной ПКВ-CRM₁₉₇ использовали сухие целевые продукты, полученные согласно Примерам 2А и 2В. Так, в частности, к сухому полисахариду Рп6В добавляли раствор 2М NaCl. Конечная концентрация полученного раствора полисахарида (PS) составляла 5-10 мг/мл, к которому добавляли свежеприготовленный раствор CDAP в ацетонитриле (100 мг/мл) до соотношения CDAP/PS 0,8-1,6 мг/мг. Через 90 с к полученной перемешиваемой реакционной смеси прибавляли раствор 0,5М NaOH до получения pH смеси 9,0-9,5. При данном pH осуществляли активацию PS в течение 2-3 минут.

Очищенный белок CRM₁₉₇ добавляли к активированному PS в соотношении CRM₁₉₇ /PS 1-1,2 мг/мг и проводили реакцию конъюгации при pH 9,5 -9,7 в течение 2 часов при постоянном контроле pH. Затем к смеси добавляли раствор 2М глицина с целью гашения непрореагировавших групп эфира цианата. Затем доводили pH смеси до 8,5-9,0 (pH гашения) и перемешивали 30 минут при 24° С, а затем 7-8 часов – при 2-8°С.

Полученные конъюгаты очищали с помощью гель-фильтрации, используя колонку с Sephacryl S400HR, уравновешенную 0,15 М NaCl. Гель-фильтрацию использовали для удаления непроконъюгировавших PS и белка-носителя, а также для удаления солей. Фракции, содержащие конъюгаты, обнаруживали с помощью детекции при УФ 280 нм. Фракции объединяли и стерильно фильтровали на мембране с пределом отсечки 0,22 мкм. Содержание белкового носителя в конъюгатах составляло ≈ 50 мас. %.

В. Применение конъюгатов КПС-CRM₁₉₇ для производства заявляемых пневмококковых конъюгированных 23-валентной и 14-валентной вакцин ПКВ-CRM₁₉₇ (фармацевтического средства).

Высокоочищенные конъюгаты белка-носителя с каждым из КПС 23-х или 14-ти серотипов пневмококков, химическая структура которых была подтверждена методом ¹H-ЯМР-спектроскопического анализа согласно Примеру 2С, растворяли в фосфатном буфере (pH 7.0 – 7,6) с добавлением консерванта фенола (не более 1,25 мг/доза) и стерильно разливали в ампулы по 0,5 мл раствора с получением 1 дозы финальной формы конъюгированной 23-валентной или 14-валентной вакцины, содержащей 92 мкг или 56 мкг конъюгатов, соответственно.

С. Иммуногенность заявляемых пневмококковых конъюгированных 23-валентной и 14-валентной вакцин (ПКВ-CRM₁₉₇).

Для оценки иммуногенности заявляемой 23-валентной ПКВ-CRM₁₉₇, содержащей по 2 мкг каждого из пневмококковых КПС серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11, 12F, 14, 15В, 15F, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23F, 33F (46 мкг КПС суммарно) и 46 мкг CRM₁₉₇ (50% м/ м), и заявляемой 14-валентной ПКВ-CRM₁₉₇, содержащей по 2 мкг каждого из пневмококковых КПС серотипов 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 11А, 14, 15F, 18С, 19А, 19F, 23А, 23F (28 мкг КПС суммарно) и 28 мкг CRM₁₉₇ (50% м/ м), указанные препараты в 0,5 мл стерильного изотонического раствора вводили 10 мышам (СВА×С57BL/6)F1 в/б трёхкратно с интервалом в 14 дней. Для определения адъювантного действия CRM₁₉₇ на пневмококковые КПС для сравнения использовали КПС тех же серотипов в такой же концентрации, для чего заявляемые 23-валентную и 14-валентную ППВ разводили в 12 раз в стерильном изотоническом растворе для получения тестовой дозы, содержащей по ≈ 2 мкг КПС каждого серотипа. Кровь забирали через 42 дня после первичного введения препаратов. Уровень сывороточных сероспецифических IgG определяли с помощью ИФА, предварительно сорбируя на 96-луночных планшетах КПС (50 мкг/мл) каждого из исследуемых серотипов.

Как следует из табл. 8, использование CRM₁₉₇ в качестве белка-носителя для заявляемых 23-валентной и 14-валентной ПКВ-CRM₁₉₇, содержащих эпидемически значимое для Евразийского региона сочетание КПС серотипов 6А, 15F и 23А, оказывает выраженное иммуностимулирующее (адъювантное) действие на иммунный ответ за счёт увеличения титров IgG по сравнению с заявляемыми 23-валентной и 14-валентной ППВ. При этом особо высокие подъемы IgG зарегистрированы для КПС серотипов 4, 5, 7F, 8, 9N, 9V, 14, 15В, 15F, 19F, 23А, 23F в составе заявляемой 23-валентной ПКВ-CRM₁₉₇ и для КПС серотипов 4, 5, 7F, 14, 15F, 19F, 23А, 23F в составе заявляемой 14-валентной ПКВ-CRM₁₉₇ и, можно полагать, что в отношении данных серотипов иммуностимулирующее действие CRM₁₉₇ является максимальным.

Таблица 8

Иммуногенность заявляемых 23-валентной и 14-валентной ПКВ-CRM₁₉₇ и заявляемых 23-валентной и 14-валентной ППВ

Серотип <i>S. pneumoniae</i>	Препарат/ кратность подъёма титра IgG иммунных сывороток			
	Заявляемая 23-валентная ППВ	Заявляемая 23-валентная ПКВ-CRM ₁₉₇	Заявляемая 14-валентная ППВ	Заявляемая 14-валентная ПКВ-CRM ₁₉₇
1	-	4 ± 0,2	НО	НО
3	2 ± 0,2	3 ± 0,1	3 ± 0,1	5 ± 0,4
4	2 ± 0,1	6 ± 0,4	2 ± 0,4	6 ± 0,2
5	2 ± 0,1	6 ± 0,1	2 ± 0,1	8 ± 0,2
6А	2 ± 0,15	4 ± 0,2	2 ± 0,15	3 ± 0,6
6В	-	3 ± 0,2	2 ± 0,3	3 ± 0,1

7F	4 ± 0,5	8 ± 0,4	3 ± 0,2	8 ± 0,1
8	3 ± 0,2	8 ± 0,2	НО	НО
9N	3 ± 0,1	7 ± 0,3	НО	НО
9V	2 ± 0,2	6 ± 0,1	НО	НО
10A	2 ± 0,1	5 ± 0,1	НО	НО
11A	2 ± 0,25	5 ± 0,2	2 ± 0,1	4 ± 0,2
12F	3 ± 0,4	5 ± 0,2	НО	НО
14	3 ± 0,1	8 ± 0,5	6 ± 0,4	9 ± 0,4
15F	4 ± 0,2	7 ± 0,1	3 ± 0,4	6 ± 0,3
15B	2 ± 0,2	6 ± 0,2	НО	НО
18C	-	4 ± 0,1	2 ± 0,2	3 ± 0,4
19A	3 ± 0,1	5 ± 0,2	2 ± 0,1	4 ± 0,1
19F	3 ± 0,1	8 ± 0,2	3 ± 0,6	8 ± 0,5
22F	-	4 ± 0,2	НО	НО
23A	2 ± 0,3	6 ± 0,4	4 ± 0,2	6 ± 0,3
23F	2 ± 0,1	7 ± 0,2	3 ± 0,4	6 ± 0,2
33F	2 ± 0,4	3 ± 0,1	НО	НО

НО – не определяли

Д. Снижение содержания белка в составе заявляемых ПКВ-CRM₁₉₇.

Поливалентные конъюгированные вакцины, как правило, содержат компоненты конъюгатов антиген-белковый носитель в массовом соотношении 1:1 (м/м) или 50% (м/м) по содержанию белка, что является мишенью для критики, так как белковый носитель в высоких дозах может «перегружать» иммунную систему новорожденных, аллергиков, иммунокомпроментированных и часто болеющих респираторными инфекциями пациентов. Решение проблемы снижения белковой нагрузки для поливалентных конъюгированных пневмококковых вакцин весьма актуально в связи с неизбежным ростом числа валентностей препаратов для лучшего серологического охвата заболеваемости. Для исследования возможности снижения содержания белкового носителя была создана заявляемая 14-валентная ПКВ-CRM₁₉₇, содержащая по 2 мкг каждого из пневмококковых КПС серотипов 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 11A, 14, 15F, 18C, 19A, 19F, 23A, 23F (28 мкг КПС суммарно) и включающая 10 мкг CRM₁₉₇ ($\approx 25\%$ м/м) или 28 мкг CRM₁₉₇ ($\approx 50\%$ м/м), т.е. с 25%-ным или 50%-ным содержанием белка-носителя соответственно.

Заявляемую 14-валентную ПКВ-CRM₁₉₇ с 25%-ным и 50%-ным содержанием белка-носителя вводили 10 мышам (CBA×C57BL/6)F1 в/б трёхкратно с интервалом в 14 дней в 0,5 мл стерильного изотонического раствора. Кровь забирали чрез 42 дня после первичного введения препаратов. Уровень сывороточных сероспецифических IgG определяли с помощью ИФА, предварительно сорбирав на 96-луночных планшетах КПС (50 мкг/мл) каждого из исследуемых серотипов. Как следует из Таблицы 9, заявляемая 14-валентная ПКВ-CRM₁₉₇, содержащая 25% (м/м) CRM₁₉₇, обнаруживает сравнимую иммуногенность с заявляемой 14-валентной ПКВ-CRM₁₉₇, содержащей 50% (м/м) CRM₁₉₇. При этом высокий иммунный ответ на

конъюгаты с пониженным содержанием белкового носителя не был обусловлен изменением техники связывания компонентов конъюгатов, например, введением спейсера между компонентами или иными технологическими приемами. Можно полагать, что межмолекулярное антигенно-белковое взаимодействие конъюгатов в составе вакцины, включающей новое сочетание конъюгированных КПС серотипов 6А, 15F, 23А, оказывает неочевидное для специалиста положительное иммуномодулирующее действие на иммунный ответ к конъюгату каждого серотипа 14-валентной композиции, позволяющее снижать содержание белкового носителя в составе конъюгатов в диапазоне от 25% до 50% (м/м) без пропорционального снижения иммуногенности заявляемой вакцины.

Таблица 9

Иммуногенность заявляемой 14-валентной ПКВ-CRM₁₉₇, содержащей 50% (м/м) CRM₁₉₇ и 25% (м/м) CRM₁₉₇

Серотип <i>S. pneumoniae</i>	Содержание CRM ₁₉₇ / кратность подъема титра IgG иммунных сывороток	
	25% (м/м) CRM ₁₉₇	50% (м/м) CRM ₁₉₇
3	4 ± 0,4	4 ± 0,1
4	5 ± 0,3	6 ± 0,4
5	7 ± 0,5	8 ± 0,1
6А	3 ± 0,3	3 ± 0,1
6В	2 ± 0,1	3 ± 0,2
7F	7 ± 0,2	8 ± 0,3
11А	4 ± 0,1	5 ± 0,1
14	8 ± 0,3	8 ± 0,25
15F	6 ± 0,2	6 ± 0,4
18С	3 ± 0,2	3 ± 0,1
19А	4 ± 0,3	5 ± 0,2
19F	7 ± 0,2	7 ± 0,4
23А	6 ± 0,1	7 ± 0,2
23F	6 ± 0,1	7 ± 0,5

Е. Получение компонентов заявляемой 23-валентной и 14-валентной ПКВ-Ас₃-ЛПС – конъюгатов КПС с липидосодержащим носителем.

В качестве альтернативного адьюванта для усиления иммунизационного потенциала входящих в заявляемые 23-валентную и 14-валентную вакцины КПС был использован липидосодержащий носитель – низкоэндоотоксичный апирогенный триацильный липополисахарид бактерии *S. sonnei*, представляющий собой триацильный дериват липида А (Ас₃-ЛПС), полученный методом, предложенным Ledov et al. (Ledov V.A., Golovina M.E., Markina A.A., Knirel Y.A., L'vov V.L., Kovalchuk A.L., Aparin P.G. «Highly homogenous tri-acylated S-LPS acts as a novel clinically applicable vaccine against Shigella flexneri 2a infection». Vaccine, 2019, doi:10.1016/j.vaccine.2018.12.067.i).

Экспериментально доказано, что введение Ас₃-ЛПС бактерии *S. sonnei* в

качестве адьюванта в состав кандидатных вакцин против геморрагической лихорадки с почечным синдромом приводило к усилению иммунного ответа испытуемых, снижению антигенной нагрузки на организм, а также к стабилизации вакцины при хранении (Kurashova S.S., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K. «Various Adjuvants Effect on Immunogenicity of Puumala Virus Vaccine». *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2020, Oct 26;10:545371. doi: 10.3389/fcimb.2020.545371.eCollection 2020). В результате проведенных клинических испытаний было установлено, что парентеральное введение Ас₃-ЛПС людям в однократной ЧД 50 мкг является полностью безопасным (Ledov et al.), поэтому именно такая доза адьюванта была выбрана для включения его в состав заявляемых 23-валентной и 14-валентной конъюгированных вакцин.

Конъюгаты каждого из компонентов заявляемой 23-валентной и 14-валентной ПКВ-Ас₃-ЛПС получали по известной методике восстановительного аминирования с использованием восстанавливающего агента цианборгидрида натрия NaBH₃CN (US 4673574, P. W. Anderson, *Immunogenic conjugates*. 1987; Morais V., Suarez N. «Conjugation Mechanism for Pneumococcal Glycoconjugate Vaccines: Classic and Emerging Methods *Bioengineering*», 2022, 9, 774. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9120774>).

Для получения конъюгатов каждого из компонентов заявляемой 23-валентной и 14-валентной ПКВ-Ас₃-ЛПС использовали сухие целевые продукты, полученные согласно Примерам 2А и 2В. Так, в частности, к сухому полисахариду Рn6В, полученному согласно Примеру 2А, добавляли 2М NaCl до итоговой концентрации раствора полисахарида (PS) 8-10 мг/мл; затем к полученному раствору PS добавляли раствор глутарового альдегида до его итоговой концентрации 1,5 %. Через 2 часа к перемешиваемой реакционной смеси добавляли Ас₃-ЛПС бактерии *S. sonnei* до его итоговой концентрации 10-12 мг/мл и затем при pH 5,5-6,0 смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. Цианборгидрит натрия добавляли до концентрации 10 мг/мл и проводили реакцию конъюгации еще в течение 5 часов при постоянном контроле pH. Полученные конъюгаты очищали с помощью гель-фильтрации, используя колонку с Sephacryl S400HR, уравновешенную 0,15 М NaCl. Процедура гель-фильтрации использовалась для удаления непроконъюгировавших КПС и Ас₃-ЛПС, а также для удаления солей. Фракции, содержащие конъюгаты, детектировали с помощью рефрактометра и объединяли; затем стерильно фильтровали на мембране с пределом отсеки 0,22 мкм. Содержание Ас₃-ЛПС-носителя в конъюгатах составляло от 40 до 75 мас. %.

Г. Применение конъюгатов КПС-Ас₃-ЛПС для производства заявляемых конъюгированных 23-валентной и 14-валентной вакцин ПКВ-Ас₃-ЛПС (фармацевтического средства).

Высокоочищенные конъюгаты Ас₃-ЛПС с каждым из КПС 23-х или 14-ти серотипов пневмококков, химическая структура которых была подтверждена методом ¹H-ЯМР-спектроскопического анализа согласно Примеру 2С, растворяли в фосфатном буфере (pH 7.0 – 7,6) с добавлением консерванта

фенола (не более 1,25 мг/доза) и стерильно разливали в ампулы по 0,5 мл раствора с получением 1 дозы финальной формы конъюгированной 23- или 14-валентной вакцины, содержащей 96 мкг или 78 мкг конъюгатов, соответственно.

Г. Иммуногенность заявляемых пневмококковых конъюгированных 23-валентной и 14-валентной вакцин, включающих липидосодержащий носитель (ПКВ-Ас₃-ЛПС).

Для оценки иммуногенности заявляемой 23-валентной ПКВ-Ас₃-ЛПС, содержащей по 2 мкг КПС каждого из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11, 12F, 14, 15В, 15F, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23F и 33F (46 мкг КПС суммарно) и 50 мкг Ас₃-ЛПС бактерии *S. sonnei*, и заявляемой 14-валентной ПКВ-Ас₃-ЛПС, содержащей по 2 мкг КПС каждого из серотипов 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 11А, 14, 15F, 18С, 19А, 19F, 23А и 23F (28 мкг КПС суммарно) и 50 мкг Ас₃-ЛПС бактерии *S. sonnei*, указанные препараты вводили 10 мышам (СВА×С57BL/6)F1 в/б трёхкратно с интервалом в 14 дней в 0,5 мл стерильного изотонического раствора. Кровь забирали через 42 дня после первичного введения препаратов. Уровень сывороточных сероспецифических IgG определяли с помощью ИФА, предварительно сорбируя на 96-луночных планшетах КПС (50 мкг/мл) каждого из исследуемых серотипов.

Как следует из табл. 10, использование Ас₃-ЛПС бактерии *S. sonnei* в качестве липидосодержащего носителя для заявляемых 23-валентной и 14-валентной ПКВ-Ас₃-ЛПС, содержащих эпидемически значимое для Евразийского региона сочетание КПС серотипов 6А, 15F и 23А, оказывает выраженное иммуностимулирующее (адыювантное) действие на иммунный ответ за счёт увеличения титров IgG по сравнению с заявляемыми 23-валентной и 14-валентной ППВ.

При этом особо высокие подъемы IgG зарегистрированы для КПС серотипов 3, 4, 5, 7F, 8, 9N, 9V, 11А, 14, 15В, 15F, 19F, 23А, 23F в составе заявляемой 23-валентной ПКВ-Ас₃-ЛПС и для КПС серотипов 3, 4, 5, 7F, 8, 14, 15F, 19F, 23А, 23F в составе заявляемой 14-валентной ПКВ-Ас₃-ЛПС и, можно полагать, в отношении данных серотипов иммуностимулирующее действие липидосодержащего носителя является максимальным.

Таблица 10

Иммуногенность заявляемых 23-валентной и 14-валентной ПКВ-Ас₃-ЛПС и заявляемых 23-валентной и 14-валентной ППВ

Серотип <i>S. pneumoniae</i>	Препарат/ кратность подъема титра IgG иммунных сывороток			
	Заявляемая 23-валентная ППВ	Заявляемая 23-валентная ПКВ-Ас ₃ -ЛПС	Заявляемая 14-валентная ППВ	Заявляемая 14-валентная ПКВ-Ас ₃ -ЛПС
1	-	4 ± 0,2	НО	НО
3	2 ± 0,2	6 ± 0,6	3 ± 0,1	6 ± 0,3

4	2 ± 0,1	8 ± 0,2	2 ± 0,4	6 ± 0,4
5	2 ± 0,1	8 ± 0,4	2 ± 0,1	9 ± 0,5
6A	2 ± 0,15	4 ± 0,1	2 ± 0,15	3 ± 0,2
6B	-	5 ± 0,2	2 ± 0,3	4 ± 0,1
7F	4 ± 0,5	8 ± 0,4	3 ± 0,2	8 ± 0,6
8	3 ± 0,2	7 ± 0,4	НО	НО
9N	3 ± 0,1	9 ± 0,2	НО	НО
9V	2 ± 0,2	6 ± 0,1	НО	НО
10A	2 ± 0,1	4 ± 0,3	НО	НО
11A	2 ± 0,25	6 ± 0,5	2 ± 0,1	5 ± 0,2
12F	3 ± 0,4	5 ± 0,3	НО	НО
14	3 ± 0,1	8 ± 0,4	6 ± 0,4	8 ± 0,2
15F	4 ± 0,2	7 ± 0,2	3 ± 0,4	6 ± 0,1
15B	2 ± 0,2	7 ± 0,1	НО	НО
18C	-	4 ± 0,1	2 ± 0,2	4 ± 0,3
19A	3 ± 0,1	6 ± 0,4	2 ± 0,1	5 ± 0,1
19F	3 ± 0,1	7 ± 0,3	3 ± 0,6	8 ± 0,3
22F	-	3 ± 0,1	НО	НО
23A	2 ± 0,3	7 ± 0,1	4 ± 0,2	8 ± 0,5
23F	2 ± 0,1	7 ± 0,4	3 ± 0,4	7 ± 0,3
33F	2 ± 0,4	4 ± 0,2	НО	НО

НО – не определяли

Н. Пирогенность заявляемых пневмококковых конъюгированных вакцин (ПКВ) Определение пирогенности заявляемых 23-валентной и 14-валентной пневмококковых конъюгированных вакцин проводили в соответствии с требованиями ГФ XIV, ОФС.1.2.4.0005.15 «Пирогенность» [iv].

