

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034157**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.13

(51) Int. Cl. *A61K 39/095* (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)

(21) Номер заявки
201591425

(22) Дата подачи заявки
2014.01.29

**(54) ВАКЦИННАЯ АНТИГЕННАЯ МУЛЬТИВАЛЕНТНАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ
КОНСТРУКЦИЯ, ЕЕ ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) MI2013A000142

(32) 2013.01.31

(33) IT

(43) 2015.11.30

(86) PCT/EP2014/051670

(87) WO 2014/118201 2014.08.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БИОСИНЗ С.Р.Л. (IT)

(72) Изобретатель:
Порро Массимо (IT)

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) PORRO M. ET AL.: "A molecular model of artificial glycoprotein with predetermined multiple immunodeterminants for gram-positive and gram-negative encapsulated bacteria", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 23, no. 4, 1 April 1986 (1986-04-01), pages 385-391, XP023682553, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/0161-5890(86)90136-7 [retrieved on 1986-04-01] page 386, page 390, right-hand column, paragraph 3

EP-B1-1501542

(57) Изобретение относится к антигенной мультивалентной молекулярной конструкции, включающей зависимый от Т-хелперов белок-переносчик, ковалентно связанный по меньшей мере с тремя полисахаридными антигенами различной серологической специфичности. Изобретение также относится к вакцине для человека или животного против инфекций, связанных по меньшей мере с одним патогеном, содержащей заявленную конструкцию и фармацевтически приемлемый носитель. Также изобретение относится к применению заявленной конструкции и вакцины против инфекций у человека или животного. Кроме того, изобретение относится к способу получения заявленной конструкции путем конъюгации белка-переносчика с полисахаридными антигенами.

034157

B1

034157

B1

Настоящее изобретение относится к новым конъюгатным антигенам, экспрессирующим встроенные множественные эпитопы, и к поливалентным гликоконъюгатным вакцинам и составам, содержащим те же составляющие. Кроме того, настоящее изобретение рассматривает применение этих вакцин, в особенности для защиты популяции и, в частности, для защиты педиатрической популяции, от легочных и системных инфекций, обусловленных *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *M. tuberculosis*, *S. aureus*, или от кишечных инфекций, обусловленных *S. typhi*, *V. cholerae* и *E. coli*. Настоящее изобретение дополнительно относится к новым гликоконъюгатным вакцинам для защиты от системных и мочеполовых инфекций *C. albicans* и *E. coli* или для защиты от инфекций *M. bovis* в ветеринарной медицине.

Конъюгатные вакцины являются золотым стандартом для определения современных успехов клинической иммунологии. С начала 90-х годов изобретение конъюгатных вакцин для предупреждения *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* существенно улучшило качество жизни педиатрической популяции в западном мире. Такой выдающийся успех, как ожидается в настоящее время, распространится на развивающиеся страны благодаря Расширенной программе вакцинации, финансируемой ВОЗ, и недавно внедренным национальным программам вакцинации в результате обязательства о потенциальном предоставлении рынка (AMC) нескольких стран.

Так, например, вакцины, такие как "Pnevnar", существующие на западных рынках с 2000 г. (ранее в своем 7-валентном составе и в настоящее время в своем 13-валентном составе, при этом оба состава содержат один типоспецифический полисахарид (Ps) *S. pneumoniae*, ковалентно конъюгированный с белком-переносчиком CRM197), в настоящее время рекомендованы WHO всем странам мира для беспрецедентной кампании иммунизации с целью защиты педиатрической популяции от системных инфекций, обусловленных *S. pneumoniae* (IPD или инвазивного пневмококкового заболевания), которые могут в конечном итоге вызывать острый бактериальный менингит. В действительности, эта патология хорошо описана как таковая, которая имеет высокий уровень смертности только потому, что временной интервал лечения снижен до нескольких часов от начала проявления симптомов, поэтому рациональной стратегией, которой следует придерживаться, является профилактика, а не лечение заболевания.

