

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490757 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.10.31

(22) Дата подачи заявки
2024.04.17

(51) Int. Cl. *A61K 39/09* (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/116 (2006.01)
A61K 47/06 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ УЛУЧШЕНИЯ АДСОРБЦИИ ПОЛИСАХАРИДНО-БЕЛКОВЫХ
КОНЬЮГАТОВ И ПОЛУЧЕННАЯ ИЗ НИХ ПОЛИВАЛЕНТНАЯ ВАКЦИННАЯ
КОМПОЗИЦИЯ

(31) 202323028039

(32) 2023.04.17

(33) IN

(71) Заявитель:
СЕРУМ ИНСТИТЮТ ОФ ИНДИЯ
ПРАЙВАТ ЛИМИТЕД (IN)

(72) Изобретатель:

Пунавалла Цирус Соли, Дхере
Райеев Мхаласакант, Джана Свапан
Кумар, Джаин Шитал Шантилал,
Махаджан Амол Даттатрайа, Паул
Гоураб Шанкар, Малвийа Хитеш
Кумар, Джоши Четан Вилас, Гаутам
Маниш Махеш, Кале Пратхамеш
Пракаш, Гаирола Сунил Джагдиш
Прасад, Маллийа Аша Динеш, Сони
Дипен Джагдишбхаи, Патни Сушил
Вардхаман, Гаваде Винай Виджай (IN)

(74) Представитель:

Нюховский В.А. (RU)

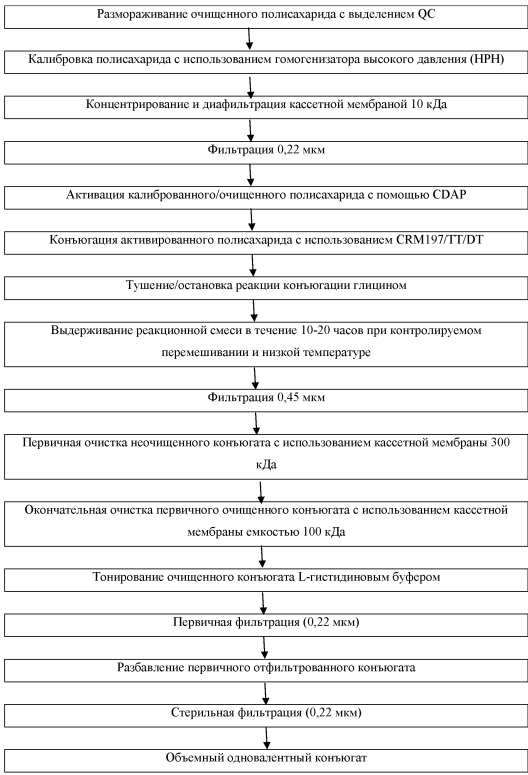
(57) Изобретение относится к вакцинным композициям, содержащим конъюгаты пневмококкового полисахарида с белком-носителем. Изобретение, в частности, относится к улучшенным, стабильным, иммуногенным мультивалентным вакцинным композициям, конъюгированным с полисахаридно-белковым конъюгатом *Streptococcus pneumoniae*, имеющим по меньшей мере три различных белка-носителя, получению вакцинных композиций и способам профилактики и/или лечения пациентов с *Streptococcus pneumoniae*. Эти поливалентные пневмококковые композиции преодолевают эпителиальную супрессию, вызванную переносчиком, обеспечивают усиленный иммунный ответ на новые серотипы (по сравнению с существующими одобренными вакцинами), а также помогают бороться с появлением невакцинных серотипов.

A1

202490757

202490757

A1



СПОСОБЫ УЛУЧШЕНИЯ АДСОРБЦИИ ПОЛИСАХАРИДНО-БЕЛКОВЫХ КОНЬЮГАТОВ И ПОЛУЧЕННАЯ И НИХ ПОЛИВАЛЕНТНАЯ ВАКЦИННАЯ КОМПОЗИЦИЯ

ССЫЛКА НА СООТВЕТСТВУЮЩУЮ ПАТЕНТНУЮ ЗАЯВКУ

Настоящее дополнение - это дополнительный патент, поданный в соответствии со статьей 54 Закона Индии о патентах 1970 года, претендующий на приоритет заявки на патент Индии № 2185 / MUM / 2015, поданной 08^{че} Июнь 2015 года.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее раскрытие относится к способам производства вакцинных композиций и полученным из них вакцинным композициям. В частности, настоящее раскрытие относится к способам получения вакцинных композиций, улучшенным составам, новым стабильным и иммуногенным мультивалентным препаратами. Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* вакцинные композиции, конъюгированные с полисахаридом и белком, и способы профилактики и/или лечения субъектов с Пневмококк *Streptococcus pneumoniae*.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Все публикации в настоящем документе включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки. Следующее описание включает информацию, которая может быть полезна для понимания настоящего изобретения. Это не является признанием того, что какая-либо информация, представленная здесь, является известным уровнем техники или имеет отношение к заявленному в настоящее время изобретению, или что любая публикация, на которую прямо или косвенно ссылаются, является известным уровнем техники.

Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* является основной причиной пневмонии, менингита и плеврального выпота у детей и взрослых. Существует более 100 различных серотипов Пневмококк *Streptococcus pneumoniae*, идентифицированных на сегодняшний

день. Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* ежегодно приводит к более чем 1 миллиону смертей во всем мире среди детей в возрасте до 5 лет и является ведущей причиной как инвазивных пневмококковых заболеваний (ИПД) (например, бактериемии, бактериемической пневмонии и менингита), так и неинвазивных заболеваний (например, небактериемической пневмонии, среднего отита и синусита). В совокупности эти состояния являются причиной большей глобальной заболеваемости и смертности, чем болезни, вызываемые любым другим патогеном. Дети в возрасте до 5 лет, пожилые люди и взрослые с сопутствующими заболеваниями (такими как ВИЧ-инфекция и другие состояния, связанные с иммунодефицитом), как правило, в большей степени подвержены пневмококковой инфекции. Подсчитано, что ежегодно у детей в возрасте до 5 лет происходит около 45 миллионов эпизодов инфекций нижних дыхательных путей и более 300000 смертей из-за инвазивной пневмококковой инфекции (ИПД).

В настоящее время доступны два класса пневмококковых вакцин – одни на основе полисахаридов, а другие на основе полисахаридов, конъюгированных с белком-носителем.

Пневмовакс® 23 (Merck Sharp & Dohme Corp.) – вакцина на основе полисахаридов, содержащая очищенные капсульные полисахариды 23 серотипов (1, 2, 3, 4, 5, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 17F, 18С, 19F, 19А, 20, 22F, 23F и 33F), вызывающие около 90% инвазивных пневмококковых инфекций в промышленно развитых странах. Однако пневмококковые полисахариды являются независимыми от Т-клеток антигенами и, следовательно, слабо иммуногенны у лиц в возрасте <2 лет и не способны индуцировать иммунную память. Следовательно, младенцы и дети раннего возраста плохо реагируют на неконъюгированные пневмококковые полисахариды.

Примерно 50% ежегодных случаев смерти детей от пневмококковой инфекции в мире приходится на 4 страны Африки и Азии: Индию (~ 68 700 смертей); Нигерию (~ 49 000); Демократическую Республику Конго (~14 500); и Пакистан (~14 400).

Для решения проблемы снижения иммуногенности, связанной с пневмококковой полисахаридной вакциной у младенцев и детей, требуется разработка улучшенных полисахаридно-белковых конъюгированных вакцин, в которых наиболее важные в эпидемиологическом отношении серотипы пневмококка соединены с различными белковыми носителями. Этот подход включает ковалентное связывание полисахарида с белком для усиления иммуногенности и повышения уровня сывороточных антител. Эти белковые носители являются Т-клеточно-зависимыми антигенами, которые стимулируют ответ Т-хелперных клеток, который подготавливает вакцинированного индивидуума к анамнестическому или бустерному ответу. Соединение полисахаридного антигена с белковым носителем превращает полисахарид из Т-клеточно-независимого в Т-клеточно-зависимый антиген, на который маленькие дети могут реагировать иммунологически.

Конъюгированные вакцины, состоящие из полисахаридов, конъюгированных с иммуногенным белком, вызывают Т-клеточно-зависимый ответ с установлением В-клеточной памяти и длительной иммунизацией. Преимущества PCV включают его активность у детей раннего возраста и потенциальное длительное действие. ВОЗ провела предварительную квалификацию пневмококковых конъюгированных вакцин (PCV) против *Стрептококк пневмонии* препарат Превнар® (Pfizer), содержащий 7 наиболее часто выделяемых серотипов (4, 6В, 9V, 14, 18С, 19F и 23F), вызывающих инвазивную пневмококковую инфекцию у детей раннего возраста, был впервые лицензирован в Соединенных Штатах в феврале 2000 года. Впоследствии был одобрен препарат Prevnar13® (Pfizer), содержащий конъюгаты полисахаридов серотипов 6А, 6В, 19А, 19F в дополнение к 1, 3, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18С и 23F. Синфлорикс® (GSK) – еще одна одобренная конъюгированная вакцина, которая обеспечивает защиту от 1, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19F и 23F, а также перекрестную защиту от 19А и 6А. ПНЕВМОСИЛ® (Институт сыворотки Индии Pvt Ltd (SIPL)), предварительно квалифицированная 10-валентная вакцина ВОЗ обеспечивает защиту от пневмококковых серотипов 1, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 19А, 19F и 23F (защищает от 10 наиболее значимых серотипов,

которые с наибольшей вероятностью вызывают серьезные заболевания в регионах мира с самым высоким бременем – Африке и Азии, включая многие страны Латинской Америки).

Использование пневмококковой конъюгированной вакцины (PCV) в Национальных программах иммунизации педиатров (NIPS) по всему миру значительно снизило смертность и заболеваемость, связанные с пневмококковой инфекцией. Институт сыворотки 'ПНЕВМОСИЛ® была внедрена по меньшей мере в 60 странах с низким уровнем дохода, и более 225 миллионов детей были вакцинированы, и было предотвращено более 700 000 смертей. Кроме того, по оценкам, в период с 2010 по 2019 год PCV13 во всем мире предотвратил 175 миллионов случаев пневмококковой инфекции и 625 000 смертей среди детей в возрасте до 5 лет. Помимо обеспечения защиты детей раннего возраста от пневмококковой инфекции, плановая иммунизация детей также обеспечивает косвенную защиту невакцинированного населения за счет сокращения носоглоточного носительства серотипов вакцины, тем самым снижая передачу заболевания. По мере того как все больше стран увеличивают распространение PCV, вакцинация против PCV дает возможность ежегодно предотвращать около 54,6 миллиона эпизодов и 399 000 смертей среди детей в возрасте до 5 лет из-за пневмококковой инфекции во всем мире.

Однако одной из проблем, связанных с рутинным использованием существующих пневмококковых конъюгированных вакцин, является замена серотипа. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) сообщила о появлении циркуляции невакцинных серотипов и замене серотипов, что приводит к увеличению доли пневмококковых заболеваний этих серотипов как у детей, так и у взрослых (Документ с изложением позиции ВОЗ – февраль 2019 г.). Wkly. Epidemiol. Res. 2019; 94:85-104 и Вайнбергера М.Д. и др.; Ланцет. 2012; 378:1962-1973). Каждая вакцина нацелена только на некоторые из всех серотипов пневмококка, поэтому ожидается, что распространенность невакцинных серотипов (NVTs) увеличится, что приведет к увеличению носительства NVTs и связанных с ними клинических синдромов. Эпиднадзорные исследования продемонстрировали

увеличение частоты носительства НВТЗ после введения PCV-7, а также увеличение числа случаев пневмококковой инфекции, вызванной НВТЗ. Кроме того, стоит учитывать предвзятость в системах эпиднадзора за заболеваниями, которая может привести к недооценке истинного объема замещения.

Внедрение Prevnar13® в 2010 году в программу иммунизации стало эффективной мерой профилактики ИПДС у детей. Бремя болезней, связанных с *S. pneumoniae* значительно снизился с момента применения Prevnar13®. Prevnar13® снизил общую частоту IPDs более чем на 50%. Однако произошло очевидное изменение в распределении серотипов *S. pneumoniae* а возросшая распространенность NVTs может компенсировать преимущество снижения распространенности серотипов вакцины (VTS) после введения PCV13. Следовательно, необходимы высоковалентные вакцины, способные адекватно защищать от максимального количества серотипов пневмококка, включая серотипы 2, 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F, 24F и 33F.

Кроме того, распространенность индивидуального серотипа может меняться с течением времени в разных географических регионах или возрастных группах. Возросшая распространенность и патогенность NVTs создают новые проблемы для снижения бремени пневмококковой инфекции, чему способствовала повсеместная вакцинация против PCV. Среди NVT серотип 24F считается одним из наиболее распространенных возбудителей IPD в Европе и Западной части Тихоокеанского региона. (Ближний Восток и Северная Африка) Кроме того, серотип 24F и другие NVT, такие как 8, 12F и 33F, рассматривались в верхней части спектра инвазивности среди детей, иммунизированных PCV. Следовательно, при разработке высоковалентных пневмококковых вакцин следует учитывать географические различия в распределении серотипов и эволюционирующую распространенность серотипа пневмококка.

Недавно еще две мультивалентные пневмококковые вакцины были одобрены для использования в США. Vaxneuvance® (Merck Sharp & Dohme Corp) обеспечивает защиту от

15 *Стрептококк пневмонии* серотипы 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F. Превнар 20® (Pfizer) - еще одна одобренная конъюгированная вакцина, обеспечивающая защиту от *Пневмококк Streptococcus pneumoniae* серотипы 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F.

Pfizer 13 valent, Pfizer 20 valent, Merck 15, Pfizer 7 valent - все это вакцины, состоящие из одного типа белка-носителя, то есть CRM197. Одним из наиболее важных факторов, который может влиять на иммуногенность конъюгированных вакцин, является выбор белка-носителя, который позволяет избежать опосредованного носителем подавления реакции антител. Наличие единственного типа белка-носителя приводит к индуцированному носителем эпитопическому подавлению, при этом для индивидуального серотипа желаемый ответ антиполисахаридных антител может не быть достигнут. Такие соединения, как полисахариды и пептиды, слабо иммуногенны и не могут вызывать иммунный ответ сами по себе, они обычно должны быть ковалентно связаны с носителем, которым обычно являются крупные белки, обладающие высокой иммуногенностью. Эти белки-носители связываются с антигенпредставляющей клеткой (АРС) и обеспечивают Т-клеточные эпитопы через МНС класса II для презентации Т-хелперным клеткам и усиливают иммунный ответ. Такие белки, как столбнячный анатоксин (ТТ), дифтерийный анатоксин (DT), нетоксичный мутант дифтерийного токсина (CRM197), используются в качестве эффективных носителей для повышения иммуногенности. Однако эти белки-носители индуцируют реакцию антител, которая конкурирует с антителом-пептидом / полисахаридом; проблема, которая может усугубиться, если субъект ранее подвергался воздействию этого носителя. Эта ситуация усугубляется для вакцин, которые используют тот же тип белка-носителя при предыдущей иммунизации, и когда тот же самый белок-носитель используется повторно в другой вакцине, это приводит к подавлению иммунного ответа. Следовательно, выбор белка (ов)-носителя является важным критерием при производстве вакцин. Следовательно, требуются альтернативные поливалентные конъюгированные вакцины,

содержащие несколько типов белков-носителей, решающие проблему индуцированного носительством эпитопического подавления.

Как уже упоминалось, вакцины Pfizer / GSK / Merck пока доступны только в развитых странах, и по-прежнему существует острая потребность в доступных пневмококковые вакцины, которые являются доступно во всем мире для стран с низким и средним уровнем дохода, которые наиболее уязвимы к пневмококковым заболеваниям и способны обеспечить защиту от наиболее распространенных, возникающих и патогенных серотипов пневмококка.

Как упоминалось выше, для того чтобы полисахарид индуцировал достаточное количество антител для защиты у младенца, полисахарид как иммуноген должен вызывать помощь Т-клеток. Следовательно, полисахариды должны быть ковалентно присоединены к белку-носителю, чтобы сделать их достаточно иммуногенными у маленьких детей. Простая смесь полисахарида и белка-носителя не делает полисахарид более иммуногенным у младенцев. Таким образом, конъюгированная вакцина обычно состоит из бактериального полисахарида, полисахарида с уменьшенным размером, или производных от него олигосахаридов, которые ковалентно присоединены к эпитопу Т-клеток, содержащему полипептид, обычно белок-носитель. Иммунный ответ на конъюгат очень похож на ответ на белок. Это приводит к развитию сильного ответа IgG на конъюгированный полисахарид и формирует иммунологическую память у маленьких детей.

Полисахариды также могут быть фрагментированы / измельчены по размеру перед этапом конъюгации для повышения эффективности конъюгации/ выхода конъюгата, увеличения количества реакционноспособных групп, что приводит к повышенной иммуногенности конъюгатов. Дробление/калибровка полисахаридов может осуществляться различными методами, такими как термический гидролиз, химический гидролиз (кислотный, щелочной, озонолитический и свободнорадикальный), ферментативная калибровка (лиазы и гидролазы), обработка ультразвуком и гомогенизация, что приводит к случайному уменьшению размера, что часто приводит к

увеличению полидисперсности образца, которые впоследствии могут быть измельчены (с помощью хроматографических или ультрафильтрационных стадий) для получения полисахаридов более определенной длины для конъюгации с белком-носителем. Полисахариды с уменьшенным размером обычно соединяются с белком-носителем с помощью конечного редуцирующего сахара. Такие селективные подходы позволяют избежать химической модификации вдоль сахаридной цепи и дают более четкие структуры, которые легче изготавливать с сохранением консистенции. Определение размера ферментов, хотя и простое, ограничено коммерческой доступностью ферментов, их стоимостью и чувствительностью к денатурации. Химический гидролиз (кислотная и щелочная обработка или свободнорадикальные механизмы) приводит к образованию большого количества моносахаридов и побочных продуктов, что нежелательно при крупномасштабном производстве вакцины.

Как правило, очищенный полисахарид химически активируют/модифицируют для образования реакционноспособных групп, которые могут соединяться с белком-носителем. Необходимо определить оптимальную степень активации сахарной цепи, чтобы обеспечить эффективное конъюгирование без изменения структурной целостности сахара. Двумя наиболее часто используемыми методами активации полисахаридов являются окисление периодата и цианилирование. При окислении периодата концевые гидроксильные группы, присутствующие в полисахариде, окисляются до альдегида с использованием окислителя-агента (периодат, такой как периодат натрия, периодат калия или периодическая кислота). Вицинальные гидроксильные группы полисахарида расщепляются окислителем, что приводит к образованию реакционноспособных альдегидных групп. Важной потенциальной проблемой при использовании периодата для активации полисахарида является изменение физической структуры полисахарида с потерей важных эпитопов. Видно, что даже низкие уровни активации могут привести к потере специфического эпитопа и созданию новых эпитопов. В частности, стадия окисления периодата перед восстановительным аминированием может привести к раскрытию кольцевой структуры сахара, что может привести к образованию

конъюгатов с разомкнутым кольцом, в зависимости от серотипа. Такие полисахариды с разомкнутым кольцом могут повторно закрываться после процесса конъюгации, в некоторых случаях, заставляя полисахариды образовывать дополнительные новые конформации, в результате чего образуются новые эпитопы (Poolman J. et al. Вакцина Иммунол. 2011; 18:327-336).

В зависимости от выбранного химического состава полисахаридные и / или белковые носители могут быть дериватизированы перед конъюгацией. Уровень химической дериватизации может определять стехиометрию конъюгации, влиять на сохранение В-клеточных и Т-клеточных эпитопов и образование агрегатов. Уровень химической дериватизации влияет на соотношение полисахаридов к белку и, в конечном счете, на иммуногенность. Следовательно, выбор стратегии конъюгации может повлиять на эффективность конъюгации, соотношение сахаридов к белку и структуру и размер гликоконъюгата с последующим воздействием на иммуногенность.

Метод конъюгации может влиять на иммуногенность и функциональность индуцируемых антител. Метод конъюгации с восстановительным аминированием использовался в большинстве лицензированных пневмококковых конъюгированных вакцин (PCV) (Pfizer 7 valent 13 valent 20 valent / Merck 15 valent PCV), который заключается в конъюгации сахар-белок путем образования основания Шиффа между производными сахара альдегидами и аминами в белках с последующим восстановлением. Первым этапом является введение альдегидных групп вдоль полисахаридной цепи путем частичного окисления периодатом натрия. Цисдиоли в сахарном кольце и остатки сиаловой кислоты являются наиболее чувствительными зонами для образования альдегидов при окислении периодата. Затем в реакцию добавляется белок-носитель. Альдегиды из сахаров обычно вступают в реакцию с остатками лизина белка-носителя. Эта методология заключается в первоначальном образовании связей основаниями Шиффа между карбонильной группой в углеводе и аминогруппой в белке. Затем основание Шиффа специфически восстанавливают слабым восстановителем цианоборгидридом натрия до более стабильного

аминирование также используются апротонные растворители (ДМСО). Однако восстановительное аминирование имеет важные недостатки, включая низкий выход, низкую эффективность связывания и риск частичного разрушения структуры углеводов. Кроме того, ДМСО непрактично использовать из-за значительно более высокой температуры кипения ДМСО, которая может нанести вред полисахариду и белку-носителю. ДМСО – это органический растворитель, который может привести к денатурации белков-носителей. Кроме того, одним из основных недостатков ДМСО является сложность удаления после реакции; его высокая температура кипения (189 °C) очень затрудняет удаление ротавапором.

Химия цианилирования первоначально использовала CNBr для создания реакционноспособных цианоэфирных групп на полисахаридах, использованных в первом конъюгате Hib, о котором сообщил в 1980 году доктор Джон Роббинс. Цианилирование с помощью CNBr является широко используемым методом для получения белково-полисахаридных конъюгированных вакцин. Однако эффективность конъюгатов, полученных методом CNBr, была низкой и требовала использования реакционноспособных линкеров, таких как дигидразид адипиновой кислоты (ADH). Выходы активации составляют всего 0,5–2%, что приводит к использованию большого количества CNBr со всеми сопутствующими рисками для здоровья. Хотя CNBr является недорогим реагентом, он очень токсичен и его использование требует особого внимания. Кроме того, чувствительные полисахариды могут быть повреждены из-за высокого уровня pH, необходимого для активации CNBr. Другим недостатком этих способов является то, что активированный полисахарид содержит как сложный эфир цианата, так и имидокарбонатные структуры в различных пропорциях. Сложноэфирные группы цианата гидролизуются при высоком pH, в то время как имидокарбонаты при гидролизе при более кислом pH образуют неактивные карбонаты. (Виктор Мораис и др.; Биоинженерия (Базель). Декабрь 2022 г.; 9 (12): 774).

Альтернативно, CDAP использовался для конъюгированных белково-полисахаридных вакцин (Синфлорикс, ПНЕВМОСИЛ®), используя его в

качестве цианилирующего агента для активации растворимых полисахаридов. CDAP, который проще в использовании по сравнению с CNBr, имеет то преимущество, что он может активировать полисахариды при более низком pH, чем CNBr, и с меньшим количеством побочных реакций. В отличие от CNBr, CDAP-активированные полисахариды могут быть непосредственно конъюгированы с белками, что упрощает процесс. Более того, CDAP-активированные полисахариды могут быть функционализированы диамином или дигидразидом для получения полисахаридов, производных от амино- или гидразида.

Составы вакцин, как правило, должны быть стабильными и иметь однородную консистенцию, чтобы обеспечить длительный срок хранения и использование контейнеров для нескольких доз. Вакцины на основе белков, включая конъюгаты полисахарид-белок, подвержены агрегации и осаждению белков, что может привести к эффективному снижению общей концентрации вакцины из-за недоступности осажденного белкового продукта. В частности, вакцины, конъюгированные с полисахарид-белком, по-видимому, имеют более сильную тенденцию к агрегации, чем один только белок-носитель (см. Verti et al., 2004, *Biophys J* 86:3-9). При производстве конъюгата полисахарид-белок композиция может содержать агрегаты типа полисахарид-полисахарид, белок-белковый тип или полисахарид-белковый тип. Такие скопления также наблюдаются в готовом продукте, что приводит к отбраковке 4-10% заполненных флаконов вакцины с полисахаридно-белковым конъюгатом (-ами), тем самым влияя на стабильность и эффективность конъюгированной вакцины.

Кроме того, уровень неконъюгированного или "свободного" сахара при конъюгации и во время хранения считается критическим показателем стабильности вакцин на основе белка-полисахарида-носителя и оказывает существенное влияние на эффективность вакцины. Неконъюгированный/свободный полисахарид может образовываться из-за неполной очистки конъюгата или нестабильности конечного продукта. Свободный полисахарид, свободный белок-носитель, процент о-ацетилирования полисахаридов и молекулярный размер полисахаридов являются важными параметрами, указывающими на

стабильность, они влияют на качество и иммуногенность вакцины и должны быть оптимизированы.

Не все серотипы пневмококка одинаково распространены, поэтому эффективная пневмококковая конъюгированная вакцина должна содержать те серотипы, которые наиболее часто ассоциируются с пневмококковым заболеванием. Увеличение устойчивости к антибиотикам среди штаммов, замещающих серотип, и частоты случаев замещения серотипа как у носителей, так и у инфекционных изолятов после внедрения конъюгированных вакцин обуславливает необходимость в пневмококковых вакцинах с более широким охватом против пневмококков.

Количество серотипов вакцины, как правило, ограничено, поскольку каждый серотип должен быть индивидуально конъюгирован с белком-носителем, и есть опасения по поводу ограничения общей дозы белка-носителя для контроля переносимости, вызванной переносчиком. Это может усилить иммунный ответ на белок-носитель, что может вызвать системную перегрузку, приводящую к снижению иммунного ответа на определенные серотипы. Другие ограничения могут включать объем дозы вакцины, который потребовался бы для введения, если бы было включено больше конъюгированных полисахаридов, что также может оказывать влияние на доступность вакцины. Следовательно, при разработке поливалентных вакцин важно расширить иммунный стимул для существующих и дополнительных серотипов и воздействовать на все факторы, задействованные в традиционных методах конъюгации. В дополнение к обеспечению подходящей защиты от растущего числа серотипов, существует также необходимость в разработке методов снижения уровня антител к белку-носителю, несмотря на увеличение числа серотипов.

Настоящим заявитель подчеркивает, что получение стабильного и иммуногенного конъюгата полисахарид-белок является сложной задачей. Поливалентные конъюгированные вакцины очень трудно воспроизводимо изготовить и охарактеризовать, поскольку требуется множество тестов высвобождения, прежде чем их можно будет

использовать. Заявитель обнаружил, что физико-химические характеристики полисахаридного антигена, метод фрагментации/калибровки полисахарида, восстановление полисахарида после калибровки, длина полисахарида/молекулярная масса, соотношение полисахарида к белку-носителю и тип используемого химического состава конъюгации, эффективность конъюгации, оптимизированная адсорбция для каждого серотипа (конкретная комбинация серотипов, подлежащих совместной адсорбции), состав без агрегации (тип вспомогательных веществ, тип/концентрация полисорбата, тип/концентрация адъюванта из квасцов), стабильность (масса конъюгата, процентное содержание свободного полисахарида, процентное содержание свободного белка) при хранении все это оказывает влияние как на структуру, так и на иммунный ответ каждой вакцины, конъюгированной с полисахаридом-белком-носителем, а также на процесс производства каждого полисахарид-белкового конъюгата, стабильность различны и не могут быть экстраполированы от одного конъюгата к другому. Участки, в которых прикрепляется полисахаридный антиген, также могут оказывать влияние на иммуногенность вакцины. Кроме того, в мультивалентной конъюгированной вакцине динамическое взаимодействие различных конъюгатов в одном препарате может привести либо к маскировке, либо к усилению иммунного ответа нескольких серотипов. Сохранение целостности структуры полисахарида на этапах очистки, калибровки, конъюгации и составления рецептуры также является необходимым условием для обеспечения сохранности иммуногенных эпитопов.

Следовательно, по-прежнему существует острая неудовлетворенная потребность в поливалентных пневмококковых конъюгированных вакцинах, приготовленных с использованием оптимальных производственных процессов и составов, которые способны защищать от максимального числа серотипов пневмококка, снижают иммунную супрессию, индуцируемую белком-носителем, и являются высокостабильными, демонстрируют повышенную иммуногенность, а также доступны по цене для доступа / распространения по всему миру.

ЦЕЛИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Некоторые из целей настоящего раскрытия, которым здесь удовлетворяет по меньшей мере один вариант осуществления, заключаются в следующем:

Целью настоящего раскрытия является улучшение одной или нескольких проблем известного уровня техники или, по крайней мере, предоставление полезной альтернативы.

Другой целью настоящего раскрытия является предоставление способа получения мультивалентного *Стрептококк пневмонии* композиция вакцины из полисахаридно-белкового конъюгата.

Еще одной целью настоящего раскрытия является предоставление способа получения мультивалентного *Стрептококк пневмонии* вакцинная композиция из полисахаридно-белкового конъюгата, обладающая улучшенной адсорбцией.