23-валентные ПКВ разводили в 10 раз в апиrogenном физиологическом растворе (0,9% -ном хлориде натрия) до концентрации 9,2 мкг/мл для конъюгатов КПС с белком-носителем CRM₁₉₇ и до концентрации 9,6 мкг/мл для конъюгатов КПС с липидосодержащим носителем Ас₃-ЛПС.

14-валентные ПКВ разводили в 10 раз в апиrogenном физиологическом растворе (0,9% -ном хлориде натрия) до концентрации 5,6 мкг/мл для конъюгатов КПС с белком-носителем CRM₁₉₇ и до концентрации 7,8 мкг/мл для конъюгатов КПС с липидосодержащим носителем Ас₃-ЛПС.

Исследуемые препараты вводили внутривенно трём кроликам породы шиншилла массой 2,3-2,6 кг из расчёта 1 мл испытуемого раствора вакцины на 1 кг массы животного. Согласно установленным нормам, препарат считается апиrogenным, если он не вызывает подъем температуры ни у одного из трех подопытных кроликов более, чем на 0,5 °С по сравнению с исходной температурой, а сумма подъемов температур у трех подопытных кроликов не превышает 1,2 °С («Пирогенность» [iv]). При проверке пирогенности *in vivo* все исследуемые вакцинные препараты были апиrogenны и не вызывали подъема температуры ни у одного из трех подопытных кроликов более, чем на 0,4 °С по сравнению с исходной температурой, а сумма подъемов температур у трех подопытных

кроликов не превышала $\pm 0,6$ °С (табл. 11), что соответствует критериям апиrogenности.

Таблица 11

Пирогенность заявляемых пневмококковых конъюгированных вакцин (ПКВ)

Препарат	Показатели температуры
Заявляемая 23-валентная ПКВ-CRM ₁₉₇	(+ 0°С; +0,2°С; + 0,2°С) + 0,4 °С
Заявляемая 14-валентная ПКВ-CRM ₁₉₇	(+ 0,2°С; +0,1°С; + 0°С) + 0,3 °С
Заявляемая 23-валентная ПКВ-Ас ₃ -ЛПС	(+ 0,2°С; +0,3°С; + 0°С) + 0,5 °С
Заявляемая 14-валентная ПКВ-Ас ₃ -ЛПС	(+ 0,2°С; +0,2°С; + 0,1°С) + 0,5 °С

Заявляемые изобретения для ясности их понимания описаны в некоторых подробностях выше, в Примерах 1- 4, однако на практике могут быть выполнены некоторые их изменения и модификации в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинация пневмококковых капсульных полисахаридов бактерии *Streptococcus pneumoniae*, включающая 23 серотипа: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15F, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23F, 33F.
2. Вакцина, включающая эффективное количество комбинации пневмококковых капсульных полисахаридов 23-х серотипов бактерии *S. pneumoniae* по п.1.
3. Вакцина по п.2, в которой комбинация пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов бактерии *S. pneumoniae* является апиrogenной для кролика в дозе до 57,5 мкг/кг веса в тесте пирогенности на кроликах.
4. Вакцина по п.2 или п.3, вызывающая защиту от бактерий *S. pneumoniae* путем индукции гуморального иммунного ответа у млекопитающих с образованием серотип-специфических IgG и IgM.
5. Вакцина по п.2, без примеси С-полисахарида.
6. Вакцина по п.2, содержащая менее 2 мас.% С-полисахарида.
7. Вакцина по п.2, в которой примесь белков и нуклеиновых кислот составляет менее 2 мас.%.
8. Вакцина по п.2, включающая фармацевтически приемлемые добавки.
9. Вакцина по п.8, в которой фармацевтически приемлемые добавки выбраны из группы, включающей стабилизаторы рН, консерванты, адъюванты, изотонирующие агенты и их комбинации.
10. Вакцина по любому из пп.2 - 9, в которой пневмококковые капсульные полисахариды содержатся в неконъюгированной форме.
11. Вакцина по п.8, включающая в качестве фармацевтически приемлемой добавки белковый носитель или липидосодержащий носитель.
12. Вакцина по п.11, включающая в качестве белкового носителя рекомбинантный белок CRM197.
13. Вакцина по п.11, включающая в качестве липидосодержащего носителя триацильный липополисахарид или триацильный липоолигосахарид эндотоксичных бактерий.
14. Вакцина по п.13, в которой эндотоксичные бактерии выбраны из группы, включающей бактерии рода *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Bordetella*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Klebsiella*, *Chlamydia*, *Corynebacterium* или их комбинации.
15. Вакцина по любому из пп.11 – 14, в которой пневмококковые капсульные полисахариды содержатся в конъюгированной форме.

16. Вакцина по любому из пп. 2 – 15, имеющая лекарственную форму, выбранную из группы, включающей стерильный раствор для инъекций; аэрозоль, спрей, капли, ингаляции для подкожного, внутримышечного, интраназального или ингаляционного введения; таблетки, капсулы, пеллеты для энтерального введения.
17. Комбинация пневмококковых капсульных полисахаридов бактерии *S.pneumoniae*, включающая 14 серотипов: 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 11А, 14, 15F, 18С, 19А, 19F, 23А, 23F .
18. Комбинация по п. 17, дополнительно включающая по меньшей мере один капсульный полисахарид бактерии *S.pneumoniae*, выбранный из группы, состоящей из полисахаридов серотипов 1, 8, 9N, 9V, 10А, 12F, 15В, 22F и 33F, где указанная комбинация представляет собой 15-, 16-, 17-, 18-, 19-, 20-, 21-, 22- или 23-компонентную комбинацию пневмококковых капсульных полисахаридов бактерии *S.pneumoniae*.
19. Вакцина, включающая эффективное количество комбинации пневмококковых капсульных полисахаридов 14-ти серотипов бактерии *S. pneumoniae* по п.17.
20. Вакцина по п.19, дополнительно включающая по меньшей мере один капсульный полисахарид бактерии *S.pneumoniae*, выбранный из группы, состоящей из полисахаридов серотипов 1, 8, 9N, 9V, 10А, 12F, 15В, 22F и 33F, где указанная вакцина представляет собой 15-, 16-, 17-, 18-, 19-, 20-, 21-, 22- или 23-валентную вакцину.
21. Вакцина по п.19 или п.20, в которой комбинация пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов бактерии *S. pneumoniae* является апириогенной для кролика в дозе от 35 до 57,5 мкг/кг веса в тесте пирогенности на кроликах.
22. Вакцина по п.19 или п.20, вызывающая защиту от бактерий *S. pneumoniae* путем индукции гуморального иммунного ответа у млекопитающих с образованием серотип-специфических IgG и IgM.
23. Вакцина по п.19 или п.20, без примеси С-полисахарида.
24. Вакцина по п.19 или п.20, содержащая менее 2 мас.% С-полисахарида.
25. Вакцина по п.19 или п.20, в которой примесь белков и нуклеиновых кислот составляет менее 2 мас.%.
26. Вакцина по п.19 или п.20, включающая фармацевтически приемлемые добавки.
27. Вакцина по п.26, в которой фармацевтически приемлемые добавки выбраны из группы, включающей стабилизаторы рН, консерванты, адьюванты, изотонирующие агенты и их комбинации.
28. Вакцина по любому из пп. 19 - 27, в которой пневмококковые капсульные полисахариды содержатся в неконъюгированной форме.
29. Вакцина по п.26, включающая в качестве фармацевтически приемлемой добавки белковый носитель или липидосодежащий носитель.

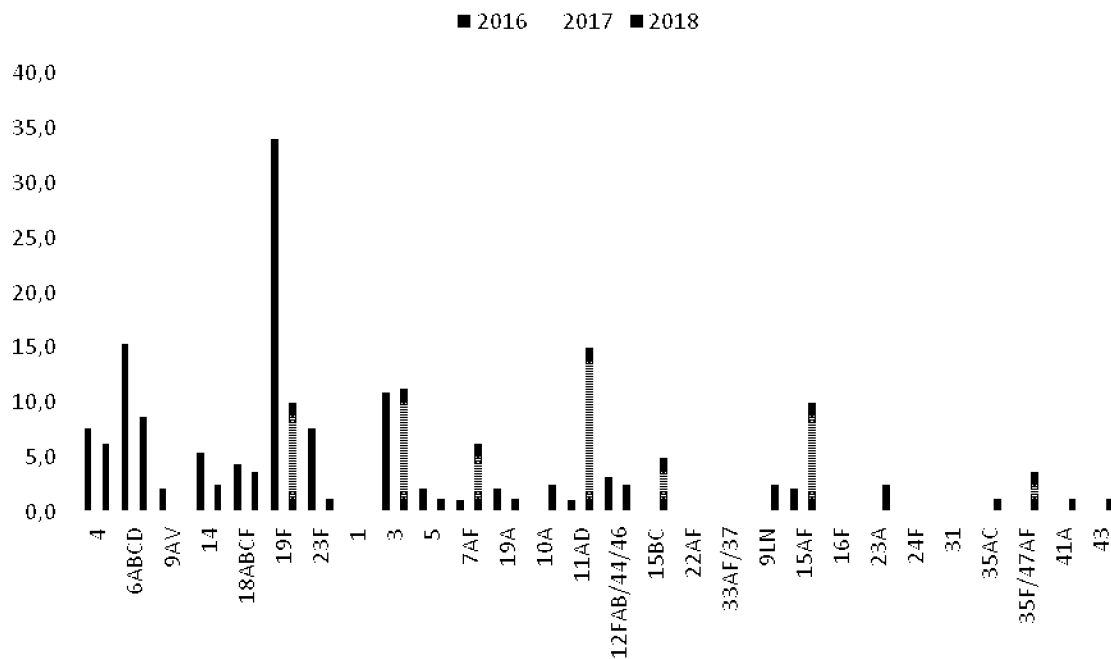
30. Вакцина по п.29, включающая в качестве белкового носителя рекомбинантный белок CRM197.
31. Вакцина по п.29, включающая в качестве липидосодержащего носителя триацильный липополисахарид или триацильный липоолигосахарид эндотоксичных бактерий.
32. Вакцина по п.31, в которой эндотоксичные бактерии выбраны из группы, включающей бактерии рода *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Bordetella*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Klebsiella*, *Chlamydia*, *Corynebacterium* или их комбинации.
33. Вакцина по любому из пп.29–32, в которой пневмококковые капсульные полисахариды содержатся в конъюгированной форме.
34. Вакцина по любому из пп.19 – 33, имеющая лекарственную форму, выбранную из группы, включающей стерильный раствор для инъекций; аэрозоль, спрей, капли, ингаляции для подкожного, внутримышечного, интраназального или ингаляционного введения; таблетки, капсулы, пеллеты для энтерального введения.
35. Способ получения высокоочищенного капсульного полисахарида бактерии *S. pneumoniae*, предусматривающий
- i) получение культуры бактерий в жидкой фазе;
 - ii) отделение жидкой фазы от бактериальных клеток;
 - iii) удаление из жидкой фазы бактериальных белков и нуклеиновых кислот с получением раствора капсульного полисахарида;
 - iv) осуществление катионообменной хроматографии раствора капсульного полисахарида с получением раствора целевого продукта.
36. Способ по п.35, дополнительно включающий диафильтрацию раствора целевого продукта с последующей лиофилизацией полученного концентрата с получением сухого целевого продукта.
37. Способ по п.35, в котором отделение жидкой фазы от бактериальных клеток осуществляют методом тангенциальной микрофльтрации на мембране с пределом отсечки 0,22 мкм с получением фильтрата жидкой фазы.
38. Способ по п.37, в котором полученный фильтрат жидкой фазы подвергают в дальнейшем концентрированию с последующей диафильтрацией полученного концентрата 0,2 М раствором хлорида натрия.
39. Способ по п.38, в котором концентрирование полученного фильтрата жидкой фазы осуществляют методом ультрафльтрации на мембране с пределом отсечки 100 кДа в тангенциальном режиме.
40. Способ по п.35, в котором удаление из жидкой фазы бактериальных белков и нуклеиновых кислот осуществляют после её ферментативной или кислотной обработки.
41. Способ по п.40, в котором для ферментативной обработки жидкой фазы используют нуклеазы и протеазы.

42. Способ по п.35 или п.40, в котором удаление из жидкой фазы бактериальных белков и нуклеиновых кислот осуществляют методом тангенциальной ультрафильтрации в границах отсечки 100 кДа с получением раствора капсульного полисахарида.
43. Способ по п.35, в котором в качестве катионообменной хроматографии используют жидкостную колоночную хроматографию.
44. Способ по п.43, в котором в качестве жидкостной колоночной хроматографии используют колоночную хроматографию низкого давления с детектированием целевого продукта.
45. Способ по п.35 или п.43, или п.44, в котором в качестве сорбента для катионообменной хроматографии используют гелевую или макропористую катионообменную смолу.
46. Способ по п.45, в котором катионообменная смола выбрана из группы, включающей смолу на основе целлюлозы, сефадексов, сефароз, сефакрилов и TSK-геля.
47. Способ по п.35, в котором капсульный полисахарид бактерии *S. pneumoniae* выбран из группы, включающей полисахариды серотипов 3, 4, 5, 6A, 6B, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 15F, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A и 23F.
48. Способ по п.35 или п.36, обеспечивающий получение целевого продукта с неизменной первичной структурой молекулы и неальтерированными антигенными детерминантами.
49. Способ по п.35 или п.36, обеспечивающий получение целевого продукта без примеси С-полисахарида.
50. Способ по п.35 или п.36, обеспечивающий получение целевого продукта с содержанием С-полисахарида менее 2 мас.%.
51. Способ по п.35 или п.36, обеспечивающий получение целевого продукта с содержанием белков и нуклеиновых кислот менее 2 мас.%.
52. Применение комбинации пневмококковых капсульных полисахаридов 23-х серотипов бактерии *S. pneumoniae* по п.1 для производства фармацевтического средства для профилактики или лечения заболеваний, вызываемых бактерией *S. pneumoniae*.
53. Применение по п.52, в котором заболевания, вызываемые бактерией *S. pneumoniae*, выбраны из группы, включающей пневмонию, пневмококковый менингит, средний отит, бактериемию, сепсис или их комбинацию.
54. Применение по п.52, в котором фармацевтическое средство имеет лекарственную форму, выбранную из группы, включающей стерильный раствор для инъекций; аэрозоль, спрей, капли, ингаляции для подкожного, внутримышечного, интраназального или ингаляционного введения; таблетки, капсулы, пеллеты для энтерального введения.
55. Применение комбинации пневмококковых капсульных полисахаридов 14-ти серотипов бактерии *S. pneumoniae* по п.17 для производства фармацевтического средства для профилактики или лечения заболеваний, вызываемых бактерией *S. pneumoniae*.

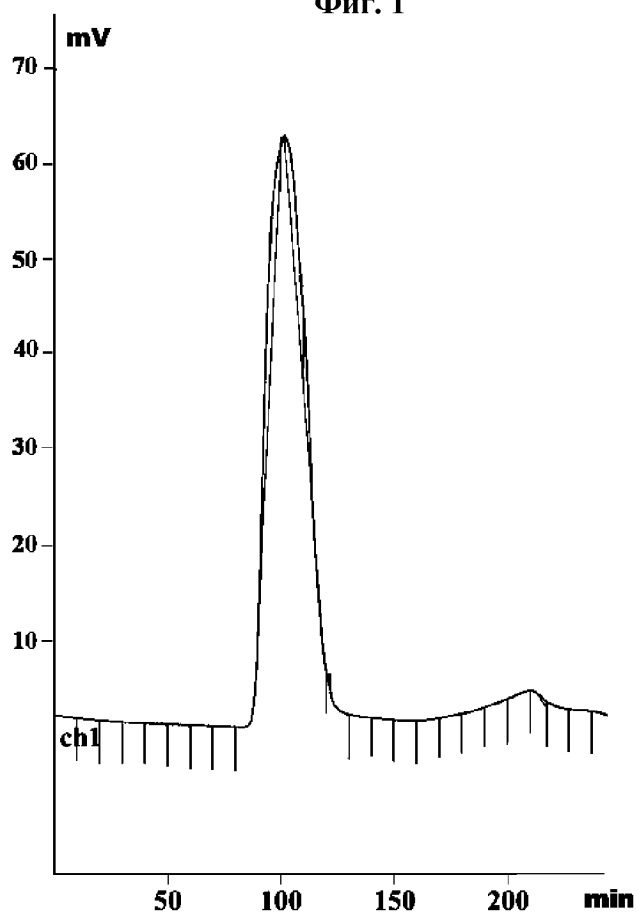
56. Применение по п.55, в котором комбинация пневмококковых капсульных полисахаридов бактерии *S.pneumoniae* дополнительно включает по меньшей мере один капсульный полисахарид, выбранный из группы, состоящей из полисахаридов серотипов 1, 8, 9N, 9V, 10A, 12F, 15B, 22F и 33F, где указанная комбинация представляет собой 15-, 16-, 17-, 18-, 19-, 20-, 21-, 22- или 23-компонентную комбинацию пневмококковых капсульных полисахаридов бактерии *S.pneumoniae*.

57. Применение по п.55 или п.56, в котором заболевания, вызываемые бактерией *S. pneumoniae*, выбраны из группы, включающей пневмонию, пневмококковый менингит, средний отит, бактериемию, сепсис или их комбинацию.

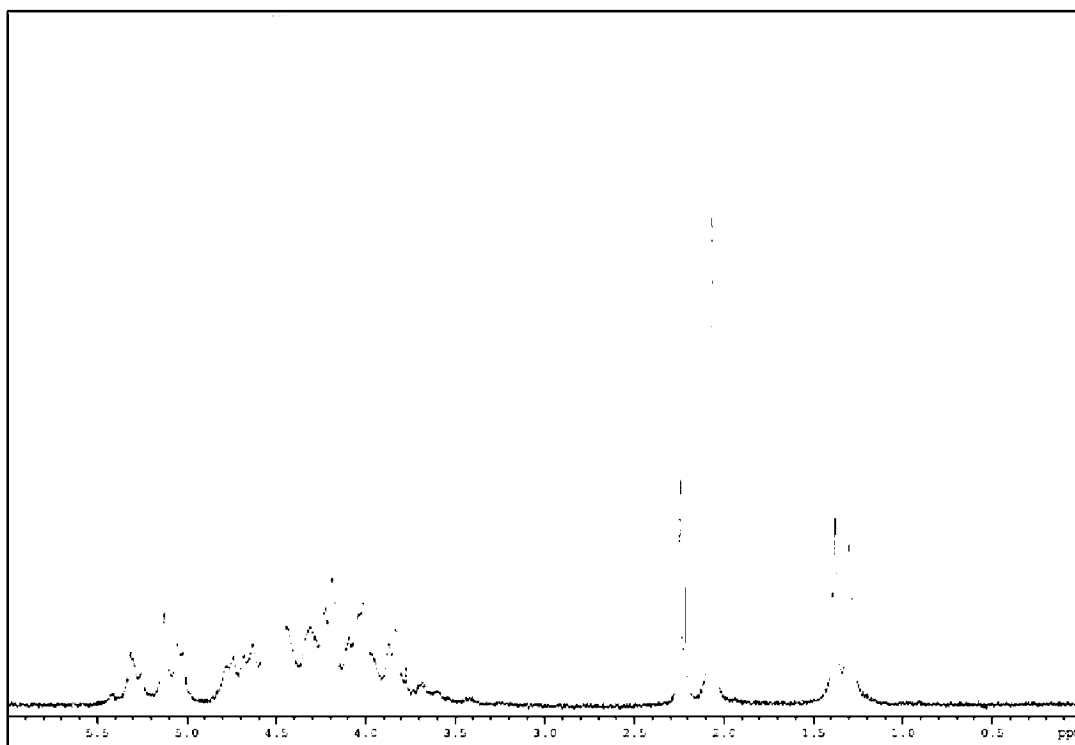
58. Применение по п.55 или п.56, в котором фармацевтическое средство имеет лекарственную форму, выбранную из группы, включающей стерильный раствор для инъекций; аэрозоль, спрей, капли, ингаляции для подкожного, внутримышечного, интраназального или ингаляционного введения; таблетки, капсулы, пеллеты для энтерального введения.