Поскольку количество видов бактерий, значимо репрезентативных в отношении инфекций у человека, обусловленных *S. pneumoniae*, является многочисленным (до 23 видов бактерий из более чем 90 видов, известных в настоящее время), и стратегия использования одного типоспецифического Ps, конъюгированного с белком-переносчиком, требует значительной дозы белка-переносчика в случае, когда вакцинный состав содержит несколько конъюгированных антигенов (например, 13 или 15 или более при включении наиболее эпидемиологически важных серотипов, указанных WHO в качестве устойчивых к лекарственным препаратам, которые включают серотипы бактерий (в соответствии с датской номенклатурой) 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F), возможность снижения количества белка-переносчика в составах всего конъюгата становится приоритетной задачей.

В действительности, необходимо иметь ввиду, что ребенку, подвергающемуся иммунизации конъюгатными вакцинами *H. influenzae* (один типоспецифический конъюгат Ps b типа), *N. meningitidis* (четыре группоспецифических конъюгата группы A,C,W135 и Y Ps) и *S. pneumoniae* (до тринадцати типоспецифических конъюгатов Ps 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F типа) для предупреждения IPD широкого спектра, собираются вводить восемнадцать конъюгированных антигенов, которые имеют соответствующую нагрузку, в восемнадцать раз большую одной типоспецифической дозы белка-переносчика.

Кроме того, эта доза должна быть умножена на три-четыре раза, учитывая факт, что три-четыре дозы вакцины необходимы для обеспечения ребенку полной защиты на протяжении первых 2 лет жизни. С учетом всех обстоятельств общее количество белка-переносчика, вводимого ребенку, легко может достичь доз приблизительно 0,20 мг, по меньшей мере, в случае белка CRM197, при очевидном стрессе иммунной системы, которая, однако, пока, по-видимому, хорошо переносит такое количество белка-переносчика для обеспечения хозяину зависимости от хелперных Т-клеток. Однако постоянно улучшая состав поливалентных вакцин, например вакцину для предупреждения инфекций *S. pneumoniae*, предопределено, что количество Ps серотипа, следовательно, белка-переносчика, повышается со временем.

В этом отношении автор настоящего изобретения обнаружил новую категорию конъюгатных антигенов, которые характеризуются экспрессией нескольких углеводных специфичностей, заранее определенных и встроенных в молекулярную конструкцию, которая использует один моль (или микромоль, или наномоль, или пикомоль, все величины представлены в виде его доли) белка-переносчика для переноса по меньшей мере 1 моль (или микромоль, или наномоль, или пикомоль, все величины представлены в виде его доли) каждого по меньшей мере из трех различных типоспецифических углеводных антигенов, таким образом, конъюгат экспрессирует, по меньшей мере, все четыре различные связанные с антигеном серологические специфичности.

Таким образом, вакцинный состав, охватывающий, как минимум, восемнадцать типоспецифических конъюгатных антигенов, как пример, будет синтезирован только с использованием одной трети (или 33%) от количества необходимого белка-переносчика в доступном в настоящее время составе, связанном

с одним антигеном так, что иммуногенная нагрузка на иммунную систему хозяина будет значительно ниже и, соответственно, безопаснее.

Фактически, в иммунологии хорошо известным является существование феномена, определенного как "зависимые от белка-переносчика иммунная супрессия и иммунная интерференция" вследствие подавления иммунной системы, которая становится перегруженной количеством белкового антигена, вводимого в повторных дозах, например в качестве конъюгатной структуры, особенно, когда значительные серологические титры уже существующих специфических к белку-переносчику антител IgG памяти присутствуют у хозяина, получающего лечение (Dagan R. et al., *Vaccine* 28 (34): 5513-5523, 2010). Значительное снижение дозы белка-переносчика с использованием настоящей молекулярной модели, тем не менее, обеспечивает полную экспрессию зависимости от Т-хелперов, в соответствии с предыдущей экспериментальной работой, указывающей, что иммунный ответ анамнестического IgG млекопитающих на гликоконъюгатный антиген ограничен гибридной связывающей областью белковоуглеводных эпитопов со специфичностью иммунного ответа, ограничивающейся несколькими остатками моносахаридов ковалентно связанной углеводной структуры (Arndt and Porro, *Immunobiology of Proteins and Peptides*, Edited by M.Z. Atassi, Plenum Press, New York and London, Vol. 303, стр. 129-148, 1991).