Еще одной целью настоящего раскрытия является предоставление способа приготовления мультивалентный *Стрептококк пневмонии* вакцинная композиция из полисахаридно-белкового конъюгата (предпочтительно 20-валентный или 21-валентный), имеющий конъюгаты, полученные с использованием CDAP, содержащие три различных белка-носителя (DT, TT, CRM197), при этом полисахариды из серотипов 4 и 24F индивидуально конъюгируются с DT; полисахариды из серотипов 3, 6A, 9V, 15B, 19A, 22F индивидуально конъюгируются с TT, а полисахариды из серотипов 1, 2, 5, 6B, 7F, 8, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19F, 23F, 33F индивидуально конъюгируются с CRM197.

Еще одной целью настоящего раскрытия является предоставление способа получения мультивалентного *Стрептококк пневмонии* вакцинная композиция, конъюгированная с полисахаридом и белком, в которой конъюгаты на основе 11 CRM197 и DT получают путем активации с помощью Тетрафторборат 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP) с

использованием подходы прямого связывания с использованием химии цианилирования.

Другой целью настоящего раскрытия является предоставление способа получения мультивалентной *Стрептококк пневмонии* полисахаридно-белковой конъюгированной вакцинной композиции, в которой все конъюгаты на основе ТТ получают путем первого приготовления производного от АДН ТТ (в присутствии EDAC) с последующим конъюгированием его с CDAP-активированными полисахаридами.

Еще одной целью настоящего раскрытия является предоставление способ получения мультивалентной *Стрептококк пневмонии* полисахаридно-белковой конъюгированной вакцинной композиции, обладающей высокой эффективностью конъюгации.

Другой целью настоящего раскрытия является предоставление способа для приготовления мультивалентного *Стрептококк пневмонии* вакцинная композиция из полисахаридно-белкового конъюгата обладает высоким извлечением полисахаридов.

Еще одной целью настоящего раскрытия является предоставление способа получения мультивалентного *Стрептококк пневмонии* вакцинная композиция из конъюгата полисахарид-белок, в которой структурная целостность полисахаридов поддерживается за счет использования гомогенизации под высоким давлением (в отличие от химического проклеивания).

Еще одной целью настоящего раскрытия является предоставление мультивалентного *Стрептококк пневмонии* вакцинная композиция, конъюгированной с полисахаридом-белком, включающем конъюгаты пневмококкового полисахарида-белка-носителя.

Другой целью настоящего раскрытия является предоставление мультивалентной *Стрептококк пневмонии* полисахаридно-белковой

конъюгированной вакцинной композиций, содержащей более одного конъюгированного с белком-носителем пневмококкового полисахарида.

Еще одной целью настоящего раскрытия является предоставление мультивалентной *Стрептококк пневмонии* композиция полисахаридно-белковой конъюгированной вакцины, обеспечивающей защиту от наиболее распространенных серотипов пневмококка.

Еще одной целью настоящего раскрытия является предоставление мультивалентной *Стрептококк пневмонии* полисахаридно-белковой конъюгированной вакцинной композиции, обладающей повышенной иммуногенностью.

Еще одной целью настоящего раскрытия является предоставление мультивалентной *Стрептококк пневмонии* композиция полисахаридно-белковой конъюгированной вакцины, выявляющей перекрестную реактивность к серотипам пневмококка.

Еще одной целью настоящего раскрытия является предоставление мультивалентной *Стрептококк пневмонии* полисахаридно-белковой конъюгированной вакцинной композиции, лишенной агрегатов и обладающей долгосрочной стабильностью в широком диапазоне температур.

Другой целью настоящего раскрытия является предоставление мультивалентной *Стрептококк пневмонии* полисахаридно-белковой конъюгированной вакцинной композиции, имеющей увеличенное количество геля квасцов, что приводит к оптимальной адсорбции и, таким образом, обеспечивает повышенный ответ IgG-антител, опосредованный В-клетками.

Еще одной целью настоящего раскрытия является предоставление мультивалентной *Стрептококк пневмонии* вакцинной композиции из полисахаридно-белкового конъюгата, содержащей большее количество полисорбата 20 (Твин 20), что приводит к составу без агрегации и улучшенным свойствам текучести.

Другой целью настоящего раскрытия является предоставление многовалентной *Стрептококк пневмонии* полисахаридно-белковая конъюгированной вакцинной композиции, имеющей оптимальную молекулярную массу полисахарида серотипа 4 (100-200 кДа), серотипа 24F (100-200 кДа), серотипа 3 (100-200 кДа), серотипа 6A (400-900 кДа), серотипа 6B (100-200 кДа), серотипа 9V (100-200 кДа), серотипа 15B (100-200 кДа), серотипа 19A (100-200 кДа), серотипа 22F (100-200 кДа) и соответствующего полисахарида-белковые конъюгаты, тем самым обеспечивая улучшенную иммуногенность (по сравнению с тем, когда эти полисахариды конъюгируются с CRM197).

Еще одной целью настоящего раскрытия является предоставление многовалентной *Стрептококк пневмонии* полисахаридно-белковая конъюгированная вакцинная композиция с минимальным содержанием свободных полисахаридов.

Другие цели и преимущества настоящего раскрытия будут более очевидны из следующего описания, которое не предназначено для ограничения объема настоящего раскрытия.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Заявитель обнаружил, что 1) ожидается, что более низкая адсорбция на квасцах подвергнет соответствующие конъюгированные антигены риску деградации с течением времени, когда вакцинный состав находится на полке, следовательно, для *Пневмококк Streptococcus pneumoniae* серотипы 4, 6B, 7F, 14, 15B, 18C, 19F, 22F, увеличение количества квасцового геля со 125 мкг до 187,5 мкг на дозу приводило к улучшению адсорбции (по меньшей мере, на 30% для всех серотипов) (по меньшей мере, на 80% для серотипов 1, 2, 3, 5, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F 33F) и, таким образом, обеспечивало повышенный ответ IgG-антител, опосредованный В-клетками (IgG, по меньшей мере, в 2 раза выше); 2) более высокое количество полисорбата 20 в мультивалентных пневмококковых конъюгированных вакцинах привело к получению препарата без агрегации, улучшенным свойствам текучести (особенно в присутствии

повышенного содержания геля с большее количество добавляемых антигенов); 3) новая улучшенная, стабильная и иммуногенная мультивалентная полисахаридно-белковая конъюгированная вакцинная композиция (предпочтительно 20-валентная или 21-валентная), имеющая конъюгаты, полученные с использованием CDAP, включающие три различных белка-носителя (DT, TT, CRM197), где серотипы 4 и 24F индивидуально конъюгированы с DT; серотипы 3, 6A, 9V, 15B, 19A, 22F индивидуально конъюгированы с TT, остальные полисахариды из серотипов (1, 2, 5, 6B, 7F, 8, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19F, 23F, 33F) индивидуально конъюгированы с CRM197; 4) все CRM197 и DT на основе конъюгаты получают путем активации с помощью Тетрафторборат 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP) с использованием подходы прямого связывания с использованием химии цианилирования, в то время как все конъюгаты на основе TT получают путем первого приготовления производного от ADH TT (в присутствии EDAC) с последующим конъюгированием его с CDAP-активированными полисахаридами; 5) оптимальная молекулярная масса полисахарида серотипа 4 находится в диапазоне от 130 до 170 кДа (SEC-HPLC), серотипа 24F находится в диапазоне от 100 до 200 кДа (SEC-HPLC), серотипа 3 находится в диапазоне от 140 до 180 кДа (SEC-HPLC). ВЭЖХ), серотип 6A находится в диапазоне от 400 кДа до 900 кДа (SEC-HPLC), серотип 6B составляет в диапазоне от 100 кДа до 200 кДа (SEC-HPLC), серотип 9V находится в диапазоне от 120 кДа до 160 кДа (SEC-HPLC), серотип 15B находится в диапазоне от 120 кДа до 160 кДа (SEC-HPLC), серотип 19A - от 120 кДа до 160 кДа (SEC-HPLC), 22F находится в диапазоне от 100 кДа до 150 кДа (SEC-HPLC)) и оптимальная молекулярная масса полисахарид-белковых конъюгатов серотипа 4 находится в диапазоне от 3000 кДа до 10000 кДа (СЕК-МАЛ), серотип 24F находится в диапазоне от 1500 кДа до 10000 кДа (СЕК-МАЛ), серотип 3 находится в диапазоне от 3000 кДа до 10000 кДа (СЕК-МАЛ), серотип 6A находится в диапазоне от 7000 кДа до 10000 кДа (СЕК-МАЛ), серотип 6B находится в диапазоне от 4000 кДа до 15000 кДа (СЕК-МАЛ), серотип 9V находится в диапазоне от 15000 кДа до 30000 кДа (СЕК-МАЛ), серотип 15B находится в диапазоне от 6000 кДа до 10000 кДа (СЕК-МАЛ), серотип 19A находится в диапазоне

от 5000 кДа до 8000 кДа (СЕК-МАЛ), серотип 22F находится в диапазоне от 9000 кДа до 18000 кДа (СЕК-МАЛ), обеспечивая тем самым повышенную иммуногенность. (по сравнению с тем, когда эти полисахариды конъюгированы с CRM197); 6) высокая эффективность конъюгации (от 40 % до 45 % для серотипов 4 и 24F, от 30 % до 35 % для серотипа 3, от 40 % до 45 % для серотипа 6A, от 25 % до 30 % для серотипа 9V, от 45 % до 55 % для серотипа 15B, от 30 % до 35 % для серотипа 19A, от 40 % до 45 % для серотипа 22F); 7) оптимальная адсорбция конъюгатов (не менее 30 %); 8) содержание свободных полисахаридов <15 % для всех конъюгатов и свободного белка (<10%); и 9) высокое извлечение полисахаридов и структурная целостность, поддерживаемая за счет использования гомогенизации под высоким давлением (в отличие от химической калибровки).

Кроме того, вакцинные композиции были приготовлены с использованием подхода с использованием двух смесей, при котором некоторые серотипы адсорбируются по отдельности в качестве первого набора, а остальные серотипы адсорбируются вместе во втором наборе с последующим смешиванием обоих наборов для получения вакцинной композиции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРИЛАГАЕМЫХ ЧЕРТЕЖЕЙ

Настоящее раскрытие теперь будет описано с помощью прилагаемого чертежа, на котором:

ФИГУРА 1 иллюстрирует технологическую схему получения конъюгата полисахарид-белок-носитель пневмококка в соответствии с вариантом осуществления настоящего раскрытия; и

ФИГУРА 2 иллюстрирует технологический процесс приготовления вакцинной композиции в соответствии с вариантом осуществления настоящего раскрытия.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Хотя настоящее раскрытие может быть восприимчиво к различным вариантам осуществления, определенные варианты осуществления показаны на чертеже и после подробного обсуждения, при том понимании, что настоящее раскрытие может рассматриваться как иллюстрация принципов раскрытия и не предназначено для ограничения объема раскрытия тем, что проиллюстрировано и раскрыто в этом описании.

Варианты осуществления предоставлены таким образом, чтобы полностью передать объем настоящего раскрытия специалисту в данной области техники. Изложены многочисленные детали, относящиеся к конкретным компонентам и процессам, для обеспечения полного понимания вариантов осуществления настоящего раскрытия. Специалисту в данной области будет очевидно, что детали, представленные в вариантах осуществления, не должны быть истолкованы как ограничивающие объем настоящего раскрытия. В некоторых вариантах осуществления хорошо известная композиция, хорошо известные процессы и хорошо известные методики подробно не описаны.

Терминология, используемая в настоящем раскрытии, предназначена только для объяснения конкретного варианта осуществления, и такая терминология не должна рассматриваться как ограничивающая объем настоящего раскрытия. Используемые в настоящем раскрытии формы "a", "an" и "the" могут также включать формы множественного числа, если контекст явно не предполагает иного.

Условия "включает в себя", "содержащий", "включая" и "имея" являются переходными фразами с открытым концом и, следовательно, указывают на наличие указанных функций, целых чисел, шагов, операций, элементов, модулей, единиц измерения и/или компонентов, но не запрещают наличие или добавление одной или нескольких других функций, целых чисел, шагов, операций, элементов, компонентов и/или их групп. Конкретный порядок этапов, раскрытый в процессе настоящего раскрытия, не следует толковать как обязательно требующий их выполнения в соответствии с описанием или

иллюстрацией. Также следует понимать, что могут быть использованы дополнительные или альтернативные этапы.

Термины "первый", "второй", "третий" и т.д. Не следует толковать как ограничивающие объем настоящего раскрытия, поскольку вышеупомянутые термины могут использоваться только для отличия одного элемента, компонента, области, слоя или секции от другого компонента, области, слоя или секции. Такие термины, как первый, второй, третий и т.д., используемые здесь, не подразумевают конкретной последовательности или порядка, если только это четко не указано в настоящем раскрытии.

Понятно, что каждый признак, или вариант осуществления, или комбинация, описанные здесь, являются неограничивающим, иллюстративным примером любого из аспектов изобретения и, как таковые, предназначены для комбинирования с любым другим признаком, или вариантом осуществления, или комбинацией, описанными здесь. Например, когда признаки описаны с помощью таких формулировок, как "один вариант осуществления", "некоторые варианты осуществления", "определенные варианты осуществления", "дополнительный вариант осуществления", "конкретные примерные варианты осуществления" и/или "другой вариант осуществления", каждый из этих типов вариантов осуществления представляет собой неограничивающий пример признака, который предназначен для комбинирования с любым другим признаком или комбинацией признаков, описанных здесь, без необходимости перечислять все возможные комбинации. Такие признаки или комбинации признаков применимы к любому из аспектов изобретения.

Определения:

Для того чтобы настоящее раскрытие было более понятным, ниже сначала даются определения некоторым терминам. Дополнительные определения для следующих терминов и другие термины могут быть изложены в спецификации.

Используемый здесь термин "серотип", упомянутый во всем настоящем раскрытии, относится к Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* серотип, если не указано иное.

Используемый здесь термин "полисахарид" относится к полисахариду/сахаридам/сахару/углеводу, который является внешним по отношению к клеточной стенке, но соприкасается с ней. Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* серотипы: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6A, 6B, 6C, 6D, 6E, 6F, 6G, 6H, 7A, 7B, 7C, 7D, 7F, 8, 9A, 9L, 9F, 9N, 9V, 10A, 10B, 10C, 10D, 10F, 11, 11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F, 12A, 12B, 12F, 13, 13FF, 14, 15A, 15B, 15C, 15F, 16, 16A, 16F, 17A, 17F, 18, 18A, 18B, 18C, 18F, 19A, 19B, 19C, 19F, 20, 20A, 20B, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24A, 24B, 24F, 25A, 25F, 27, 28A, 28F, 29, 31, 32A, 32F, 33A, 33B, 33C, 33D, 33E, 33F, 34, 35A, 35B, 35C, 35D, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41A, 41F, 42, 43, 44, 45, 46, 47A, 47F и 48.

Используемый здесь "белок-носитель" относится к любому белку, который конъюгирован с полисахаридом, как правило, с целью усиления или облегчения обнаружения антигена иммунной системой. Композиция(ы) по настоящему раскрытию включает более одного конъюгата с полисахаридом пневмококка, и каждый конъюгат содержит белок-носитель, конъюгированный с полисахаридом из другого серотипа пневмококковой инфекции. Пневмококк *Streptococcus pneumoniae*.

Используемый здесь термин "конъюгат(ы)" или "конъюгат(ы) белка-полисахарида-носителя" относится к Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* полисахарид, конъюгированный с белком-носителем с использованием химии конъюгации CDAP.

Используемый здесь термин "молекулярный вес" относится к среднemasсовой молекулярной массе и является мерой молекулярного размера полисахарида, оцененного либо методом ВЭЖХ-RI, либо методом ВЭЖХ-УФ/RI, либо методом HPSEC-УФ/RI/MALS. В случае пневмококкового полисахарида (ов) молекулярную массу рассчитывают методом размерно-эксклюзионной хроматографии (SEC) в сочетании с

высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Термины SEC-HP-RI и SEC-HPLC используются взаимозаменяемо во всей спецификации. В случае конъюгата (ов) пневмококкового полисахарида-белка-носителя "молекулярная масса" или "молекулярный размер" вычисляется методом высокоэффективной размерно-экслюзионной хроматографии (SEC) в сочетании с многоугловым лазерным рассеянием света (MALS).

Используемый здесь термин "вакцинная композиция" относится к биологическому препарату, который обеспечивает активный приобретенный иммунитет по меньшей мере против одного *S. pneumoniae* серотип и может взаимозаменяемо использоваться с термином "вакцина".

Используемый здесь термин "эффективное количество", описанный в настоящем описании, относится к количеству, необходимому для вызова иммунного ответа у субъекта, которому вводят композицию. Иммунный ответ характеризуется наличием одного или более Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* антигенспецифические антитела у хозяина, которые значительно снижают вероятность или тяжесть инфицирования Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* во время последующего вызова.

Используемый здесь термин "доза" относится к однократному введению вакцинной композиции по настоящему раскрытию и обычно составляет 0,5 мл, если не указано иное.

Используемый здесь термин "субъект" относится к млекопитающему, включая мышей, кроликов и людей. В определенных вариантах осуществления субъектом является взрослый, подросток или младенец. В некоторых вариантах осуществления используются термины "индивид" или "пациент", которые предназначены для взаимозаменяемости с термином "субъект".

Используемые здесь термины "полисорбат 20" и "твин 20" взаимозаменяемы во всем описании.

Настоящее раскрытие предусматривает способы приготовления вакцинных композиций с использованием подхода с использованием двух смесей. В Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* полисахариды индивидуально конъюгируются с белками-носителями и производятся с использованием химии конъюгации цианилированием для обеспечения оптимальной иммуногенности и стабильности вакцинной композиции. В вакцинной композиции используется более одного типа белка-носителя. Настоящее раскрытие дополнительно предусматривает вакцинные композиции, содержащие Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* полисахариды, которые способны предотвращать и/или лечить Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* болезни.

В одном из аспектов настоящего раскрытия предлагается способ получения стабильный и иммуногенный мультивалентный конъюгат полисахарид-белок пневмококка композиция вакцины. Метод включает индивидуальное конъюгирование полисахаридов пневмококка со специфическими белками-носителями. Полученные конъюгаты пневмококкового полисахарида-белка-носителя смешивают с гистидином и NaCl с последующей адсорбцией на адъюванте из соли алюминия в присутствии сукцината в виде двух отдельных смесей, содержащих специфические полученные конъюгаты пневмококкового полисахарида-белка-носителя. Затем две смеси смешивают для получения вакцинной композиции по настоящему изобретению. Способ подробно описан в следующих параграфах.

В варианте осуществления настоящего раскрытия способ приготовления вакцинной композиции включает следующие этапы:

- i. индивидуально конъюгирующий пневмококковый полисахарид, полученный из *Стрептококк пневмонии* серотипы выбран из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6А, 6В, 6С, 6D, 6Е, 6F, 6G, 6Н, 7А, 7В, 7С, 7D, 7F, 8, 9А, 9L, 9F, 9N, 9V, 10А, 10В, 10С, 10D, 10F, 11, 11А, 11В, 11С, 11D, 11Е, 11F, 12А, 12В, 12F, 13, 13FF, 14, 15А, 15В, 15С, 15F, 16, 16А, 16F, 17А, 17F, 18, 18А, 18В, 18С, 18F, 19А, 19В, 19С, 19F, 20, 20А, 20В, 21, 22А, 22F, 23А, 23В, 23F, 24А, 24В, 24F, 25А,

25F, 27, 28A, 28F, 29, 31, 32A, 32F, 33A, 33B, 33C, 33D, 33E, 33F, 34, 35A, 35B, 35C, 35D, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41A, 41F, 42, 43, 44, 45, 46, 47A, 47F и 48 к белку-носителю в соотношении между 1: 0,5 и 1:1,5, и в рН в пределах досягаемости от 8,0 до 10 для получения конъюгатов полисахарид-белок-носитель;

- ii. адсорбирование первого набора конъюгатов полисахарид-белок пневмококка, содержащих полисахариды, полученные из *Стрептококк пневмонии* серотипы, выбранные из группы, состоящей из 4, 6A, 9V, 15B, 22F и 23F, полученные на стадии (i) на адъюванте из соли алюминия в присутствии соли, гистидина и янтарной кислоты при температуре в диапазоне от 18°C до 30°C, рН в диапазоне от 5,0 до 7,0, в течение периода времени от 18 до 30 часов;
- iii. адсорбирование второго набора конъюгатов пневмококкового полисахарида с белком-носителем, содержащих полисахариды, полученные из *S. pneumoniae* серотипы, выбранные из группы, включающей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6A, 6B, 6C, 6D, 6E, 6F, 6G, 6H, 7A, 7B, 7C, 7D, 7F, 8, 9A, 9L, 9F, 9N, 9V, 10A, 10B, 10C, 10D, 10F, 11, 11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F, 12A, 12B, 12F, 13, 13FF, 14, 15A, 15B, 15C, 15F, 16, 16A, 16F, 17A, 17F, 18, 18A, 18B, 18C, 18F, 19A, 19B, 19C, 19F, 20, 20A, 20B, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24A, 24B, 24F, 25A, 25F, 27, 28A, 28F, 29, 31, 32A, 32F, 33A, 33B, 33C, 33D, 33E, 33F, 34, 35A, 35B, 35C, 35D, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41A, 41F, 42, 43, 44, 45, 46, 47A, 47F и 48, 6A, 9V, 15B, 22F и 23F, полученные на стадии (i) на адъюванте из соли алюминия в присутствии соли, гистидина и янтарной кислоты при температуре в диапазоне от 18 °С до 30 °С, рН в диапазоне от 5,0 до 7,0, для период времени в от 12 часов до 24 часов; и
- iv. смешивание первого набора, полученного на этапе (ii), со вторым набором, полученным на этапе (iii), в присутствии поверхностно-активного вещества в диапазоне 80 от мкг до 150 мкг на дозу 0,5 мл композиции с помощью плоского лопастного

рабочего колеса турбины Rushton для период времени от 50 до 80 часов при температуре в диапазоне от 4 ° С до 12°С.

В варианте осуществления настоящего изобретения пневмококковые полисахариды конъюгируют с белком-носителем с использованием реакции цианилирования, и вакцинная композиция включает по меньшей мере три различных белка-носителя.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения вакцинная композиция включает i) общую концентрацию адъюванта соли алюминия в диапазоне 20–375 мкг Al.³⁺ на дозу 0,5 мл композиции, ii) каждый полисахарид-белок-носитель имеет процент адсорбции не менее 30 %, iii) сохраняет желаемые физико-химические и иммуногенные характеристики конъюгата полисахарида сахарид-белок-носитель, и iv) поверхностно-активное вещество в диапазоне 80 от мкг до 150 мкг на дозу 0,5 мл композиции приводит к минимальный образование агрегатов и частиц и улучшенные текучие свойства вакцинной композиции.

В другом варианте осуществления второй набор конъюгатов пневмококкового полисахарида с белком-носителем содержит *S. pneumoniae* полисахариды, полученные из серотипов, выбранных из группы, включающей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6А, 6В, 6С, 6D, 6Е, 6F, 6G, 6Н, 7А, 7В, 7С, 7D, 7F, 8, 9А, 9L, 9F, 9N, 9V, 10А, 10В, 10С, 10D, 10F, 11, 11А, 11В, 11С, 11D, 11Е, 11F, 12А, 12В, 12F, 13, 13FF, 14, 15А, 15В, 15С, 15F, 16, 16А, 16F, 17А, 17F, 18, 18А, 18В, 18С, 18F, 19А, 19В, 19С, 19F, 20, 20А, 20В, 21, 22А, 22F, 23А, 23В, 23F, 24А, 24В, 24F, 25А, 25F, 27, 28А, 28F, 29, 31, 32А, 32F, 33А, 33В, 33С, 33D, 33Е, 33F, 34, 35А, 35В, 35С, 35D, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41А, 41F, 42, 43, 44, 45, 46, 47А, 47F и 48.

В предпочтительном варианте осуществления второй набор конъюгатов пневмококкового полисахарида с белком-носителем включает *S. pneumoniae* полисахариды, полученные из серотипов, выбранных из группы, состоящей из 1, 2, 3, 5, 6В, 7F, 8, 10А, 11А, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 24F и 33F.

В варианте осуществления второй набор конъюгатов пневмококкового полисахарида с белком-носителем включает *S. pneumoniae* полисахариды, полученные из серотипов, выбранных из группы, состоящей из 1, 2, 5, 6В, 7F, 8, 10А, 11А, 12F, 14, 18С, 19А, 19F и 33F.

В варианте осуществления второй набор конъюгатов пневмококкового полисахарида с белком-носителем содержит *S. pneumoniae* полисахариды, полученные из серотипов, выбранных из группы, состоящей из 1, 2, 3, 5, 6В, 7F, 8, 10А, 11А, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 24F и 33F.

В варианте осуществления второй набор конъюгатов пневмококкового полисахарида с белком-носителем содержит *S. pneumoniae* полисахариды, полученные из серотипов, выбранных из группы, состоящей из 1, 2, 5, 6В, 7F, 8, 10А, 11А, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 24F и 33F.

В другом варианте осуществления второй набор конъюгатов пневмококкового полисахарида с белком-носителем включает по меньшей мере один *S. pneumoniae* полисахарид, полученный из серотипов 9А, 9N и 9L.

В еще одном варианте осуществления второй набор конъюгатов пневмококкового полисахарида с белком-носителем лишен *S. pneumoniae* полисахарид, полученный из серотипа 3.

Пневмококковые полисахариды вакцинных композиций по настоящему раскрытию экстрагируются из Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* с использованием известных методов. Ферментация, очистка, калибровка Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* серотипы могут быть проведены согласно методам, раскрытым в 786/MUM/2007, 1075/MUM/2009, 282/MUM/2012, WO2012127485, WO2013088448, 2889/MUM/2014, IN201623002962, WO2016199003, IN201921036006 или WO2021229604. Вкратце, пневмококковые полисахариды получают путем выращивания отдельных особей. *S. pneumoniae* серотипы в среде с pH в диапазоне от 7 до 8, температурой в диапазоне 35–38°C при

перемешивании со скоростью от 50 до 150 об/мин при скорости воздушного потока от 0 до 0,5 об/мин. Полученный урожай концентрируют и диафильтруют, после чего обычно проводят ферментативную и химическую обработку для извлечения полисахарида. Затем следует центрифугирование и одна или несколько стадий хроматографии для удаления примесей и дальнейшей диафильтрации для получения очищенных нативных полисахаридов.

В варианте осуществления полученный выше осветленный ферментационный бульон серотипов пневмококков концентрируют и диафильтруют (мембрана MWCO массой 100 кДа; 25 мМ натрий-фосфатный буфер при нейтральном pH с последующей диафильтрацией водой для инъекций (WFI)). Концентрированный и диафильтрованный бульон, содержащий полисахарид, подвергают ферментативной обработке (нуклеазой) при 37°C в течение 10±2 часов при перемешивании. Обработанный ферментом раствор полисахарида обрабатывают химическим веществом, таким как сульфат аммония, и подвергают центрифугированию с последующей диафильтрацией. Диафильтрованный раствор, содержащий полисахарид, подвергают хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC) на колонке с последующим концентрированием и диафильтрацией. За этим следует еще один этап хроматографии с использованием ионообменной хроматографической колонки. Полисахариды, поступающие в колонку, элюируются с использованием соли (NaCl) (различные полисахариды элюировали при различной ионной силе соли). Затем раствор полисахарида концентрируют, а затем диафильтруют. Диафильтрованный раствор полисахарида дополнительно фильтруют и хранят замороженным до дальнейшего использования.

В варианте осуществления способ настоящего раскрытия лишен стадии мультимодальной хроматографии во время очистки полисахарида(ов).

В другом варианте осуществления способ настоящего раскрытия лишен стадии флокуляции (многовалентный катион, выбранный из группы, состоящей из алюминия, железа, кальция и магния) во время очистки полисахарида(ов).

Штаммы бактерий, используемые для получения полисахаридов может быть получен в установленных центрах сбора культур, таких как, Центры по контролю и профилактике заболеваний (CDC), Атланта, США; CBER/FDA, США; ATCC, США; NIH, США; NIAID, США; PHE, Великобритания и тому подобное. Аналогично, белки-носители, используемые в настоящем раскрытии, могут быть получены из установленных источников.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия, (i) серотипы пневмококка 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F получены из Центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC) Атланты, США; (ii) серотип пневмококка 24F получен из Института медицинских наук Кемпеговда (KIMS), Бангалор, Индия; (iii) *Pseudomonas fluorescens* (для CRM197) получен от Pfenex Inc, США; (iv) *Corynebacterium diphtheriae* (штамм CN 2000) для дифтерийного анатоксина (DT) был получен Национальным контрольным органом Центрального исследовательского института (C.R.I.) Касаули, НР, Индия, из Исследовательской лаборатории Wellcome, Лондон, Великобритания, и штамм был выпущен Serum Institute of India Private Limited в 1973 году; и (v) *Clostridium tetani* (*Клостридиум тетани*) (Harvard 49205) был получен Национальным контрольным органом Центрального исследовательского института (C.R.I.) Касаули, НР, Индия от Нидерландского института вакцин (NVI), и штамм был выпущен Serum Institute of India Private Limited в 1973 году.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия общее содержание азота (%) в очищенном полисахариде определяют/измеряют с использованием известных методов. Общее содержание азота может быть определено/измерено с использованием метода ТОС ТНМ, метода Кьельдаля, метода CHNS, ЯМР, НРАЕС-РАD или любого другого метода. В предпочтительном варианте осуществления общее содержание азота может быть определено/измерено с использованием метода ТОС ТНМ.