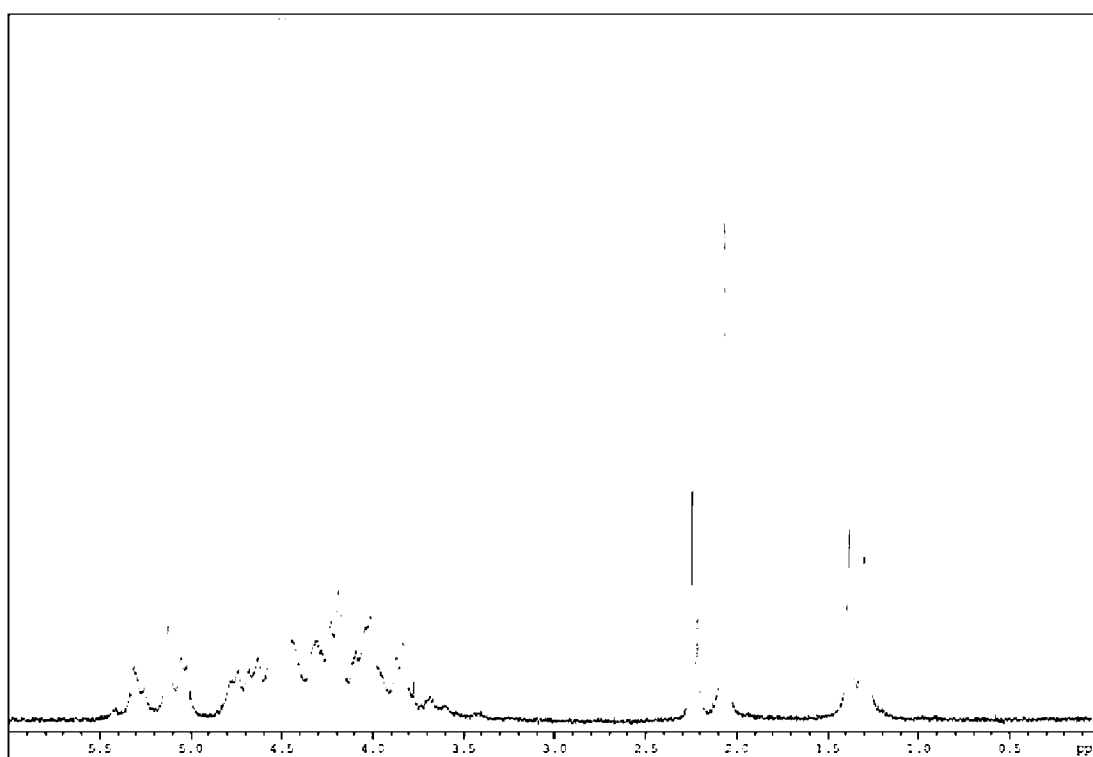
Фиг. 1



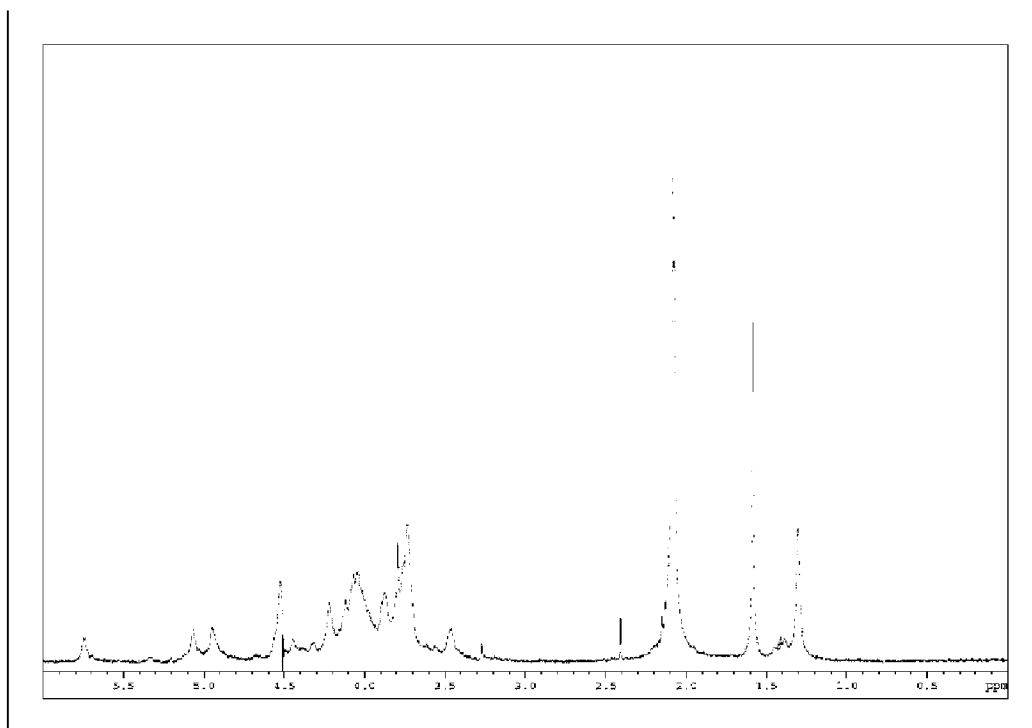
Фиг. 2



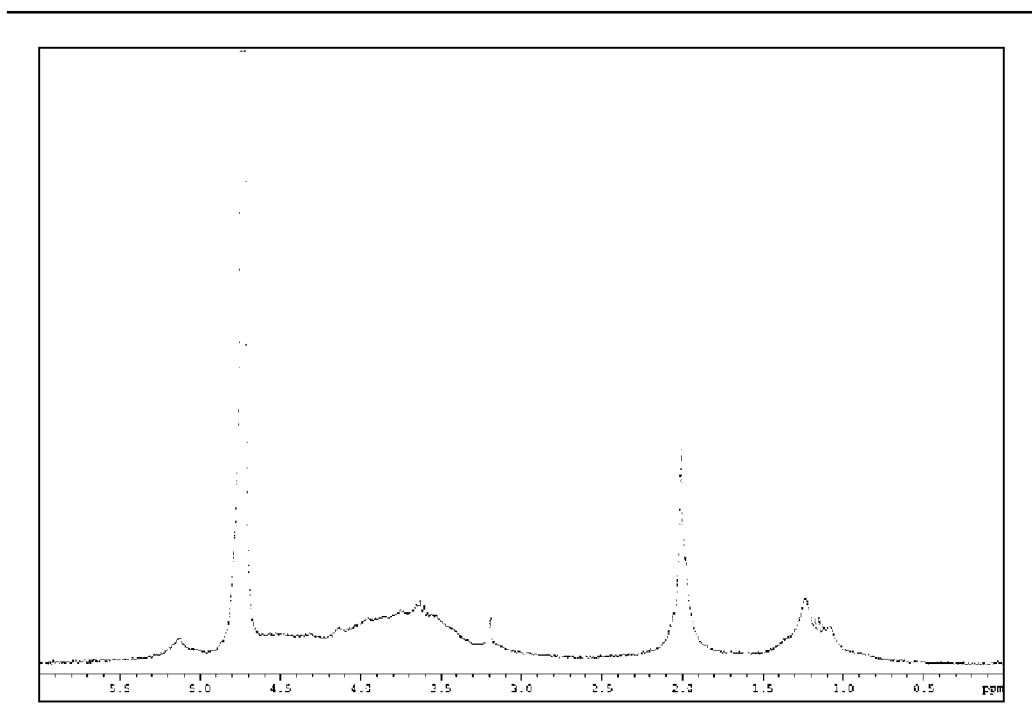
Фиг. 3А



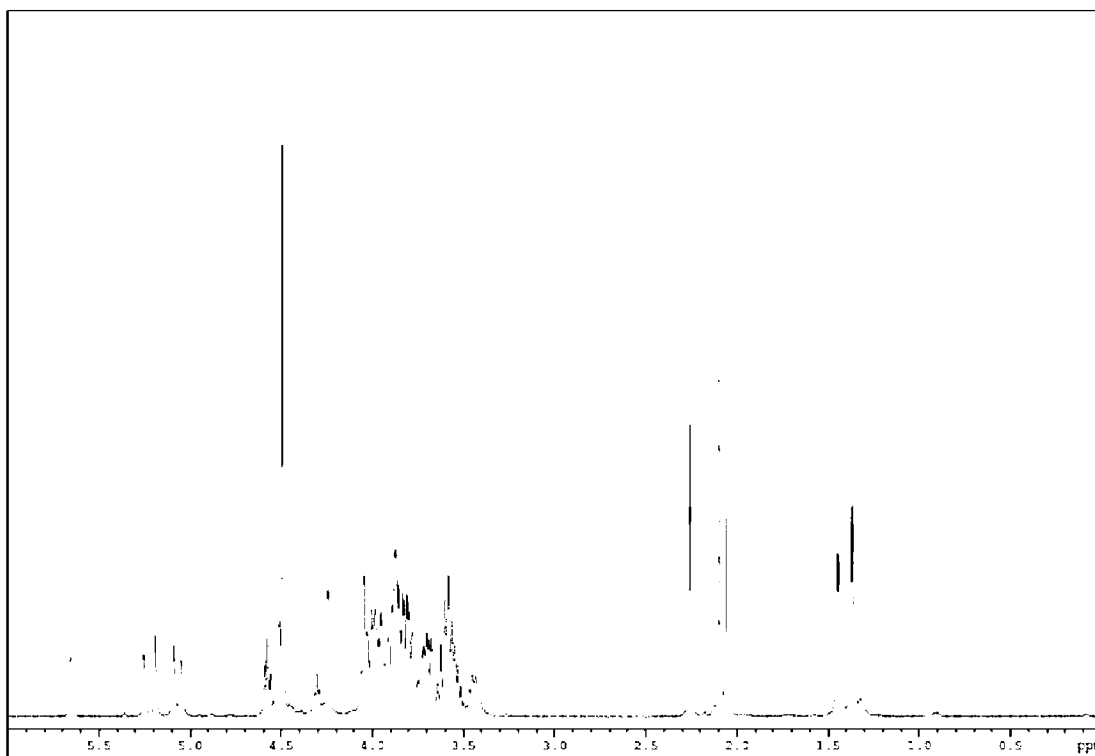
Фиг. 3В



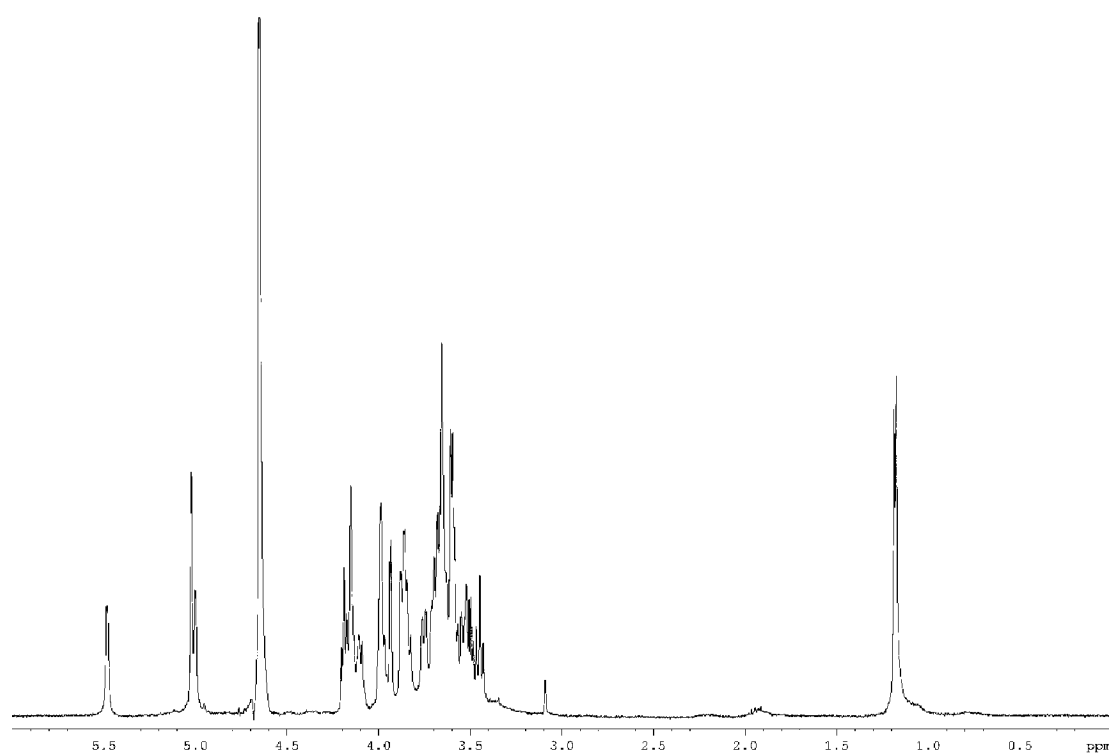
Фиг. 3С



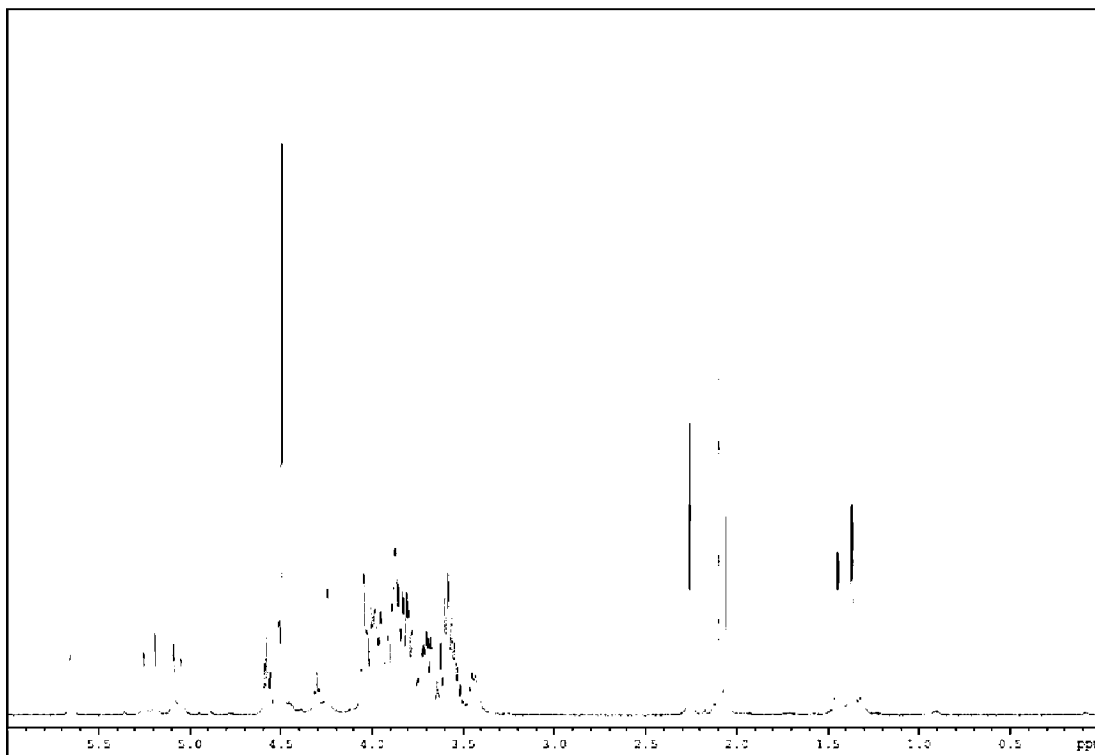
Фиг. 3D



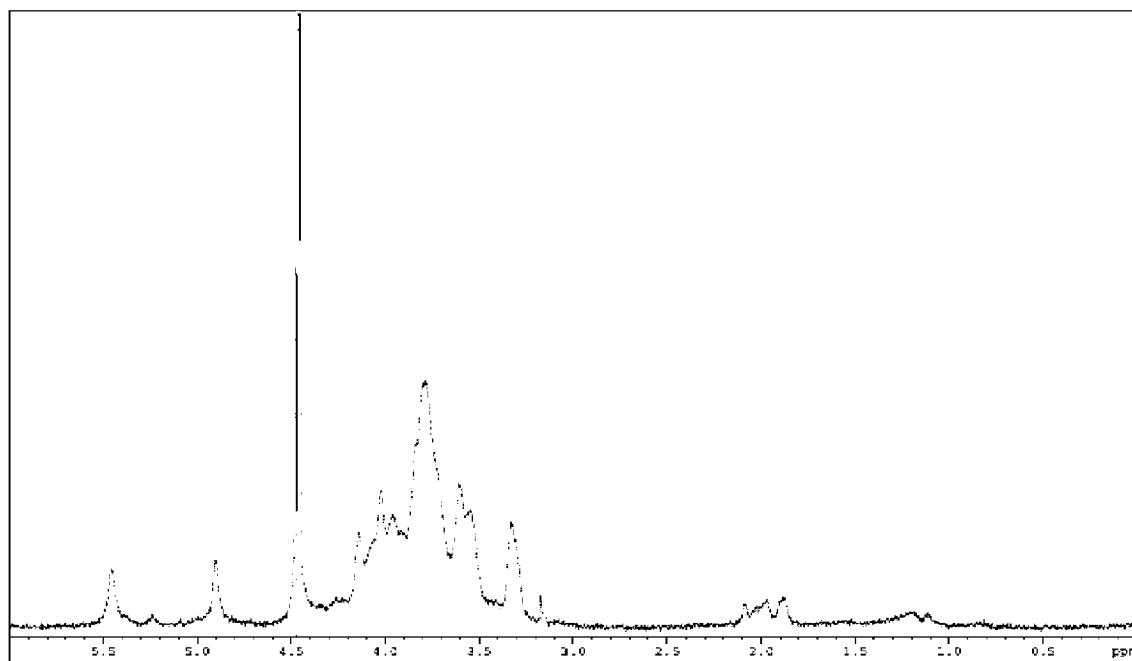
Фиг. 3E



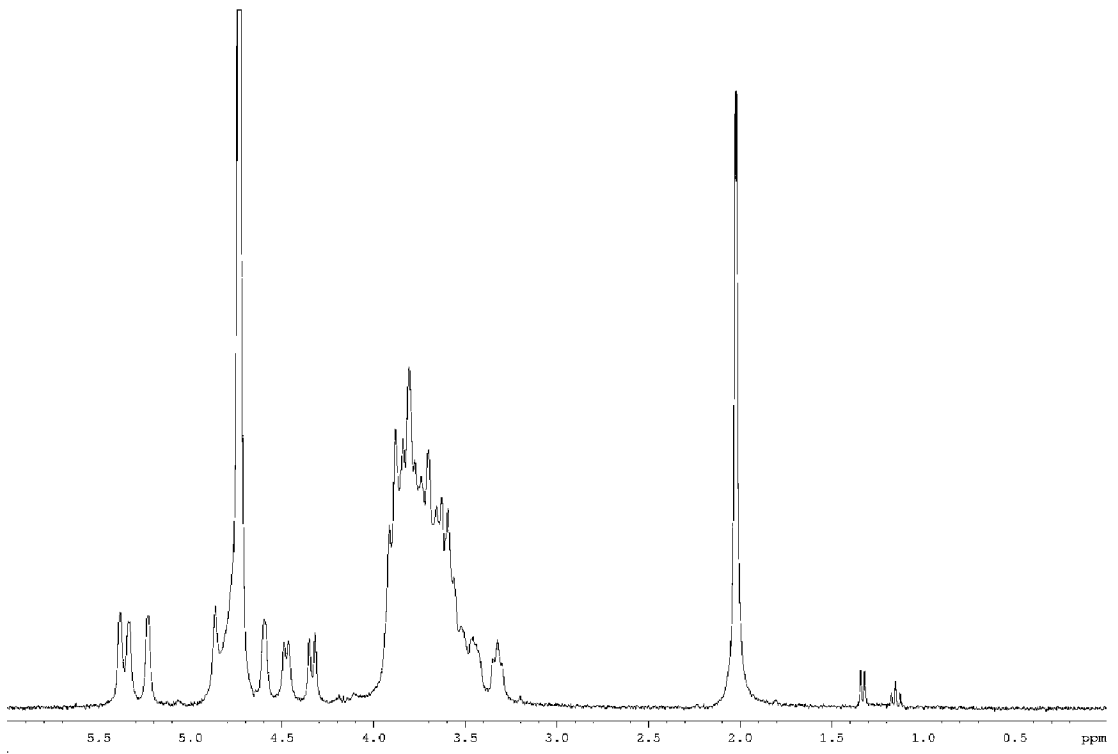
Фиг. 3F



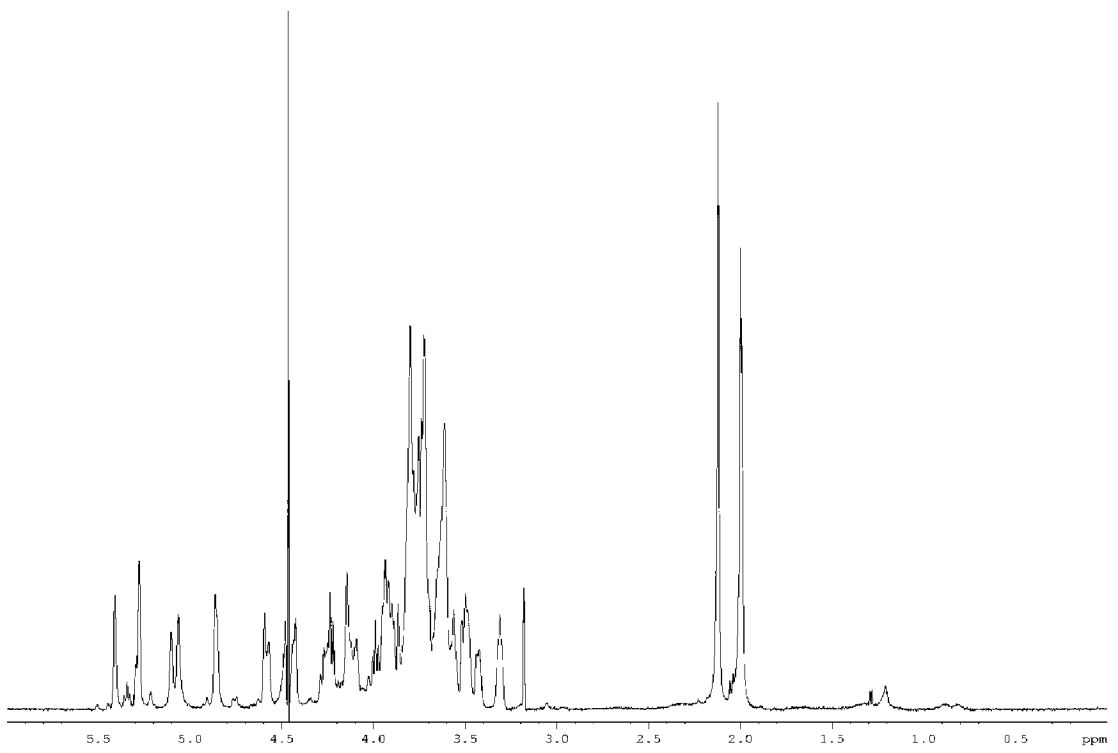
Фиг. 3Г



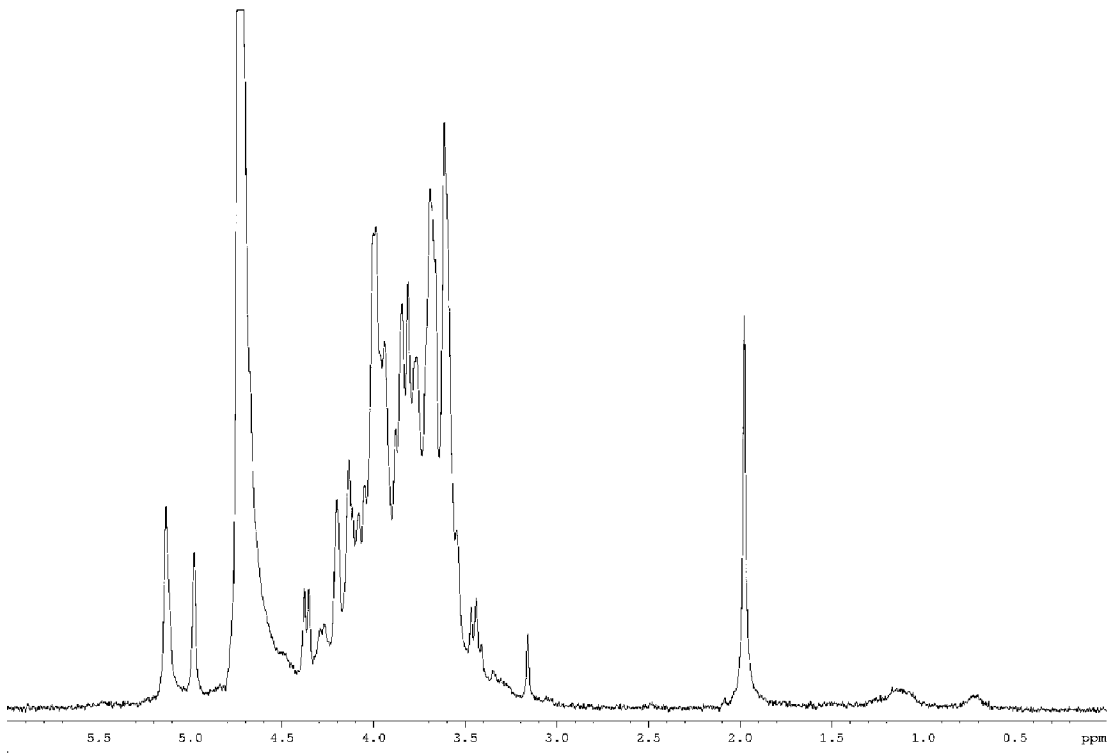
Фиг. 3И



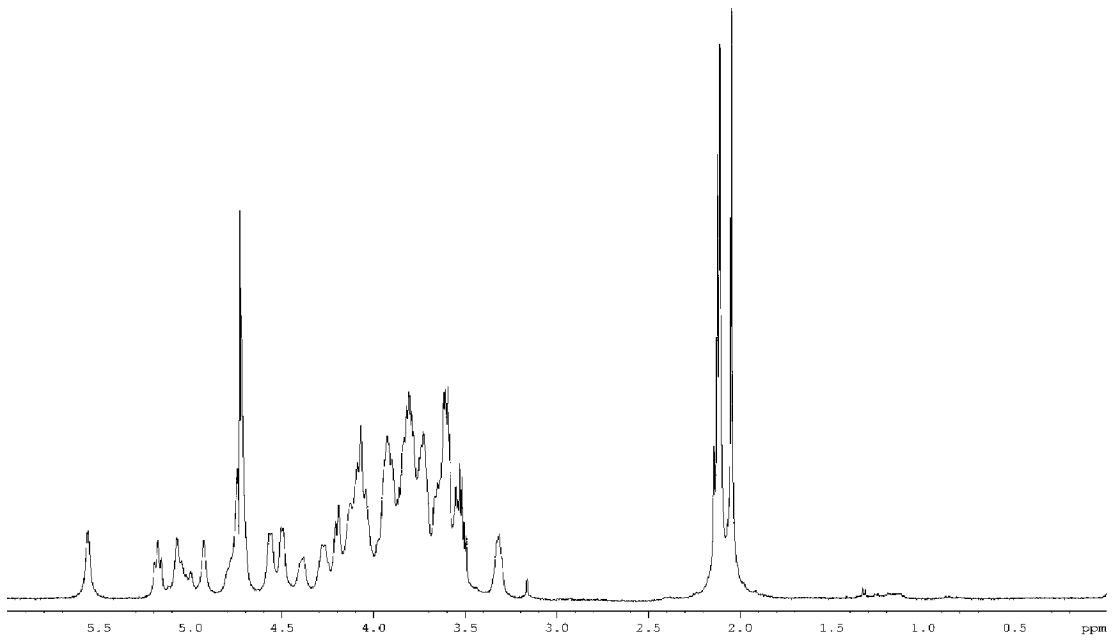
Фиг. 3I



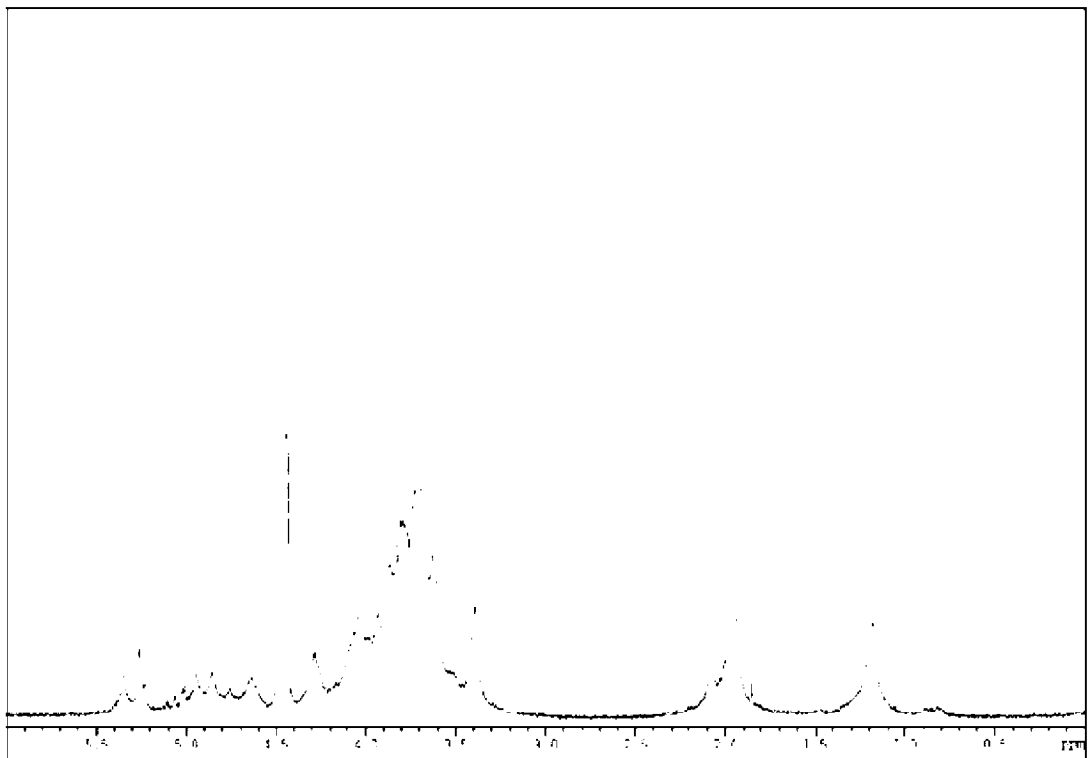
Фиг. 3J



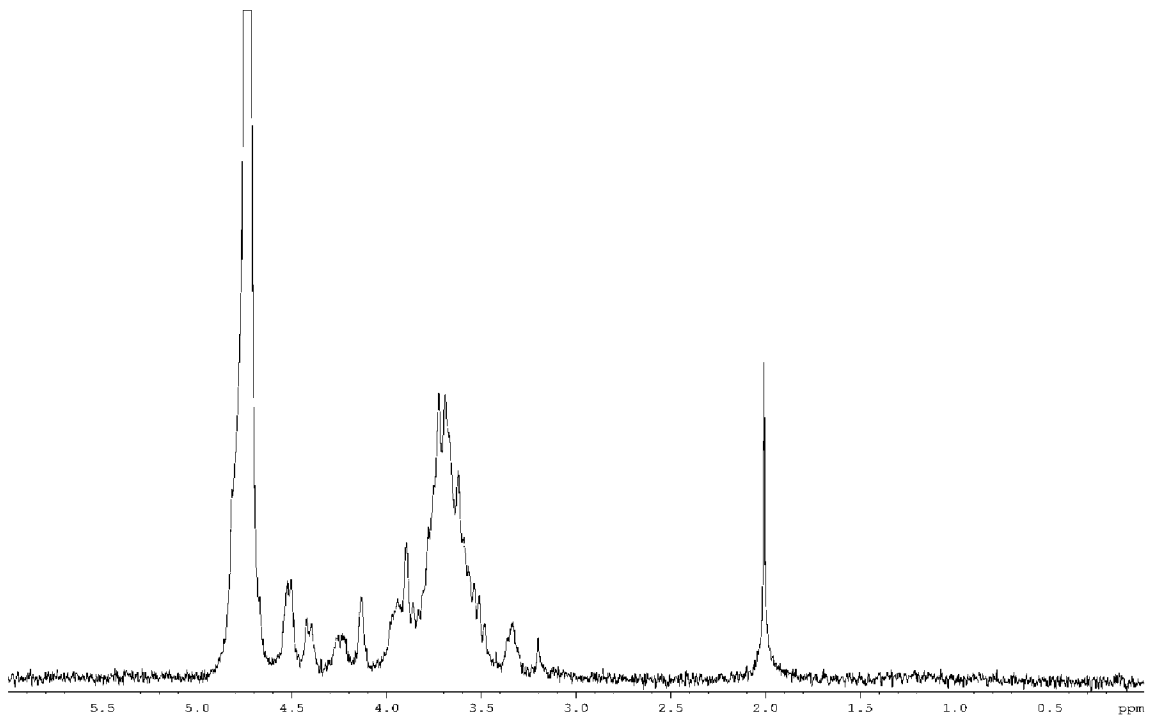
Фиг. 3К



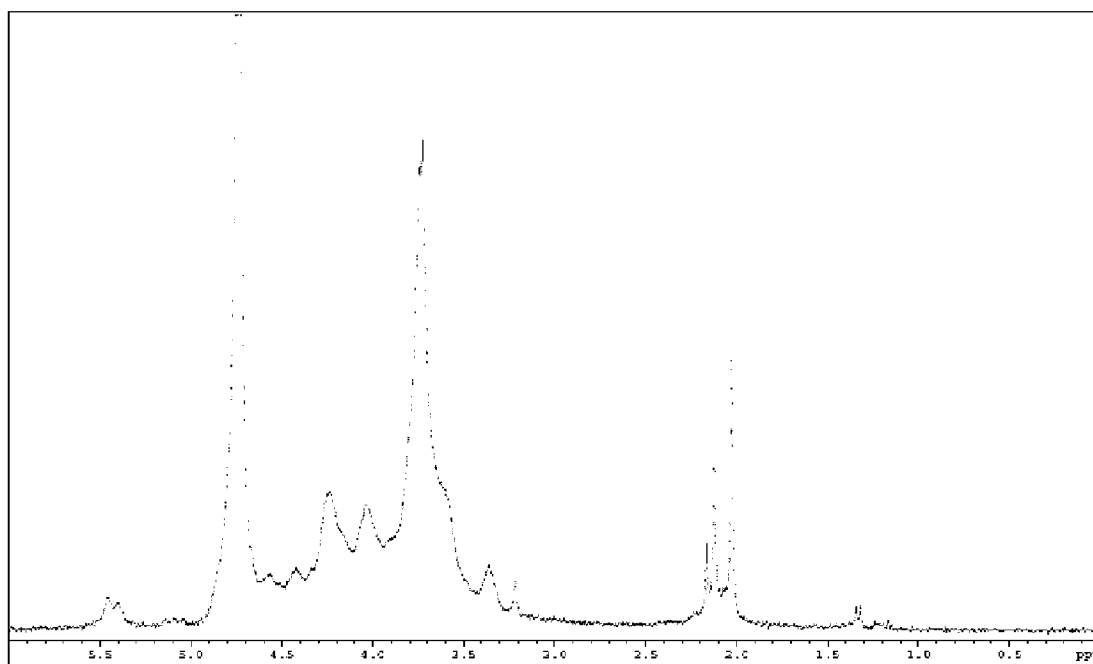