В указанной выше работе исследуют различные химические стратегии и Ps *S.pneumoniae* с различной MW, конъюгированных с белком-переносчиком CRM197, с целью получения оптимальной конъюгатной структуры при использовании монофункционально активированных углеводных антигенов; также работа исследует наиболее вероятную молекулярную область в конъюгатной конструкции, которая отвечает за зависимость от Т-хелперов у млекопитающих (посредством анализа поликлональных антител изотипа IgG) с помощью молекулярного картирования синтезированных конъюгатов.

US 4711779 в названии того же заявителя раскрывает молекулярную модель тривалентной, экспрессирующей гликопротеин иммуногенности у млекопитающих к грамположительной и грамотрицательной бактерии. Документ ссылался на молекулярную конструкцию, которая использовала олигосахариды низкой MW, ковалентно спаренные с белком-переносчиком с помощью линкерного производного, вводимого в концевую восстанавливающую группу, обнаруженную после химического гидролиза при низкой температуре; этот конъюгат характеризовался максимум тремя специфичностями (к белку CRM197, к Ps 6A типа, Ps группы C); в нем использовались монофункциональные полисахариды; молекулярная конструкция индуцировала серологическую специфичность к белку-переносчику и к каждому из двух переносимых углеводных структур.

US 5306492 также в названии того же заявителя раскрывает олигосахаридные конъюгатные вакцины и усовершенствованный способ получения указанных конъюгатных вакцин на основе олигосахаридов. Способ включал активацию олигосахаридных гаптенных при высокой температуре и в раскрытой концевой восстанавливающей группе перед ковалентным связыванием с белком-переносчиком с помощью линкерной молекулы; типичный конъюгат экспрессировал бивалентную специфичность (к белку CRM197 и к типовой (или групповой)-Ps); в нем использовались монофункциональные олигосахариды; молекулярная конструкция индуцировала серологическую специфичность к белку-переносчику и к одной переносимой углеводной структуре.

EP 1501542 в названии того же заявителя раскрывает новый способ получения с высокой эффективностью HMW полидисперсных поперечно-связанных конъюгатных антигенов на основе полисахаридов; типичный конъюгат экспрессировал специфичность к белку столбнячного токсина и к переносимому типу- (или групповой)-Ps; в нем использовались полифункциональные полисахариды, спаренные с полифункциональными белками-переносчиками; молекулярная конструкция индуцировала серологическую специфичность с белком-переносчиком и с одной переносимой углеводной структурой.

Кроме того, Porro M. et al. в *Medecine Tropicale*, 43: 129-132, 1983 первыми представили химизм активации олигосахарида менингококковой группы B (ранее гидролизованного в контролируемой кислой среде) в его концевой восстанавливающей группе, с помощью аммиака и посредством восстановительного аминирования при низкой температуре (25-37°C); такая монофункциональная аминогруппа, несущая олигосахарид, затем была активирована с помощью бис-сукцинимидилэфира адипиновой кислоты, а затем конъюгирована с аминогруппами остатков лизина белка-переносчика CRM197. Активированный олигосахаридный антиген был монофункциональным в способе конъюгации, и конъюгация происходила без предшествующей активации белка-переносчика CRM197.