В одном из вариантов осуществления экстрагированные и очищенные пневмококковые полисахариды используются в нативной форме.

В другом варианте осуществления экстрагированные и очищенные пневмококковые полисахариды измельчают для получения одной или нескольких частей пневмококковых полисахаридов. Молекулярная масса измельченных полисахаридов меньше, чем у экстрагированные и очищенные пневмококковые полисахариды в нативной форме.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия, пневмококковый полисахарид определяют по размеру перед конъюгацией с соответствующим белком-носителем с использованием один или несколько способов термической обработки, звуковой обработки, механических средств, химического гидролиза, эндолитической ферментативной обработки, физического сдвига, гомогенизатора гаулина и обработки ультразвуком для получения размера пневмококковый полисахарид, имеющий молекулярную массу в диапазоне от 50 кДа до 600 кДа (СЕК-ВЭЖХ). В предпочтительном варианте размер полисахарид пневмококка имеет молекулярную массу в диапазоне от 100 кДа до 200 кДа (СЕК-ВЭЖХ). В варианте осуществления калибровку осуществляют с использованием химического гидролиза с использованием одного или нескольких $FeCl_3$, CH_2O_2 , обработка метапериодатом натрия и ацетатом натрия.

Видно, что эффективность конъюгации/выход конъюгата, иммуногенность конъюгатов, полученных с использованием полисахаридов с частичным уменьшением размера, выше по сравнению с конъюгатами, полученными из полноразмерных (нативных) полисахаридов. Кроме того, уменьшение размера полисахаридов снижает вязкость раствора и увеличивает количество реакционноспособных концевых групп, способствуя увеличению частоты образования ковалентной связи.

В варианте осуществления калибровку осуществляют механическими средствами с использованием гомогенизатора высокого давления. В варианте осуществления, калибровку проводят со скоростью 20–30 КПСИ (килограмм-фунтов на квадратный дюйм), предпочтительно 24–30

КПСИ с использованием не менее чем 1 прохода. В другом варианте осуществления используют от 1 до 3 проходов для получения полисахарида желаемого размера с молекулярной массой. В еще одном варианте осуществления также может быть использовано более 3 проходов для получения полисахарида требуемого размера с желаемой молекулярной массой. KPSI может варьироваться в зависимости от *S. pneumoniae* серотип, из которого получен полисахарид. В соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия наблюдается высокое извлечение полисахаридов и поддержание структурной целостности полисахаридов, когда для калибровки полисахаридов используется гомогенизация под высоким давлением по сравнению с тем, когда для калибровки полисахаридов используется химический метод калибровки.

В другом варианте осуществления пневмококковый полисахарид не подвергают калибровке перед конъюгацией с белком-носителем. В варианте осуществления пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 6А, не подвергается калибровке перед конъюгацией с белком-носителем. В варианте осуществления, в полисахарид, полученный из серотипа 6А, используется в нативной форме и имеет молекулярную массу в диапазоне от 400 кДа до 900 кДа (SEC-HPLC), предпочтительно в диапазоне от 700 кДа до 800 кДа (SEC-HPLC).

В варианте осуществления молекулярная масса полисахарида определенного размера, полученного из серотипа 4, находится в диапазоне от 130 кДа до 170 кДа (SEC-VЭЖХ), предпочтительно в диапазоне от 130 кДа до 165 кДа (SEC-VЭЖХ).

В варианте осуществления молекулярная масса полисахарида определенного размера, полученного из серотипа 3, находится в диапазоне от 140 до 180 кДа (SEC-VЭЖХ), предпочтительно в диапазоне от 150 до 170 кДа (SEC-VЭЖХ).

В варианте осуществления молекулярная масса полисахарида определенного размера, полученного из серотипа 24F, находится в диапазоне от 100 до 200 кДа (SEC-VЭЖХ), предпочтительно в диапазоне

от 120 до 170 кДа (СЕК-ВЭЖХ), более предпочтительно в диапазоне от 130 до 160 кДа (СЕК-ВЭЖХ).

В варианте осуществления молекулярная масса полисахарида определенного размера, полученного из серотипа 6В, находится в диапазоне от 100 до 200 кДа (SEC-HPLC), предпочтительно в диапазоне от 110 до 175 кДа (SEC-HPLC), более предпочтительно в диапазоне от 130 до 160 кДа.

В варианте осуществления молекулярная масса полисахарида определенного размера, полученного из серотипа 9V, находится в диапазоне от 120 до 160 кДа (СЕК-ВЭЖХ), предпочтительно в диапазоне от 130 до 150 кДа (СЕК-ВЭЖХ).

В варианте осуществления молекулярная масса полисахарида определенного размера, полученного из серотипа 15В, находится в диапазоне от 120 до 160 кДа (СЕК-ВЭЖХ), предпочтительно в диапазоне от 130 до 150 кДа (СЕК-ВЭЖХ).

В варианте осуществления молекулярная масса полисахарида определенного размера, полученного из серотипа 19А, находится в диапазоне от 120 кДа до 160 кДа (СЕК-ВЭЖХ), предпочтительно в диапазоне от 130 кДа до 150 кДа (СЕК-ВЭЖХ).

В варианте осуществления молекулярная масса полисахарида определенного размера, полученного из серотипа 22F, находится в диапазоне от 100 до 150 кДа (СЕК-ВЭЖХ), предпочтительно в диапазоне от 120 до 140 кДа (СЕК-ВЭЖХ).

В другом варианте осуществления полисахарид, полученный из *S. pneumoniae* серотип 24F определяют с помощью гомогенизатора высокого давления. В варианте осуществления полисахарид, полученный из *S. pneumoniae* серотип 24F не определяется с помощью кислотного гидролиза (уксусная кислота, HCl, фосфорная, лимонная кислота или их смесь).

В другом варианте осуществления нативный полисахарид, полученный из *S. pneumoniae* серотип 6В имеет молекулярную массу >200 кДа (SEC-HPLC), которая после уменьшения размера с использованием гомогенизатора составляет <200 кДа (SEC-HPLC). В еще одном варианте осуществления вакцинная композиция по настоящему раскрытию лишена полисахарида, полученного из *S. pneumoniae* серотип 6В с молекулярной массой 500-1800 кДа (СЕК-ВЭЖХ).

В варианте осуществления настоящего изобретения полисахарид, полученный из *S. pneumoniae* серотип определяют с использованием трифторуксусной кислоты (ТФА) для получения полисахарида определенного размера, имеющего молекулярную массу в диапазоне от 100 до 200 кДа (СЕК-ВЭЖХ).

В варианте осуществления полисахарид, полученный из *S. pneumoniae* серотип 18С имеет >80% О-ацетилирования.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия соль на этапе (ii) и этапе (iii) выбирается из группы, включающей хлорид магния, хлорид калия, хлорид натрия и их комбинации, и концентрация соли в вакцинной композиции находится в диапазоне от 2 мг до 10 мг на дозу 0,5 мл вакцинной композиции. В варианте осуществления соль представляет собой хлорид натрия. В предпочтительном варианте осуществления концентрация соли в вакцинной композиции составляет 4,5 мг на дозу 0,5 мл вакцинной композиции.

В другом варианте, гистидин на стадии (ii) и стадии (iii) находится в диапазоне от 0,1 мг до 10 мг на дозу 0,5 мл вакцинной композиции. В еще одном варианте осуществления янтарная кислота на стадии (ii) и стадии (iii) находится в диапазоне от 0,1 мг до 10 мг на дозу 0,5 мл вакцинной композиции. Предпочтительно концентрация янтарной кислоты в конечном препарате мультивалентной конъюгированной вакцины составляет 20 мМ (2,36 мг/мл).

Как правило, поверхностно-активное вещество на стадии (iv) выбирают из группы, включающей полисорбат, полимергликоль, сложный эфир сорбитана и их комбинации; и концентрация поверхностно-активного вещества находится в диапазоне от 90 мкг до 120 мкг на дозу 0,5 мл вакцинной композиции. В предпочтительном варианте осуществления поверхностно-активным веществом на стадии (iv) является полисорбат 20, и концентрация полисорбата 20 находится в диапазоне от 80 мкг до 120 мкг на дозу 0,5 мл вакцинной композиции.

В одном из вариантов осуществления пневмококковый полисахарид индивидуально конъюгируется с белком-носителем с использованием карбодимид, восстановительное аминирование или цианилирование сопряжение реакция.

Полисахариды могут быть конъюгированы с соответствующими белками-носителями с использованием различных подходов. Аминокислотные остатки, которые наиболее подходят для химического связывания с полисахаридами, - это те, которые нанесены на поверхность белка-носителя и боковые цепи которых содержат реакционноспособные функциональные группы, такие как первичные аминогруппы лизинов и карбоксильные группы остатков глутаминовой или аспарагиновой кислоты. Карбоксильные группы белков-носителей могут быть конъюгированы с амино- или гидразидными производными полисахаридов путем карбодимидной конденсации; а лизиновые аминогруппы могут быть конъюгированы с полисахаридами путем реакции с их производными, содержащими активные группы, такими как сукцинимидоэфиры или цианоэфиры, квадратными или прямым восстановительным аминированием.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения пневмококковые полисахариды конъюгируют с одним или несколькими белками-носителями, выбранными из группы, включающей CRM-система¹⁹⁷, дифтерийный анатоксин (DT), столбнячный анатоксин (TT), *Нейссерия менингитидис* комплекс внешней мембраны, фрагмент С столбнячного анатоксина, рекомбинантный полноразмерный столбнячный токсин с восемью индивидуальными аминокислотными

мутациями (8МТТ), фрагмент В дифтерийного токсина (DTFB), коклюшный анатоксин, белок *D. H. influenzae*, *E. coli* LT, *E. coli* ST, экзотоксин А из *Синегнойная палочка*, комплекс внешней мембраны с (ОМРС), порины, fHBP, Por А, Por В, трансферринсвязывающие белки, пневмолизин, поверхностный белок пневмококка А (PspA), поверхностный адгезин пневмококка А (PsaA), PhtA, PhtB, PhtE, пневмококковый PhtD, поверхностные белки пневмококка BVH-3 и BVH-11, *M. catarrhalis* uspA, защитный антиген (РА) *Сибирская палочка* (*Bacillus anthracis*) и детоксифицированный фактор отека (ЕF) и летальный фактор (LF) *Бацилла антрацид*, овальбумин, гемоцианин замочной скважины (KLH), Пептидаза С5а группы А или В *Стрептококк*, сывороточный альбумин человека, сывороточный альбумин крупного рогатого скота (BSA), очищенное белковое производное туберкулина (PPD), субъединица холерного токсина В, синтетические пептиды, белки теплового шока, белки коклюша, цитокины, лимфокины, гормоны, факторы роста, искусственные белки, содержащие множество эпитопов CD4+ Т-клеток человека из различных антигенов патогенного происхождения, таких как N19, белки поглощения железа, токсин А или В из *C. difficile* и *S. агалактиевые* белки и любые их эквиваленты.

Белки-носители должны содержать достаточное количество открытых аминокислот, предназначенных для выбранного процесса конъюгации, должны быть стабильными и обладать хорошей растворимостью в буферах и концентрациях, при которых протекают реакции конъюгации.

В варианте осуществления способа по настоящему раскрытию используются три различных белка-носителя, а именно дифтерийный анатоксин (DT), столбнячный анатоксин (ТТ) и CRM197. Пневмококковые полисахариды по отдельности конъюгируются с соответствующим белком-носителем.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пневмококковый полисахарид, полученный из серотипов, выбранных из группы, включающей 3, 6А, 9V, 15В, 19А и

22F, конъюгирован со столбнячным анатоксином в качестве белка-носителя, по меньшей мере один пневмококковый полисахарид, полученный из серотипов 4 и 24F, конъюгирован с дифтерийным анатоксином в качестве белка-носителя и по меньшей мере один пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа, выбранного из группы, включающей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6A, 6B, 6C, 6D, 6E, 6F, 6G, 6H, 7A, 7B, 7C, 7D, 7F, 8, 9A, 9L, 9F, 9N, 9V, 10A, 10B, 10C, 10D, 10F, 11, 11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F, 12A, 12B, 12F, 13, 13F, 14, 15A, 15B, 15C, 15F, 16, 16A, 16F, 17A, 17F, 18, 18A, 18B, 18C, 18F, 19A, 19B, 19C, 19F, 20, 20A, 20B, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24A, 24B, 24F, 25A, 25F, 27, 28A, 28F, 29, 31, 32A, 32F, 33A, 33B, 33C, 33D, 33E, 33F, 34, 35A, 35B, 35C, 35D, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41A, 41F, 42, 43, 44, 45, 46, 47A, 47F и 48 конъюгированы с CRM197 в качестве белка-носителя.

В варианте осуществления настоящего изобретения пневмококковый полисахарид, полученный из серотипов 19A и 19F, индивидуально конъюгируют с белком-носителем того же типа, выбранным из столбнячного анатоксина, дифтерийного анатоксина и CRM197.

В варианте осуществления настоящего изобретения пневмококковый полисахарид, полученный из серотипов 19A и 19F, индивидуально конъюгируют с различными типами белков-носителей, выбранных из столбнячного анатоксина, дифтерийного анатоксина и CRM197.

Для получения иммуногенных конъюгатов полисахарид-белок-носитель обычно используются два метода конъюгации: (1) прямое конъюгирование полисахарида и белка-носителя и (2) непрямое конъюгирование полисахарида и белка-носителя с помощью бифункционального линкерного или спейсерного реагента. Как правило, как прямые, так и непрямые методы конъюгации требуют химической активации углеводной части перед конъюгацией с белком-носителем.

Как правило, очищенный полисахарид химически активируют/модифицируют для образования реакционноспособных групп, которые могут соединяться с белком-носителем. Двумя

наиболее часто используемыми методами активации полисахаридов являются окисление периодата и цианилирование. При окислении периодата концевые гидроксильные группы, присутствующие в полисахариде, окисляются до альдегида с использованием окислителя (периодата, такого как периодат натрия, периодат калия или периодическая кислота). Вицинальные гидроксильные группы полисахарида расщепляются окислителем, что приводит к образованию реакционноспособных альдегидных групп.

Важной потенциальной проблемой при использовании периодата для активации полисахарида является изменение физической структуры полисахарида с потерей важных эпитопов. Видно, что даже низкие уровни активации могут привести к потере специфического эпитопа и созданию новых эпитопов.

Химия цианилирования включает создание реакционноспособных цианоэфирных групп на полисахариде. Цианогенбромид (CNBr) первоначально использовался в качестве цианилирующего агента и был в основном заменен 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторборатом (CDAP) в качестве цианилирующего агента. Химия цианилирования первоначально использовала CNBr для создания реакционноспособных цианоэфирных групп на полисахаридах, использованных в первом конъюгате Hib, о котором сообщил в 1980 году доктор Джон Роббинс.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия пневмококковые полисахариды могут быть конъюгированы с белком-носителем с использованием реакции конъюгации/химического состава, выбранного из группы, состоящей из химического состава цианилирования, химического состава карбодиимидов, химического состава CNBr и химического состава восстановительного аминирования.

В варианте осуществления настоящего раскрытия реакцию конъюгации предпочтительно проводят с использованием цианилирующего агента, выбранного из группы, состоящей из 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторбората (CDAP), CDAP-зеленого, 1-циано-4-

пирролидинопиридиния тетрафторбората (CPPT), 1-цианоимдазола (1-CI), 1-цианобензотриазола (1-CBT), 2-цианопиридазин-3(2H)он (2-CPO), функциональное производное, и его модификации.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия пневмококковые полисахариды конъюгируют с белком-носителем с использованием реакции цианилирования. Пневмококковые полисахариды взаимодействуют с 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторборатом (CDAP) и смешивают в соотношении между от 1:0,3 до 1:2 по весу полисахариды пневмококка: CDAP при температуре в пределах досягаемости от 22 ° С до 25 ° С в течение периода времени от 4 до 10 минут и обращение к CDAP активированный полисахарид с белком-носителем смешивают в соотношении от 1: 0,5 до 1:1,5 по весу CDAP активированный пневмококковые полисахариды: белок-носитель, реакция, проводимая при pH в пределах досягаемости от 8,0 до 10 в течение периода времени от 3 до 5 часов с последующим тушением глицином для получения конъюгатов полисахарид-белок-носитель.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения активацию пневмококковых полисахаридов осуществляют с использованием 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафлуорбората (CDAP). CDAP вступает в реакцию с полисахаридом, обменивая цианогруппу на гидроксильный водород, который в избытке содержится в полисахариде, что приводит к образованию цианоэфира. Этот цианоэфир обладает высокой реакционной способностью. Активацию обычно проводят при pH от 9 до 10, и фактически существует сильная зависимость pH от эффективности активации CDAP PS. Затем цианоэфиры вступают в реакцию с эпсилон-аминными лизина с образованием стабильной связи O-алкил-изомочевина. Активация CDAP занимает всего несколько минут, а конъюгация завершается через несколько часов. Затем реакцию гасят с использованием аминоксодержащего реагента, такого как глицин.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения соотношение полисахарида к CDAP (Ps:CDAP) (в пересчете на массу)

для следующих серотипов составляет: серотип 4 - 1:0,8; серотип 24F-1:1±0,25; серотип 3-1:0,3; серотип 6A-1:1; серотип 9V-1:1; серотип 15B-1:1,2; серотип 19A-1:1; и серотип 22F-1:1.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения соотношение полисахарида к белку-носителю (Ps:Pr) (в пересчете на массу) для следующих серотипов составляет: серотип 4-1:0,9; серотип 24F- 1:1±0,25; серотип 3-1:1; серотип 6A-1:1,2; серотип 9V-1:1; серотип 15B-1:1; серотип 19A-1:1; и серотип 22F-1:1.

Далее, периодат натрия окисляет диолы (2 соседних атома углерода с гидроксильными группами) в альдегиды (RHC=O) и в этом процессе разрывает связи C-C. Таким образом, в зависимости от структуры полисахарида активация периодатом может фрагментировать (уменьшать размер) полисахарид, содержащий внутрицепочечные диолы, или открывать кольцевую структуру повторяющихся звеньев моносахарида, что может изменять конформацию и, потенциально, также иммуногенность полисахарида. Химический метод цианилирования с использованием 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторбората (CDAP) позволяет осуществлять прямое конъюгирование (без использования спейсера) полисахаридных антигенов с белками. CDAP реагирует со свободными OH-группами полисахарида без разрыва цепи, образуя цианоэфирные группы, высокореактивные с аминок группами белков с образованием ковалентных связей. Это также позволяет лучше сохранять нативные полисахаридные эпитопы и оказывает положительное влияние на иммуногенность вакцина композиции.

Настоящее раскрытие использует активацию пневмококковых полисахаридов на основе CDAP перед конъюгацией и, следовательно, устраняет недостатки, связанные с восстановительным аминированием и химией конъюгации на основе CNBr.

В варианте осуществления процесс конъюгации по настоящему раскрытию не включает активацию полисахарида с использованием ацетата натрия с последующим конъюгированием с белком-носителем с использованием восстановителя (цианоборгидрида натрия). В варианте осуществления полисахарид, полученный из серотипа 23F с

CRM197 в качестве белка-носителя, не включает активацию полисахарида с использованием ацетата натрия с последующим конъюгированием с использованием восстановителя (цианоборгидрида натрия).

В варианте осуществления способ настоящего раскрытия не предполагает использования еТЭС-спейсера для конъюгации полисахарида с белком-носителем. В варианте осуществления перед конъюгацией белок (белки) -носитель (ы) дериватизируют с образованием amino-и/или карбоксильных групп с помощью гетеро- или гомо-бифункционального линкера, выбранного из группы, состоящей из гидразина, карбогидразида, хлорида гидразина, дигидразида, ϵ -аминогексановой кислоты, хлоргексанол-диметилацетата, D-глюкуронолактона, цистамина и p-нитрофенилэтиламина, гександиамина, этилендиамина, 1,6 -диаминооксигексан или β -пропинамидо, нитрофенилэтиламин, галогеналкилгалогенид, 6-аминокапроновая кислота и их комбинации. Дериватизация может быть проведена с использованием реакция карбодиимидообразования, восстановительного аминирования или цианилирования.

В предпочтительном варианте гетеро-или гомо-бифункциональным линкером является дигидразид. В примерном варианте гетеро- или гомо-бифункциональным линкером является дигидразид адипиновой кислоты (ADH).

Гидразидные группы могут быть введены в белки через карбоксильные группы остатков аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты на белке с использованием карбодиимидной реакции, восстановительного аминирования, цианилирования, например, путем взаимодействия с гидразином, карбогидразидом, сукцинил дигидразидом, дигидразидом адипиновой кислоты, хлоридом гидразина (например, дигидрохлоридом гидразина) или любыми другими дигидразидами в присутствии карбодиимида, такого как 1-этил-3(3-диметиламинопропил) карбодиимид (EDC). EDC

используется в качестве катализатора для активации и модификации белкового реагента гидразином или дигидразидом.

В варианте осуществления полисахариды, полученные из *S. pneumoniae* серотипы 6A, 9V, 19A, 22F, 15B конъюгированы независимо, конъюгированы с ТТ в качестве белка-носителя. Сначала ТТ дериватизируют с использованием ADH (в присутствии EDAC), а затем конъюгируют с соответствующими полисахаридами, которые были активированы с использованием CDAP.

В другом варианте осуществления полисахарид, полученный из *S. pneumoniae* серотип 3 - это независимо конъюгируется с ТТ в качестве белка-носителя.

В одном из вариантов осуществления пневмококковый полисахарид конъюгируется с белком-носителем в отсутствие линкера.

В воплощение, конъюгаты пневмококкового полисахарида с белком-носителем вакцинной композиции по настоящему раскрытию не получают с использованием химии восстановительного аминирования. Кроме того, способ приготовления вакцинной композиции в соответствии с настоящим раскрытием не содержит реагентов/химических веществ/ферментов, таких как протеаза, протеиназа, диоксид кремния, уксусная кислота, ДМСО, окислитель (периодат, периодат натрия или метапериодат) и борогидрид натрия. В другом варианте осуществления способ настоящего раскрытия не использует бикарбонатный/карбонатный буфер для очистки полисахарида, полученного из *S. pneumoniae* получен из серотипа 1.

В варианте осуществления адъювант в виде соли алюминия на стадии (ii) и стадии (iii) выбирают из группы, включающей гидроксид алюминия, фосфат алюминия, гидроксифосфат алюминия и сульфат алюминия калия и их смеси. Концентрация количество адъюванта из соли алюминия находится в диапазоне от 20 мкг до 375 мкг Al^{3+} на дозу 0,5 мл препарата вакцина композиция. В предпочтительном варианте осуществления итого концентрация адъюванта из соли

алюминия находится в диапазоне от 170 мкг до 200 мкг Al^{3+} на дозу 0,5 мл вакцинной композиции.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия конъюгаты пневмококкового полисахарида с белком-носителем содержат свободного полисахарида менее 15% и свободного белка менее 10%.

В варианте осуществления адсорбцию на стадии (ii) и стадии (iii) проводят в присутствии консерванта. Количество консерванта находится в диапазоне от 1 мг до 8 мг на дозу 0,5 мл препарата. вакцина композиция. Консервант выбран из группы, включающей 2-феноксиэтанол, бензэтония хлорид (фемерол), фенол, м-крезол, тиомерсал, формальдегид, метилпарабен, пропилпарабен, бензалкония хлорид, бензиловый спирт, хлорбутанол, п-хлор-м-крезол, бензиловый спирт и их комбинации. В предпочтительном варианте консервантом является 2-феноксиэтанол, имеющий концентрацию в диапазоне от 2,5 мг до 5 мг на дозу 0,5 мл вакцинной композиции, предпочтительно NMT 5 мг/доза 0,5 мл. В примерном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация 2-феноксиэтанола составляет 4 мг на дозу 0,5 мл вакцинной композиции.

В другом аспекте настоящего раскрытия предусмотрено стабильный и иммуногенный мультивалентный конъюгат полисахарид-белок пневмококка вакцинная композиция, содержащая по меньшей мере один конъюгат пневмококкового полисахарида-белка-носителя.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения пневмококковый полисахарид получают из *S. pneumoniae* серотипы, выбранные из группы, включающей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6A, 6B, 6C, 6D, 6E, 6F, 6G, 6H, 7A, 7B, 7C, 7D, 7F, 8, 9A, 9L, 9F, 9N, 9V, 10A, 10B, 10C, 10D, 10F, 11, 11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F, 12A, 12B, 12F, 13, 13FF, 14, 15A, 15B, 15C, 15F, 16, 16A, 16F, 17A, 17F, 18, 18A, 18B, 18C, 18F, 19A, 19B, 19C, 19F, 20, 20A, 20B, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24A, 24B, 24F, 25A, 25F, 27, 28A, 28F, 29, 31, 32A, 32F, 33A, 33B, 33C, 33D, 33E, 33F, 34, 35A, 35B, 35C, 35D, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41A, 41F, 42, 43, 44, 45, 46, 47A, 47F и 48.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения композиция представляет собой конъюгатную композицию 15, 16, 17, 18, 19, 20 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30-валентный пневмококковый полисахарид-белок-носитель.

В варианте осуществления настоящего изобретения молекулярная масса пневмококковых полисахаридов, за исключением полисахарида, полученного из серотипа 6А, находится в диапазоне от 50 кДа до 600 кДа (SEC-HPLC), предпочтительно в диапазоне от 100 кДа до 200 кДа (SEC-HPLC).

В другом варианте осуществления молекулярная масса пневмококкового полисахарида, полученного из серотипа 6А, находится в диапазоне от 400 кДа до 900 кДа (СЕК-ВЭЖХ).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения каждый пневмококковый полисахарид, присутствующий в вакцинной композиции, индивидуально конъюгирован с белком-носителем.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения пневмококковые полисахариды конъюгируют с одним или несколькими белками-носителями, выбранными из группы, включающей CRM-система₁₉₇, дифтерийный анатоксин (DT), столбнячный анатоксин (TT), *Нейссерия менингитидис* комплекс внешней мембраны, фрагмент С столбнячного анатоксина, рекомбинантный полноразмерный столбнячный токсин с восемью индивидуальными аминокислотными мутациями (8МТТ), фрагмент В дифтерийного токсина (DTFB), коклюшный анатоксин, белок D *H. influenzae*, *E. coli* LT, *E. coli* ST, экзотоксин А из *Синегнойная палочка*, комплекс внешней мембраны с (OMPС), порины, fHBP, Por А, Por В, трансферринсвязывающие белки, пневмолизин, поверхностный белок пневмококка А (PspA), поверхностный адгезин пневмококка А (PsaA), PhtA, PhtB, PhtE, пневмококковый PhtD, поверхностные белки пневмококка BVH-3 и BVH-11, *M. catarrhalis* uspA, защитный антиген (РА) *Сибирская палочка* (*Bacillus anthracis*) и детоксифицированный фактор отека (EF) и летальный фактор (LF) *Бацилла антрацид*, овалбумин, гемоцианин замочной скважины

(KLH), Пептидаза С5а группы А или В *Стрептококк*, сывороточный альбумин человека, сывороточный альбумин крупного рогатого скота (BSA), очищенное белковое производное туберкулина (PPD), субъединица холерного токсина В, синтетические пептиды, белки теплового шока, белки коклюша, цитокины, лимфокины, гормоны, факторы роста, искусственные белки, содержащие множество эпитопов CD4+ Т-клеток человека из различных антигенов патогенного происхождения, таких как N19, белки поглощения железа, токсин А или В из *S. difficile* и *S. agalactiae* и любые их эквиваленты.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия, каждый конъюгат полисахарид-белок-носитель пневмококка имеет молекулярную массу в диапазоне от 1500 кДа до 30000 кДа (в секундах).

В варианте осуществления молекулярная масса конъюгата 6А-ТТ в вакцинной композиции находится в диапазоне от 7000 кДа до 10000 кДа (СЕК-МАЛ), предпочтительно в диапазоне от 8000 кДа до 9000 кДа (СЕК-МАЛ).

В варианте осуществления молекулярная масса конъюгата 4-ДТ в композиции вакцины находится в диапазоне от 3000 кДа до 10000 кДа (СЕК-МАЛ), предпочтительно в диапазоне от 3000 кДа до 9000 кДа (СЕК-МАЛ).

В варианте осуществления молекулярная масса конъюгата 3-ТТ в вакцинной композиции находится в диапазоне от 3000 кДа до 10000 кДа (СЕК-МАЛ), предпочтительно в диапазоне от 4000 кДа до 10000 кДа (СЕК-МАЛ).

В варианте осуществления молекулярная масса конъюгата 24F-ДТ в композиции вакцины находится в диапазоне от 1500 кДа до 10000 кДа (СЕК-МАЛ), предпочтительно в диапазоне от 2000 кДа до 6000 кДа (СЕК-МАЛ).

В варианте осуществления молекулярная масса конъюгата 6В-СRM197 в вакцинной композиции находится в диапазоне от 4000 кДа до 15000 кДа (СЕК-МАЛ), предпочтительно в диапазоне от 5000 кДа до 12000 кДа (СЕК-МАЛ).