Фиг. 3Л



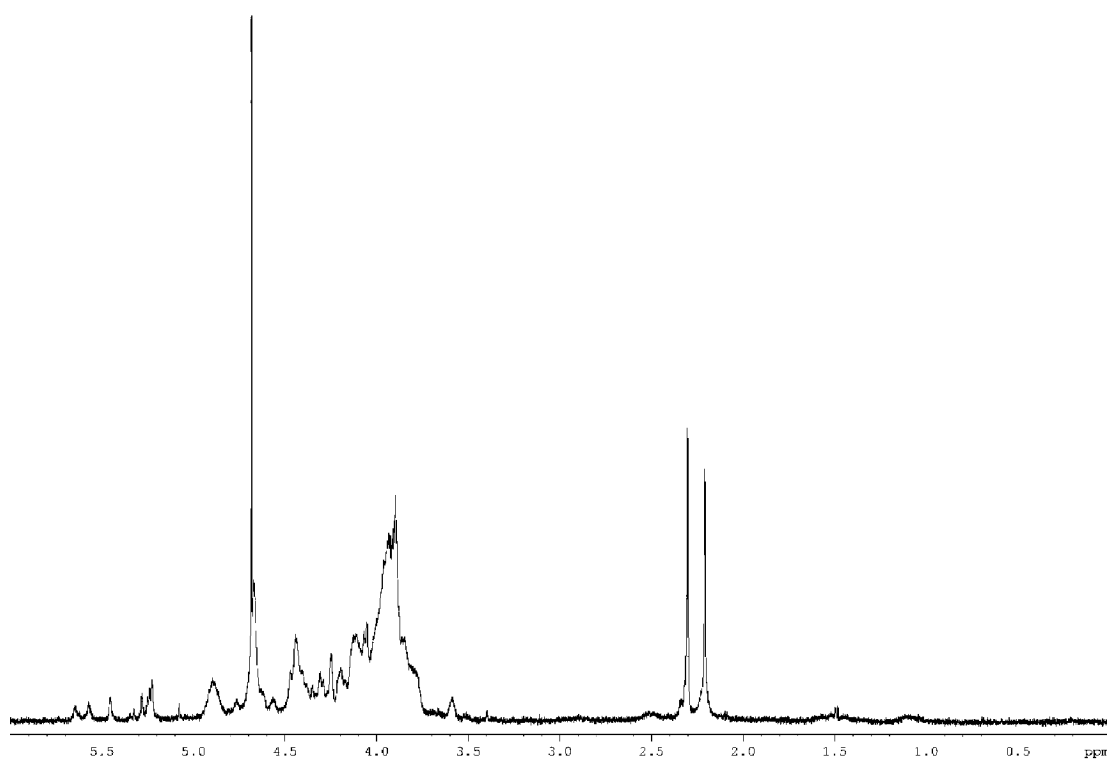
Фиг. 3М



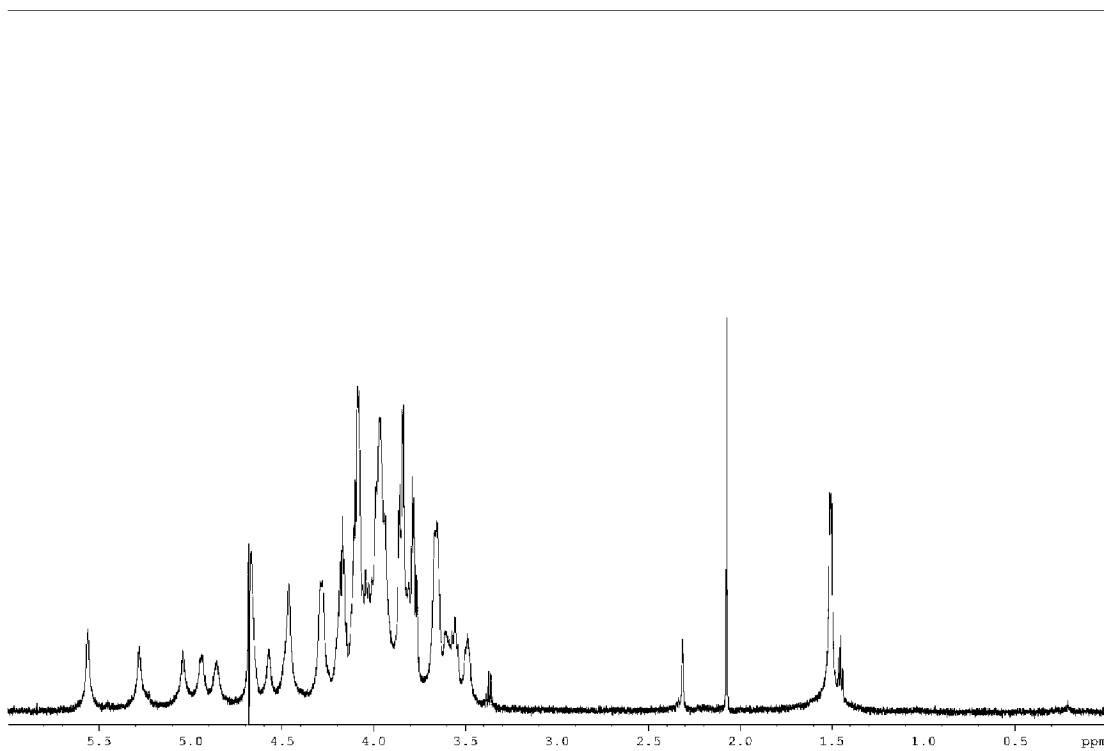
Фиг. 3N



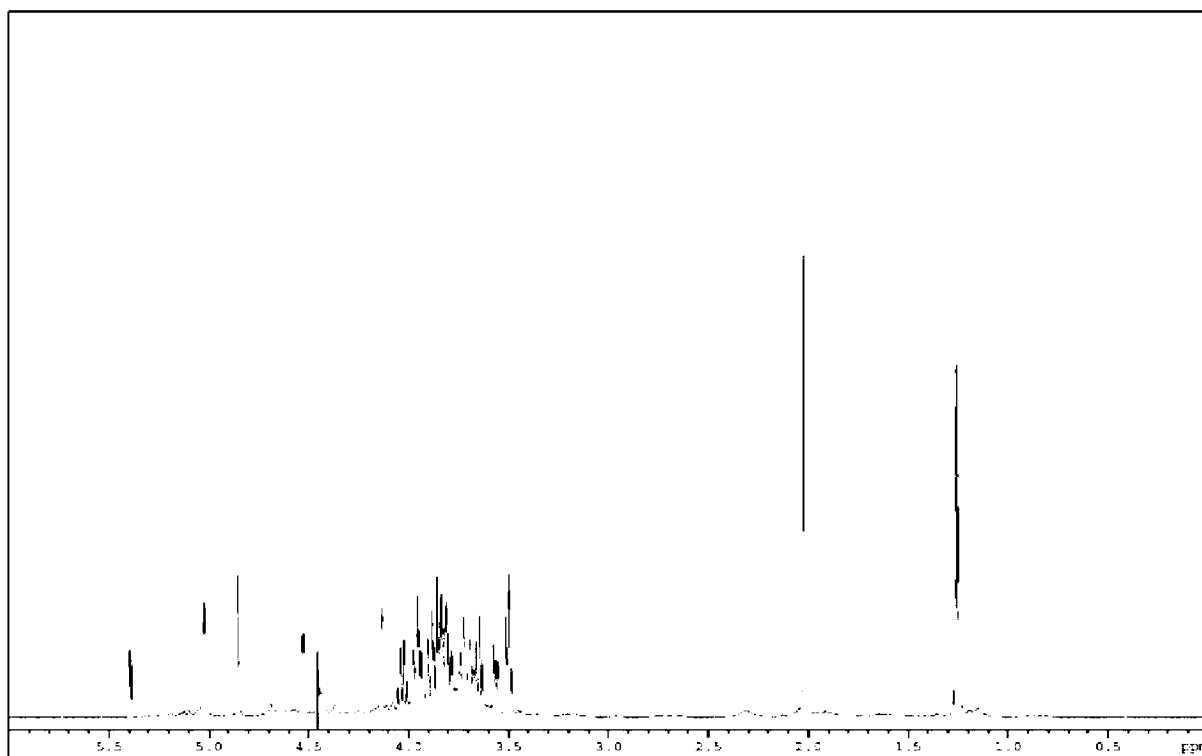
Фиг. 30



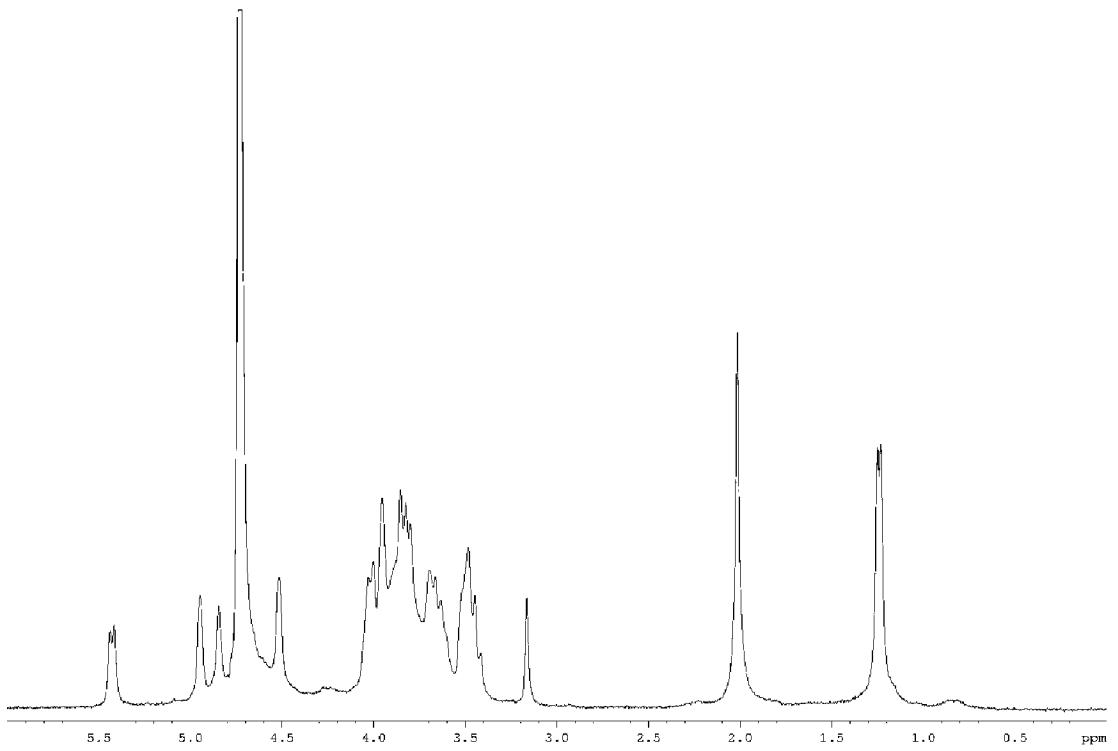
Фиг. 3P



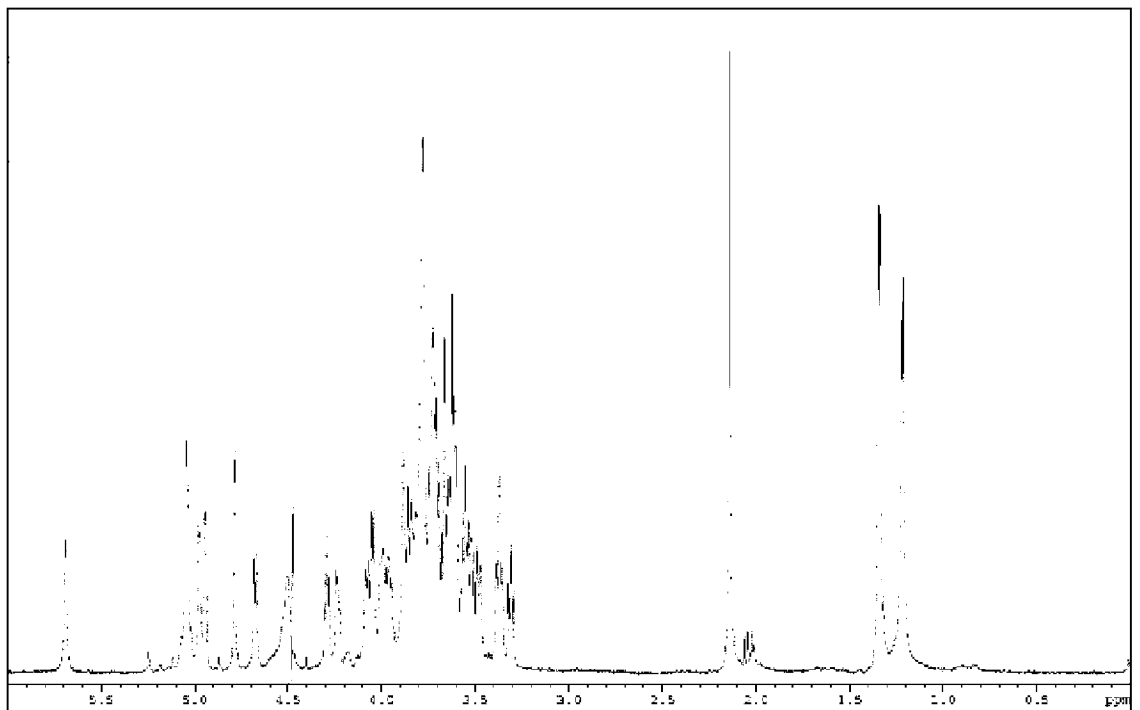
Фиг. 3Q



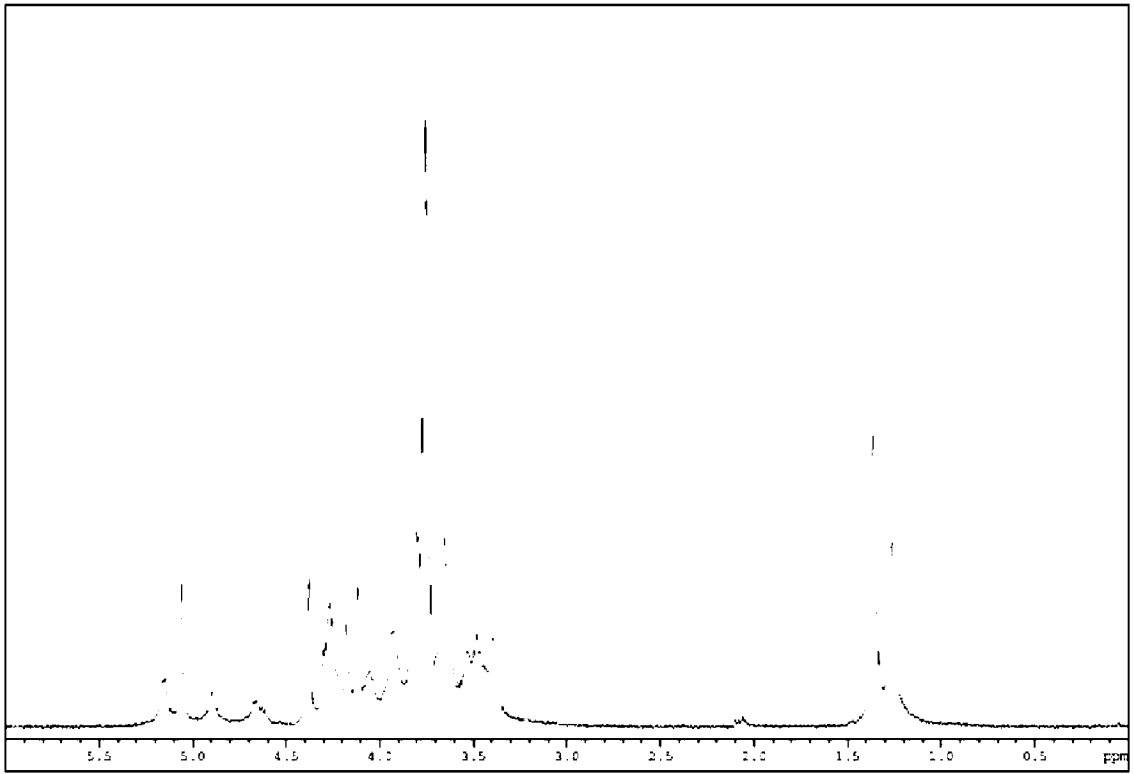
Фиг. 3R



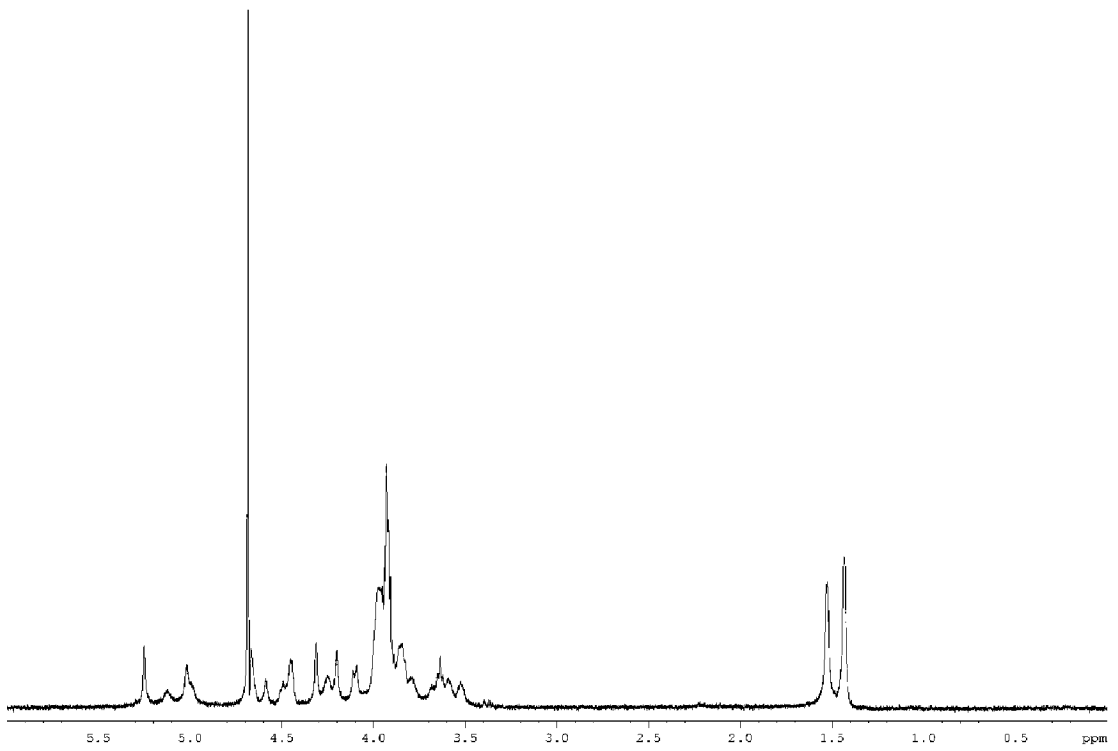
Фиг. 3S



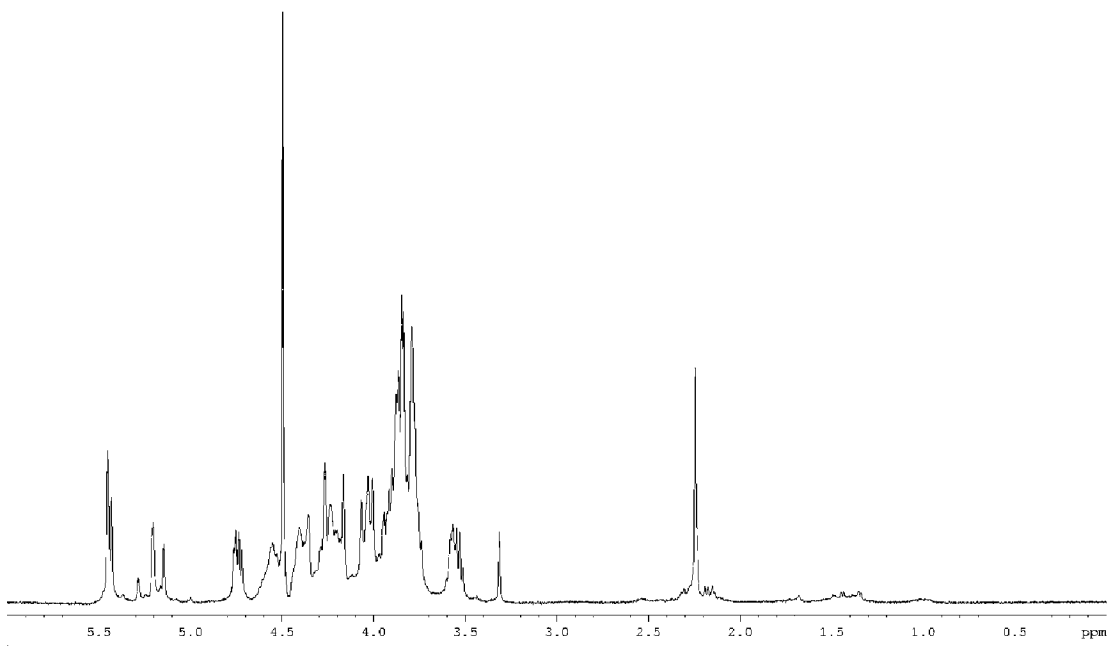
Фиг. 3Т



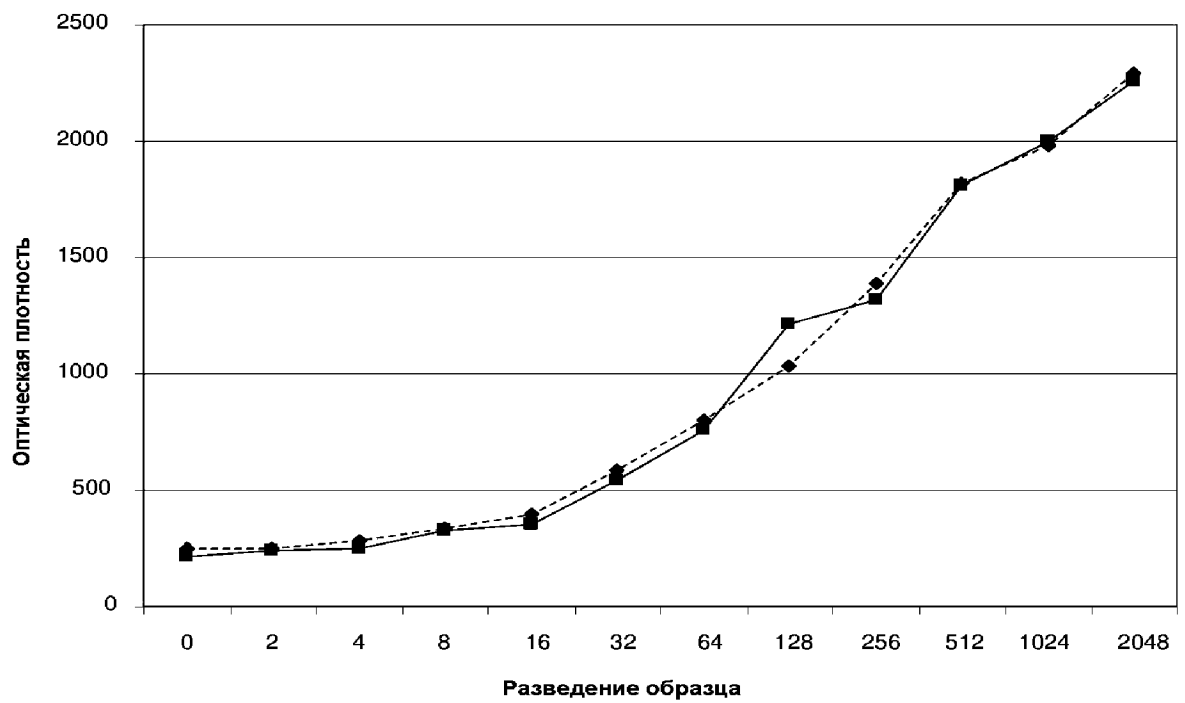
Фиг. 3U



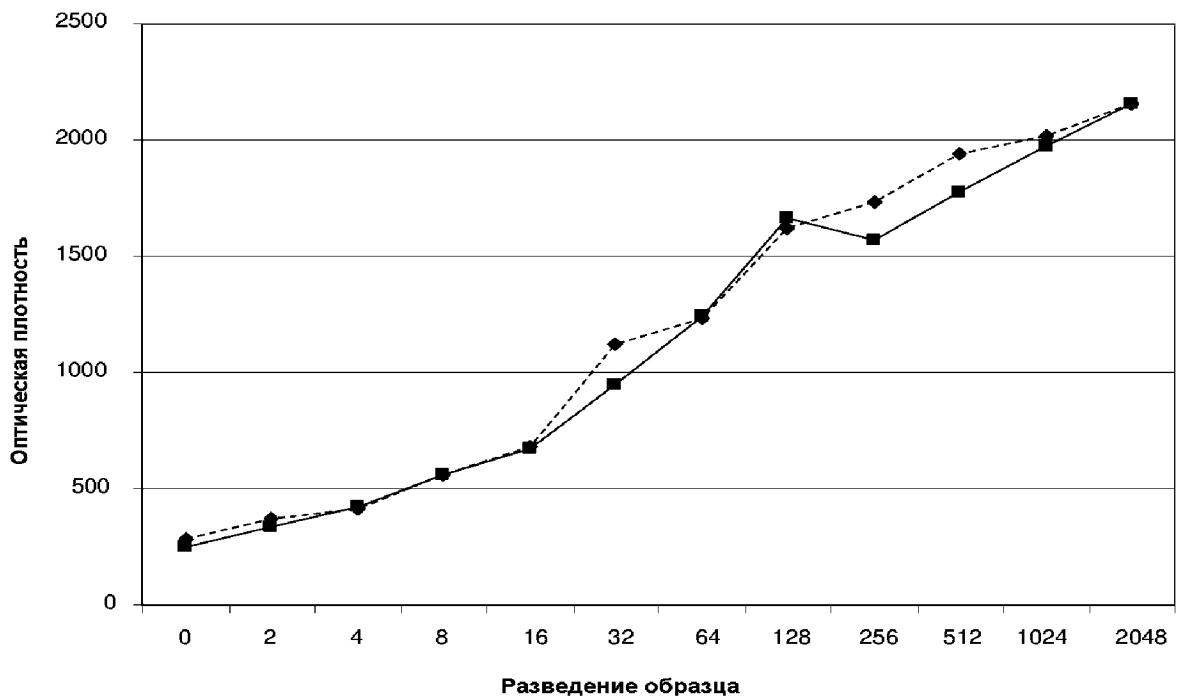
Фиг. 3V



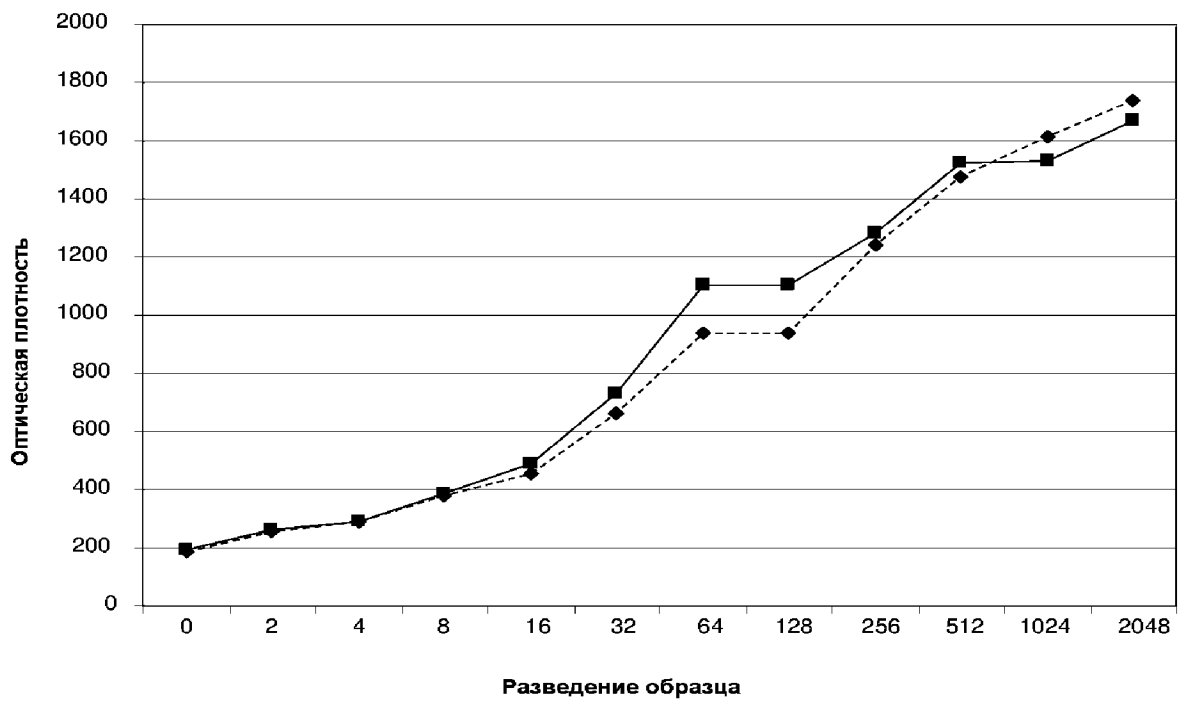
Фиг. 3W



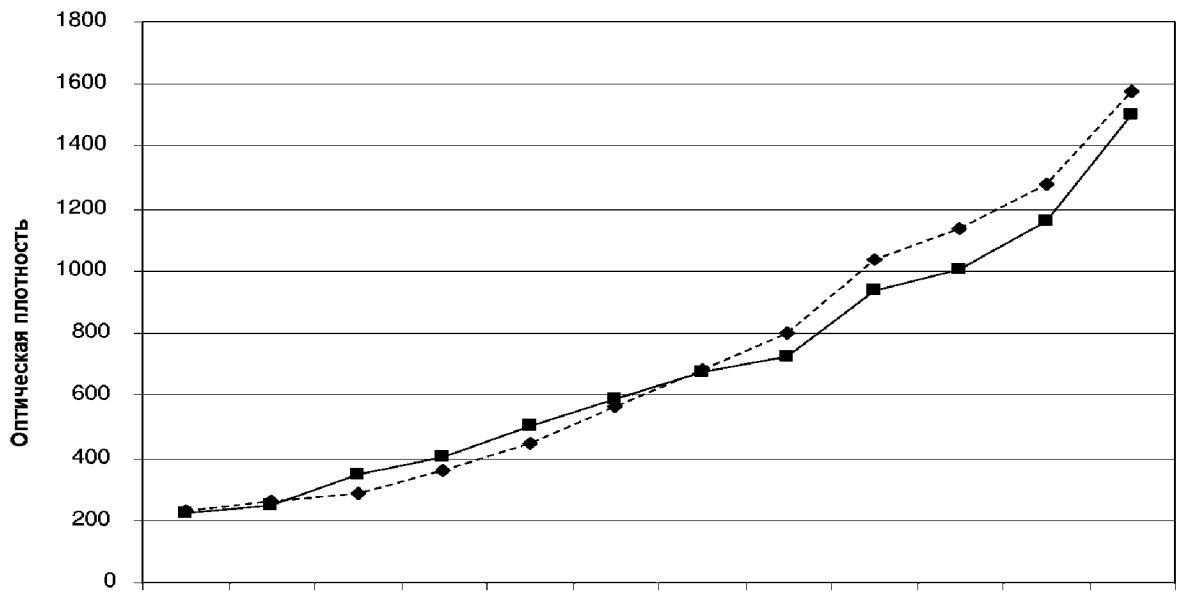
Фиг. 4A



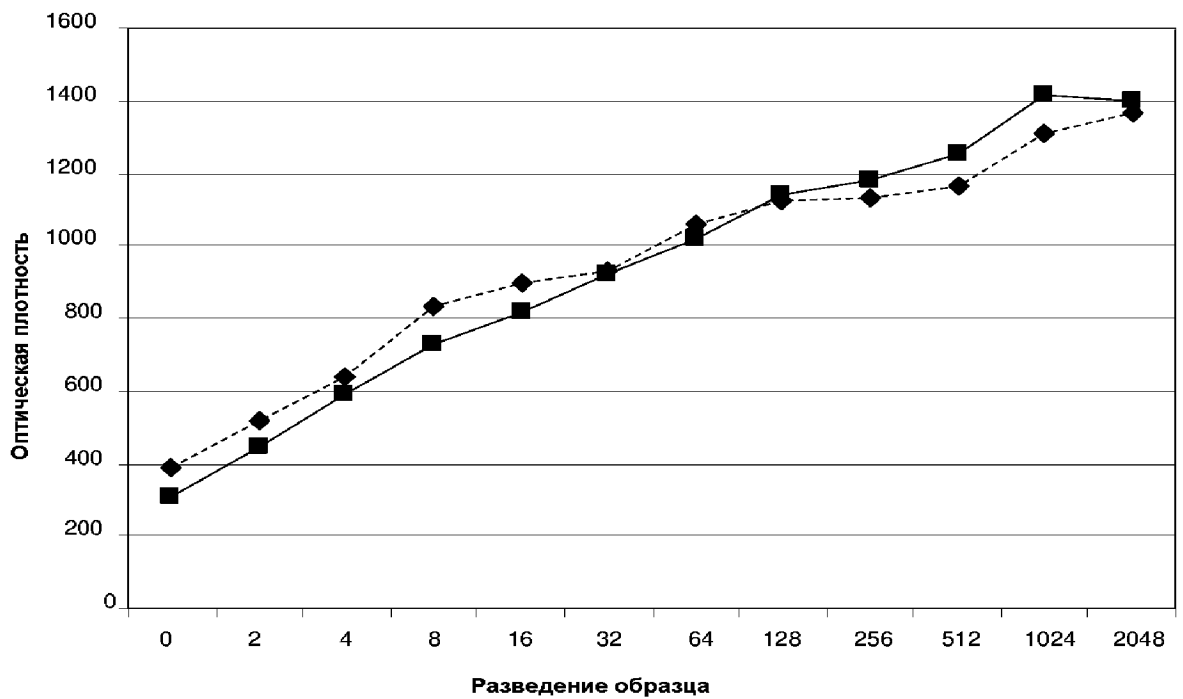