Кроме того, Porro M. et al. в *Molecular Immunology*, 22: 907-919 (1985) первыми раскрыли химизм активации олигосахарида пневмококка 6A типа (ранее гидролизованного в контролируемой кислой среде) в его концевой восстанавливающей группе, с помощью аммиака и посредством восстановительного аминирования, в своей работе под названием "Специфические антитела к дифтерийному токсину и капсульному полисахариду пневмококка 6A типа, индуцированные с помощью модели полусинтетического гликоконъюгатного антигена". Такая монофункциональная аминогруппа, несущая олигосахарид, затем была активирована с помощью бис-сукцинимидилэфира адипиновой кислоты и после чего конъюгирована с аминогруппами остатков лизина белка-переносчика CRM197. Активированный олигосахаридный антиген был монофункциональным в способе конъюгации и без предшествующей активации белка-переносчика.

В более поздней работе в *Molecular Immunology*, 23: 385-391, (1986), те же авторы охарактеризовали двухэтапный способ конъюгации с тем же белком-переносчиком CRM197 из двух капсульных олигосахаридов (полученных от грамотрицательной и грамположительной бактерии, соответственно) с помощью химизма активации и химизма конъюгации, раскрытых в предыдущих цитированных работах. Оба активированные олигосахаридные антигены были монофункциональными в способе конъюгации и без предшествующей активации белка-переносчика.

Замечено, что конъюгат, раскрытый в такой работе, включает различные конечные активированные капсульные олигосахариды с низкой MW (а именно, Ps *Streptococcus pneumoniae* 6A типа и Ps группы C *Neisseria meningitidis*). Использование такой конечной активации обеспечивает низкую эффективность связывания, приводя к образованию непропорционального огромного количества белка-переносчика по отношению к максимальному количеству двух переносимых олигосахаридных структур (приблизительно 31,2 мкг CRM197 с 4,8 мкг Ps 6A и 3 мкг Ps C типа, см. стр. 387, левый столбец указанной выше работы 1986 г.).

В конечном итоге, в более поздней работе (Porro M. под редакцией R. Bell и G. Tortigiani (Всемирная организация здравоохранения), стр. 279-306; John Wiley & Sons Publishers, Нью-Йорк, 1987 г., автор настоящего изобретения обобщает указанные выше концепции и технические процедуры для конъюгатных антигенов, состоящих из белка-переносчика и максимум из двух различных углеводных структур.

В развитии указанных выше работ, предпочтительный (не ограничивающий) вариант осуществления основного субъекта молекулярной конструкции настоящего изобретения составлен мультивалентным, предпочтительно тетравалентным, полусинтетическим гликопротеином, который характеризуется встроенными множественными эпитопами и экспрессирует свою зависимую от Т-хелперов иммуногенную специфичность "in vivo" к белку CRM197, а также к трем переносимым типоспецифическим Ps, например Ps *S.pneumoniae*. В качестве примера любая триада из Ps 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F типа *S.pneumoniae*, такая же, как и триада, состоящая из Ps 3, 6A, 7F типа, может быть конъюгирована с белком-переносчиком. В качестве примера выражением тетравалентный обозначается антиген белка-переносчика (действующий сам по себе в качестве антигена, а не только в качестве переносчика) совместно с тремя переносимыми Ps-антигенами.

Таким образом, новая молекулярная конструкция индуцирует серологическую специфичность к белку-переносчику и к каждой из трех переносимых углеводных структур.

Этот полусинтетический тетравалентный антиген может рассматриваться в качестве нового предшественника нового поколения конъюгатных антигенов, экспрессирующих множественные специфичности, для получения вакцин с обязательно более широким спектром защиты против множества бактериальных патогенов, при этом значительно снижается количество белка-переносчика с целью достижения целесообразного улучшения:

А) стоимости получения вакцин;

В) эффективности их получения в отношении улучшения эффективности связывания, которая позволила синтез гликопротеина с тремя (или более) Ps-антигенами (также характеризующегося высокой MW);