В варианте осуществления молекулярная масса конъюгата 9V-ТТ в вакцинной композиции находится в диапазоне от 15000 кДа до 30000 кДа (СЕК-МАЛ), предпочтительно в диапазоне от 20000 кДа до 30000 кДа (СЕК-МАЛ).

В варианте осуществления молекулярная масса конъюгата 15В-ТТ в композиции вакцины находится в диапазоне от 6000 кДа до 10000 кДа (СЕК-МАЛ), предпочтительно в диапазоне от 7500 кДа до 9000 кДа (СЕК-МАЛ).

В варианте осуществления молекулярная масса конъюгата 19А-ТТ в композиции вакцины находится в диапазоне от 5000 кДа до 8000 кДа (СЕК-МАЛ), предпочтительно в диапазоне от 6000 кДа до 7000 кДа (СЕК-МАЛ).

Как правило, молекулярная масса конъюгата 22F-ТТ в вакцинной композиции по настоящему раскрытию составляет >12500 кДа (в СЕКУНДАХ). В варианте осуществления молекулярная масса конъюгата 22F-ТТ в композиции вакцины находится в диапазоне от 9000 кДа до 18000 кДа (СЕК-МАЛ), предпочтительно в диапазоне от 10000 кДа до 17000 кДа (СЕК-МАЛ).

Вакцинная композиция по настоящему раскрытию включает использование более чем одного типа белка-носителя, индивидуально конъюгированного со специфическими пневмококковыми полисахаридами.

Известно, что конъюгированные вакцины, содержащие один и тот же белок-носитель, связаны с подавлением иммунного ответа на полисахариды. Это может быть связано с (i) конкуренцией за захват и презентацию антигена между В-клетками с поверхностными иммуноглобулинами, специфичными для эпитопов белка-носителя, и В-

клетками, специфичными для полисахарида, (ii) предотвращением связывания конъюгированных вакцин со специфичными к полисахариду В-клетками свободным белком-носителем и (iii) подавлением ответа на полисахариды путем увеличения числа специфичных к носителю В-клеток, индуцированного предыдущей инъекцией белка-носителя, что предотвращает связывание полисахарида с В-клетками.

Вакцинная композиция по настоящему раскрытию использует множество белков-носителей, что устраняет упомянутые выше недостатки, связанные с использованием одного типа белков-носителей в конъюгированной вакцинной композиции.

В варианте осуществления настоящего изобретения пневмококковые полисахариды конъюгированы с тремя различными белками-носителями. В примерном варианте осуществления настоящего изобретения тремя различными белками-носителями являются дифтерийный анатоксин (DT), столбнячный анатоксин (TT) и CRM197.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия, по меньшей мере один пневмококковый полисахарид конъюгирован с CRM197 в качестве белка-носителя, по меньшей мере один пневмококковый полисахарид, выбранный из серотипов 3, 6А, 9V, 15В, 19А, 22F, конъюгирован с TT в качестве белка-носителя и по меньшей мере один пневмококковый полисахарид конъюгирован с DT в качестве белка-носителя.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия, по меньшей мере один пневмококковый полисахарид конъюгирован с CRM197 в качестве белка-носителя, по меньшей мере один пневмококковый полисахарид, выбранный из серотипов 3, 6А, 9V, 15В, 19А, 22F, конъюгирован с TT в качестве белка-носителя и по меньшей мере один пневмококковый полисахарид, выбранный из серотипов 4 и 24F, конъюгирован с DT в качестве белка-носителя.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия, по меньшей мере один пневмококковый полисахарид конъюгирован с CRM197 в качестве белка-носителя, по меньшей мере два пневмококковых

полисахарида, выбранных из серотипов 3, 6А, 9V, 15В, 19А, 22F, конъюгированы с ТТ в качестве белка-носителя и по меньшей мере один пневмококковый полисахарид конъюгирован с DT в качестве белка-носителя.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере три пневмококковых полисахарида, выбранных из серотипов 3, 6А, 9V, 15В, 19А, 22F, конъюгированы с ТТ, один пневмококковый полисахарид конъюгирован с DT, а остальные пневмококковые полисахариды конъюгированы с CRM197.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере четыре пневмококковых полисахарида, выбранных из серотипов 3, 6А, 9V, 15В, 19А, 22F, конъюгированы с ТТ, один пневмококковый полисахарид конъюгирован с DT, а остальные пневмококковые полисахариды конъюгированы с CRM197.

В варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере пять пневмококковых полисахаридов, выбранных из серотипов 3, 6А, 9V, 15В, 19А, 22F, конъюгированы с ТТ, один пневмококковый полисахарид конъюгирован с DT, а остальные пневмококковые полисахариды конъюгированы с CRM197.

В другом варианте осуществления настоящего раскрытия шесть пневмококковых полисахаридов, полученных из серотипов 3, 6А, 9V, 15В, 19А, 22F, конъюгированы с ТТ, один пневмококковый полисахарид конъюгирован с DT, а остальные пневмококковые полисахариды конъюгированы с CRM197.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения шесть пневмококковых полисахаридов конъюгированы с ТТ, два пневмококковых полисахарида конъюгированы с DT, а остальные пневмококковые полисахариды конъюгированы с CRM197.

В варианте осуществления настоящего изобретения пять пневмококковых полисахаридов независимо конъюгированы с ТТ, два пневмококковых полисахарида независимо конъюгированы с DT, а

остальные пневмококковые полисахариды независимо конъюгированы с CRM197.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения пневмококковый полисахарид, конъюгированный с CRM197, выбирается из группы, включающей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6А, 6В, 6С, 6D, 6Е, 6F, 6G, 6H, 7А, 7В, 7С, 7D, 7F, 8, 9А, 9L, 9F, 9N, 9V, 10А, 10В, 10С, 10D, 10F, 11, 11А, 11В, 11С, 11D, 11Е, 11F, 12А, 12В, 12F, 13, 13FF, 14, 15А, 15В, 15С, 15F, 16, 16А, 16F, 17А, 17F, 18, 18А, 18В, 18С, 18F, 19А, 19В, 19С, 19F, 20, 20А, 20В, 21, 22А, 22F, 23А, 23В, 23F, 24А, 24В, 24F, 25А, 25F, 27, 28А, 28F, 29, 31, 32А, 32F, 33А, 33В, 33С, 33D, 33Е, 33F, 34, 35А, 35В, 35С, 35D, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41А, 41F, 42, 43, 44, 45, 46, 47А, 47F и 48.

В варианте осуществления настоящего изобретения пневмококковые полисахариды, конъюгированные с ТТ, выбраны из группы, включающей 1, 3, 5, 6А, 9V, 15В, 19А и 22F.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения пневмококковые полисахариды, конъюгированные с DT, выбраны из группы, включающей 3, 4, 15В и 24F.

В варианте осуществления пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 1, конъюгирован с CRM197 в качестве белка-носителя.

В варианте осуществления пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 3, конъюгируют с ТТ в качестве белка-носителя.

В варианте осуществления пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 9V, конъюгируют с ТТ в качестве белка-носителя.

В варианте осуществления пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 9А, может быть конъюгирован с белком-носителем, выбранным из DT, ТТ и CRM197.

В варианте осуществления пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 9L, может быть конъюгирован с белком-носителем, выбранным из DT, ТТ и CRM197.

В варианте осуществления пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 9N, может быть конъюгирован с белком-носителем, выбранным из DT, TT и CRM197. В варианте осуществления настоящего изобретения пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 4, конъюгирован с DT в качестве белка-носителя. В варианте осуществления пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 5, конъюгирован с CRM197 в качестве белка-носителя.

В другом варианте осуществления пневмококковые полисахариды, полученные из серотипов 1 и 5, независимо конъюгируют с CRM197 в качестве белка-носителя; и пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 3, конъюгируют с TT в качестве белка-носителя.

В еще одном варианте осуществления вакцинальная композиция содержит пневмококковые полисахариды, полученные из серотипов 1 и 5, независимо конъюгированные с CRM197 в качестве белка-носителя и не содержащие *S. pneumoniae* полисахарид, полученный из серотипа 3. В варианте осуществления пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 6A, конъюгируют с TT в качестве белка-носителя. В варианте осуществления пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 9V, конъюгируют с TT в качестве белка-носителя. В варианте осуществления пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 15B, конъюгируют с TT в качестве белка-носителя. В варианте осуществления пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 18C, конъюгирован с CRM197 в качестве белка-носителя. В варианте осуществления конъюгируют пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 19A к TT в качестве белка-носителя. В варианте осуществления пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 19F, конъюгируют с CRM197 в качестве белка-носителя. В варианте осуществления пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 24F, конъюгируют с DT в качестве белка-носителя. В варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один пневмококковый полисахарид, полученный из серотипов, выбранных из группы, включающей 3, 6A, 9V, 15B, 19A и 22F, конъюгирован со столбнячным анатоксином в качестве белка-носителя, по меньшей мере один пневмококковый полисахарид, полученный из серотипов 4 и 24F,

конъюгирован с дифтерийный анатоксин в качестве белка-носителя и по меньшей мере один пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа, выбранного из группы, включающей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6А, 6В, 6С, 6D, 6Е, 6F, 6G, 6Н, 7А, 7В, 7С, 7D, 7F, 8, 9А, 9L, 9F, 9N, 9V, 10А, 10В, 10С, 10D, 10F, 11, 11А, 11В, 11С, 11D, 11Е, 11F, 12А, 12В, 12F, 13, 13FF, 14, 15А, 15В, 15С, 15F, 16, 16А, 16F, 17А, 17F, 18, 18А, 18В, 18С, 18F, 19А, 19В, 19С, 19F, 20, 20А, 20В, 21, 22А, 22F, 23А, 23В, 23F, 24А, 24В, 24F, 25А, 25F, 27, 28А, 28F, 29, 31, 32А, 32F, 33А, 33В, 33С, 33D, 33Е, 33F, 34, 35А, 35В, 35С, 35D, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41А, 41F, 42, 43, 44, 45, 46, 47А, 47F и 48 конъюгированы с CRM197 в качестве белка-носителя.

Вакцинная композиция по настоящему изобретению не содержит белка D, PsaA, поверхностного белка пневмококка А и фрагмента дифтерийного токсина в качестве белка(ов)-носителя для пневмококковых полисахаридов.

В варианте осуществления настоящего изобретения вакцинная композиция содержит пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 2; а остальные пневмококковые полисахариды получены из серотипов, выбранных из группы, состоящей из 1, 3, 4, 5, 6, 6А, 6В, 6С, 6D, 6Е, 6F, 6G, 6Н, 7А, 7В, 7С, 7D, 7F, 8, 9А, 9L, 9F, 9N, 9V, 10А, 10В, 10С, 10D, 10F, 11, 11А, 11В, 11С, 11D, 11Е, 11F, 12А, 12В, 12F, 13, 13FF, 14, 15А, 15В, 15С, 15F, 16, 16А, 16F, 17А, 17F, 18, 18А, 18В, 18С, 18F, 19А, 19В, 19С, 19F, 20, 20А, 20В, 21, 22А, 22F, 23А, 23В, 23F, 24А, 24В, 24F, 25А, 25F, 27, 28А, 28F, 29, 31, 32А, 32F, 33А, 33В, 33С, 33D, 33Е, 33F, 34, 35А, 35В, 35С, 35D, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41А, 41F, 42, 43, 44, 45, 46, 47А, 47F и 48.

В варианте осуществления настоящего изобретения вакцинная композиция содержит пневмококковые полисахариды, полученные из серотипов 6А и 6В; а остальные пневмококковые полисахариды получены из серотипов, выбранных из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6С, 6D, 6Е, 6F, 6G, 6Н, 7А, 7В, 7С, 7D, 7F, 8, 9А, 9L, 9F, 9N, 9V, 10А, 10В, 10С, 10D, 10F, 11, 11А, 11В, 11С, 11D, 11Е,

11F, 12A, 12B, 12F, 13, 13FF, 14, 15A, 15B, 15C, 15F, 16, 16A, 16F, 17A, 17F, 18, 18A, 18B, 18C, 18F, 19A, 19B, 19C, 19F, 20, 20A, 20B, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24A, 24B, 24F, 25A, 25F, 27, 28A, 28F, 29, 31, 32A, 32F, 33A, 33B, 33C, 33D, 33E, 33F, 34, 35A, 35B, 35C, 35D, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41A, 41F, 42, 43, 44, 45, 46, 47A, 47F и 48.

В варианте осуществления настоящего изобретения пневмококковые полисахариды, полученные из серотипов 6A и 6B, оба конъюгированы с CRM197 в качестве белка-носителя. В другом варианте осуществления настоящего раскрытия пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 6A, конъюгируют с TT, а пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 6B, конъюгируют с CRM197 в качестве белка-носителя.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия вакцинные композиции настоящего изобретения могут дополнительно содержать пневмококковые полисахариды, полученные из серотипов 6C, 20B, 15A, 15C, 16F, 20A, 20B, 31, 9A, 9N, 9L, 35B, 23A, 23B, 17F, 29, 34, 39.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения вакцинная композиция представляет собой конъюгатную композицию 15-, 16-, 17-, 18-, 19-, 20-, 21-, 22-, 23-, 24-, 25-, 26-, 27-, 28-, 29-, или 30-валентный пневмококковый полисахарид-белок-носитель.

В варианте осуществления вакцинная композиция представляет собой 20-валентную композицию, содержащую 20 различных *Пневмококк Streptococcus pneumoniae* конъюгаты полисахарид-белок-носитель, содержащие полисахариды, полученные из серотипов 1, 2, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F.

В варианте осуществления вакцинная композиция представляет собой 20-валентную композицию, содержащую 20 различных *Пневмококк Streptococcus pneumoniae* конъюгаты полисахарид-белок-носитель, содержащие полисахариды, полученные из серотипов 1, 2, 3, 4, 5,

6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F.

В варианте осуществления вакцинная композиция представляет собой 20-валентную композицию, содержащую 20 различных *Пневмококк Streptococcus pneumoniae* конъюгаты полисахарид-белок-носитель, содержащие полисахариды, полученные из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F.

В варианте осуществления вакцинная композиция представляет собой 21-валентную композицию, содержащую 21 различную *Пневмококк Streptococcus pneumoniae* конъюгаты полисахарид-белок-носитель, содержащие полисахариды, полученные из серотипов 1, 2, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 24F и 33F.

В варианте осуществления вакцинная композиция представляет собой 21-валентную композицию, содержащую 21 различную *Пневмококк Streptococcus pneumoniae* конъюгаты полисахарид-белок-носитель, содержащие полисахариды, полученные из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F.

В варианте осуществления вакцинная композиция представляет собой 22-валентную композицию, содержащую 22 различных *Пневмококк Streptococcus pneumoniae* конъюгаты полисахарид-белок-носитель, содержащие полисахариды, полученные из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 24F и 33F.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия вакцинная композиция содержит от 1,0 мкг до 10 мкг полисахарида каждого серотипа пневмококка, предпочтительно в диапазоне от 2,2 мкг до 3,3 мкг. В другом варианте осуществления вакцинная композиция содержит от 4,4 до 6,6 мкг полисахарида, полученного из серотипа 6В.

Вакцинная композиция по настоящему раскрытию включает фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, выбранные из поверхностно-активных веществ, стабилизаторов, буферов, разбавителей, адъювантов, консервантов, солей и растворителей.

В варианте осуществления адъювант представляет собой адъювант из соли алюминия, выбранный из группы, состоящей из гидроксид алюминия, фосфат алюминия, гидроксифосфат алюминия и сульфат алюминия калия. Как правило, концентрация адъюванта составляет не более 1,15 мг на дозу 0,5 мл вакциновой композиции. В варианте осуществления концентрация адъюванта находится в диапазоне от 0,5 мг до 1 мг на дозу 0,5 мл вакциновой композиции. В соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия концентрация адъюванта составляет не более 1,13 мг на дозу 0,5 мл вакциновой композиции. В предпочтительном варианте осуществления концентрация адъюванта составляет 0,847 мг на 0,5 мл дозы вакциновой композиции.

В другом варианте осуществления адъювант содержит от 20 до 375 мкг Алюминия³⁺ на дозу 0,5 мл препарата вакцина композиция.

В одном из вариантов осуществления адъювантом является фосфат алюминия, содержащий от 170 до 200 мкг Al³⁺ на дозу 0,5 мл вакциновой композиции.

В предпочтительном варианте осуществления адъювант содержит 187,5 мкг Al³⁺ на дозу 0,5 мл вакциновой композиции.

Буфер выбирается из группы, включающей гистидин, сукцинат, цитрат, фосфат, трис-ацетат-этилендиаминтетрауксусную кислоту (ТАЕ) и 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинтансульфоновую кислоту (HEPES). Концентрация буфера находится в диапазоне от 0,1 мг до 10 мг.

В одном из вариантов осуществления вакцинная композиция содержит гистидин в качестве буфера.

В другом варианте осуществления вакцинная композиция содержит сукцинат в качестве буфера.

В еще одном варианте осуществления вакцинная композиция содержит от 0,1 до 10 мг гистидина и от 0,1 до 10 мг сукцината в качестве буфера. В предпочтительном варианте осуществления вакцинная композиция содержит 1,55 мг гистидина и 1,18 мг сукцината в качестве буфера.

Поверхностно-активное вещество выбирают из группы, включающей полисорбат, полимергликоль, сложный эфир сорбитана и их комбинации, и концентрация поверхностно-активного вещества в композиции вакцины находится в диапазоне от 80 мкг до 120 мкг. В варианте осуществления настоящего изобретения поверхностно-активным веществом является полисорбат 20 (а не полисорбат 80). В предпочтительном варианте осуществления концентрация поверхностно-активного вещества в композиции вакцины составляет 100 мкг.

Значение HLB (гидрофильно-липофильный баланс) для полисорбата 20 составляет 16,7, а для полисорбата 80 – 15 значений HLB. Полисорбат 20 более гидрофильен по своей природе. Значение HLB, равное 16,7, для полисорбата 20 придает относительно более сильную гидрофильную природу. Это обеспечивает его свойства хорошего эмульгатора и стабилизатора для водных суспензий и эмульсионных систем за счет улучшения смачивающих свойств частиц в рецептуре. Следовательно, вероятно, более подходящим является стабилизация вакцинных составов на основе суспензии квасцов, особенно пневмококковой вакцины. Этот аспект более актуален, когда в рецептуре смешивают 22 одновалентных конъюгата в присутствии геля квасцов и других вспомогательных веществ, таких как гистидин. Было обнаружено, что полисорбат 20 является предпочтительным для составов мультивалентных пневмококковых вакцин (PCV20 и PCV21) для обеспечения их стабильности. Полисорбат 20 защищает вакцинный состав от агрегации, вызванной напряжениями, вызванными поверхностью раздела. Такие нагрузки (воздух / жидкость или

жидкость на поверхности / контейнер) возникали на этапах производства, которые могут привести к нежелательной адсорбции, агрегации или выпадению в осадок.

Известно, что полисорбат 80 используется в качестве поверхностно-активного вещества в составе вакцины. Однако в вакцинной композиции по настоящему раскрытию в качестве поверхностно-активного вещества используется полисорбат 20, который отличается от полисорбата 80, как показано ниже.

- i. Полисорбат 20, используемый в настоящем описании, структурно отличается от полисорбата 80.

Химическая структура полисорбатов 20 и 80. w r x r y r z относится к общему количеству оксиэтиленовых субъединиц в каждой молекуле поверхностно-активного вещества и не может превышать 20.

- ii. Содержание жирных кислот в полисорбате 20 отличается от содержания полисорбата 80

Содержание жирных кислот в полисорбате 20 и 80

Кроме того, полисорбат 20 является более гидрофильным по сравнению с полисорбатов 80 (PS-20 имеет значение HLB 16,71, тогда как PS-80 имеет значение HLB 15; Чем выше значение HLB поверхностно-активного вещества, тем более гидрофильным оно является. Чем ниже значение HLB поверхностно-активного вещества, тем более липофильным оно является). Монолауратная фракция полисорбата 20 составляет всего 40-60% смеси. Принимая во внимание, что моноолеатная фракция полисорбата 80 составляет >58% смеси. Полисорбат 20 имеет молекулярную массу 1225 дальтон. Полисорбат 80 имеет молекулярную массу 1,31 кДа. Полисорбат 80 более склонен к образованию окислительных частиц по сравнению с полисорбатов 20 в результате большего содержания ненасыщенных алкильных боковых цепей в полисорбатов 80.

Более высокое количество поверхностно-активного вещества (полисорбата 20) в вакцинной композиции по настоящему раскрытию способствует получению композиция без агрегации, обладающая улучшенными свойствами текучести даже в присутствии повышенного содержания квасцового геля с более высоким количеством антигенов (пневмококковых полисахаридов), включенных в композицию.

Соль выбирают из группы, включающей хлорид магния, хлорид калия, хлорид натрия и их комбинации, и концентрация соли в вакцинной композиции находится в диапазоне от 2 мг до 10 мг на дозу 0,5 мл вакцинной композиции. В варианте осуществления соль представляет собой хлорид натрия. В предпочтительном варианте осуществления концентрация соли в вакцинной композиции составляет 4,5 мг на дозу 0,5 мл вакцинной композиции.

В одном из вариантов осуществления вакцинная композиция находится в форме разовая композиция не содержит консервантов.

В другом варианте осуществления вакцинная композиция находится в форме многодозовая композиция и содержит консервант, выбранный из группы, включающей 2-феноксиэтанол, бензэтония хлорид (фемерол), фенол, м-крезол, тиомерсал, формальдегид, метилпарабен, пропилпарабен, бензалкония хлорид, бензиловый спирт, хлорбутанол, п-хлор-м-крезол, бензиловый спирт и их комбинации.

В одном из вариантов осуществления концентрация содержание консерванта находится в диапазоне от 1 мг до 8 мг на дозу 0,5 мл препарата. вакцина композиция.

В другом варианте осуществления концентрация содержание консерванта находится в диапазоне от 2,5 мг до 5 мг на дозу 0,5 мл препарата. вакцина композиция.

В еще одном варианте осуществления консервантом является 2-феноксиэтанол в концентрация в диапазоне от 2,5 мг до 5 мг на дозу 0,5 мл вакцина композиция.

Как правило, рН вакцинной композиции находится в диапазоне от 5 до 7, предпочтительно в диапазоне от 5 до 6.

В варианте осуществления вакцинная композиция представляет собой 20-валентная композиция и выпускается в виде дозы 0,5 мл, включающей:

- a. 20 отчетливых *S. pneumoniae* полисахариды, полученные из серотипов 1, 2, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F;
- b. фосфат алюминия в качестве адъюванта, содержащего от 170 мкг до 200 мкг Алюминия³⁺;
- c. гистидин в концентрации от 1 мг до 2 мг;
- d. сукцинат в концентрации от 1 мг до 2 мг;
- e. полисорбат 20 в концентрации 80 мкг до 120 мкг;
- f. хлорид натрия в концентрации от 2 мг до 10 мг; и
- g. рН в диапазоне от 5 до 7;

в котором

- i. *S. pneumoniae* полисахарид, полученный из серотипа 4, конъюгирован с DT в качестве белка-носителя; *S. pneumoniae* полисахариды, полученные из серотипов 15В, 6А, 9V, 19А и 22F, конъюгируют с TT в качестве белка-носителя; и *S. pneumoniae* полисахариды, полученные из серотипов 1, 2, 5, 6В, 7F, 8, 10А, 11А, 12F, 14, 18С, 19F, 23F и 33F, конъюгированы с CRM197 в качестве белка-носителя;
- ii. 2.2 мкг до 3,3 мкг каждого *S. pneumoniae* полисахарид, за исключением серотипа 6В;
- iii. 4.4 мкг до 6,6 мкг *S. pneumoniae* полисахарид серотипа 6В;
- iv. от 10 мкг до 200 мкг CRM197
- v. от 5 мкг до 70 мкг столбнячного анатоксина; и
- vi. от 1 мкг до 25 мкг дифтерийного анатоксина.

В варианте осуществления вакцинная композиция представляет собой 21 валентную композицию и составлена в виде дозы 0,5 мл, содержащей:

- a. 21 отчетливый *S. pneumoniae* полисахариды , полученные из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F;
- b. фосфат алюминия в качестве адъюванта, содержащего 170 – 200 Al^{3+} ;
- c. гистидин в концентрации от 1 до 2 мг;
- d. сукцинат в концентрации от 1 до 2 мг;
- e. полисорбат 20 в концентрации от 80 до 120 мкг;
- f. хлорид натрия в концентрации от 2 до 10 мг; и
- g. рН в диапазоне от 5 до 7;

в котором

- i. в *S. pneumoniae* полисахарид, полученный из серотипа 4, конъюгирован с DT в качестве белка-носителя; *S. pneumoniae* полисахариды, полученные из серотипов 6А, 9V, 15В, 19А и 22F, конъюгируют с TT в качестве белка-носителя; а остальные *S. pneumoniae* полисахариды конъюгированы с CRM197 в качестве белка-носителя; Вакцинная композиция включает
- ii. от 2,2 до 3,3 мкг каждого полисахарида *S. pneumoniae*, за исключением серотипа 6В.;
- iii. 4,4 – 6,6 мкг полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 6В;
- iv. от 10 мкг до 200 мкг CRM197
- v. от 5 мкг до 70 мкг столбнячного анатоксина; и
- vi. от 1 мкг до 25 мкг дифтерийного анатоксина.

В варианте осуществления вакцинная композиция представляет собой 21 валентную композицию и составлена в виде дозы 0,5 мл, содержащей:

- a. 21 отчетливый *S. pneumoniae* полисахариды, полученные из серотипов 1, 2, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 24F и 33F;

- a. фосфат алюминия в качестве адъюванта, содержащий 170 мкг до 200 мкг из Всех³⁺;
- b. гистидин в концентрации от 1 мг до 2 мг;
- c. сукцинат в концентрации от 1 мг до 2 мг;
- d. полисорбат 20 в концентрации 80 мкг до 120 мкг;
- e. хлорид натрия в концентрации от 2 мг до 10 мг; и
- f. pH в диапазоне от 5 до 7;

в котором

- i. *S. pneumoniae* полисахариды, полученные из серотипов 4 и 24F, конъюгированы с DT в качестве белка-носителя; *S. pneumoniae* полисахариды, полученные из серотипов 15B, 6A, 9V, 19A и 22F, конъюгируют с TT в качестве белка-носителя; и *S. pneumoniae* полисахариды, полученные из серотипов 1, 2, 5, 6B, 7F, 8, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19F, 23F и 33F, конъюгированы с CRM197 в качестве белка-носителя;
- ii. 2,2 мкг до 3,3 мкг каждого *S. pneumoniae* полисахарид, за исключением серотипа 6B;
- iii. 4,4 мкг до 6,6 мкг *S. pneumoniae* полисахарид серотипа 6B;
- iv. от 10 мкг до 200 мкг CRM197
- v. от 5 мкг до 70 мкг столбнячного анатоксина; и
- vi. от 1 мкг до 25 мкг дифтерийного анатоксина.

В варианте осуществления вакцинная композиция представляет собой 22-валентную композицию и составлена в виде дозы 0,5 мл, содержащей:

- a. 22 отчетливых *S. pneumoniae* полисахариды, полученные из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 24F и 33F;
- a. фосфат алюминия в качестве адъюванта, содержащий 170 мкг до 200 мкг из Всех³⁺;
- b. гистидин в концентрации от 1 мг до 2 мг;
- c. сукцинат в концентрации от 1 мг до 2 мг;
- d. полисорбат 20 в концентрации 80 мкг до 120 мкг;

- e. хлорид натрия в концентрации от 2 мг до 10 мг; и
- f. pH в диапазоне от 5 до 7;

в котором

- i. *S. pneumoniae* полисахариды, полученные из серотипов 4 и 24F, конъюгированы с DT в качестве белка-носителя; *S. pneumoniae* полисахариды, полученные из серотипов 3, 15B, 6A, 9V, 19A и 22F, конъюгируют с TT в качестве белка-носителя; и *S. pneumoniae* полисахариды, полученные из серотипов 1, 2, 5, 6B, 7F, 8, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19F, 23F и 33F, конъюгированы с CRM197 в качестве белка-носителя;
- ii. 2.2мкг до 3,3 мкг каждого *S. pneumoniae* полисахарид, за исключением серотипа 6B;
- iii. 4.4 мкг до 6,6 мкг *S. pneumoniae* полисахарид серотипа 6B;
- iv. от 10 мкг до 200 мкг CRM197
- v. от 5 мкг до 70 мкг столбнячного анатоксина; и
- vi. от 1 мкг до 25 мкг дифтерийного анатоксина.

В одном из вариантов осуществления *S. pneumoniae* полисахарид, полученный из серотипа 15B, конъюгируют с DT в качестве белка-носителя. В другом варианте осуществления *S. pneumoniae* полисахарид, полученный из серотипа 15B, может быть конъюгирован с CRM197 в качестве белка-носителя.

В варианте осуществления вакцинная композиция может содержать по меньшей мере один *S. pneumoniae* полисахарид, полученный из серотипов, выбранных из 9A, 9N и 9L.

В одном из вариантов осуществления вакцинная композиция может содержать *S. pneumoniae* полисахарид, полученный из серотипа 3.

В другом варианте осуществления вакцинная композиция лишена *S. pneumoniae* полисахарид, полученный из серотипа 3.