Фиг. 4В



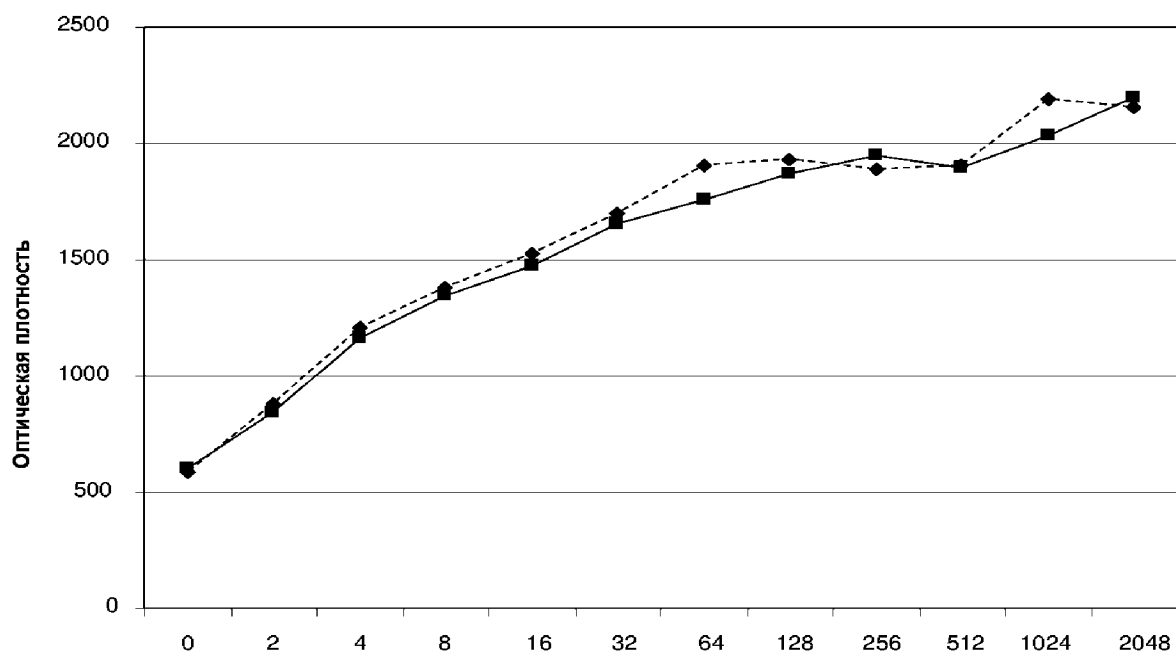
Фиг. 4С



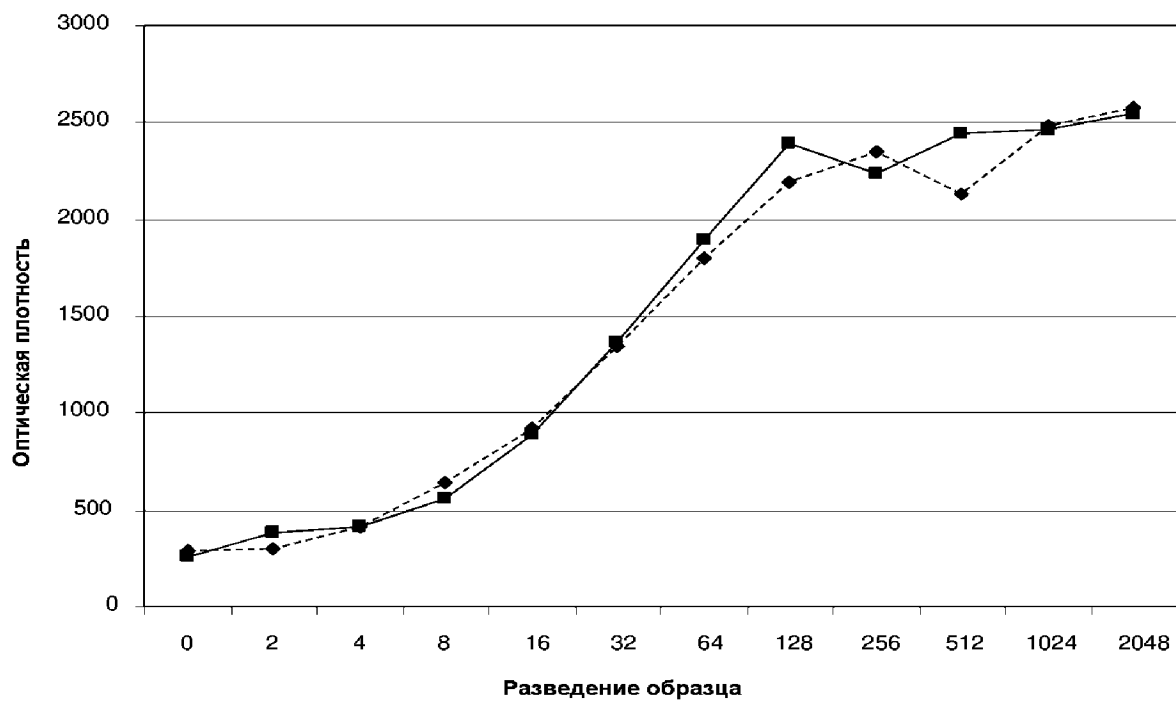
Фиг. 4D



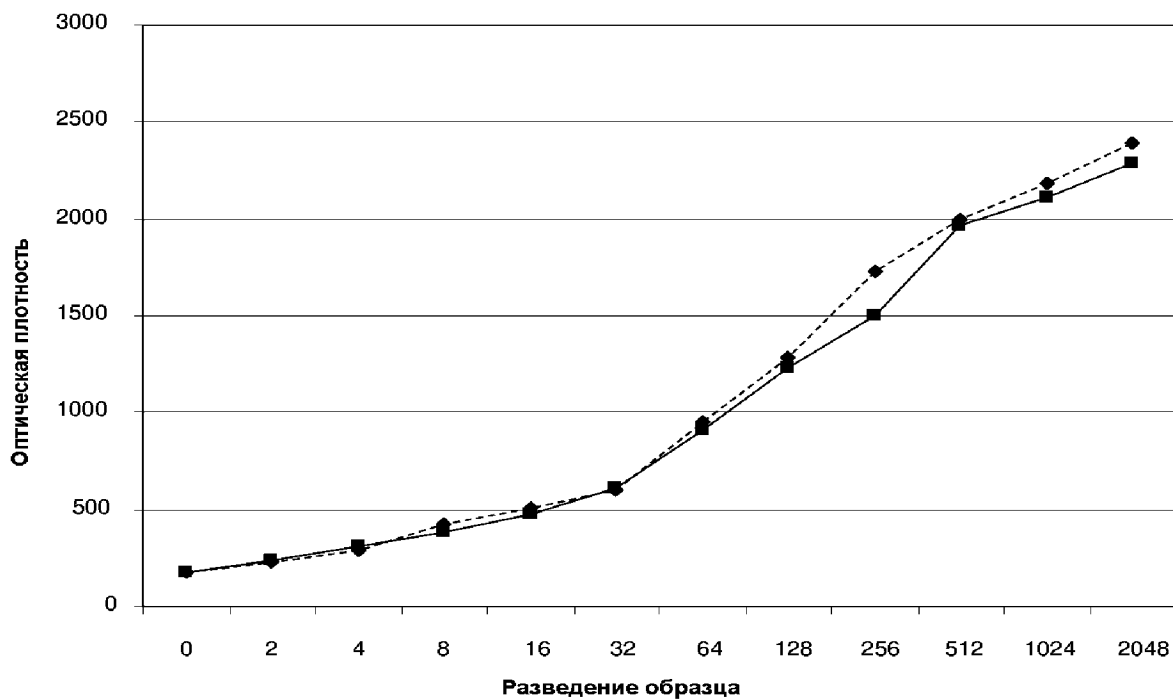
Фиг. 4E



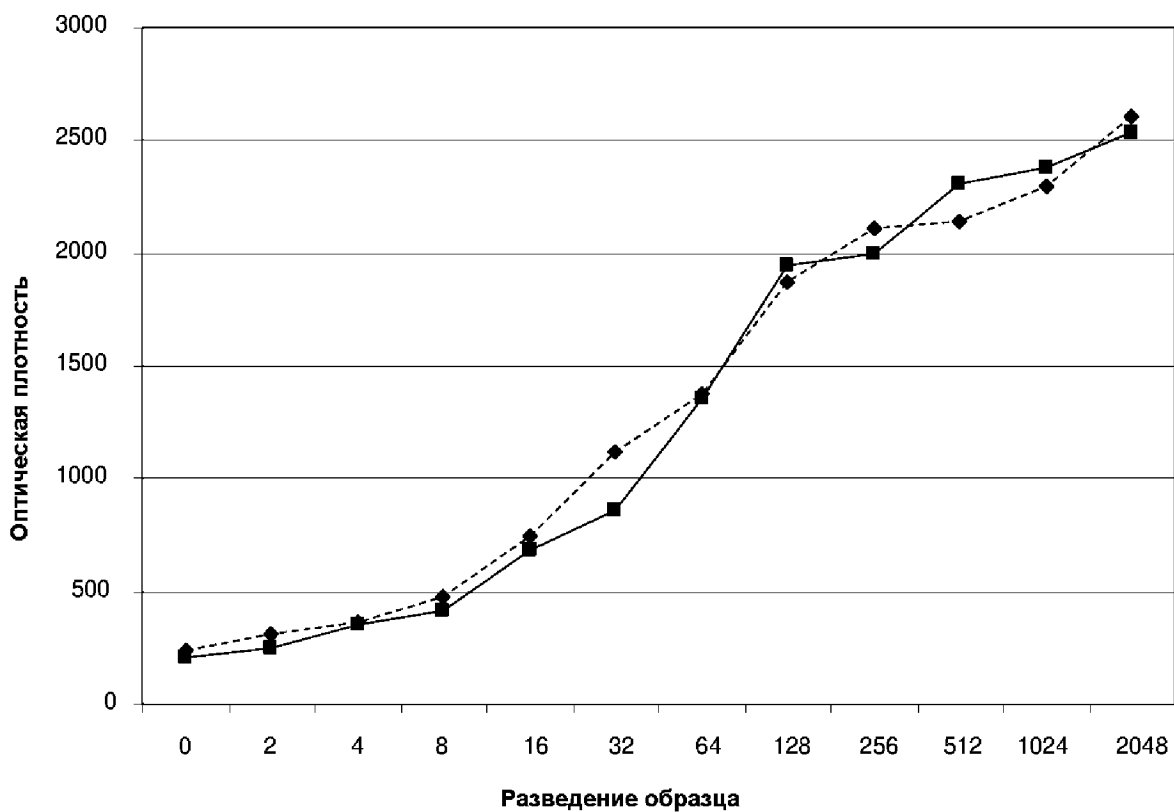
Фиг. 4F



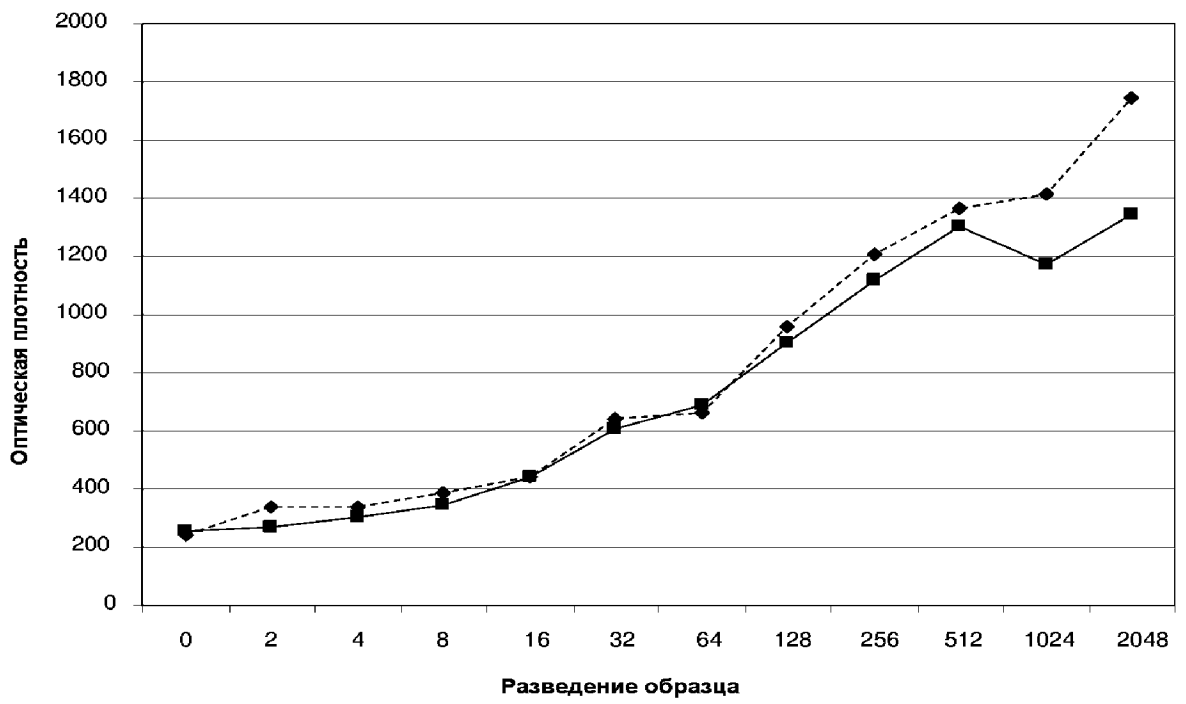
Фиг. 4G



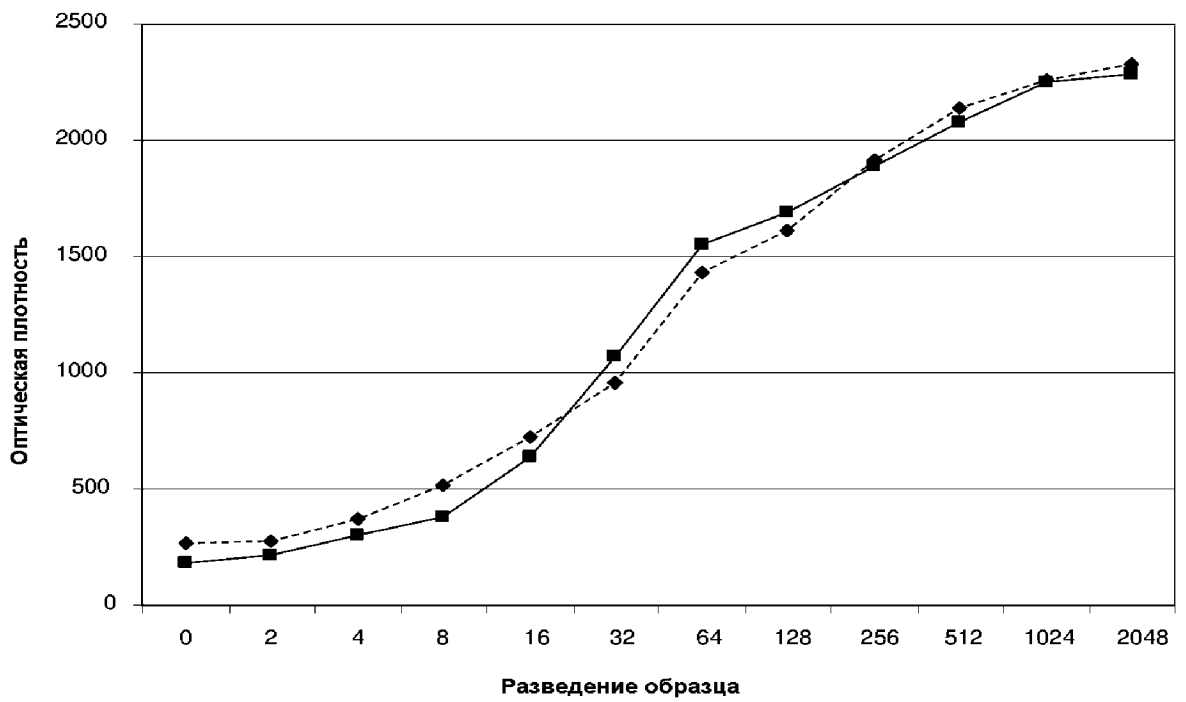
Фиг. 4H



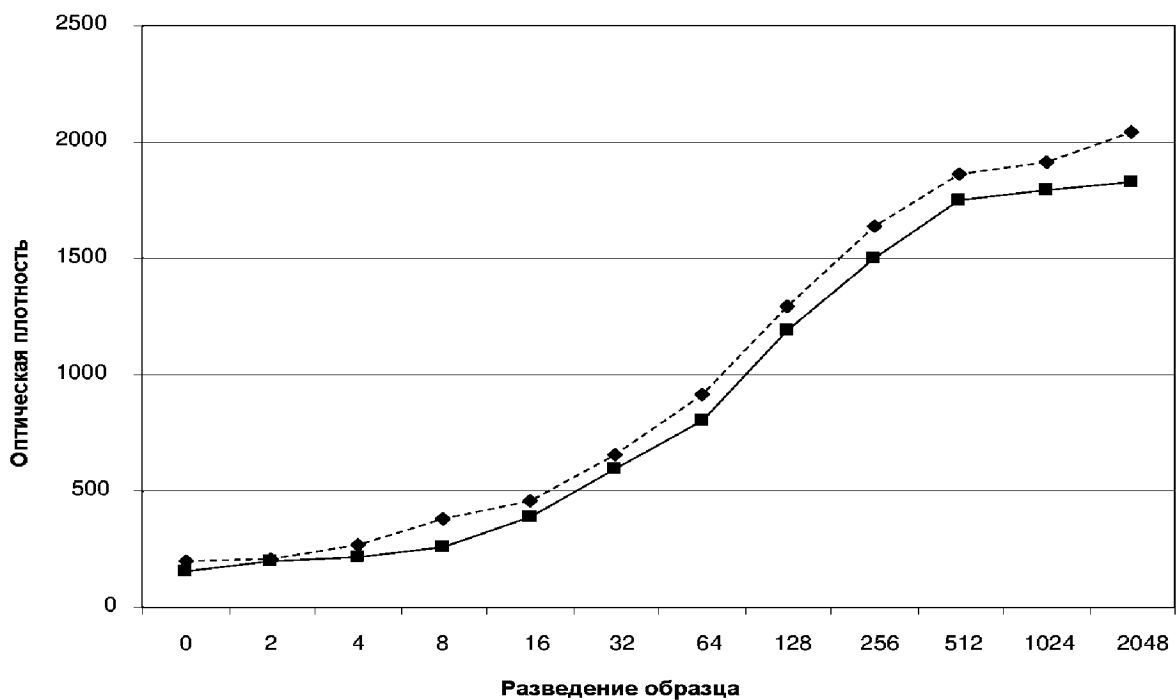
Фиг. 4I



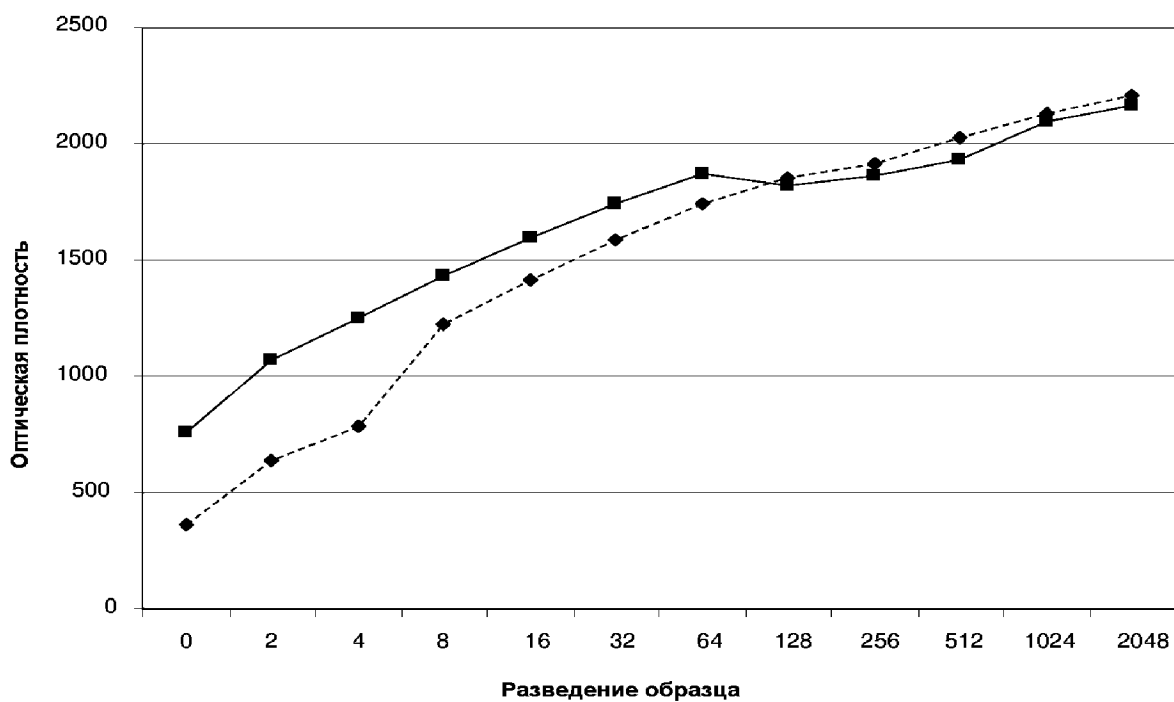
Фиг.4J



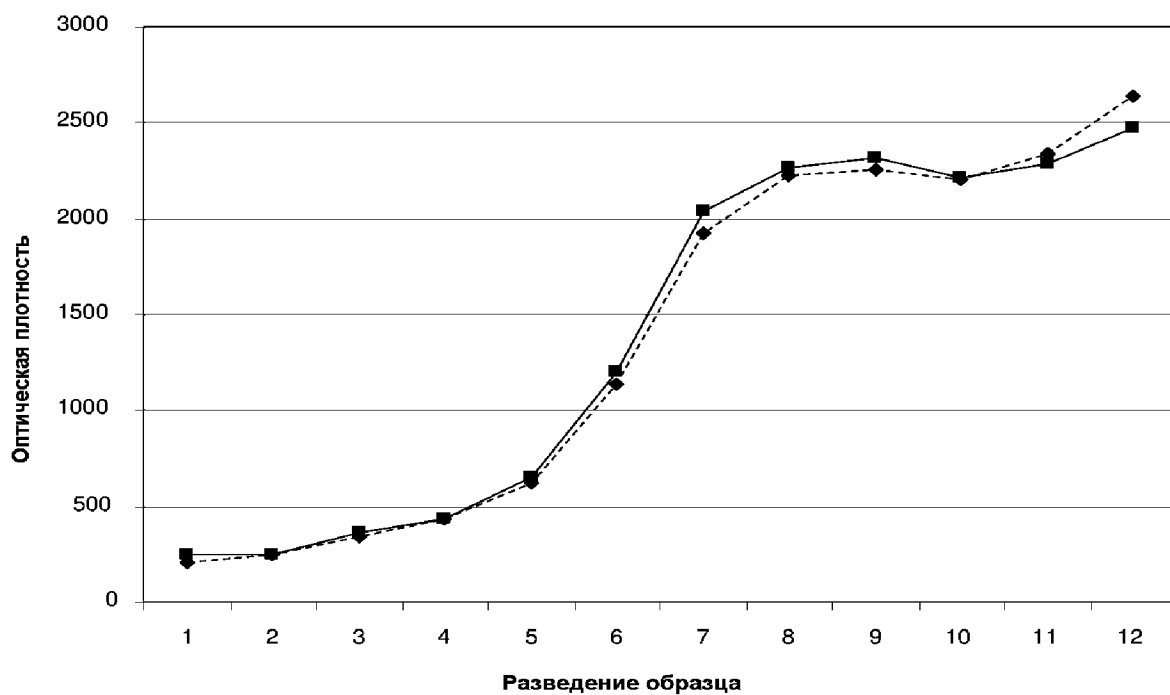
Фиг.4К



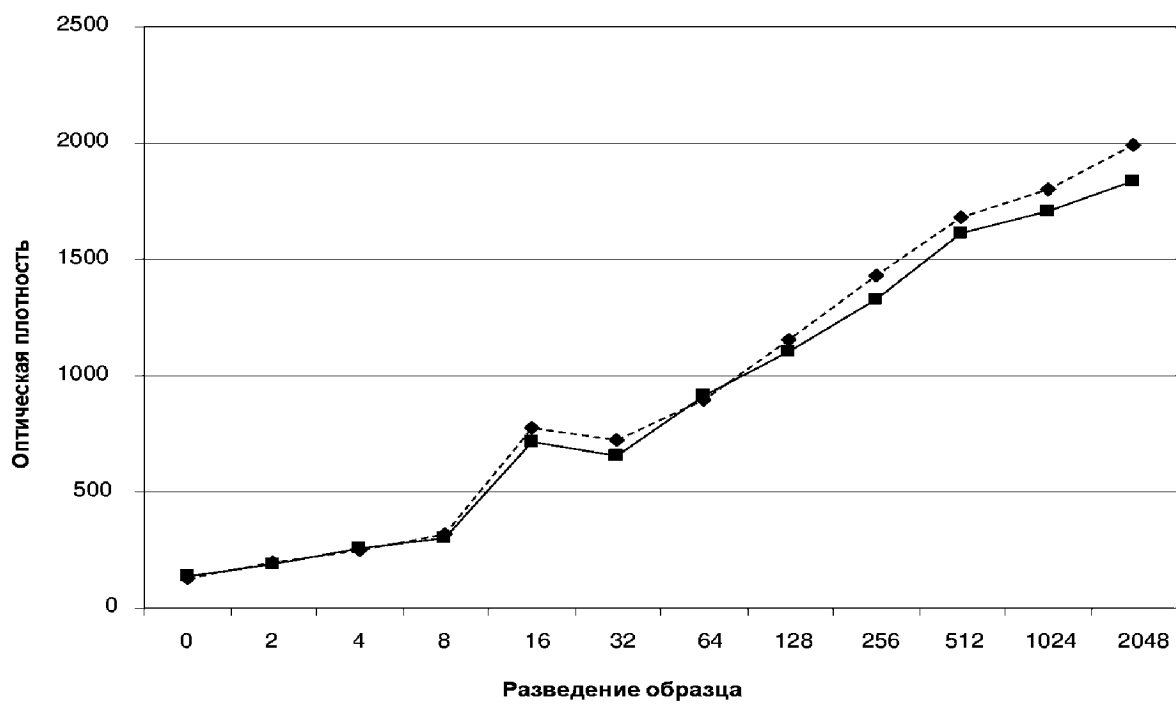
Фиг.4L



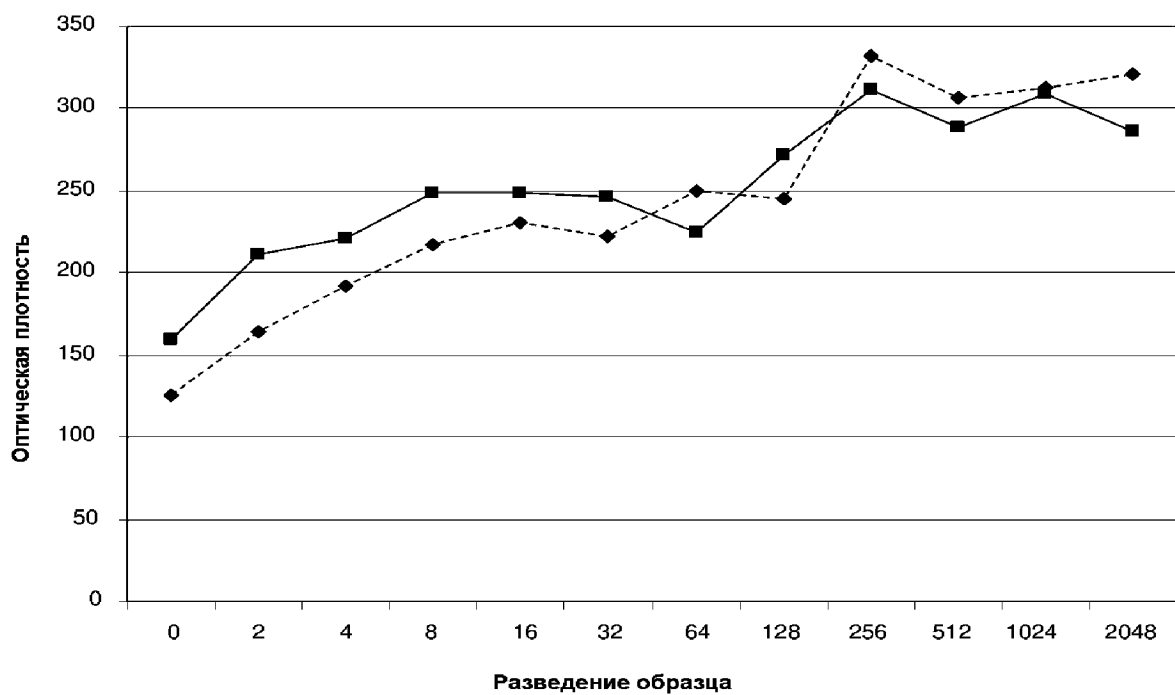
Фиг.4M



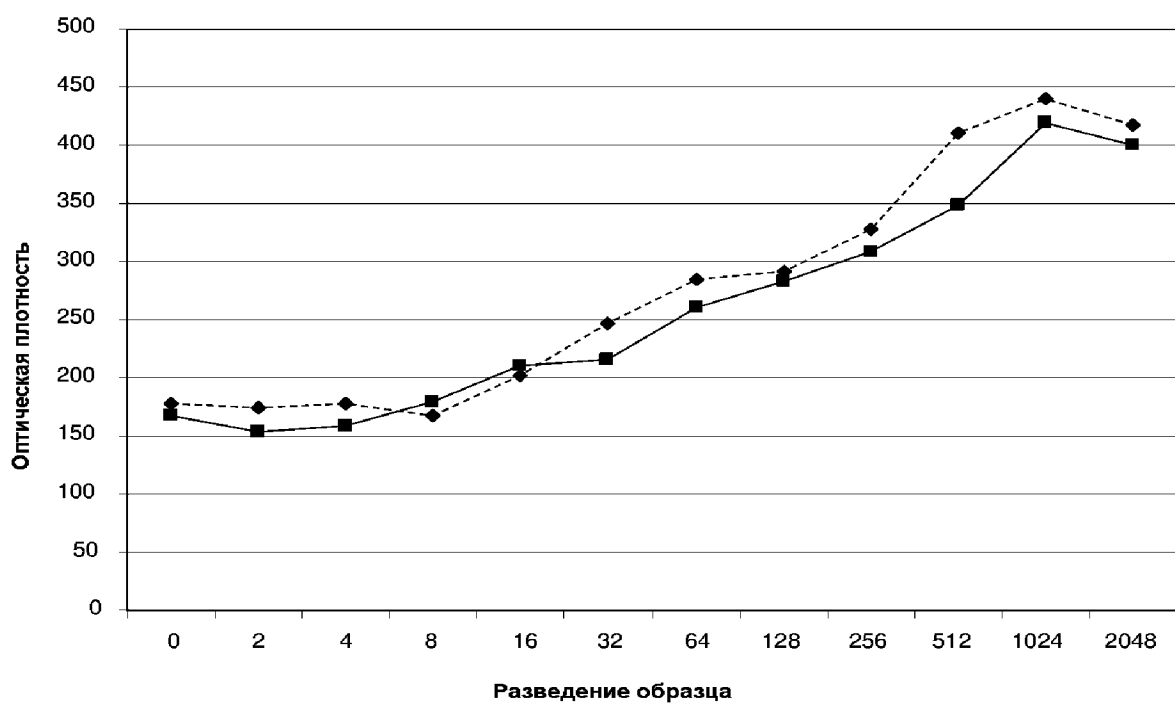
Фиг.4N



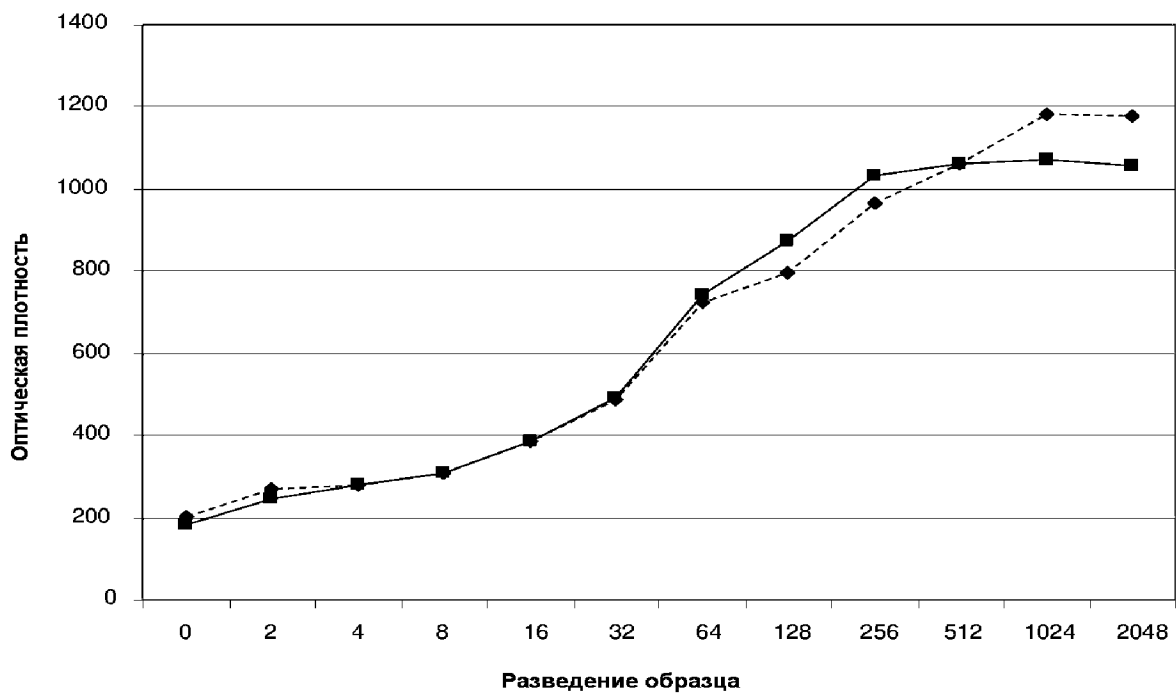
Фиг. 4O