С) точности их получения в отношении количественного определения с серологической точки зрения количества ковалентно связанного Ps с помощью анализа ELISA на основе специфического ингибирования, описанного в настоящей заявке, с целью точного определения множественных углеводных антигенов, присутствующих в раскрытой молекулярной конструкции, на основе иммунохимического, а не химического количественного определения из указанной ранее работы (см. Porro et al. 1986), особенно в различных случаях, где высокосходные сходства существуют в пределах видоспецифических углеводных структур;

Д) их безопасности по отношению к более низкому количеству дозы белка, оказывающего влияние на иммунную систему целевой популяции. Фактически, указанная доза белка составляет приблизительно 30% (приблизительно 10 мкг белка в дозе, включающей весь 15-валентный состав при 2 мкг белка/триада/доза) дозы белка, присутствующей в конъюгате CRM197 с двумя Ps из работы Porro et al., 1986. Такое снижение не было бы предсказуемым для специалиста в таком количестве на основе доступной стехиометрии, описанной в работе, где иммунизирующая доза содержала бы по меньшей мере 31,2 мкг CRM197; таким образом, для мультивалентной композиции, содержащей 13 или 15 конъюгированных антигенов, даже в предположении возможности получения в соответствии с предшествующим химизмом, множественной тетравалентной молекулярной моделью, подробно описанной в изобретении, количество белка CRM197 в составе было бы $31,2 \times 15/3 = 156,0$ мкг в противоположность 10 мкг мультивалентного конъюгата настоящего изобретения;

и, соответственно,

Е) общественной пользы таких конъюгатных вакцин.

Настоящее изобретение открывает новые перспективы в области клинической иммунологии и вакцинологии. Фактически, встроенная множественная антигенность раскрытой молекулярной конструкции, специфическая для различных бактериальных антигенов, в действительности соответствует в инновационной области полифармакологии синтезу лекарственного препарата, разработанного a priori для одно-

временного достижения множественных рецепторов фармакологической значимости, таким образом, обеспечивая снижение числа лекарственных препаратов для введения в связанной форме (Besnard J. et al., Nature, 492: 215-220, 2012).

Таким образом, объектом настоящего изобретения является антигенная мультивалентная молекулярная конструкция, включающая зависимый от Т-хелперов белок-переносчик, ковалентно связанный по меньшей мере с тремя углеводными структурами различной серологической специфичности, где каждая углеводная структура содержит по меньшей мере один из повторяющихся основных антигенных эпитопов, включающих по меньшей мере от пяти до двенадцати остатков моносахаридов, предпочтительно по меньшей мере из от восьми до двенадцати остатков моносахаридов согласно оценке посредством определения молекулярной массы и ЯМР-спектроскопии (эквивалентной различным числам основных повторяющихся единиц в зависимости от гомологических или гетерологических последовательностей), причем указанные повторяющиеся основные антигенные эпитопы оценивают по реактивности с типоспецифическими или группоспецифическими поликлональными или моноклональными антителами посредством определения их соответствующих значений MIC_{50} при ингибировании их гомологичной эталонной системы полисахарид-антитело. В соответствии с настоящим изобретением предполагают, что выраженные углеводные структуры включает олигосахариды (природные или синтетические) или полисахариды (такие как капсульные полисахариды).

Зависимый от Т-хелперов белок-переносчик антигенной мультивалентной молекулярной конструкции в соответствии с настоящим изобретением ковалентно связан по меньшей мере с тремя (например, тремя, или четырьмя, или пятью) углеводными структурами различной серологической специфичности до границы реактивности нуклеофильных аминогрупп структурных аминокислот, главным образом, Lys, но также, например, основных свойств Arg и His, присутствующих в структуре белка-переносчика, участвующего в реакции связывания.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления настоящего изобретения зависимый от Т-хелперов белок-переносчик, ковалентно связанный по меньшей мере с тремя различными углеводными структурами различной серологической специфичности, выбирают из природного дифтерийного мутантного белка CRM197 (PRF 1007216A), дифтерийного анатоксина (CAE11230.1 гомологичного токсина), столбнячного анатоксина (ID № AAK72964.2 гомологичного токсина), белка D из *Haemophilus influenzae* (AAA24998.1); пневмококковых поверхностных белков (PspA EMBL CBW33751.1 и PspC EMBL ACF56456.1); пневмококкового токсина (Pneumolysin EMBL ACF56060.1) или их вариантов и производных. В частности, если используется столбнячный анатоксин, то предпочтительно использовать анатоксин, химически дериватизированный спейсером на основе дигидразида адипиновой кислоты (столбнячный анатоксин-ADH).