В другом варианте осуществления 21-валентная вакцинная композиция содержит от 8 до 45 мкг столбнячного анатоксина на дозу 0,5 мл композиции. В еще одном варианте осуществления вакцинная

композиция содержит от 1 мкг до 15 мкг дифтерийного анатоксина на дозу композиции 0,5 мл. В варианте осуществления вакцинная композиция содержит от 1 мкг до 8 мкг дифтерийного анатоксина на 0,5 мл композиции.

Вакцинная композиция по настоящему раскрытию, описанная выше, когда она составлена в виде многодозовой композиции, содержит 2-феноксизтанол в концентрации в диапазоне от 2,5 мг до 5 мг на дозу 0,5 мл вакцина композиция.

Вакцинная композиция по настоящему раскрытию вакцинная композиция стабильна при 2-8 °С, 25 °С и 40°С. В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения вакцинная композиция стабильна при 2-8°С и 25°С в течение периода, по меньшей мере, 3 месяцев.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия, вакцинная композиция конъюгатов пневмококковый полисахарид-белок-носитель содержит свободного полисахарида менее 15% и свободного белка менее 10%.

В варианте осуществления вакцинная композиция может необязательно содержать вспомогательные вещества, такие как маннит, глицин, лактоза, трегалоза, сахароза, раффиноза, полимеры (карбоксиметилцеллюлоза, полуксамер, ПЭГ и подобные).

Вакцинная композиция по настоящему раскрытию разработана для введения субъекту-человеку с целью профилактики, уменьшения возникновения или предотвращения инфекций, вызванных *Стрептококк пневмонии* путем введения эффективного количества вакцинной композиции.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия субъект-человек выбирается из числа младенцев (в возрасте <1 года), малышей (в возрасте от примерно 12 до 24 месяцев), маленьких

детей (в возрасте от примерно 2 до 5 лет), детей старшего возраста (в возрасте от примерно 5 до 13 лет), подростков (в возрасте от примерно 13 до 18 лет), взрослых (в возрасте от примерно 18 до 65 лет) или пожилых людей (в возрасте >65 лет).

В варианте осуществления количество конъюгата пневмококкового полисахарида с белком-переносчиком в дозе вакцинной композиции по настоящему раскрытию присутствует в количестве, достаточном для индуцирования иммунопротекторного ответа без существенных побочных эффектов. Хотя количество каждого конъюгата пневмококковый полисахарид-белок-носитель может варьироваться в зависимости от серотипа пневмококка, каждая доза вакцинных композиций содержит от 1,0 мкг до 10 мкг каждого пневмококкового полисахарида, конъюгированного с каждым белком-носителем.

В варианте осуществления предложен способ индуцирования иммунного ответа у человека-субъекта на Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* конъюгата полисахарид-белок-носитель путем введения иммуногенно эффективного количества вакцинной композиции по настоящему раскрытию. Вакцинная композиция, описанная выше, может вводиться нуждающемуся субъекту любым из обычных путей, используемых в области вакцин, включая, но не ограничиваясь этим, оральный путь, путь через слизистую оболочку, назальный путь, интраназальный путь и посредством инъекций иглой (внутримышечно, внутрикожно, подкожно, внутривенно и т.д.).

Используемый здесь термин "эффективное количество" композиций, описанных в настоящем раскрытии, относится к количеству, необходимому для вызова иммунного ответа у субъекта, которому вводят вакцинную композицию. Иммунный ответ характеризуется наличием одного или нескольких Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* антигенспецифические антитела у субъекта, которые значительно снижают вероятность или тяжесть инфицирования Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* во время последующего вызова.

В варианте осуществления настоящего раскрытия наблюдается по меньшей мере 2-кратное увеличение общего титра IgG и функционального титра IgG при серотипировании 3, 6А, 9V, 19А и 15В конъюгируются с ТТ в качестве белка-носителя по сравнению с серотипами 3, 6А, 9V, 19А и 15В, конъюгированными с CRM197 в качестве белка-носителя.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия пневмококковые полисахариды, полученные из серотипов 3, 6А, 9V и 19А, демонстрируют повышенные титры IgG, когда их конъюгируют со столбнячным анатоксином (ТТ) в качестве белка-носителя по сравнению с тем, когда пневмококковые полисахариды, полученные из серотипов 3, 6А, 9V и 19А, конъюгируют с CRM197 в качестве белка-носителя.

Кроме того, пневмококковые полисахариды, полученные из серотипов 6А, 6В и 19А, 19F, проявляют перекрестную реактивность (возможно, из 6А и 19А, соответственно), когда пневмококковые полисахариды, полученные из серотипов 4, 24F, конъюгируют с DT в качестве белка-носителя; пневмококковые полисахариды, полученные из серотипов 3, 15В, 6А, 9V, 19А и 22F, конъюгируют с ТТ в качестве белка-носителя; и пневмококковые полисахариды, полученные из серотипов 1, 2, 5, 6В, 7F, 8, 10А, 11А, 12F, 14, 18С, 19F, 23F и 33F конъюгированы с CRM197 в качестве белка-носителя.

Исследования иммуногенности вакцинной композиции настоящего изобретения на мышах и кроликах показывают улучшение иммунного ответа на серотип 6В, что, вероятно, обусловлено перекрестной реактивностью со стороны 6А-ТТ. Кроме того, вакцинные композиции, содержащие серотипы 3, 6А, 9V, 15В и 19А, конъюгированные с ТТ в качестве белка-носителя вместо CRM197 в качестве белка-носителя, вызывали лучший иммунный ответ (титры IgG). Аналогичная тенденция наблюдается и в реакции на опсонизационный анализ (OPA).

Вакцинные композиции, содержащие серотип 4, конъюгированный с DT в качестве белка-носителя (по сравнению с CRM197 в качестве белка-носителя), вызывали лучший иммунный ответ (титры IgG).

Аналогичные результаты также ожидаются, когда вакцинная композиция по настоящему раскрытию лишена *S. pneumoniae* полисахарид, полученный из серотипа 3.

Настоящее раскрытие содержит вакцинные композиции и способы их получения. Вакцинные композиции настоящего раскрытия включают один или несколько конъюгатов полисахарида-белка-носителя пневмококка, при этом каждый из конъюгатов содержит полисахарид из другого серотипа Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* конъюгируется с белком-носителем. Вакцинные композиции содержат более одного типа белка-носителя и индивидуально конъюгированы с различными полисахаридами. Вакцинные композиции дополнительно включают гистидин в оптимальной концентрации и сукцинат в качестве буфера, адъювант из соли алюминия, полисорбат 20 и хлорид натрия в качестве наполнителя. В случае многодозового приготовления в композицию добавляется консервант. Кроме того, вакцинные композиции были приготовлены с использованием подхода с использованием двух смесей, при котором некоторые из серотипов адсорбируются вместе в виде первого набора, а остальные серотипы адсорбируются вместе во втором наборе, с последующим смешиванием обоих наборов для получения вакцинной композиции. Вакцинными композициями по настоящему раскрытию являются лишен агрегации; демонстрирует долгосрочную стабильность в широких температурных диапазонах, таким образом сохранение желаемых характеристик множества пневмококковых конъюгатов и обеспечение защиты от наиболее распространенных серотипов пневмококка.

Настоящее раскрытие 1) использует увеличенное количество геля квасцов со 125 мкг до 187,5 мкг на дозу, что приводит к улучшению адсорбции (по меньшей мере, на 30% для всех серотипов) (по меньшей мере, на 80% для серотипов 1, 2, 3, 5, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 33F) и, таким образом, обеспечивает повышенный ответ IgG-антител, опосредованный В-клетками (титры IgG, по меньшей мере, в 2 раза более высокие, были получены для серотипов 1, 10A, 15B и 22F); 2) более высокое количество полисорбата 20 в

поливалентных пневмококковых конъюгированных вакцинах привело к получению препарата, не содержащего агрегации., улучшенные свойства текучести (особенно в присутствии увеличенного содержания геля с добавлением большего количества антигенов); 3) новая улучшенная, стабильная и иммуногенная поливалентная полисахаридно-белковая конъюгированная вакцинная композиция (предпочтительно 20-валентная или 21-валентная), имеющая конъюгаты, полученные с использованием CDAP, включающие три различных белка-носителя (DT, TT, CRM197), где серотипы 4 и 24F индивидуально конъюгированы с DT; серотипы 6A, 9V, 15B, 19A, 22F индивидуально конъюгированы с TT, остальные белки-носители полисахариды из серотипов (1, 2, 5, 6B, 7F, 8, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19F, 23F, 33F) индивидуально конъюгируют с CRM197; 4) все конъюгаты на основе CRM197 и DT получают путем активации с Тетрафторборат 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP) с использованием подходы прямого связывания с использованием химии цианилирования, в то время как все конъюгаты на основе TT получают путем первого приготовления производного от ADH TT (в присутствии EDAC) с последующим конъюгированием его с CDAP-активированными полисахаридами; 5) оптимальная молекулярная масса полисахарида серотипа 4 находится в диапазоне от 130 до 170 кДа (SEC-HPLC), серотипа 24F находится в диапазоне от 100 до 200 кДа (SEC-HPLC), серотипа 3 находится в диапазоне от 140 до 180 кДа (SEC-HPLC). ВЭЖХ), серотип 6A находится в диапазоне от 400 кДа до 900 кДа (SEC-HPLC), серотип 6B составляет в диапазоне от 100 кДа до 200 кДа (SEC-HPLC), серотип 9V находится в диапазоне от 120 кДа до 160 кДа (SEC-HPLC), серотип 15B находится в диапазоне от 120 кДа до 160 кДа (SEC-HPLC), серотип 19A - от 120 кДа до 160 кДа (SEC-HPLC), 22F находится в диапазоне от 100 кДа до 150 кДа (SEC-HPLC)) и соответственно оптимальная молекулярная масса полисахарид-белковых конъюгатов серотип 4 находится в диапазоне от 3000 кДа до 10000 кДа (СЕК-МАЛ), серотип 24F находится в диапазоне от 1500 кДа до 10000 кДа (СЕК-МАЛ), серотип 3 находится в диапазоне от 3000 кДа до 10000 кДа (СЕК-МАЛ), серотип 6A находится в диапазоне от 7000 кДа до 10000 кДа (СЕК-МАЛ), серотип 6B находится в диапазоне от 4000 кДа до

15000 кДа (СЕК-МАЛ), серотип 9V находится в диапазоне от 15000 кДа до 30000 кДа (СЕК-МАЛ), серотип 15В находится в диапазоне от 6000 кДа до 10000 кДа (СЕК-МАЛ), серотип 19А находится в диапазоне от 5000 кДа до 8000 кДа (СЕК-МАЛ), серотип 22F находится в диапазоне от 9000 кДа до 18000 кДа (СЕК-МАЛ). тем самым обеспечивая улучшенную иммуногенность (по сравнению с тем, когда эти полисахариды конъюгируют с CRM197); 6) высокая эффективность конъюгации (от 40% до 45 % для серотипов 4 и 24F, от 30% до 35 % для серотипа 3, от 40 % до 45 % для серотипа 6А, от 25 % до 30 % для серотип 9V, от 45 % до 55 % для серотипа 15В, от 30 % до 35 % для серотипа 19А, от 40 % до 45 % для серотипа 22F); 7) оптимальная адсорбция конъюгатов (не менее 30 %); 8) содержание свободных полисахаридов <15 % для всех конъюгатов и свободного белка (<10%); и 9) высокое извлечение полисахаридов и структурная целостность, поддерживаемая за счет использования гомогенизации под высоким давлением (в отличие от химической калибровки).

Кроме того, вакцинные композиции были приготовлены с использованием подхода с использованием двух смесей, при котором некоторые серотипы адсорбируются по отдельности в качестве первого набора, а остальные серотипы адсорбируются вместе во втором наборе с последующим смешиванием обоих наборов для получения вакцинной композиции.

Кроме того, композиция настоящего изобретения может быть разлита в силиконизированные или несиликонизированные контейнеры.

ПРИМЕРЫ

Предыдущее описание вариантов осуществления приведено в целях иллюстрации и не предназначено для ограничения объема настоящего раскрытия. Отдельные компоненты конкретного варианта осуществления, как правило, не ограничены этим конкретным вариантом осуществления, но являются взаимозаменяемыми. Такие изменения не следует рассматривать как отход от настоящего раскрытия, и все такие изменения считаются относящимися к сфере применения настоящего раскрытия.

Настоящее раскрытие дополнительно описано в свете следующих примеров, которые приведены только для иллюстрации и не должны быть истолкованы как ограничивающие объем раскрытия.

Источник биологических ресурсов, используемых в настоящем раскрытии

Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* серотипы, а именно, 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F были получены из Центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC), Атланта, США. Пневмококк *Streptococcus pneumoniae* серотип 24F был получен в Институте медицинских наук Кемпеговда (KIMS), Бангалор, Индия.

Белки – носители:

Дифтерийный анатоксин (DT): Штамм *Corynebacterium diphtheriae* PW8 CN2000 был получен в Исследовательской лаборатории Wellcome, Лондон, Соединенное Королевство Центральным исследовательским институтом Национального контрольного органа (С.Р.І.) Касаули, Химачал-Прадеш, Индия, в лиофилизированной форме в 1973 году. Штамм был восстановлен и дополнительно лиофилизирован в Основной партии семян *C. diphtheriae* CN2000 A1 в С.Р.І. Kasauli.

Столбнячный анатоксин (TT): Штамм *Clostridium tetani* Гарвардский штамм №49205 был получен Национальным контрольным органом С.Р.І. Касаули из Государственного института Фольксгезондхайда (Нидерланды) в лиофилизированной форме.

CRM197: CRM197 получен из рекомбинантного штамма CS463-003 (MB101) *Псевдомонада флуоресцентные* приобретен у Pfenex, США.

Пример-1: Приготовление мультивалентной вакцинной композиции с использованием трех различных белков-носителей

i. Ферментация:

Инокулят серотипов пневмококков (для 21-валентной вакцинной композиции использовались следующие серотипы пневмококков: 1, 2, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 24F и 33F) выращивали при рН $7,1 \pm 0,5$, при $35-38^{\circ}\text{C}$ при перемешивании при 40-100 об/мин со скоростью потока воздуха 0-0,5 об/мин. Скорость добавления питательной среды была эквивалентна скорости добавления щелочной смеси для поддержания заданного значения рН (7,1). Для снижения вязкости использовался сульфат марганца. (При использовании серотипа 3 кормовая среда не использовалась).

ii. Очищение:

Осветленный ферментационный бульон серотипов пневмококков, полученный на вышеупомянутой стадии, концентрировали и диафильтровали с использованием мембраны MWC0 емкостью 100 кДа. Диафильтрацию проводили с использованием 154 мМ NaCl с последующей диафильтрацией водой для инъекций (WFI).

Концентрированный и диафильтрованный бульон, содержащий полисахарид, подвергали ферментативной обработке (нуклеазой) при 37°C в течение 10 ± 2 часов при перемешивании.

Сульфат аммония добавляли к раствору полисахарида, обработанного нуклеазой, до 50% насыщения и инкубировали при $2-8^{\circ}\text{C}$ в течение 12 ± 2 часов (кроме серотипа 5). Смесь подвергали глубокой фильтрации для удаления осадка, который выбрасывали. Раствор подвергали диафильтрации с плотностью 100 кДа с использованием NaCl с последующим охлаждением WFI. Этот диафильтрованный раствор, содержащий полисахарид с буфером и высокой концентрацией соли, загружали на колонку хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC).

Колонку для хроматографии с гидрофобным взаимодействием (300 мл) уравнивали 5 М NaCl в фосфатном буфере при рН 6,8, и затем на колонку загружали раствор полисахарида (500 мл) в диапазоне рН от 6 до 8, предпочтительно при рН от 6 до 7. Колонку дополнительно

промывали 5 М NaCl в фосфатном буферном растворе при pH 6,8. В этих условиях полисахарид извлекали при проточной и уравнивающей промывке из колонки. Затем раствор полисахарида концентрировали с использованием фильтра MWCO мощностью 100 кДа, а затем диафильтровали NaCl и водой для инъекций (WFI).

Колонку ионообменной хроматографии (300 мл) (сильный анионообменник) уравнивали 50 мМ натрий-фосфатным буфером, а затем загружали раствор полисахарида (500 мл) в колонку в диапазоне pH от 6 до 8, предпочтительно при pH от 6,5 до 7,5. Колонку дополнительно промывали тем же буфером. Адсорбированные полисахариды элюировали ступенчатым градиентным элюированием с использованием 1,0 М NaCl (различные полисахариды элюировали при различной ионной силе NaCl).

Затем раствор полисахарида концентрировали с использованием фильтра MWCO мощностью 100 кДа, а затем диафильтровали водой для инъекций (WFI).

Диафильтрованный раствор полисахарида фильтровали через мембранный фильтр 0,22 мкм в полипропиленовые бутылки. Очищенный полисахарид хранили замороженным. Этот процесс был проведен для серотипов 1, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 19А, 19F и 23F.

Для серотипов 2, 4, 8, 10А, 11А, 12F, 15В, 18С, 22F, 24F и 33F использовали только метод НИС. Для этих серотипов не использовалась хроматография ИЕС. Вместо осаждения сульфатом аммония использовали осаждение pH, а затем для всех этих серотипов использовали диафильтрацию методом WFI. Использовался только метод НИС, если в составе вакцины использовался серотип 3.

Технологическим условием для осаждения pH для этих серотипов является:

pH: $5,8 \pm 0,2$ pH при использовании 20% HCl, время: 6 ± 2 часа, температура: 7 ± 2 °C.

iii. Определение размера:

Гомогенизатор высокого давления (Microfluidics Inc., модель M-110EH-30) использовали для снижения молекулярной массы полисахаридов перед стадией активации, за исключением полисахарида серотипа 6A. Уменьшение размера производилось со скоростью 20–30 КПСИ (килограмм-фунтов на квадратный дюйм) и использовалось от 3 до 30 проходов. КПСИ и количество проходов (таблица 1) варьировали в зависимости от серотипа, из которого был получен полисахарид. В таблице 1 приведены используемое давление и количество проходов для каждого серотипа, используемого в композиции по настоящему раскрытию.

iv. Спряжение:

Общий процесс конъюгации для всех серотипов: Параметры сопряжения в соответствии с вариантом осуществления настоящего раскрытия представлены в Таблице-2, а общий технологический процесс представлен на рисунке-1.

Для конъюгации брали очищенные и гомогенизированные полисахариды с молекулярной массой от 100 до 200 кДа (за исключением очищенного полисахарида серотипа 6A, который используется в нативной форме с молекулярной массой от 400 до 900 кДа). Начальную концентрацию полисахарида регулировали перед концентрированием. Для разных серотипов используются разные концентрации полисахаридов, как показано в таблице 2. Для активации полисахаридов 1-циано-4-диметиламинопиридинтетрафторборатом (CDAP), свежеприготовленный химический раствор CDAP (~100 мг/мл ацетонитрила) добавляли в соответствии с соотношением полисахарид:CDAP, указанным в таблице 1, при перемешивании магнитной мешалкой (110±25 об/мин при 22±3°C). После полного смешивания CDAP при перемешивании pH доводили до 9,5±0,3 с использованием гидроксида натрия/уксусной кислоты, за исключением серотипа 19A, у которого pH находится в диапазоне 9,0±0,3. Продолжительность активации полисахарида составляет от 3 до 10 минут в зависимости от серотипа, и время активации начинается с регулировки pH.

После завершения активации, используя те же условия перемешивания и температуры, к активированному полисахариду добавляли специфический белок-носитель для каждого полисахарида (соотношение полисахарид: белок-носитель = от 1:0,5 до 1:1,5) для инициирования реакции конъюгации. Белок-носитель добавляли через 3-10 минут после активации, в зависимости от конкретного серотипа. рН для конъюгации поддерживался на уровне $9,5 \pm 0,3$, за исключением серотипа 19А, где рН находился в диапазоне $9,0 \pm 0,3$. Продолжительность конъюгации варьируется для разных серотипов и обычно проводилась от 20 минут до 9 часов в зависимости от серотипа, для которого проводится реакция конъюгации. Для серотипа 6А конъюгацию продолжали до $4 \pm 1,5$ часов. После завершения конъюгации реакцию гасили, используя NLT 10 частей 2М глицина с регулировкой рН до $8,1 \pm 0,3$. Реакцию следует продолжать в течение примерно 1 часа при температуре $22 \pm 3^\circ\text{C}$, затем от 10 до 20 часов при температуре $12 \pm 3^\circ\text{C}$ при перемешивании.

Конъюгаты очищали с помощью фильтрации 0,45 мкм с последующей фильтрацией тангенциальным потоком (TFF). Нежелательные остатки реакции (свободные полисахариды, белок, CN-, ACN, DMAP) и низкомолекулярные конъюгаты в первую очередь удаляли TFF мембраны 300 кДа (первичной очистки) с NLT 20 CVD в 0,9% растворе NaCl с последующей диафильтрацией 100 кДа в качестве конечной стадии очистки с использованием тех же технологических стадий, что и при первичной очистке.

Молекулярная масса очищенных индивидуальных конъюгатов находилась в диапазоне от 1500 кДа до 30000 кДа (в секундах).

Очищенный конъюгат разбавляли/стабилизировали добавлением исходного раствора 200 мМ L-гистидина в 0,9% мас./об. NaCl для получения его конечной концентрации 20 мМ L-гистидина. Была проведена окончательная фильтрация 0,22 мкл для получения одновалентного объемного конъюгата (МБК), который хранили при температуре от 2 до 8°C до дальнейшего использования.

Оценка содержания свободного полисахарида и свободного белка:

1. Оценка свободного белка:

а. Протокол для бесплатной оценки ТТ / DT методом ВВСІА / Сэндвич-ИФА

Двухэтапный протокол

Шаг 1: Выделение свободного ТТ/DT

Моноклональные антитела, специфичные к соответствующим серотипам, инкубируют со смолой белка А. Смола белка А. обладает сродством к Fc-области Ab, позволяя Fab-области Ab взаимодействовать со специфическим антигеном. Конъюгированный Ps при инкубации со смолой, помеченной Ab белком А, связывается с конъюгированным Ps и свободным Ps, присутствующим в конъюгате. Смолу, помеченную Ab, вместе с конъюгатом центрифугируют для получения гранул смолы. Супернатант, содержащий свободный ТТ/DT, собирают в отдельную пробирку. Свободный ТТ оценивают с помощью анализа конкурентного ингибирования на основе гранул (ВВСІА). Свободный DT оценивают с помощью сэндвич-ИФА.

Шаг 2: Оценка ТТ с помощью ВВСІА

Микросферические гранулы соединяют с ТТ для использования их в ВВСІА. Супернатант, т.е. предполагается наличие свободного ТТ, предварительно нейтрализуют с помощью моноклонального антитела против ТТ на планшете для микротитрования. Предварительно нейтрализованный образец переносится на микросферические гранулы, соединенные с ТТ. Свободный Ab, доступный после этапа предварительной нейтрализации, взаимодействует с гранулами, соединенными с ТТ. Реакцию, связанную с Ab-Ag, выявляют с помощью конъюгата IgG (fc-специфичного) к фикоэритрину против мыши. Считывание с планшета производится с помощью системы BioPlex-200 protein suspension array. MFI (Средняя интенсивность флуоресценции) обратно пропорциональна концентрации, присутствующей в образце.

Шаг 2: Оценка DT методом сэндвич-ИФА

Планшеты для ИФА покрывают лошадиными поликлональными сыворотками против DT. В лунки добавляют супернатант, т.е. ожидаемый уровень свободного DT. Мышиное моноклональное антитело против DT (собственного производства) конъюгируют с HRP с использованием набора для конъюгации HRP. Антиген DT находится между поликлональным антителом, специфичным к DT, и конъюгатом мышиного моноклонального антитела против DT-HRP. Для определения реакции добавляют ТМВ вместе с субстратом. Реакцию гасят с использованием 1N раствора HCl. Поглощение измеряют при 450 нм с помощью микропланшетного спектрофотометра. Оптическая плотность прямо пропорциональна концентрации DT, присутствующей в образце.

b. Альтернативный метод определения свободного белка с помощью CZE

Мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЕКС) является одним из методов электрокинетической хроматографии и основана на использовании ионного поверхностно-активного вещества в проточном буфере в концентрации, значительно превышающей его критическую мицеллярную концентрацию. Додecilсульфат натрия (SDS) является одним из самых популярных поверхностно-активных веществ и широко используется для МЕКС. Мицелла SDS мигрирует к положительному электроду посредством электрофореза. Электроосмотический поток направлен в направлении отрицательного электрода и он сильнее, чем электрофоретическая миграция мицеллы SDS при pH выше 5. Таким образом, мицелла SDS также мигрирует к отрицательному электроду со скоростью, равной разнице между электроосмотической и электрофоретической скоростями. Нейтральный анализируемый элемент мигрирует в мицеллярном растворе с электроосмотической скоростью, когда он свободен от мицеллы, и со скоростью мицеллы, когда он включен в мицеллу. Таким образом, разделение растворенных веществ будет происходить в результате относительных коэффициентов распределения в мицеллярной фазе (мицеллах) и водной фазе.

2. Оценка свободных полисахаридов

Принцип

Дезоксихолат натрия (DOC) является ионным детергентом и используется для селективного осаждения белка в комплексном растворе. Это свойство DOC используется здесь для оценки содержания свободного сахара в образцах полисахаридных конъюгатов.

В образцах конъюгатов DOC осаждает как свободный, так и конъюгированный белок. Осадок можно удалить фильтрованием, а фильтрат можно использовать для оценки содержания сахаридов.

Экспериментальная процедура

Метод А: Для серотипов 1, 3, 6В, 7F, 8, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 22F, 23F, 33F

Приготовление заготовки: Возьмите 600 мкл 20 мМ гистидинового буфера вместо образца и выполните ту же процедуру, что приведена ниже.

Возьмите 600 мкл образца в каждую пробирку Эппендорфа в двух экземплярах.

Добавьте 204 мкл 10%-ного раствора DOC в каждый образец и осторожно перемешайте.

Выдержите образцы при комнатной температуре в течение 10 минут.

Добавьте 77 мкл 1N соляной кислоты в каждый образец и осторожно перемешайте.

Выдержите образцы при комнатной температуре в течение 10 минут.

Аккуратно перемешайте и отфильтруйте весь объем с помощью шприц-фильтра 0,22 мкм в новую пробирку Эппендорфа или перенесите в отжимной фильтр и центрифугируйте при 5000 оборотах в минуту в течение 2 минут.

Немедленно перенесите 500 мкл фильтрата в новую пробирку Эппендорфа, содержащую 30 мкл 0,5 М бикарбоната натрия, в образец и осторожно перемешайте.

Метод В: Для серотипов 2, 4, 6А, 19А, 19F

Приготовление заготовки: Возьмите 650 мкл 20 мМ гистидинового буфера вместо образца и выполните ту же процедуру, что приведена ниже.

Возьмите 650 мкл образца в каждую пробирку Эппендорфа в двух экземплярах.

Добавьте 221 мкл 10%-ного раствора DOC в каждый образец и осторожно перемешайте.

Выдержите образцы на ледяной бане в течение 2 минут.

Добавьте 62 мкл 1N соляной кислоты в каждый образец.

Аккуратно перемешайте и отфильтруйте весь объем с помощью шприц-фильтра 0,22 мкм в новую пробирку Эппендорфа или перенесите в отжимной фильтр и центрифугируйте при 5000 оборотах в минуту в течение 2 минут.

Немедленно перелейте 500 мкл фильтрата в новую пробирку Эппендорфа, содержащую 20 мкл 0,5 М бикарбоната натрия, и аккуратно перемешайте.

v. **Формулировка:**

Общий процесс приготовления 20/21-валентной вакцинной композиции в соответствии с настоящим описанием представлен на рисунке 2.

Смешать А: конъюгаты 4-DT, 6A-TT, 9V-TT, 15B-TT, 22F-TT и 23F-CRM пневмококкового полисахарида-белка-носителя; гистидин; NaCl; и 2-PE (в случае многодозового состава) смешивали с фосфатом алюминия; и сукцинатом. при температуре от 18°C до 30°C с последующим

регулируем pH на $6 \pm 0,5$ (через NLT 2 часа) полисорбат 20 добавляли через $6,0 \pm 2$ часа.

Смесь В: конъюгаты 1-CRM, 2-CRM, 5-CRM, 6B-CRM, 7F-CRM, 8-CRM, 10A-CRM, 11A-CRM, 12F-CRM, 14-CRM, 18C-CRM, 19A-ТТ, 19F-CRM, 33F-CRM пневмококкового полисахарида с белком-носителем (24F-DT в случае 21-валентной композиции); гистидин; NaCl; и 2-PE (в случае многодозового состава) смешивали с фосфатом алюминия; и сукцинатом при температуре от 18°C до 30°C с последующим регулированием pH на $6 \pm 0,5$ (через NLT 2 часа) полисорбат 20 добавляли через $6,0 \pm 2$ часа. Конъюгат 3-ТТ полисахарида-белка-носителя пневмококка, если он использовался, присутствовал в смеси В.