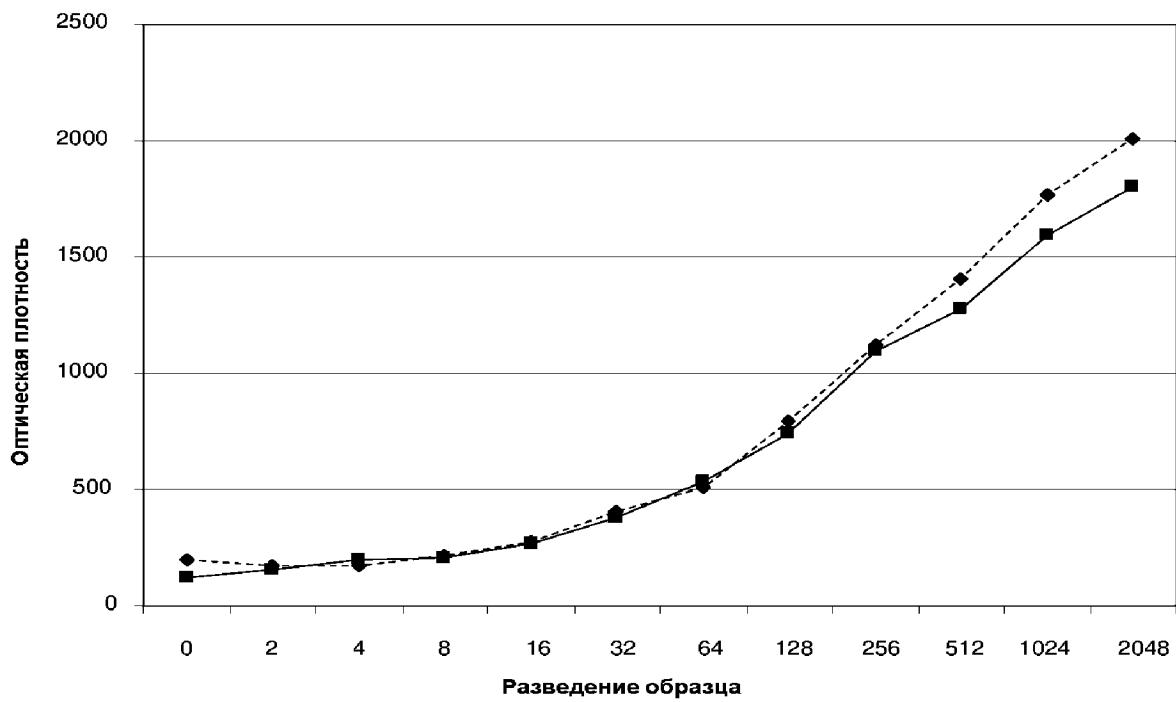
Фиг.4P



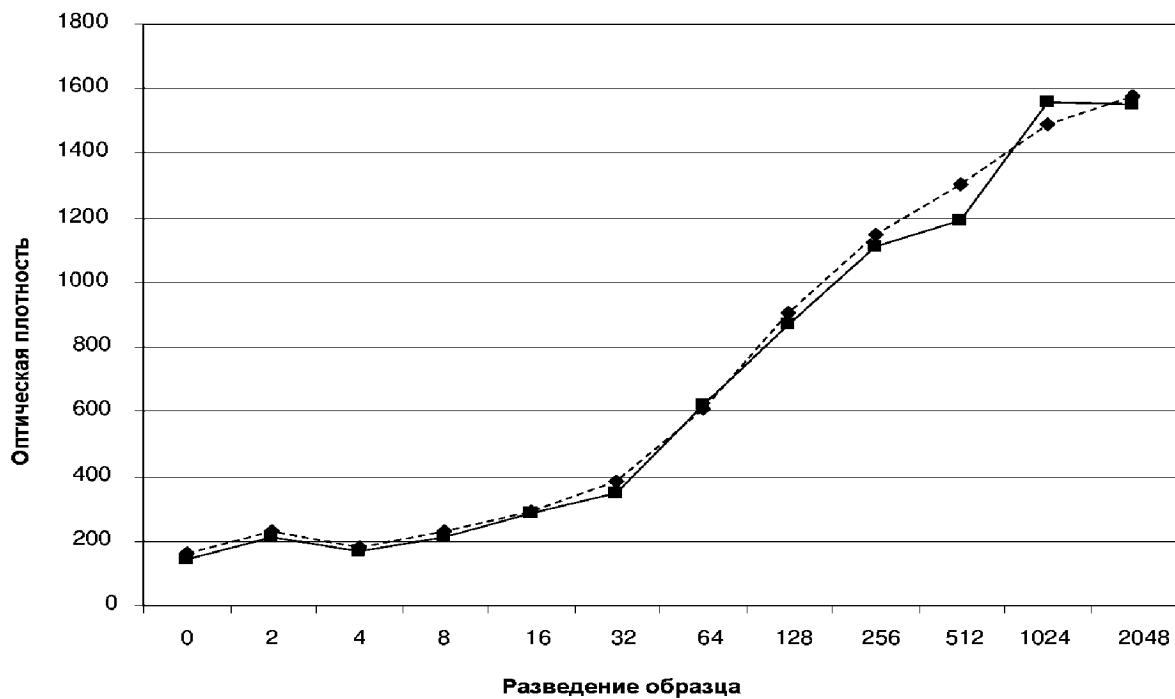
Фиг.4Q



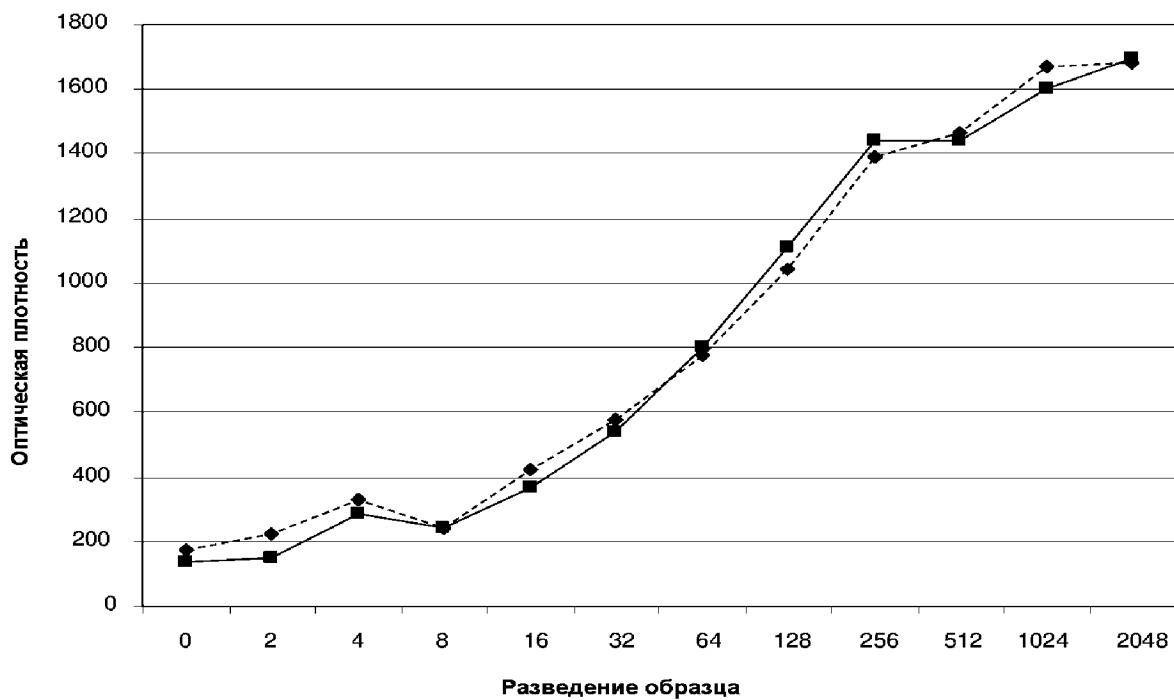
Фиг.4R



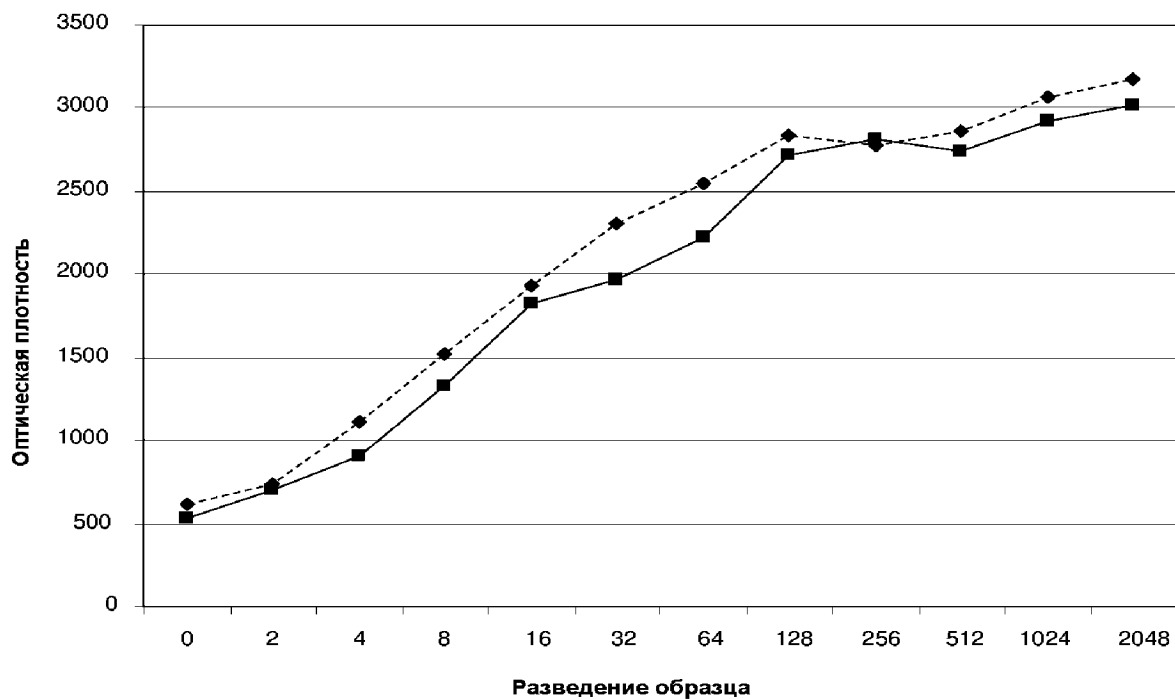
Фиг.4S



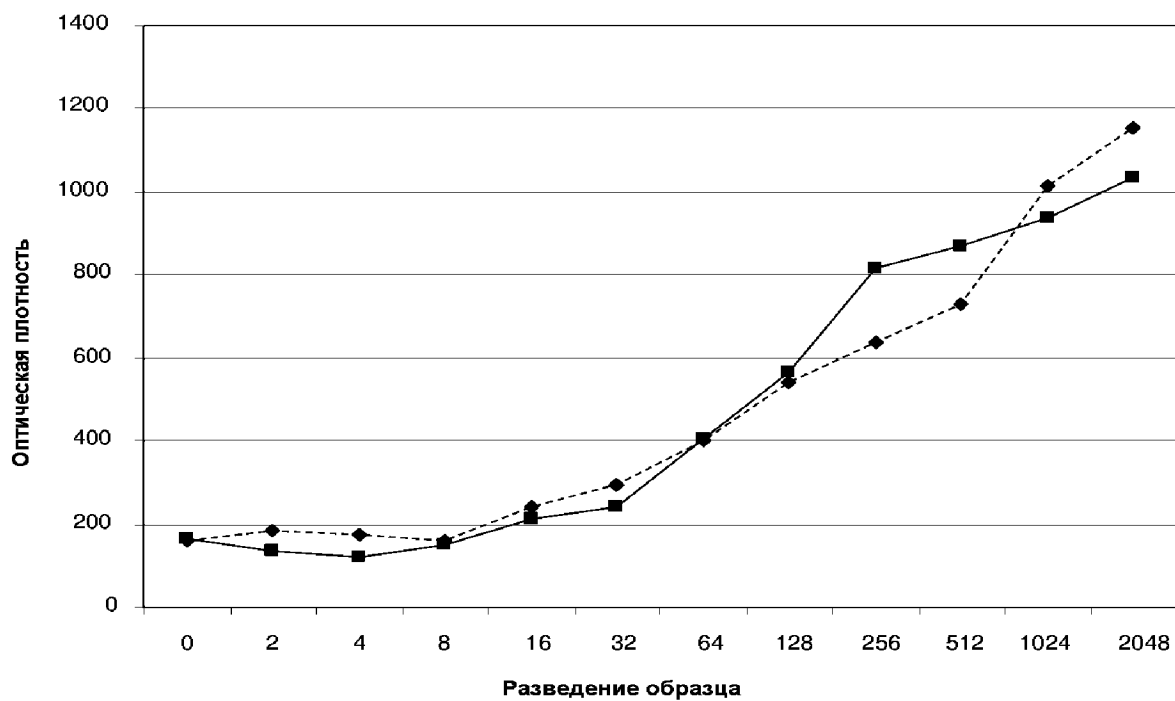
Фиг.4Т



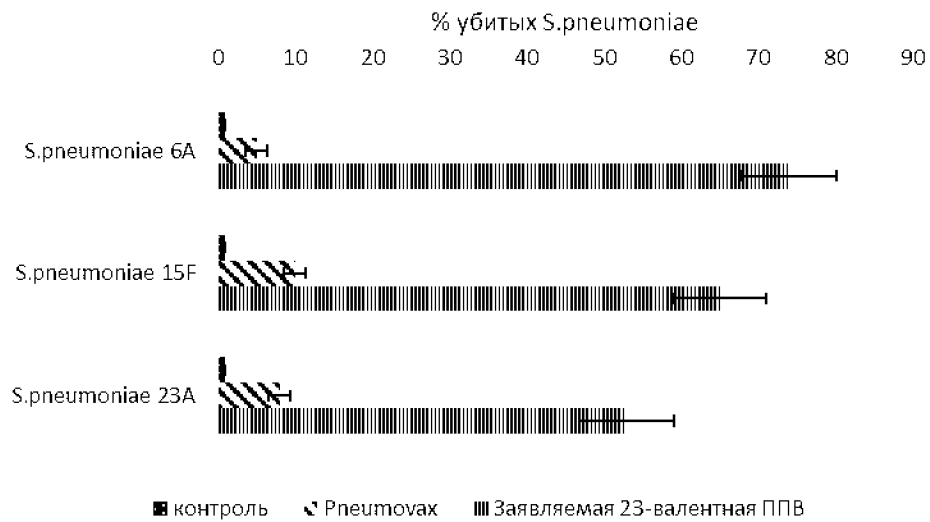
Фиг.4У



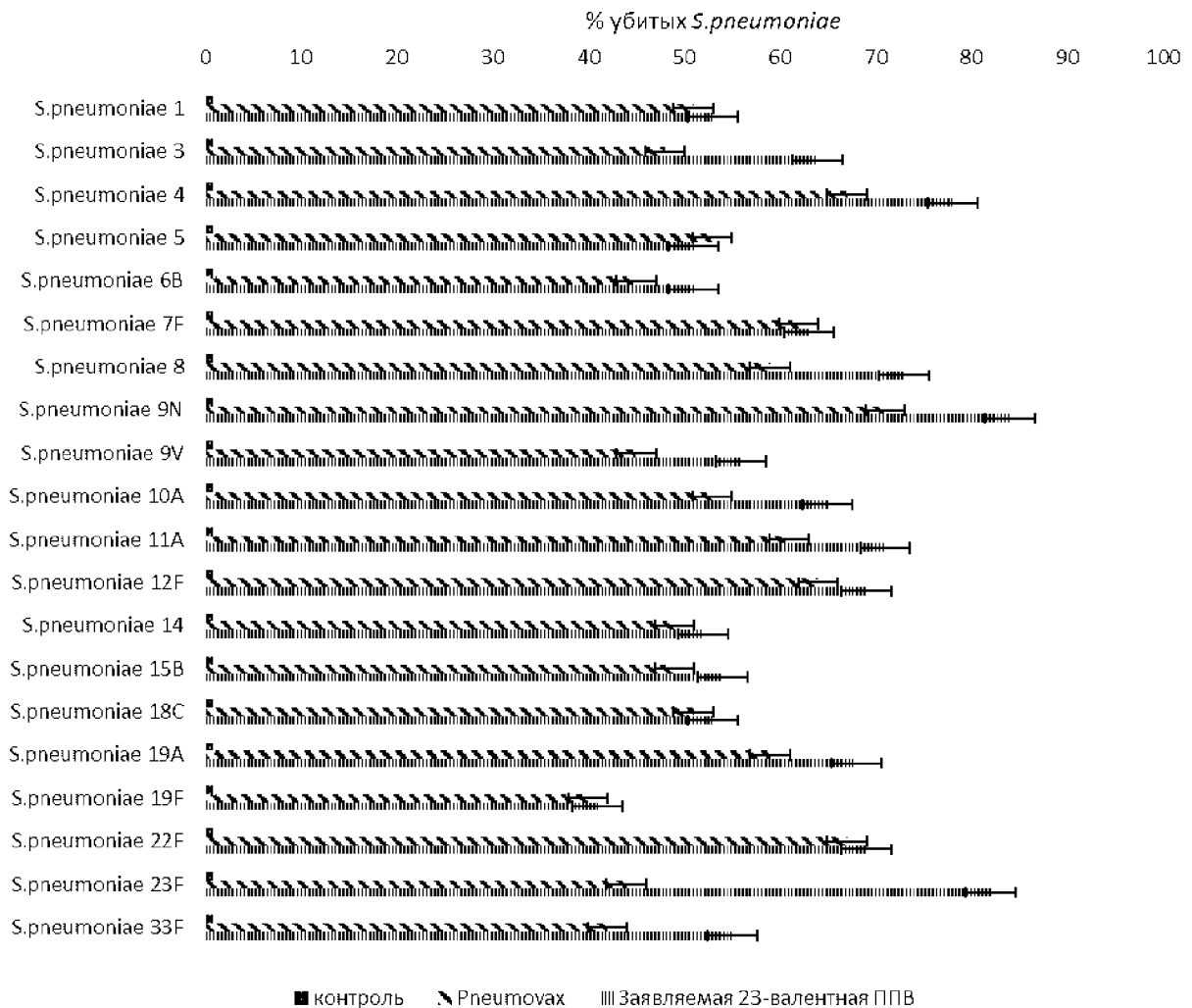
Фиг.4V



Фиг.4W



Фиг.5



Фиг.6

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202390941

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
A61K 39/09, 39/385, 47/64, 1/16, B01D 61/14, A61P 31/04

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, EAPATIS, Google, Reaxys

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 2011/031893 A1 (MATRIVAX RESEARCH & DEVELOPMENT CORP. et al.) 17.03.2011, формула	1-58