Смесь А (через 24 ± 6 ч) и смесь В (через 18 ± 6 ч) перемешивали при перемешивании в течение 72 ч при температуре от 4 до 12°C . При необходимости доводили pH до $6 \pm 0,5$ и конечный объем регулировали водой для инъекций (WFI) для получения вакцинной композиции (Объемный состав PCV-20/21). Это было разлито по подходящим контейнерам (таким как стеклянные флаконы, силиконизированные флаконы, предварительно заполненные шприцы) по мере необходимости. Силиконизированные флаконы были поставлены (i) Muller + Muller - Joh, Германия; (ii) Nuova Ompi, Италия; и (iii) Schott Kaisha, Индия. Предварительно заполненный шприц был поставлен компанией BD Medical Pharmaceuticals.

Различные составы были приготовлены с использованием метода настоящего раскрытия, как представлено в таблице 5.

Увеличение числа серотипов, конъюгированных со столбнячным анатоксином (ТТ), может привести к иммуносупрессии, и, следовательно, были также изучены составы 131c (см. таблицу-5a) и 135a (см. таблицу-5b), содержащие 20-валентную и 21-валентную композиции соответственно и лишённые серотипа 3 (серотип 3, конъюгированный с ТТ в качестве белка-носителя).

В таблице 6 показан процент адсорбции 20-валентной композиции (Expt-131c), полученной в соответствии с настоящим описанием. 20-валентная композиция (Expt-131c) включает три различных белка-носителя, которые индивидуально конъюгированы с полисахаридами, полученными из 20 серотипы пневмококка.

Из таблицы 6 видно, что 20-валентная композиция (Expt-131c), приготовленная в соответствии с настоящим описанием, имеет адсорбции по меньшей мере 20% для всех серотипов. Кроме того, адсорбция $\geq 90\%$ наблюдается для серотипов 1, 3, 5, 10A, 12F, 14, 19A, 19F, 23F и 33F. Аналогичная адсорбция также ожидается, когда композиция лишена конъюгата серотипа 3.

Ни в одном из составов PCV не наблюдалось агрегации / белых частиц или хлопьев любого типа, что указывает на то, что состав является достаточно стабильным и однородным. Отсутствие агрегации можно объяснить использованием полисахарида с размером частиц в диапазоне 100-200 кДа и соотношением полисахарида к CDAP (цианилирующему агенту) в диапазоне (1):(0.3 - 1.5).

21-валентная композиция (Expt-135 и Expt-135a) содержит дополнительный конъюгат (24-DT), остальные компоненты такие же, как Expt-131 и Expt-135c. Как видно из таблицы 6, большинство полисахаридов, конъюгированных с TT/CRM, демонстрируют хорошую адсорбцию ($>50\%$), аналогично, ожидается, что серотип 24, конъюгированный с DT, дает хорошую адсорбцию при включении в 21-валентный состав.

Пример-2: Определение общего содержания азота в очищенных полисахаридах

Серотипы: 2, 3, 4, 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 18C, 22F, 24F и 33F

Из таблицы 7 видно, что общее содержание азота в полисахаридах, используемых в вакцинной композиции (композициях) по настоящему раскрытию, находится в пределах указанного диапазона.

Метод TNM основан на обнаружении и количественном определении общего азота с помощью хемилюминесцентного детектора. Обнаружение, предлагаемое TNM, превосходит существующие методы, такие как метод Кьельдаля, с точки зрения следующих преимуществ:

- a. Высокая пропускная способность
- b. Не требует использования концентрированных кислот, что характерно для методов, основанных на Кьельдале.
- c. Способен обнаруживать все виды азотистых связей, таких как пептиды, аминокислоты, нуклеиновые кислоты, аминсахары, нитраты и нитриты. Методы, основанные на Кьельдале, имеют ограничения, заключающиеся в том, что с их помощью невозможно определить формы азота, такие как нитрат и нитрит.
- d. Очень чувствительный. Он может обнаруживать азот с точностью до ppb, чего нет у Kjeldahl (чувствительность в ppm).
- e. Требуется минимальное количество образцов по сравнению с методами Кьельдаля или CHNS.

Метод TNM для оценки содержания азота, используемый в настоящем раскрытии, предлагает следующие преимущества по сравнению с методом CHNS, описанным в таблице 8.

Пример-3: Оптимизация геля фосфата алюминия и полисорбата 20

Гель фосфата алюминия:

Соль алюминия регулярно используется в вакцине, и ее профиль безопасности, простота приготовления, стабильность и мощная иммуностимулирующая способность хорошо известны.

Композиции вакцин по настоящему раскрытию оценивали с использованием различных концентраций геля фосфата алюминия (alum gel) и изучали его влияние на адсорбцию отдельных серотипов. Подробная информация о составе и полученный результат представлены в таблице 9.

Из таблицы 9 видно, что увеличение содержания квасцового геля привело к положительному влиянию на адсорбцию большого числа серотипов 21-валентных вакцина состав. Увеличение количества квасцового геля со 125 мкг до 187,5 мкг (Al^{3+}) на одну дозу значительно улучшало адсорбцию для большинства серотипов. Более 70% конъюгатов серотипа показали улучшение адсорбции при увеличении содержания квасцов. Кроме того, адсорбция $\geq 90\%$ наблюдается для серотипов 1, 3, 5, 10А, 12F, 14, 19А, 19F, 23F и 33F в препарате с большим содержанием квасцов (187,5 от Al^{3+} мкг на дозу) Аналогичные результаты также ожидаются, когда вакцинная композиция по настоящему раскрытию лишена полисахарида из *S. pneumoniae* серотип 3.

Конъюгат серотипа 4, содержащий DT в качестве белка-носителя, показал более низкую адсорбцию (54%) при 125 мкг/доза (Al^{3+}) квасцовый гель. Адсорбция (79%) значительно улучшилась, когда содержание квасцового геля было увеличено до 187,5 мкг/доза (Al^{3+}). Аналогичная тенденция наблюдается и для большинства остальных серотипов. Было замечено, что дополнительные серотипы, которых не было в 10-валентной пневмококковой вакцине Заявителя (ПНЕВМОСИЛ®), показали более низкую адсорбцию при использовании меньшего количества геля из квасцов. Однако значительное улучшение адсорбции наблюдалось при более высоком количестве геля из квасцов (187,5 мкг (Al^{3+})) на каждую использованную дозу.

Сравнительные данные по адсорбции для многовалентных вакцина состав настоящего раскрытия:

Как видно из таблиц 10 и 11, адсорбция была относительно более низкой при низком содержании квасцов для многих серотипов, включая 6В, 7F и 15В, тогда как более высокая адсорбция наблюдалась при увеличении содержания квасцов. Следовательно, 187,5 мкг Al^{3+} в дальнейших исследованиях была использована доза /0,5 мл.

Сравнительные исследования влияния содержания алюминия в рецептуре на адсорбцию серотипов

В таблице 12 приведены подробные сведения о рецептуре и влиянии различного содержания алюминия на адсорбцию и содержание антигена.

Кроме того, видно, что увеличение количества квасцового геля не оказывало отрицательного влияния на антигенность вакцина композиции. Обнаружено, что гель с высоким содержанием квасцов в иммуногенном составе также полезен для усиления реакции IgG-антител, опосредованной В-клетками, о чем свидетельствуют данные исследования иммуногенности кроликов почти для всех серотипов, как показано в таблице 12а. Наблюдался ответ антител IgG с точки зрения численного превосходства для всех серотипов. Кроме того, титры IgG были по меньшей мере в 2 раза выше для серотипов 1, 10А, 15В и 22F.

Более высокая адсорбция отдельных серотипов конъюгатов рассматривается как положительный признак качества вакцинных композиций и является параметром, указывающим на стабильность. Увеличение адсорбции конъюгатов дополнительно улучшит стабильность индивидуального антигена и консистенцию партий лекарственных препаратов от партии к партии при производстве клинических материалов и коммерческих материалов. Это особенно важно для нескольких серотипов, например, 4, 6В, 7F, 15В, 18С. Ожидается, что более низкая адсорбция приведет к тому, что соответствующие антигены будут подвергаться риску деградации с течением времени, пока вакцинные композиции находятся на полке.

Данные по индивидуальной адсорбции и иммуногенности животных подтвердили преимущество использования геля с высоким содержанием квасцов в композиции мультивалентной вакцины по настоящему изобретению. Эти композиции с более высоким иммунным ответом, вероятно, обеспечат более стабильные и эффективные результаты, полезные при крупномасштабном производстве вакцин.

Полисорбат 20:

Вакцинные композиции по настоящему раскрытию содержат частицы фосфата алюминия, которые суспендированы в водной среде, а

полисорбат 20 используется в качестве неионного поверхностно-активного вещества в качестве стабилизатора. Поверхностно-активные вещества играют важную роль в стабилизации состава за счет снижения межфазного натяжения жидкость-воздух, твердое вещество-жидкость и улучшения стабильности и текучести составов на основе суспензий.

Заявитель ранее использовал 50 мкг полисорбата 20 в составе продаваемой им 10-валентной пневмококковой вакцины (ПНЕВМОСИЛ®). Однако количество полисорбата 20 было увеличено (100 мкг) из-за увеличенного количества антигенов (пневмококковых полисахаридов) и увеличенного количества квасцового геля, используемого в вакцинных композициях по настоящему раскрытию. Большее количество полисорбата 20 в настоящих вакцинных композициях демонстрирует улучшенные текучие свойства, особенно в присутствии увеличенного содержания квасцового геля с добавлением большего количества антигенов (пневмококковых полисахаридов). Кроме того, агрегаты или хлопья продукта не наблюдались при повышенных концентрациях полисорбата 20 в вакцина композиции при хранении при температуре от 2 °С до 8 °С. Также не наблюдалось никакого побочного эффекта при использовании более высокого содержания полисорбата 20 в отношении индивидуальной адсорбции серотипов конъюгата, индивидуального содержания антигена и иммунного ответа, наблюдаемого в исследованиях на животных (мыши и кролики).

Большее количество поверхностно-активного вещества (полисорбат 20) в составе вакцины по настоящему изобретению способствует получению композиции без агрегации, имеющей улучшенные свойства текучести даже в присутствии повышенного содержания квасцового геля с более высоким количеством антигенов (пневмококковых полисахаридов), включенных в композицию.

Пример-4: Исследования иммуногенности

(а) Сравнение данных иммуногенности у кроликов NZW для поливалентного пневмококкового препарата Serum Institute/ SIIPs

Expt. 131 с Expt. 106, Expt. 119 и коммерческий компаратор (Prevenar13)

Цель исследования: Целью этого исследования было проверить иммуногенность разработанного SIIPL мультивалентного пневмококкового препарата Expt. 131 и сравнить с Expt. 106, Expt. 119 вместе с коммерческим компаратором (Prevenar13) путем оценки общих титров IgG методом мультиплексного анализа на основе шариков и функциональных титров IgG либо методом ОРА, либо методом мультиплексного опсонофагоцитарного анализа (МОРА).

Детали исследования: Разработанный заявителем препарат PCV21 Expt. #131 вводили с адъювантом фосфата алюминия группе из 8 новозеландских белых кроликов (4 самца и 4 самки) после трех внутримышечных иммунизаций на 0-й, 14-й и 28-й день с даты начала исследования. Сыворотку отделяли от крови, взятой на 0, 28 и 42-й дни исследования, для проверки общего IgG методом анализа на основе шариков и функционального IgG методом мультиплексного опсонофагоцитарного анализа.

Титры на 42-й день сравнивали с данными 42-го дня ранее протестированных PCV21 Expt. 106, Expt. 119 вместе с Prevenar13. Подробная информация о составах, использованных в этом исследовании, описана в таблице13, а результат приведен в таблице 14.

Общий вывод для сравнения:

Эффект конъюгации с ТТ- Как показано в таблице14, титры как общего IgG (по ВВА), так и функционального IgG (по МОРА) значительно увеличились для серотипов 3, 6А, 9V и 19А, где используются конъюгаты ТТ в примере №131, по сравнению с конъюгатами CRM в примере №106.

Кроме того, перекрестная реактивность для сходных серотипов (т.е. 6А-6В и 19А-19F) также наблюдается для Expt.#131 по сравнению с Expt.# 106. Антитело реагирует с антигенами, отличными от

антигена, который его стимулировал. Это явление называется перекрестной реакцией или перекрестная реактивность. Перекрестная реакция происходит из-за общего эпитопа об антигене или конформационном сходстве эпитопов. В настоящем исследовании из данных было видно, что наблюдалось усиление иммунного ответа (из-за изменения белка-носителя) на 6А и 19А, иммунный ответ на 6В и 19F также увеличился, возможно, из-за перекрестной реактивности.

Титры (как общего, так и функционального IgG) для Expt.#131 сопоставимы с титрами, полученными с помощью коммерческого компаратора (Pevnar13).

Исследования иммуногенности вакцинных композиций, не содержащих пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 3, продолжаются, и ожидаются аналогичные результаты.

Общий уровень IgG методом анализа на основе шариков:

Мультиплексные анализы на основе гранул в проточных системах Lumineх проводятся на основе технологии xMAP (профилирования нескольких анализируемых веществ). Уникальные возможности мультиплексирования (до 100 пикселей) анализов Lumineх основаны на использовании микросфер, которые были внутренне окрашены красными и инфракрасными флуорофорами различной интенсивности. Каждой бусинке присваивается уникальный номер, или 'область бусинки', позволяющий отличить одну бусинку от другой.

Мультиплексный анализ на основе шариков оказался эффективной альтернативой широко используемому ИФА для оценки реакции антител. Анализ имеет много преимуществ перед ИФА, поскольку этот анализ более чувствителен, специфичен и надежен. Способность ELISA и клеточного анализа, такого как ОРА, оценивать реакцию на один антиген одновременно делает сбор данных для поливалентных вакцин более трудоемким и отнимающим больше времени. Мультиплексный анализ на основе гранул с его высокой производительностью требует гораздо меньше времени для оценки общего титра IgG. Очень мало лаборатории располагают ресурсами и оборудованием для

проведения сложного анализа на основе клеток, в отличие от анализа на основе шариков, который намного проще и его легко воспроизвести в любом месте. Когда дело доходит до тестирования кандидата на мультивалентную вакцину, доступность образца сыворотки является серьезной проблемой для ELISA и OPA, но анализ на основе шариков требует относительно меньшего объема образцов и получения данных, таких же точных, как моновалентный анализ. Были приняты меры предосторожности, чтобы избежать перекрестной реакции антител, связывающихся с представляющим интерес антигеном, путем использования полисахарида клеточной стенки пневмококка для разведения сыворотки. Различные отчеты и опубликованные статьи показали, что данные, полученные с помощью мультиплексного анализа, хорошо коррелируют с традиционными титрами OPA.

В этом анализе отдельные наборы гранул соединяют с каждым пневмококковым капсульным полисахаридным антигеном (PNPs) 21-валентной вакцинной группы, используя разработанный компанией метод соединения. Антителам в различных серийных разведениях образцов сыворотки дают возможность реагировать с полисахаридным антигеном, соединенным с гранулами, и обнаруживают с помощью конъюгата антител, меченого флуоресцентным красителем (R-фикоэритрином). Флуоресценция, генерируемая типом гранул каждого антигена, измеряется на Система Luminex (Bio-Plex200, Bio-Rad).

Результаты были проанализированы в виде титров антител. Пороговое значение для расчета общего титра IgG устанавливали как величину, обратную максимальному разведению образца сыворотки, дающему ≥ 100 MFI после вычета фонового значения для конкретного антигена. Если чистый вычитаемый MFI в разведениях 1:100 составляет <100 , то за титр принимается в два раза меньший / предыдущее разведение 1:100, т.е. 50. Аналогично, если последнее разведение имеет значение ≥ 200 MFI после вычета чистого значения, за титр принимается следующее соответствующее двукратное разведение.

Оценка функциональных антител методом опсонофагоцитарного анализа (OPA) или мультиплексного опсонофагоцитарного анализа (MOPA):

Анализ на уничтожение опсонофагоцитов (ОРА) и иммуноферментный анализ (ЕІА) являются наиболее популярными методами оценки эффективности вакцины. Хотя ЕІА предоставляют полезную информацию о количестве антител, вырабатываемых пневмококковыми вакцинами, в действительности они никогда не дают информации о функциональных IgG, вырабатываемых в ходе иммунного ответа. Поскольку защита хозяина от пневмококков осуществляется через фагоциты, вызывающие опсонизацию бактерий, анализ на уничтожение опсонофагоцитов (ОРА) оказывается предпочтительным биоаналитическим анализом для оценки антипневмококковых антител, которые функционально вовлечены в процесс опсонизации. Опсонофагоцитарные анализы (OPAS) *in vitro* с антителом и комплементом для опосредованного опсонофагоцитарного уничтожения бактерий были разработаны в качестве дополнения к иммуноферментному анализу со стандартизированным сывороточным иммуноглобулином G против пневмококковой капсулярной полисахаридной вакцины для оценки эффективности пневмококковых вакцин. ОПА является краеугольным камнем при разработке пневмококковой вакцины. Крайне важно провести ОПА до получения лицензии на вакцину, поскольку любые модификации или изменения в рецептуре вакцины могут быть тщательно оценены с последующим улучшением рецептуры в ходе разработки вакцины.

МОРА – это мультиплексированный ОРА, в котором титры ОРА против четырех бактерий могут быть проанализированы в одной лунке. Поскольку моноплексные ОПА требуют много времени и труда, выполнение МОПА имеет множество преимуществ по сравнению с ОПА, таких как требование меньшего объема сыворотки для тестирования большого количества серотипов, включенных в состав вакцины, и высокая пропускная способность анализа, позволяющая проводить быстрый и точный анализ.

Штаммы МОРА были закуплены в UAB (Университет Алабамы – лаборатория профессора Муна Нама), которая также является референсной лабораторией для анализа иммуногенности пневмококка. Все ведущие производители пневмококковых вакцин в настоящее время используют

одну и ту же процедуру МОРА и штаммы, поставляемые ЗАО, для своих исследований и клинической оценки вакцины.

МОРА использует модифицированные клинические штаммы пневмококков, которые устойчивы к определенному антибиотику (антибиотики включают: стрептомицин, спектиномицин, триметоприм и Оптохин) и используются в наборах бактерий (по 4 бактерии в наборе). Анализируются образцы сывороток с различными разведениями, и при максимальном разведении сыворотки получается $\geq 50\%$ -ная гибель бактерий по сравнению с контрольными лунками с комплементом рассматривается как титр МОРА.

Модифицированная аминная связь для оценки содержания антигена Lumineх xMAP - это новая технология, в которой используются карбоксилированные гранулы (микросферы), которые внутри помечены двумя разными флуорофорами, присваивающими каждому набору гранул уникальный идентификатор, называемый областью гранулы. Этот процесс придает важное значение данному методу, поскольку он может быть использован для оценки нескольких (до 100) различных анализируемых веществ одновременно в данном образце. Для этого необходимо, чтобы анализируемые вещества были соединены / конъюгированы с гранулами с использованием присутствующей на них группы COOH. Сообщается о многих методах связывания бактериальных полисахаридов, которые в основном представляют собой двухдневный протокол. Когда ранее разрабатывались такие методы, как DMTMM-COOH, DMTMM-NH₂, PLL применяли для связывания полисахаридов SIIP_L типа 6B, 9V и 19A, было обнаружено, что полученные связанные гранулы не дают линейной кривой в анализе конкурентного ингибирования для оценки содержания антигена, хотя они были пригодны для анализов титрования IgG. Динамический диапазон гранул был настолько низким, что они могли генерировать в основном 4-6 стандартных концентраций в линейном диапазоне из всего восьми стандартных точек, которые были необходимы для разработанного анализа конкурентного ингибирования на основе гранул (BBSIA). Поскольку анализ включает антитела из сывороток кроликов SSI, во многих случаях гранулы оказывались неподходящими из-за в

значительной степени перекрестно реагирующие антитела присутствуют в поликлональных сыворотках. Поскольку ВВСІА представляет собой мультиплексный анализ (10-Plex), антитела, специфичные для каждого серотипа, используются в смеси. Изменчивый характер перекрестных реакций сывороток SSI затруднял оптимизацию разведения антител, специфичных для каждого серотипа. Это вынудило внедрить новый метод связывания, который может усилить связывание полисахаридов, тем самым увеличивая шансы легкой оптимизации разведения антител и получения линейной кривой для восьми различных стандартных концентраций ВВСІА.

Недавно разработанный метод связывания был сконструирован уникальным образом, поскольку при использовании магнитных шариков для связывания полисахаридов, а также анализируемых белков, для промывки гранул используется магнитная ИФА-машина вместо центрифуги.

Протокол для модифицированного соединения аминов:

1. Для 1-кратной реакции связывания в масштабе используют гранулу из правильно перемешанных монодисперсных гранул объемом 100 мкл (приблизительно $1,25 \times 10^6$) гранулы ресуспендированы в буфере активации гранул. Гранулы активируют 10 мкл свежеприготовленного 50 мг/мл EDC и S-NHS каждой (в буфере для активации гранул из 100 мм MES-буфера с pH 6) в течение 20-30 мин при комнатной температуре при 30 оборотах в минуту, встряхивая на rotospin в темноте. Гранулы дважды промывают физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS) и повторно суспендируют в воде.
2. Соединяемый полисахарид активируют путем смешивания со свежеприготовленным 200 мг/мл EDC и добавляют смесь к активированным гранулам. Смесь гранул, полисахаридов и EDC инкубировали в течение 2-3 часов в темноте при комнатной температуре при 30 об/мин на ротошпине для соединения, а затем трижды промывали PBS центрифугированием при 16500 xg в течение 5 минут.

3. Чтобы замаскировать любую открытую активную группу (которая может вызвать неспецифическое связывание во время анализа), гранулы блокировали 250 мМ глюкозы и глицина каждая на 30-45 минут. при комнатной температуре при 30 оборотах в минуту на вращающемся барабане в темноте. Гранулы снова промывают PBS и хранят в буфере для хранения, эквивалентном первоначальному объему гранул.
4. При использовании магнитных шариков для соединения был применен другой подход с использованием полистирольной пластины и магнитной шайбы с приведенными ниже изменениями.
- Гранулы отбирали в круглодонную 96-луночную пластинку. Вместо центрифугирования использовали магнитную промывочную машину ELISA для промывки в 3 цикла (300 мкл буфера на лунку; PBS перед реакцией связывания и PBS с добавлением 0,2% BSA, 0,1% tween 20 и 0,05% азида натрия после реакции связывания) с интервалом в 1 минуту между двумя циклами промывки, чтобы гранула осела/ удерживалась магнитом на дне.
 - Активацию гранул, связывание и блокировку инкубации гранул производили на орбитальном шейкере.

Преимущества модифицированного соединения аминов:

Гранулы полисахарида SIIPL типа 6B, 9V и 19A, соединенные ранее доступными методами, имели более низкую и непостоянную эффективность, ограничивая чувствительность анализа по сравнению с другими серотипами с более высокой чувствительностью. Это приводит к трудностям при оптимизации кривой с аналогичным стандартным диапазоном для всех полисахаридов PCV10, и чтобы избежать этого, для связывания для ВВСИА использовались полисахариды, закупленные у ATCC.

Преимущество модифицированного метода связывания с амином заключается в том, что он позволяет получать высокоэффективные

гранулы, связанные с полисахаридом SIIP, для вышеупомянутых серотипов, что косвенно помогло повысить чувствительность анализа за счет увеличения количества стандартных точек в линейном диапазоне. Эти гранулы также способствовали легкой оптимизации разведений антител (квалификация гранул), что было предварительным условием для использования этих гранул в ВВСIA для определения содержания антигена. оценка.

Модифицированная аминная связь было обнаружено, что метод, использованный для этих серотипов в трех различных партиях спаривания, успешно прошел квалификацию, что указывает на постоянство спаривания шариков и их квалификацию на ВВСIA.

В дополнение к вышеуказанным преимуществам, модифицированный метод соединения аминов имеет ряд других преимуществ по сравнению с предыдущими методами, как указано ниже.

- Потребность в меньшем количестве полисахарида для связывания (в основном до 25 мкг)
- Этот метод менее трудоемкий и отнимает меньше времени
- Сокращение времени / количества экспериментов для квалификации гранул и оптимизации разведения антител
- При использовании пробирок из полистирола для реакции сцепления гранулы используются для связывания с внутренними стенками пробирки. Эти связанные гранулы используются для удаления при сборе надсадочной жидкости для удаления, что приводит к низкому количеству гранул. Чтобы уменьшить потерю гранул. анализ был разработан таким образом, что полистирольная 96-луночная пластина использовалась для связывания полисахаридов с магнитными гранулами, а магнитная ИФА-шайба – для этапов промывки гранул.

Гранулы полисахаридов типа 6B, 9V и 19A, соединенные модифицированным методом аминосоединения, использовали в

комбинации с гранулами других полисахаридов, соединенных одним из предыдущих методов, и было установлено, что они подходят для ВВСИА. Три разные партии гранул для всех трех полисахаридов были квалифицированы на ВВСИА, и было обнаружено, что восстановление содержания антигена в конечной партии находится в пределах установленной спецификации и составляет 70-130% от меченого содержания.

Эти полисахариды также были соединены в 60 раз более высоком масштабе сцепления с аналогичными результатами, что и для трех партий мелкомасштабного сцепления, и масштаб сцепления может быть дополнительно увеличен.

в. Сравнительные данные по иммуногенности мышей для разработанного заявителем препарата PCV21 Ex-121; Ex-119; Ex-131 и коммерчески доступных компараторов (Prevenar13 и Synflorix)

Цель исследования: Целью этого исследования было оценить потенциал разработанного SIIPL препарата PCV21 Ex-121, Ex-119, Ex-131 для выработки сильного иммунного ответа и сравнить иммуногенность с коммерческими препаратами сравнения (Prevenar13 и Synflorix). Общие титры IgG оценивали с помощью мультиплексного анализа на основе шариков (Luminex 200).

Детали исследования: Развивающие препараты PCV-21 компании SIIPL Ex-121, Ex-119 и Ex-131 вместе с препаратами сравнения (Prevnar 13 и Synflorix) вводили мышам подкожно (мышь Harlan) в разведении 1/100^{че}. Мышам делали инъекции на 0-й, 14-й и 28-й день и брали кровь на 42-й день для оценки конечного титра. Сыворотки отделяли от крови, взятой на 42-й день (терминальное кровотечение), для проверки общего титра IgG методом мультиплексного анализа на основе шариков.

Метод, используемый для оценки титра IgG: Общие титры IgG определяли с помощью мультиплексного анализа на основе шариков с использованием платформы Luminex 200. Титры рассчитывали путем

определения максимального разведения образца сыворотки, имеющего MFI ≥ 100 (пороговое значение).

Подробная информация о составах, использованных в данном исследовании, описана в таблице 15.

Титры на 42-й день приведены в таблице 16 ниже для разработанного препарата заявителя и сравнены с Превнаром-13 и Синфлориксом.

Общий вывод для сравнения:

Эффект конъюгации с ТТ- Общие титры IgG значительно увеличились для серотипов 3, 6A, 9V и 19A, где используются конъюгаты ТТ в Ex-119; Ex-131 по сравнению с титрами, полученными для конъюгатов CRM в Ex-121.

Кроме того, перекрестная реактивность для сходных серотипов (т.е. 6A-6B и 19A-19F) также наблюдается для Ex-131 по сравнению с Ex-121.

Исследования иммуногенности вакцинных композиций, не содержащих пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа 3, продолжаются, и ожидаются аналогичные результаты.

Антитело реагирует с антигенами, отличными от антигена, который его стимулировал. Это явление называется перекрестной реакцией или перекрестная реактивность. Перекрестная реакция происходит из-за общего эпитопа об антигене или конформационном сходстве эпитопов. В настоящем исследовании из данных было видно, что наблюдалось усиление иммунного ответа (из-за изменения белка-носителя) на 6A и 19A, иммунный ответ на 6B и 19F также увеличился, возможно, из-за перекрестной реактивности.

ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕЗУЛЬТАТ

Вакцинная композиция и способ получения вакцинной композиции по настоящему раскрытию, описанные здесь выше, обладают рядом

технических преимуществ, включая, но не ограничиваясь ими, реализацию:

-вакцинные композиции, которые не агрегируются; проявляет долговременную стабильность в широком диапазоне температур.

-улучшенный иммунный ответ для серотипов 6А, 9V, 19А при использовании ТТ в качестве белка-носителя по сравнению с использованием CRM197 в качестве белка-носителя

-оптимальная молекулярная масса подобранного полисахарида и конъюгата для обеспечения высокого иммунного ответа

-высокое извлечение полисахаридов и сохранение структурной целостности за счет использования гомогенизации под высоким давлением (в отличие от химической калибровки) для фрагментации полисахаридов.

-Стабильный состав (низкое содержание свободных полисахаридов, низкое содержание свободного белка)

-обеспечивают защиту от наиболее распространенных серотипов пневмококка

-использование адъюванта с высоким содержанием соли алюминия обеспечивает улучшенную адсорбцию полисахаридов пневмококка.