A	FERNANDEZ-DELGADO Lucia et al. Serotypes in adult pneumococcal pneumonia in Spain in the era of conjugate vaccines. Microorganisms, 2021, 9, p. 2245, раздел "Bacterial Identification, Antimicrobial Susceptibility Testing and Serotyping", таблица 1, обсуждения	1-34, 52-58
A	RU 2605834 C2 (СК КЕМИКАЛС КО., ЛТД.) 27.12.2016, формула	1-34, 52-58
A	RU 2784070 C1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ "САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ВАКЦИН И СЫВОРОТОК И ПРЕДПРИЯТИЕ ПО ПРОИЗВОДСТВУ БАКТЕРИЙНЫХ ПРЕПАРАТОВ" ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА (ФГУП СПБНИИВС ФМБА РОССИИ)) 23.11.2022, формула	1-34, 52-58
A	RU 2516340 C2 (ВАЙЕТ) 20.05.2014 формула	35-51
A	EP 3789494 A1 (SERUM INSTITUTE OF INDIA PRIVATE LIMITED) 10.03.2021, примеры, формула	35-51

 последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

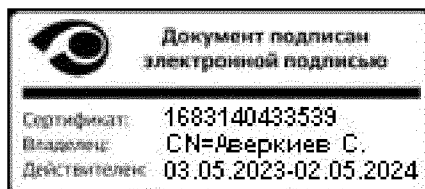
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 02 ноября 2023 (02.11.2023)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202390941

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

A61K 39/09 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01)
C07K 1/16 (2006.01)
B01D 61/14 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

СПК:

A61K 39/092
A61K 39/385
A61K 47/646
C07K 1/16
B01D 61/147
A61P 31/04