-использование полисорбата с более высоким содержанием 20 позволяет избежать образования агрегатов / хлопьев

-усиленный иммунный ответ при серотипе 6В вследствие перекрестной реактивности со стороны 6А-ТТ

-использование CDAP активизирует полисахариды, что приводит к более быстрой реакции конъюгации наряду с лучшим сохранением полисахаридного эпитопа

-использование нескольких белков-носителей позволяет избежать подавления иммунитета в результате использования одного типа белка-носителя

Приведенное выше описание конкретных вариантов осуществления полностью раскрывает общую природу представленных здесь вариантов осуществления, заключающуюся в том, что другие могут, применяя текущие знания, легко модифицировать и/или адаптировать для различных применений такие конкретные варианты осуществления, не отходя от общей концепции, и, следовательно, такие адаптации и модификации должны и предназначены для понимания в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых вариантов осуществления. Следует понимать, что фразеология или терминология, используемые здесь, предназначены для описания, а не ограничения. Следовательно, хотя варианты осуществления здесь были описаны в терминах предпочтительных вариантов осуществления, специалисты в данной области техники поймут, что варианты осуществления здесь могут быть осуществлены с модификацией в рамках духа и объема вариантов осуществления, как описано здесь.

Во всем этом описании слово "включать" или его варианты, такие как "включает" или "содержащий", будут пониматься как подразумевающие включение указанного элемента, целого числа или шага, или группы элементов, целых чисел или шагов, но не исключение любого другого элемента, целого числа или шага, или группы элементов, целых чисел или шагов.

Использование выражения "по меньшей мере" или "по меньшей мере один" предполагает использование одного или нескольких элементов, или ингредиентов, или количеств, поскольку использование может быть в варианте осуществления изобретения для достижения одной или нескольких желаемых целей или результатов.

Любое обсуждение документов, действий, материалов, устройств, изделий и т.п., которые были включены в данную спецификацию, проводится исключительно с целью предоставления контекста для раскрытия. Это не следует воспринимать как признание того, что

какой-либо или все эти вопросы составляют часть базы известного уровня техники или были общими знаниями в области, имеющей отношение к раскрытию, поскольку они существовали где-либо до даты приоритета данной заявки.

Числовые значения, упомянутые для различных физических параметров, размеров или величин, являются лишь приблизительными, и предполагается, что значения, на десять процентов превышающие/меньшие числовые значения, присвоенные параметрам, размерам или величинам, подпадают под сферу раскрытия, если в спецификации конкретно не указано обратное.

Хотя значительный акцент здесь был сделан на компонентах и составных частях предпочтительных вариантов осуществления, следует понимать, что может быть создано множество вариантов осуществления и что в предпочтительных вариантах осуществления можно внести множество изменений без отступления от принципов раскрытия. Эти и другие изменения в предпочтительном варианте осуществления, а также в других вариантах раскрытия будут очевидны специалистам в данной области техники из раскрытия здесь, посредством чего следует четко понимать, что вышеупомянутый описательный материал должен интерпретироваться просто как иллюстрация раскрытия, а не как ограничение.

Таблица 1: Давление и проходы для гомогенизации под высоким давлением

№	Серотип	Давление (KPSI)	Количество проходов
1	1	26-30	7-10
2	5	26-30	20-25
3	6A	3 - 8	1 *
4	6B	23-27	1-3
5	7F	25-29	1-3
6	9B	23-27	2-4
7	14	20-26	1-3
8	19A	26-30	1-3
9	19F	21-25	1-3
10	23F	26-30	3-6
11	2	28 - 30	5-8
12	3	28 - 30	9-12
13	4	28 - 30	10-14
14	8	28 - 30	9-12
15	10A	25 - 29	2-5
16	11A	25-29	3-6
17	12F	28-30	25-30
18	15B	27-30	2-4
19	18C	28-30	5-8
20	22F	25-30	3-6
21	24F	28-30	15-25
22	33F	20-25	3-6

* Если молекулярная масса (SEC-HP-RI) превышает 900 кДа

Таблица 2: Критические параметры конъюгации											
Серотипы	1	2	3	4	5	6A	6B	7F	8	9B	10A
Ориентировочный PNP _s Mw	100-200 кДа (кроме типа 6A: очищенный / 400-900 кДа)										
Концентрация PNP _s (мг / мл) перед активацией	3-7	4-6	3-5	5-7	5-8	5-8	10-12	9-12	3-5	7-9	7-9
Электролит	Хлорид натрия до конечной концентрации 2 ± 0,2 М										
Раствор CDAP	~ 100 мг / мл в ацетонитриле. Свежеприготовленные части CDAP составляют ± 0,25 частей по массе PNP _s (в /в). условия активации и конъюгации равны 110±25 Об/ мин при 22±3 °С										
PS: CDAP (соотношения); (мас./мас.)	1:1.1	1:0.8	1:0.3	1:0.8	1:1.1	1:1	1:1.5	1:1.5	1:0.5	1:1	1:1
Отрегулируйте pH после	~ 1 мин										

рН активации (± 0.3)	9.5										
Продолжительность активации (мин)	4 ± 1										
Белок	CRM- система 97	CRM- система 197	TT	DT	CRM- система 197	TT	CRM- система 197	CRM- система 197	CRM- система 197	TT	CRM- система 197
Конц. белка. (мг/мл)	20 мг/мл белка-носителя + хлорид натрия до конечной концентрации 2±0,2 М, Части белка-носителя составляют ± 0,25 части										
Ps: Части белка (мас. %)	1:1	1:1	1:1	1:0.9	1:1	1:1.2	1:1.1	1:1	1:1	1:1	1:1
Добавление белка После	3-10 минут активации в зависимости от серотипов										
рН конъюгации (± 0.3)	9.5										

Спряжение	20 мин - 9 часов в зависимости от серотипов (Для 6А продолжайте реакцию до 4 ± 1,5 часов)
Продолжительность	
Тушение с помощью	PNPs : глицин = 1 : NLT10 частей (в /в)
Гашение pH	8.1±0.3
Продолжительность закаливания	NLT 1 час при 22±3 °С за ними следуют 10-20 часы работы в 12±3 °С при перемешивании

Таблица 2 (Продолжение)											
Серотипы	11A	12F	14	15B	18C	19A	19F	22F	23F	33F	24F
Ориентировочный PNPs Mw	100 - 200кДа										
Концентрация PNPs (мг / мл) перед активацией	8-10	4-6	9-11	10-13	4-6	9-12	9-11	9-12	7-10	4-6	3-7
Электролит	Хлорид натрия до конечной концентрации 2 ±0,2 М										

Решение CDAP	~ 100 мг / мл в ацетонитриле. Свежеприготовленные части CDAP составляют ± 0,25 частей по массе PNPs (в /в). условия активации и конъюгации равны 110 ±25 Об/ мин при 22 ± 3 °С										
CDAP (запчасти) ; ж/б	1:1	1:1.1	1:1	1:1.2	1:1.2	1:1	1:0.8	1:1	1:1.5	1:0.9	1:1
Отрегулируйте pH после	~ 1 мин										
pH активации (+ 0.3)	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.0	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5
Продолжительность активации (мин)	4 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	6 ± 3	7 ± 3	4 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	4 ± 1
Белок	CRM-система 97	CRM-система 197	CRM-система 197	TT	CRM-система 197	TT	CRM-система 197	TT	CRM-система 197	CRM-система 197	DT
Конц. белка. (мг/мл)	20 мг/мл белка-носителя + хлорид натрия до конечной концентрации 2 ± 0,2 М, Части белка-носителя составляют ± 0,25 части										

Части белка (в/в)	1:1	1:1.1	1:1.1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1.25	1:1	1:1	1:1
Добавление белка после	3-10 мин активации в зависимости от серотипов										
pH конъюгации (<u>±</u> 0.3)	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.0	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5
Спряжение Продолжительность	20 мин - 9 часов в зависимости от серотипов										
Тушение с помощью	PNPs : глицин = 1 : NLT10 частей (в /в)										
Гашение pH	8.1±0.3										
Продолжительность закалки	NLT 1 час при 22±3 °C затем 10-20 часов при 12±3 °C при перемешивании										

Таблица-3: Характеристики пневмококковых полисахаридов и конъюгатов пневмококкового полисахарида с белком-носителем

Серотип	Белок - носитель	Мвт полисахарида (кДа) (SEC-HPLC)	Соотношение полисахарида : белок-носитель	Свободный полисахарид (%)	Молекулярная масса конъюгата (кДа) (Секунды)
2	CRM	157	1.63	2.55	6998
2	CRM	142	0.66	<1	12840
3	CRM	168	0.81	3.9	4818
3	CRM	168	0.79	1.25	9630
3	CRM	168	0.77	2.81	6253
4	DT	160	1.27	9	8030
4	DT	144	1	ND	4316
4	DT	144	0.9	1.74	3327
4	CRM	144	0.73	2.41	4999
12F	CRM	160	1.04	18.5	6592
12F	CRM	151	0.8	3.03	12686
12F	CRM	151	0.93	10.1	3353
15B	TT	141	0.7	1.54	8852
15B	CRM	141	0.7	<1	8361
15B	TT	141	0.8	7.05	8171
18C	CRM	155	0.97	>10	4803
18C	CRM	152	0.84	2.71	6549
18C	CRM	220	0.89	3.39	8198
22F	TT	123	0.6	<1	15370
22F	TT	123	0.8	<2	10850
22F	TT	132	0.75	<1	16750
22F	TT	132	0.56	<2	Недоступно
22F	CRM	132	0.63	<2	10770
8	CRM	135	0.81	3.65	2973
10A	CRM	155	0.77	1.3	8417
11A	CRM	146	0.85	<1	7854
11A	CRM	146	0.6	<2	9652

33F	CRM	135	0.9	<1	23340
6A	TT	763	1.07	1.91	8431
9B	TT	148	0.48	ND	24050
19A	TT	137	0.76	<2.69	6769
19A	DT	137	0.63	<1	4734
24F	DT	157	1.08	3.77	2370
1	CRM	139	0.7	2.3	6154
5	CRM	147	0.6	13.2	4289
6B	CRM	146	0.6	<1.5	8837
7F	CRM	145	0.8	3.5	12260
14	CRM	136	0.7	<1.5	13840
19F	CRM	154	0.6	<1.5	6222
23F	CRM	144	0.6	3.7	8534

Таблица 4: Оценка свободного белка методом МЕКС: пневмококковые полисахариды, конъюгированные со специфическими белками-носителями

Серотипы	Конъюгированный белком-носителем	Применяемый метод
2, 8, 10А, 11А, 12F, 18С, 33F	CRM197	МЕКС
4, 24F	DT	(Мицеллярная электрокинетическая
6, 9V, 19А, 3, 15В, 22F	TT	хроматография)

Таблица-5а: Вакцинные композиции в соответствии с настоящим описанием

(Все значения приведены для дозы 0,5 мл)

Серотип	Expt-131c (20-валентный)
1	CRM
2	CRM
4	DT
5	CRM
6A	TT
6B	CRM
7F	CRM
8	CRM
9B	TT
10A	CRM
11A	CRM
12F	CRM
14	CRM
15B	TT
18C	CRM
19A	TT
19F	CRM
22F	TT
23F	CRM
33F	CRM
24F	-
AlPO ₄	NMT 1,13 мг (0,847 мг фосфата алюминия, т.е. 187,5 мкг в виде Al ³⁺)
Гистидин	1,55 мг
PS -20	100 мкг
Сукцинат	1,18 мг
NaCl	4,5 мг
2-ПЭ	4 мг

Таблица-5б: Вакцинные композиции в соответствии с настоящим описанием

(Все значения приведены для дозы 0,5 мл)

Серотип	Expt-135a (21 валентный)
1	CRM
2	CRM
4	DT
5	CRM
6A	TT
6B	CRM
7F	CRM
8	CRM
9B	TT
10A	CRM
11A	CRM
12F	CRM
14	CRM
15B	TT
18C	CRM
19A	TT
19F	CRM
22F	TT
23F	CRM
33F	CRM
24F	DT
AlPO ₄	NMT 1,13 мг (0,847 мг фосфата алюминия, т.е. 187,5 мкг в виде Al ³⁺)
Гистидин	1,55 мг
PS -20	100 мкг
Сукцинат	1,18 мг
NaCl	4,5 мг
2-ПЭ	4 мг

Таблица 6: Процентная адсорбция PCV-мультивалентной композиции

Серотип	1	2	3	4	5	6A	6B	7F	8	9B	10A	11A	12F	14	15B	18C	19A	19F	22F	23F	33F
Ожидаемый результат-131	100	89	100	79	93	56	41	87	87	80	99	68	95	92	32	84	94	90	38	91	100

Таблица 7: Предельные значения содержания азота			
Серотип	Технические характеристики (% от сухого веса)	Ссылка	Результаты (%)
2	0 - 1.0	EP/VP/WHO	0.5
3	0 - 1.0	EP/VP/WHO	0.7
4	4.0 - 6.0	EP/VP/WHO	4.8
8	0 - 1.0	EP/VP/WHO	0.3
10A	0.5 - 3.5	EP/VP/WHO	1.5
11A	0 - 2.5	EP/VP/WHO	0.3
12F	3.0 - 5.0	EP/VP/WHO	3.7
15B	1.0 - 3.0	EP/VP/WHO	1.7
18C	0 - 1.0	EP/VP/WHO	0.5
22F	0 - 2.0	EP/VP/WHO	0.3
24F	Должен присутствовать	Внутренний	1.6
33F	0 - 2.0	EP/VP/WHO	0.5

Таблица 8: Сравнение элементного анализатора ТОС TNM и CHNS		
№	ТОС TNM	Элементный анализатор CHNS
1	Диапазон измерений от 0 до 10 000 мг/литр.	<100 ppm
2	Предел обнаружения составляет ≥ 5 ppb.	Предел обнаружения составляет ≥ 300 ppm.
3	Дублирование резюме составляет не более 3,0%.	CV могут достигать 10 % из-за различий в коэффициентах теплопроводности разных соединений.
4	Хемилюминесцентный детектор	Детектор теплопроводности
5	Высокоспецифичный и селективный - Отсутствие влияния ионов металлов или брома на результаты тестов.	Влияние ионов металлов или брома на результаты испытаний

Таблица 9: %-ная адсорбция серотипов (конъюгатов)		
Серотип	Ехрт-98 (AlPO ₄ -125 мкг/0,5 мл)	Ехрт-131 (AlPO ₄ - 187,5 мкг/0,5 мл)
1	100	100
2	38	89
3	100	100
4	54	79
5	73	93
6A	83	56
6B	10	41
7F	28	87
8	50	87
9B	88	80
10A	86	99
11A	0	68
12F	91	95
14	90	92
15B	60	32
18C	65	84
19A	91	94
19F	0	90
22F	0	38
23F	82	91
33F	96	100

Таблица 10: Данные по адсорбции для составов с содержанием 187,5 мкг Алюминия³⁺/ доза 0,5 мл

Comparative Adsorption data for PCV-21 Vaccine (with new conjugates 22F and 11A)																						
Exp. No.	Serotype	1	2	3	4	5	6A	6B	7F	8	9V	10A	11A	12F	14	15B	18C	19A	19F	22F	23F	33F
		Ex-111 PCV-21	Adsorption (%)	99	95	100	76	86	92	65	75	70	77	97	66	97	97	78	65	98	77	60
Ex-124 PCV-21	99	96		100	79	85	93	75	82	86	83	99	57	97	97	64	71	98	78	60	80	99
Ex-125 PCV-21	99	96		100	78	83	91	71	81	81	73	99	59	96	97	75	70	98	76	62	79	99
Ex-111 PCV-21	Ag Content (µg/SHD)	2.15	2.32	2.36	2.23	2.20	2.36	4.07	2.37	1.97	2.51	2.38	2.70	2.22	2.04	2.37	1.78	1.96	1.96	2.40	2.27	2.53
Ex-124 PCV-21		2.48	2.38	2.29	2.27	2.08	2.16	4.98	2.48	2.18	2.15	2.28	2.26	2.49	2.30	2.29	2.03	2.03	2.08	2.20	1.86	2.39
Ex-125 PCV-21		2.36	2.38	2.13	2.12	2.14	1.91	4.68	2.47	2.09	2.15	1.63	2.56	2.48	2.26	2.20	1.97	2.01	2.06	2.30	2.01	2.37

Таблица 11: Данные по адсорбции для составов со 125 мкг Al³⁺/ доза 0,5 мл

PCV21 Formulations	Type 1	Type 2	Type 3	Type 4	Type 5	Type 6A	Type 6B	Type 7F	Type 8	Type 9V	Type 10A	Type 11A	Type 12F	Type 14	Type 15B	Type 18C	Type 19A	Type 19F	Type 22F	Type 23F	Type 33F
PCV21 Formulation 122 Conte	1.86	2.13	2.16	2.23	2.26	2.44	4.69	2.14	2.04	2.40	1.64	2.30	1.60	2.07	2.29	1.98	2.25	1.93	2.37	1.84	2.36
PCV21 Formulation 122 Ads	100	75	100	68	85	51	47	49	42	80	92	63	94	93	19	54	89	53	51	94	99

Таблица 12: Влияние содержания алюминия на адсорбцию серотипов

Серотип	Ехр-98 РСV-21 (с Al ³⁺ 125 мкг/SHD)		Ехр-97 РСV-21 (с Al ³⁺ 187,5 мкг/SHD)	
	Содержание антигена (мкг /SHD)	% Адсорбции	Содержание антигена (мкг /SHD)	% Адсорбции
1	1.94	100	1.96	100
2	2.47	38	2.52	98
3	2.47	100	2.30	100
4	2.33	54	2.26	83
5	2.19	73	1.85	81
6A	2.48	83	2.27	94
6B	4.75	10	3.23	75
7F	2.12	28	1.93	76
8	2.25	50	2.32	85
9B	1.87	88	1.86	92
10A	2.52	86	1.88	100
11A	2.17	0	1.79	39
12F	2.17	91	2.26	96
14	1.98	90	1.88	97
15B	2.37	60	2.47	84
18C	2.00	65	1.90	77
19A	2.10	91	1.71	97
19F	2.22	0	1.80	68
22F	2.77	0	2.51	69
23F	1.93	82	2.06	94
33F	2.24	96	2.17	99

Таблица 13: Подробная информация о составе	
Состав	Подробные сведения
PCV21 Expt. 106	Каждый серотип в дозе 2,2 мкг/сут, за исключением типа 6В в дозе 4,4 мкг/сут.; Все серотипы в виде конъюгатов CRM197, кроме типа 4-DT, типа 15В-ТТ и типа 22f-ТТ; Гель фосфата алюминия в дозе 187,5 мкг/
PCV21 Expt. 119	Каждый серотип в дозе 2,2 мкг/сут, за исключением типа 6В в дозе 4,4 мкг/сут.; Все серотипы в виде конъюгатов CRM197, кроме типа 4-DT, типа 6А, 9V, 19А, 22F-ТТ; Гель фосфата алюминия в дозе 187,5 мкг/
PCV21 Expt. 131	Каждый серотип в дозе 2,2 мкг/сут, за исключением типа 6В в дозе 4,4 мкг/сут.; Все серотипы в виде конъюгатов CRM197, кроме типа 4-DT, типа 3, 6А, 9V, 15В, 19А, 22F-ТТ; гель фосфата алюминия в дозе 187,5 мкг/

Таблица-14: Комбинированные результаты общего IgG и функционального IgG для Expt. 106, Expt.119 и 131 вместе с Prevenar13 на 42-й день.

Description	Assay	1	5	6A	6B	7F	9V	14	19A	19F	23F
S85F1 (SIPL, PCV21, Expt. 106)	Total IgG	6400	11738	8300	10763	6979	12800	30444	3200	15222	15222
	OPA	23	247	95	142	135	52	175	32	41	235
S85F3 (SIPL, PCV21, Expt. 119)	Total IgG	10763	25600	102400	13958	9870	51200	36204	9051	23475	19740
	OPA	27	307	1839	387	181	512	269	431	596	260
S90F4 (SIPL, PCV21, Expt. 131)	Total IgG	11404	12800	91228	28735	18102	64508	51200	8063	20319	22807
	MOPA	32	81	1024	1024	456	2048	575	256	181	203
S85F4 (Prevenar 13)	Total IgG	4150	5382	6979	23475	3490	6400	2075	4150	11738	9870
	OPA	13	67	283	596	108	119	70	211	233	279

Description	Assay	2	3	4	12F	15B	18C	22F	8	10A	11A	33F
S85F1 (SIPL, PCV21, Expt. 106)	Total IgG	4525	2691	16600	4935	3200	25600	223336	3200	2691	30444	18102
	OPA	197	5	953	762	32	160	2896	283	304	320	10
S85F3 (SIPL, PCV21, Expt. 119)	Total IgG	4935	3805	23475	7611	9051	36204	204800	2468	3805	60887	13958
	OPA	218	4	437	269	87	190	1133	309	260	664	19
S90F4 (SIPL, PCV21, Expt. 131)	Total IgG	9051	20319	40637	4525	45614	36204	144815	20319	7184	51200	5702
	MOPA	228	203	912	45	114	456	2048	128	456	512	323
S85F4 (Prevenar 13)	Total IgG		13958	16600			23475					
	OPA		4	342			151					

Таблица 15: Подробная информация о составе	
Таблицы	Подробные сведения
PCV21 Ех-121	Каждый серотип в дозе 2,2 мкг/сут, за исключением типа 6В в дозе 4,4 мкг/сут.; Все серотипы конъюгированы с CRM197; гель фосфата алюминия в дозе 187,5 мкг/
PCV21 Ех-119	Каждый серотип в дозе 2,2 мкг/сут, за исключением типа 6В в дозе 4,4 мкг/сут.; Все серотипы в виде конъюгатов CRM197, кроме типа 4-ДТ, типа 6А-ТТ, 9V-ТТ, 19А-ТТ и типа 22f-ТТ; Гель фосфата алюминия в дозе 187,5 мкг/
PCV21 Ех-131	Каждый серотип в дозе 2,2 мкг/сут, за исключением типа 6В в дозе 4,4 мкг/сут.; Все серотипы в виде конъюгатов CRM197, кроме Type4-ДТ, Type3, 6А, 9V, 15В, 19А, 22F-ТТ; гель фосфата алюминия в дозе 187,5 мкг/

Серотип Номер партии.	Разбавлен ие Сложите	1	5	6A	6B	7F	9B	14	19A	19F	23F
		Пример-121	1:100	6400	3200	1600	3200	3200	3200	25600	12800
Пример-119	1:100	12800	6400	3200	12800	6400	51200	51200	51200	12800	6400
Пример-131	1:100	25600	25600	12800	25600	12800	51200	102400	204800	51200	12800
Превнар 13	1:100	12800	6400	3200	3200	25600	3200	51200	102400	12800	1600
Синфлорикс	1:100	6400	1600	NA	1600	6400	12800	51200	NA	1600	800

NA (Неприменимо) : Серотипы, отсутствующие в составе.

Серотип Номер партии.	Кратность Разбавлен ия	2	3	4	8	10A	11A	12F	15B	18C	22F	33F
		Пример-121	1:100	400	1600	3200	1600	6400	51200	3200	3200	800
Пример-119	1:100	800	3200	6400	3200	12800	12800	6400	6400	3200	51200	6400
Пример-131	1:100	3200	102400	25600	102400	25600	102400	12800	25600	6400	204800	25600
Превнар 13	1:100	NA	6400	12800	NA					200	NA	
Синфлорикс	1:100	NA	NA	102400					51200			

NA (Неприменимо) : Серотипы, отсутствующие в составе.

ИЗМЕНЁННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения стабильной и иммуногенной поливалентной пневмококковой полисахаридно-белковой конъюгированной вакцинной композиции, включающий следующие этапы:

- i. индивидуально конъюгирующий пневмококковый полисахарид, полученный из *Streptococcus pneumoniae* серотипов , выбранных из группы, включающей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6А, 6В, 6С, 6D, 6Е, 6F, 6G, 6Н, 7А, 7В, 7С, 7D, 7F, 8, 9А, 9L, 9F, 9N, 9V, 10А, 10В, 10С, 10D, 10F, 11, 11А, 11В, 11С, 11D, 11Е, 11F, 12А, 12В, 12F, 13, 13FF, 14, 15А, 15В, 15С, 15F, 16, 16А, 16F , 17А, 17F, 18, 18А, 18В, 18С, 18F, 19А, 19В, 19С, 19F, 20, 20А, 20В, 21, 22А, 22F, 23А, 23В, 23F, 24А, 24В, 24F, 25А, 25F, 27, 28А, 28F, 29, 31, 32А, 32F, 33А, 33В, 33С, 33D, 33Е, 33F, 34, 35А, 35В, 35С, 35D, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41А, 41F, 42, 43, 44, 45, 46, 47А, 47F и 48 к белку-носителю в соотношении между 1:0,5 и

1:1,5, и при рН в диапазоне от 8,0 до 10 с получением конъюгатов полисахарид-белок-носитель, где пневмококковые полисахариды конъюгируют с белком-носителем с использованием реагента для цианилирования, и вакцинная композиция содержит по меньшей мере три различных белка-носителя;

- ii. адсорбируют первый набор пневмококковых конъюгатов полисахарид-белок, содержащих полисахариды, полученные из серотипов *Streptococcus pneumoniae*, выбранных из группы, состоящей из 4, 6А, 9V, 15В, 22F и 23F, полученных на стадии (i), на адъюванте из соли алюминия в присутствии соли, гистидина и янтарной кислоты при температуре в диапазоне от 18°С до 30°С, рН в диапазоне от 5,0 до 7,0, на период времени от 18 часов до 30 часов;
- iii. адсорбируют второй набор конъюгатов полисахарид-белок-носитель пневмококка, содержащих полисахариды, полученные из серотипов *S.pneumoniae*, выбранных из группы, включающей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6А, 6В, 6С, 6D, 6Е, 6F, 6G,

6H, 7A, 7B, 7C, 7D, 7F, 8, 9A, 9L, 9F, 9N, 9V, 10A, 10B, 10C, 10D, 10F, 11, 11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F, 12A, 12B, 12F, 13, 13FF, 14, 15A, 15B, 15C, 15F, 16, 16A, 16F, 17A, 17F, 18, 18A, 18B, 18C, 18F, 19A, 19B, 19C, 19F, 20, 20A, 20B, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24A, 24B, 24F, 25A, 25F, 27, 28A, 28F, 29, 31, 32A, 32F, 33A, 33B, 33C, 33D, 33E, 33F, 34, 35A, 35B, 35C, 35D, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41A, 41F, 42, 43, 44, 45, 46, 47A, 47F и 48, полученные на стадии (i) на адъюванте из соли алюминия в присутствии соли, гистидина и янтарной кислоты при температуре в диапазоне от 18°C до 30°C, pH в диапазоне от 5,0 до 7,0, в течение периода времени от 12 часов до 24 часов; и

- iv. смешивают первый набор, полученный на стадии (ii), со вторым набором, полученным на стадии (iii), в присутствии поверхностно-активного вещества в диапазоне от 80 мкг до 150 мкг на дозу 0,5 мл композиции с помощью рабочего колеса с плоскими лопастями Rushton turbine в течение

периода времени от 50 до 80 часов при температуре в диапазоне от 4°C до 12°C;

при этом композиция содержит i) общую концентрацию адъюванта соли алюминия в диапазоне 20–375 мкг Al³⁺ на дозу 0,5 мл композиции, ii) каждый белок-полисахарид-носитель имеет процент адсорбции по меньшей мере 30%, iii) сохраняет желаемые физико-химические и иммуногенные характеристики конъюгата полисахарид-белок-носитель и iv) поверхностно-активное вещество в диапазоне от 80 мкг до 150 мкг на дозу 0,5 мл композиции приводит к минимальному образованию агрегатов и частиц и улучшению текучести вакцинной композиции.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что второй набор конъюгатов полисахарид-белок-носитель пневмококка включает полисахариды *S.pneumoniae*, полученные из серотипов, выбранных из группы, состоящей из:

- 1, 2, 3, 5, 6B, 7F, 8, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F
и 33F;

- 1, 2, 5, 6B, 7F, 8, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F и
33F;

- 1, 2, 3, 5, 6B, 7F, 8, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F,
24F и 33F; или

- 1, 2, 5, 6B, 7F, 8, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 24F
и 33F.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что адъювант соли алюминия на стадии (ii) и стадии (iii) выбирают из группы, включающей гидроксид алюминия, фосфат алюминия, гидроксифосфат алюминия и сульфат алюминия калия и их смеси; и в котором общая концентрация адъюванта соли алюминия находится в диапазоне от 170 мкг до 200 мкг Al^{3+} на дозу 0,5 мл вакцинной композиции.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что, по меньшей мере 3 различных белка-носителя выбраны из группы, состоящей из CRM₁₉₇, дифтерийного анатоксина (DT), столбнячного анатоксина (TT), комплекса внешней мембраны *Neisseria meningitidis*, фрагмента С столбнячного анатоксина, рекомбинантного полноразмерного столбнячного токсина с восемью отдельными аминокислотами. кислотные мутации (8MTT), коклюшный анатоксин, белок D *H. influenzae*, *E. coli* LT, *E. coli* ST, экзотоксин А из *Pseudomonas aeruginosa*, комплекс внешней мембраны с (OMPС), порины, fHbp, Por А, Por В, трансферрин связывающие белки, пневмолизин, пневмококковый поверхностный белок А (PspA), пневмококковый поверхностный адгезин А (PsaA), фрагмент В дифтерийного токсина (DTFB), PhtA, PhtB, PhtE, пневмококковый PhtD, пневмококковые поверхностные белки BVH-3 и BVH-11, *M. catarrhalis* uspA, защитный антиген (РА) *Bacillus anthracis* и детоксицированный отечный фактор (EF) и летальный фактор (LF) *Bacillus anthracis*, овальбумин, гемоцианин улитки улитки (KLH), пептидаза С5а группы А или группы В стрептококка, человеческий сывороточный

альбумин, бычий сывороточный альбумин (BSA), очищенное белковое производное туберкулина (PPD), субъединица В холерного токсина, синтетические пептиды, белки теплового шока, белки коклюша, цитокины, лимфокины, гормоны, факторы роста, искусственные белки, содержащие множество эпитопов CD4+ Т-клеток человека. из различных антигенов патогенного происхождения, таких как N 19, белков, поглощающих железо, токсина А или В из белков *C. difficile* и *S. agalactiae* и любых их эквивалентов, конъюгированных по меньшей мере с одним пневмококковым полисахаридом.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один пневмококковый полисахарид, полученный из серотипов, выбранных из группы, включающей 3, 6А, 9V, 15В, 19А и 22F, конъюгируют со столбнячным анатоксином в качестве белка-носителя, по меньшей мере один пневмококковый полисахарид, полученный из серотипов 4 и 24F, конъюгируют с дифтерийным анатоксином в качестве белка-носителя и по меньшей мере один пневмококковый

полисахарид, полученный из серотипа, выбранного из группы, включающей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6A, 6B, 6C, 6D, 6E, 6F, 6G, 6H, 7A, 7B, 7C, 7D, 7F, 8, 9A, 9L, 9F, 9N, 9V, 10A, 10B, 10C, 10D, 10F, 11, 11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F, 12A, 12B, 12F, 13, 13FF, 14, 15A, 15B, 15C, 15F, 16, 16A, 16F, 17A, 17F, 18, 18A, 18B, 18C, 18F, 19A, 19B, 19C, 19F, 20, 20A, 20B, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24A, 24B, 24F, 25A, 25F, 27, 28A, 28F, 29, 31, 32A, 32F, 33A, 33B, 33C, 33D, 33E, 33F, 34, 35A, 35B, 35C, 35D, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41A, 41F, 42, 43, 44, 45, 46, 47A, 47F и 48 конъюгированы с CRM197 в качестве белка-носителя.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что пневмококковые полисахариды конъюгируют с белком-носителем с использованием реакции цианилирования, а цианилирующий агент выбирают из группы, состоящей из 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторбората (CDAP), 1-циано-4-пирролидинопиридиния тетрафторбората (CPPT), 1-циано-имидазола (1-CI), 1-

цианобензотриазола (1-СВТ), 2-цианопиридазин-3(2Н)он (2-СРО), функциональные производные и их модификации.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что пневмококковые полисахариды конъюгируют с белком-носителем с использованием реакции цианилирования, включающей взаимодействие пневмококковых полисахаридов с 1-циано-4-диметиламинопиридиний тетрафторборатом (CDAP), смешанным в соотношении от 1:0,3 до 1:2 по массе пневмококковых полисахаридов: CDAP и температуру в диапазоне от 22°C до 25°C в течение периода времени от 4 минут до 10 минут и контактирование CDAP-активированного полисахарида с белком-носителем, смешанным в соотношении от 1:0,5 до 1:1,5 по массе CDAP-активированного пневмококка.
- полисахариды: белок-носитель, реакцию проводят при pH в диапазоне 8,0-10 в течение периода времени от 3 часов до 5 часов с последующим гашением глицином для получения конъюгатов полисахарид-белок-носитель.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что перед конъюгацией пневмококковый полисахарид или белок-носитель дериватизируют гетеро- или гомобифункциональным линкером, выбранным из группы, состоящей из гидразина, карбогидразида, хлорида гидразина, дигидразида, ϵ -аминогексановой кислоты, диметилацеталя хлоргексанола, D-глюкуронолактона, цистамина и п-нитрофенилэтиламина, гександиамина, этилендиамина, 1,6-диаминооксигексан или β -пропинамидо, нитрофенилэтиламин, галогеналкилгалогенид, δ -аминокапроновая кислота и их комбинации с использованием реакции карбодиимида, восстановительного аминирования или цианилирования.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что перед стадией конъюгации пневмококковые полисахариды, за исключением полисахарида, полученного из серотипа 6A, подвергают калибровке с использованием одного или нескольких из следующих способов: термической обработки, звуковой обработки, механических средств, химического гидролиза, эндолитической ферментативной

обработки, физического сдвига, гомогенизатора гаулина и обработки ультразвуком; и после калибровки молекулярная масса пневмококковых полисахаридов, за исключением полисахарида, полученного из серотипа 6А, находится в диапазоне от 50 кДа до 600 кДа (SEC-HPLC), предпочтительно в диапазоне от 100 до 200 кДа (SEC-HPLC); и где молекулярная масса пневмококкового полисахарида, полученного из серотипа 6А, находится в диапазоне от 400 до 900 кДа (SEC-HPLC), предпочтительно в диапазоне от 700 до 800 кДа (SEC-HPLC).

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что молекулярная масса размера полисахарид, который получают из серотип 4 находится в диапазоне от 130 до 170 кДа (SEC-HPLC), предпочтительно в диапазоне от 130 до 165 кДа (SEC-HPLC); молекулярная масса размера полисахарид, который получают из серотипа 24F находится в диапазоне от 100 до 200 кДа (SEC-HPLC), предпочтительно в диапазоне от 120 до 170 кДа (SEC-HPLC); молекулярная масса размера полисахарид, который получают из серотипа 6В в

диапазоне от 100 до 200 кДа (SEC-HPLC), предпочтительно в диапазоне от 110 до 175 кДа (SEC-HPLC); молекулярная масса размера полисахарид, который получают из серотипа 9V находится в диапазоне от 120 до 160 кДа (SEC-HPLC), предпочтительно в диапазоне от 130 до 150 кДа (SEC-HPLC); молекулярная масса размера полисахарид, который получают из серотипа 15B находится в диапазоне от 120 до 160 кДа (SEC-HPLC), предпочтительно в диапазоне от 130 до 150 кДа (SEC-HPLC); молекулярная масса размера полисахарид, который получают из серотипа 19A находится в диапазоне от 120 до 160 кДа (SEC-HPLC), предпочтительно в диапазоне от 130 до 150 кДа (SEC-HPLC); молекулярная масса размера полисахарид, который получают из серотипа 22Ф находится в диапазоне от 100 до 150 кДа (SEC-HPLC), предпочтительно в диапазоне от 120 до 140 кДа (SEC-HPLC) или их комбинации.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что соль на стадии (ii) и стадии (iii) выбирают из группы, включающей хлорид магния,

хлорид калия, хлорид натрия и их комбинации, и концентрация соли находится в диапазоне от 2 мг до 10 мг на дозу 0,5 мл вакцинной композиции;

гистидин на стадии (ii) и стадии (iii) находится в диапазоне от 0,1 мг до 10 мг на дозу 0,5 мл вакцинной композиции; янтарная кислота на стадии (ii) и стадии (iii) находится в диапазоне от 0,1 мг до 10 мг на дозу 0,5 мл вакцинной композиции; и

поверхностно-активное вещество на этапе (iv) выбирают из группы, включающей полисорбат, полимергликоль, сложный эфир сорбитана и их комбинации; и концентрация поверхностно-активного вещества находится в диапазоне от 80 мкг до 120 мкг на дозу 0,5 мл вакцинной композиции.

12. Способ по п.1, отличающийся тем, что поверхностно-активным веществом на стадии (iv) является полисорбат 20, а концентрация полисорбата 20 находится в диапазоне от 90 мкг до 120 мкг на дозу 0,5 мл вакцинной композиции.

13. Способ по п.1, отличающийся тем, что адсорбцию на стадии (ii) и стадии (iii) проводят в присутствии консерванта, выбранного из группы, включающей 2-феноксиэтанол, хлорид бензэтония (фемерол), фенол, м-крезол, тиомерсал, формальдегид, метилпарабен, пропилпарабен, бензалкония хлорид, бензиловый спирт, хлорбутанол, п-хлор-м-крезол, бензиловый спирт и их комбинации, и концентрация консерванта равна в диапазоне от 1 мг до 8 мг на дозу 0,5 мл вакцинной композиции.

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что консервантом является 2-феноксиэтанол, имеющий концентрацию в диапазоне от 2,5 мг до 5 мг на дозу 0,5 мл вакцинной композиции.

15. Стабильная и иммуногенная мультивалентная пневмококковая полисахаридно-белковая конъюгированная вакцинная композиция, полученная способом по любому из предшествующих пунктов, имеющая полисахарид, полученный из серотипов *Streptococcus pneumoniae*, выбранных из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6,

6A, 6B, 6C, 6D, 6E, 6F, 6G, 6H, 7A, 7B, 7C, 7D, 7F, 8, 9A, 9L, 9F, 9N, 9V, 10A, 10B, 10C, 10D, 10F, 11, 11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F, 12A, 12B, 12F, 13, 13F, 14, 15A, 15B, 15C, 15F, 16, 16A, 16F, 17A, 17F, 18, 18A, 18B, 18C, 18F, 19A, 19B, 19C, 19F, 20, 20A, 20B, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24A, 24B, 24F, 25A, 25F, 27, 28A, 28F, 29, 31, 32A, 32F, 33A, 33B, 33C, 33D, 33E, 33F, 34, 35A, 35B, 35C, 35D, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41A, 41F, 42, 43, 44, 45, 46, 47A, 47F и 48;

при этом вакцинная композиция содержит по меньшей мере 3 различных белка-носителя, выбранных из группы, состоящей из CRM197, дифтерийного анатоксина (DT), столбнячного анатоксина (TT), комплекса наружной мембраны *Neisseria meningitidis*, фрагмента С столбнячного анатоксина, рекомбинантного полноразмерного столбнячного токсина с восемь отдельных аминокислотных мутаций (8МТТ), коклюшный анатоксин, белок D *H. influenzae*, *E. coli* LT, *E. coli* ST, экзотоксин А из *Pseudomonas aeruginosa*, комплекс внешней мембраны с (ОМРС), порины, fHbp, Por А, Белки, связывающие трансферрин Por В, пневмолизин,

пневмококковый поверхностный белок А (PspA), пневмококковый поверхностный адгезин А (PsaA), фрагмент В дифтерийного токсина (DTFB), PhtA, PhtB, PhtE, пневмококковый PhtD, пневмококковые поверхностные белки BVH-3 и BVH- 11, *M. catarrhalis* uspA, защитный антиген (РА) *Bacillus anthracis* и детоксицированный отечный фактор (EF) и летальный фактор (LF) *Bacillus anthracis*, овальбумин, гемоцианин улитки улитки (KLH), С5а пептидаза группы А или группы В *Streptococcus*, человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин (BSA), очищенное белковое производное туберкулина (PPD), субъединица В холерного токсина, синтетические пептиды, белки теплового шока, белки коклюша, цитокины, лимфокины, гормоны, факторы роста, искусственные белки, содержащие множество CD4+ человека Эпитопы Т-клеток из различных антигенов патогенного происхождения, таких как N 19, белки, поглощающие железо, токсин А или В из белков *C. difficile* и *S. agalactiae* и любые их эквиваленты,

где каждый белок-носитель конъюгирован по меньшей мере с одним пневмококковым полисахаридом; и

необязательно, при этом каждая доза композиции содержит от 1,0 мкг до 10 мкг полисахарида каждого серотипа пневмококка.

16. Вакцинная композиция по п. 15, отличающаяся тем, представляет собой композицию конъюгата 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30-валентного пневмококкового полисахарида-белка-носителя.

17. Вакцинная композиция по п.15, отличающаяся тем, что содержит двадцать различных конъюгатов *Streptococcus pneumoniae* полисахарид-белок-носитель, содержащий полисахарид, полученный из серотипов 1, 2, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F.

18. Вакцинная композиция по п.15, отличающаяся тем, что содержит двадцать один отдельный конъюгат *Streptococcus pneumoniae*

полисахарид-белок-носитель, содержащий полисахарид, полученный из серотипов 1, 2, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F 22F, 23F 24F и 33F.

19. Вакцинная композиция по п.15, отличающаяся тем, что содержит 3 различных белка-носителя, выбранных из CRM₁₉₇, дифтерийный анатоксин (DT) и столбнячный анатоксин (TT), каждый конъюгированный по меньшей мере с одним пневмококковым полисахаридом.

20. Вакцинная композиция по п.19, отличающаяся тем, что пневмококковый полисахарид, конъюгированный с CRM₁₉₇, выбран из группы, включающей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6А, 6В, 6С, 6D, 6Е, 6F, 6G, 6H, 7А, 7В, 7С, 7D, 7F, 8, 9А, 9L, 9F, 9N, 9V, 10А, 10В, 10С, 10D, 10F, 11, 11А, 11В, 11С, 11D, 11Е, 11F, 12А, 12В, 12F, 13, 13FF, 14, 15А, 15В, 15С, 15F, 16, 16А, 16F, 17А, 17F, 18, 18А, 18В, 18С, 18F, 19А, 19В, 19С, 19F, 20, 20А, 20В, 21, 22А, 22F, 23А, 23В, 23F, 24А, 24В, 24F, 25А, 25F, 27, 28А, 28F,

29, 31, 32А, 32F, 33А, 33В, 33С, 33D, 33Е, 33F, 34, 35А, 35В,
35С, 35D, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41А, 41F, 42, 43, 44, 45,
46, 47А, 47F и 48;

пневмококковый полисахарид, конъюгированный с ТТ, выбирают из
группы, включающей 1, 3, 5, 6А, 9V, 15В, 19А и 22F; а
пневмококковый полисахарид, конъюгированный с DT, выбирают из
группы, включающей 3, 4, 15В и 24F.

21. Вакцинная композиция по п.19, отличающаяся тем, что по меньшей
мере один пневмококковый полисахарид, полученный из серотипов,
выбранных из группы, включающей 3, 6А, 9V, 15В, 19А и 22F,
конъюгирован со столбнячным анатоксином в качестве белка-
носителя, по меньшей мере один пневмококковый полисахарид,
полученный из серотипов 4 и 24F, конъюгирован с дифтерийным
анатоксином в качестве белка-носителя и по меньшей мере один
пневмококковый полисахарид, полученный из серотипа, выбранного
из группы, включающей 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6А, 6В, 6С, 6D, 6Е,
6F, 6G, 6Н, 7А, 7В, 7С, 7D, 7F, 8, 9А, 9L, 9F, 9N, 9V, 10А,

10B, 10C, 10D, 10F, 11, 11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F, 12A, 12B, 12F, 13, 13FF, 14, 15A, 15B, 15C, 15F, 16, 16A, 16F, 17A, 17F, 18, 18A, 18B, 18C, 18F, 19A, 19B, 19C, 19F, 20, 20A, 20B, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24A, 24B, 24F, 25A, 25F, 27, 28A, 28F, 29, 31, 32A, 32F, 33A, 33B, 33C, 33D, 33E, 33F, 34, 35A, 35B, 35C, 35D, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41A, 41F, 42, 43, 44, 45, 46, 47A, 47F и 48 конъюгированы с CRM197 в качестве белка-носителя.

22. Вакцинная композиция, по любому из пунктов 15-21, отличающаяся тем, что композиция представляет собой 20-валентную композицию и составлена в виде дозы 0,5 мл, включающей:

- 20 различных полисахаридов *S. pneumoniae*, полученных из серотипов 1, 2, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F;
- фосфат алюминия в качестве адъюванта, содержащего от 170 мкг до 200 мкг Al^{3+} ;
- гистидин в концентрации от 1 мг до 2 мг;

- сукцинат в концентрации от 1 мг до 2 мг;
- полисорбат 20 в концентрации от 80 мкг до 120 мкг;
- хлорид натрия в концентрации от 2 мг до 10 мг; и
- Уровень pH в диапазоне от 5 до 7;

где

i. *S. pneumoniae* полисахарид, полученный из серотипа 4, конъюгируют с DT в качестве белка-носителя;

S. pneumoniae полисахариды, полученные из серотипов 15B, 6A, 9V, 19A и 22F, конъюгируют с TT в качестве белка-носителя; и *S. pneumoniae* полисахариды, полученные из серотипов 1, 2, 5, 6B, 7F, 8, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19F, 23F и 33F, конъюгируют с CRM197 в качестве белка-носителя;

ii. от 2,2 мкг до 3,3 мкг каждого полисахарида *S. pneumoniae*, за исключением серотипа 6B;

iii. от 4,4 мкг до 6,6 мкг полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 6B;

iv. от 10 до 200 мкг CRM197

v. от 5 до 70 мкг столбнячного анатоксина; и

vi. от 1 мкг до 25 мкг дифтерийного анатоксина.

23. Вакцинная композиция, по любому из пунктов 15–21, отличающаяся тем, что представляет собой 21 валентную композицию и составлена в виде дозы 0,5 мл, включающей:

- 21 отдельный полисахарид *S. pneumoniae*, полученный из серотипов 1, 2, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 24F и 33F;
- фосфат алюминия в качестве адъюванта, содержащего от 170 мкг до 200 мкг Al^{3+} ;
- гистидин в концентрации от 1 мг до 2 мг;
- сукцинат в концентрации от 1 мг до 2 мг;
- полисорбат 20 в концентрации от 80 мкг до 120 мкг;
- хлорид натрия в концентрации от 2 мг до 10 мг; и
- Уровень pH в диапазоне от 5 до 7;

где

- i. Полисахариды *S. pneumoniae*, полученные из серотипов 4 и 24F, конъюгированы с DT в качестве белка-носителя; полисахариды *S. pneumoniae*, полученные из серотипов 15B, 6A, 9V, 19A и 22F, конъюгированы с TT в качестве белка-носителя; и полисахариды *S. pneumoniae*, полученные из серотипов 1, 2, 5, 6B, 7F, 8, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19F, 23F и 33F, полученные из серотипов конъюгирован с CRM197 в качестве белка-носителя;
- ii. от 2,2мкг до 3,3 мкг каждого полисахарида *S. pneumoniae*, за исключением серотипа 6B;
- iii. от 4,4 мкг до 6,6 мкг полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 6B;
- iv. от 10 до 200 мкг CRM197
- v. от 5 до 70 мкг столбнячного анатоксина; и
- vi. от 1 мкг до 25 мкг дифтерийного анатоксина.

24. Вакцинная композиция по любому из пунктов 15-23, отличающаяся тем, что полисахарид *S. pneumoniae*, полученный из серотипа 15В, конъюгирован с белком-носителем, выбранным из DT и CRM197.
25. Вакцинная композиция по любому из пунктов 15-23, отличающаяся тем, что содержит по меньшей мере один дополнительный полисахарид *S. pneumoniae*, полученный из серотипов, выбранных из 9А, 9N и 9L.
26. Вакцинная композиция, по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что каждый конъюгат полисахарида-белка-носителя пневмококка имеет молекулярную массу в диапазоне от 1500 кДа до 30000 кДа (в секундах).
27. Вакцинная композиция по п.26, отличающаяся тем, что молекулярная масса конъюгата 6А-ТТ в композиции вакцины находится в диапазоне от 7000 до 10000 кДа (SEC-MALS), предпочтительно в диапазоне от 8000 до 9000 кДа (SEC-MALS);

молекулярная масса конъюгата 4-DT в композиции вакцины находится в диапазоне от 3000 до 10000 кДа (SEC-MALS), предпочтительно в диапазоне от 3000 до 9000 кДа (SEC-MALS);

молекулярная масса конъюгата 24F-DT в композиции вакцины находится в диапазоне от 1500 до 10000 кДа (SEC-MALS), предпочтительно в диапазоне от 2000 до 6000 кДа (SEC-MALS);

молекулярная масса конъюгата 6B-CRM197 в композиции вакцины находится в диапазоне от 4000 до 15000 кДа (SEC-MALS), предпочтительно в диапазоне от 5000 кДа до 12000 кДа (SEC-MALS);

молекулярная масса конъюгата 9V-TT в композиции вакцины находится в диапазоне от 15000 до 30000 кДа (SEC-MALS), предпочтительно в диапазоне от 20000 до 30000 кДа (SEC-MALS);

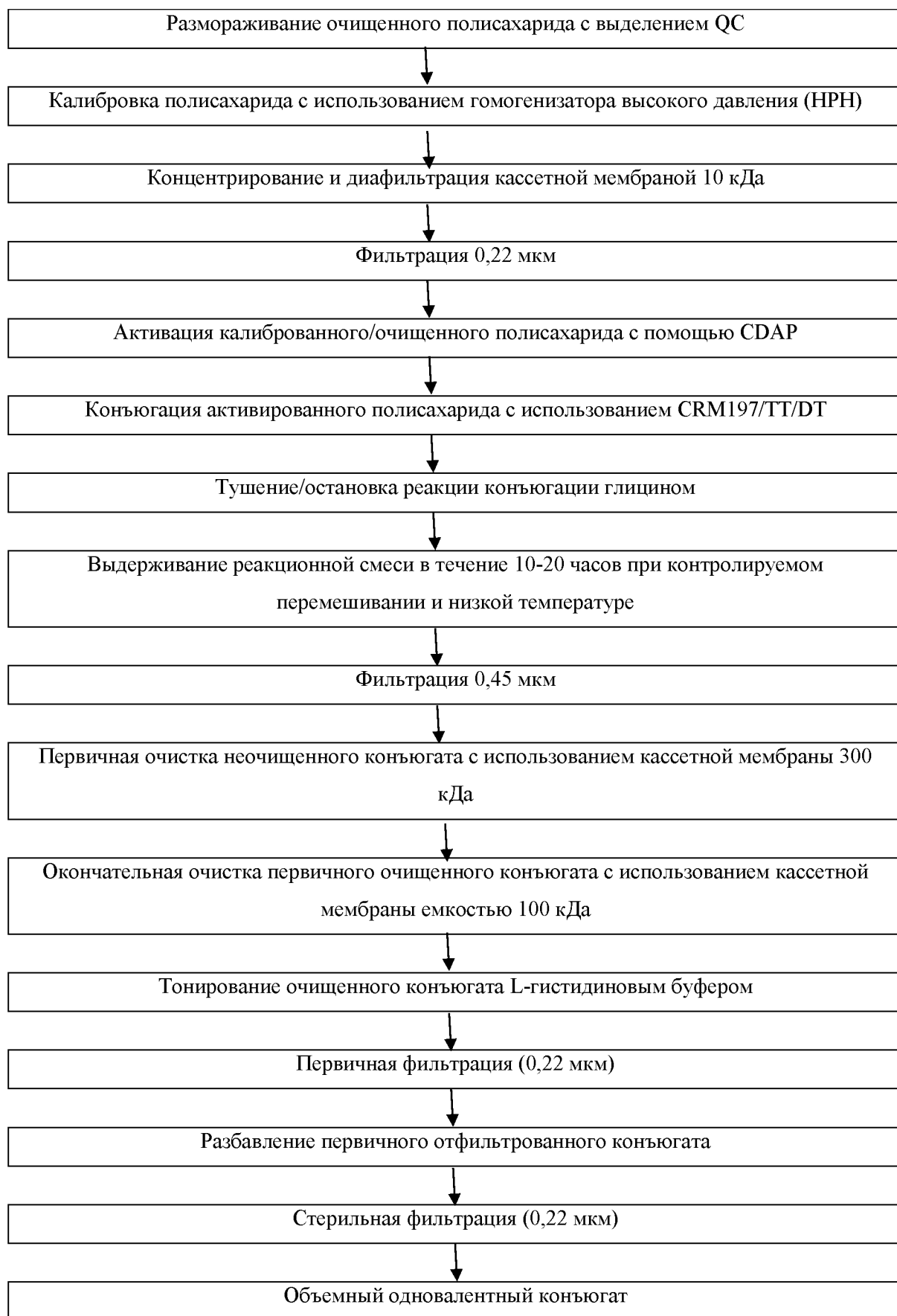
молекулярная масса конъюгата 15B-TT в композиции вакцины находится в диапазоне от 6000 до 10000 кДа (SEC-MALS), предпочтительно в диапазоне от 7500 до 9000 кДа (SEC-MALS);

молекулярная масса конъюгата 19А-ТТ в композиции вакцины находится в диапазоне от 5000 до 8000 кДа (SEC-MALS), предпочтительно в диапазоне от 6000 до 7000 кДа (SEC-MALS); молекулярная масса конъюгата 22F-ТТ в композиции вакцины находится в диапазоне от 9000 до 18000 кДа (SEC-MALS), предпочтительно в диапазоне от 10000 до 17000 кДа (SEC-MALS) или их комбинации.

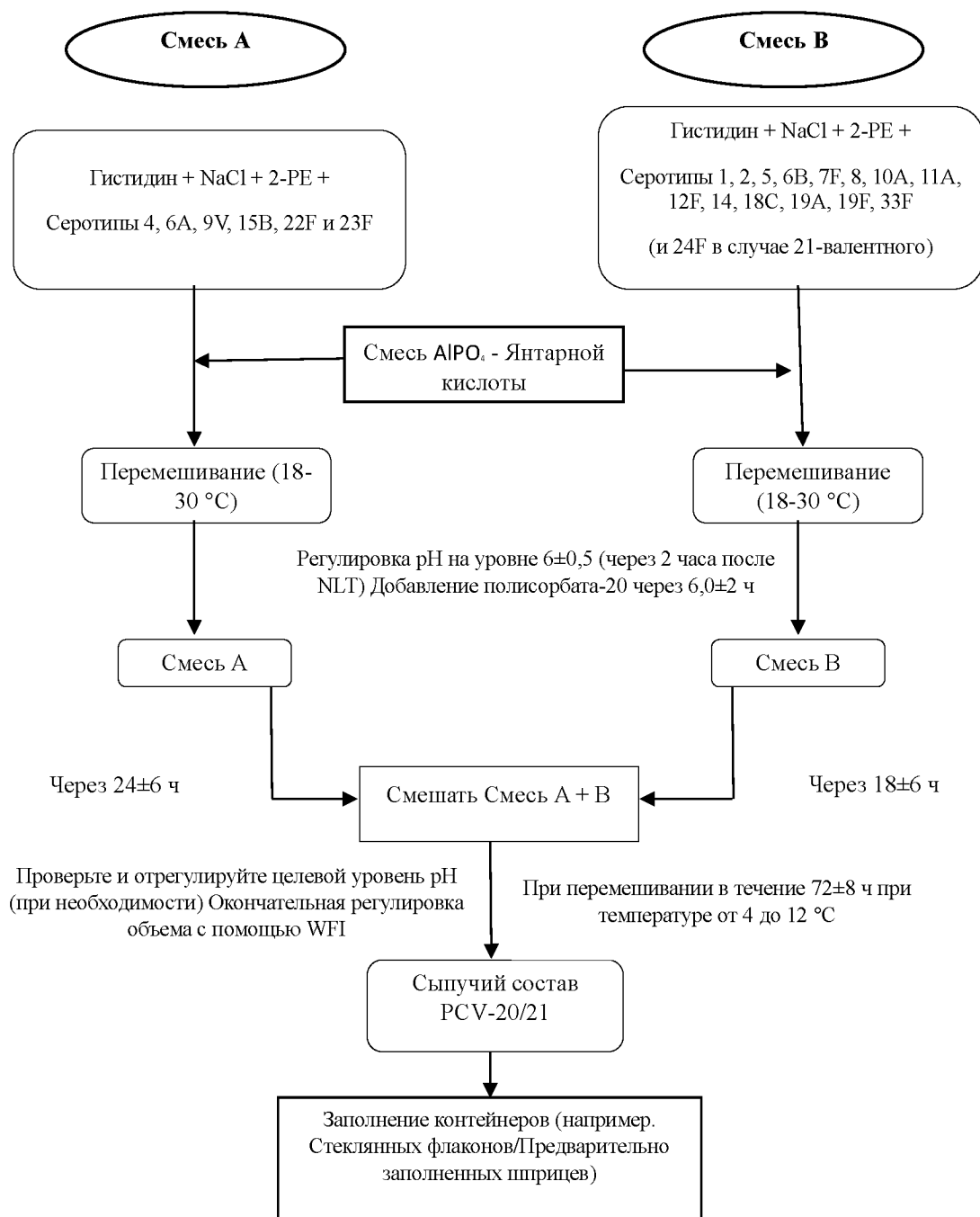
28. Вакцинная композиция, по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что представляет собой многодозовую композицию, содержащую 2-феноксиэтанол в диапазоне от 2,5 мг до 5 мг на дозу 0,5 мл вакцинной композиции.

29. Вакцинная композиция, по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что композиция стабильна при 2-8°C, 25°C и 40°C; и необязательно конъюгаты пневмококкового полисахарида с белком-носителем содержат свободного полисахарида менее 15% и свободного белка менее 10 %.

30. Вакцинная композиция, по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что пневмококковые полисахариды, полученные из серотипов 6А, 9V и 19А, демонстрируют повышенные титры IgG при конъюгации со столбнячным анатоксином (ТТ) в качестве белка-носителя по сравнению с тем, когда пневмококковые полисахариды, полученные из серотипов 6А, 9V и 19А, конъюгированы с CRM197 в качестве белка-носителя; и необязательно, в которой наблюдается по меньшей мере 2-кратное увеличение общего титра IgG и функционального титра IgG при конъюгации серотипов 6А, 9V, 19А и 15В конъюгируются с ТТ в качестве белка-носителя по сравнению с серотипами 6А, 9V, 19А и 15В, конъюгированными с CRM197 в качестве белка-носителя.



Фиг.1



Фиг.2