В соответствии с наиболее предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения белком-переносчиком является природный дифтерийный мутантный белок CRM197.

Такой белок впервые был описан Uchida и Pappenheimer в середине семидесятых годов (Uchida T. et al., J. Biol. Chem. 248, 3838-3844, 1973) и его возможное применение в качестве нового иммуногена против дифтерийного токсина, как находящегося в иммуногенной связи с дифтерийным анатоксином, уже было описано заявителем (Porro M. et al., J. Infect. Dis., 142 (5), 716-724, 1980). С тех пор заявитель использовал CRM197 в качестве идеального зависимого от Т-хелперов белка-переносчика для углеводных антигенов, после того как стали понятны причины особенных иммуногенных характеристик последней группы антигенов у людей в конкретном возрасте, включая созревание иммунной системы (в возрасте от приблизительно 2 месяцев до приблизительно 2 лет).

Белок CRM197 состоит из последовательности из 535 аминокислот, также как дифтерийный токсин (Giannini G. et al., Nucl. Acid Res., 12, 4063-4069, 1984), однако демонстрирует точечную мутацию в аминокислоте в положении 52, где Glu замещает Gly. Его антигенность, как было описано, направлена главным образом на четыре области последовательности при использовании моноклональных антител, а именно AA-последовательности 1-156, 157-193, 293-345 и 465-535 (Zucker D. and Murphy J.R., Mol. Immunol. 21, 785-793, 1984). Белок также характеризуется 39 остатками Lys и одной концевой аминокислотой на все функциональные 40 аминокислот, которые целенаправленно использовали для химических реакций, участвующих в различных стратегиях конъюгации.

Белок-переносчик CRM197 конъюгата настоящего изобретения обычно получают с помощью клонов *C. diphtheriae* C7(β 197)^{tox-}, однако, помимо прочего, его также можно получить с помощью клонов *P. fluorescens*.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления антигенной мультивалентной молекулярной конструкции настоящего изобретения переносимые углеводные структуры выбирают из, но без ограничений, *Ps Streptococcus pneumoniae* (1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 11B, 11C, 11F, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23A, 23F, 33F, 35B тип, из *Ps Neisseria meningitidis* (группа A, C, W135 и Y), *Haemophilus influenzae* (b тип), *Mycobacterium tuberculosis* и *Klebsiella pneumoniae* (т.е. антигены K1-K20), *Salmonella typhi* (Vi тип), *Escherichia Coli* (K1 тип), *Vibrio cholerae* или их комбинации. Предпочтительно такая комбинация *Ps* выполняется из *Ps*, принадлежащих к одному или нескольким патогенам, вызывающим системные и легочные заболевания (*Streptococcus pneumoniae*,

Neisseria meningitidis, *Haemophilus influenza*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae*), кроме Ps, принадлежащего к одному или нескольким патогенам, вызывающим кишечные заболевания (*Salmonella typhi* (Vi тип), *Escherichia Coli* (K1 тип), *Vibrio cholerae*), или Ps, принадлежащего к другим патогенам, например *Candida albicans*, вызывающим системные и мочеполовые инфекции.

На основе указанных выше вариантов осуществления также возможно получить гибридные молекулярные конструкции, в которых белок-переносчик функционирует в качестве зависимого от Т-хелперов вектора для антигенов *S.pneumoniae* и *N.meningitidis* и других антигенов одновременно. Эти гибридные молекулярные конструкции не существуют в природе, поскольку антигенная поверхность грамотрицательных и грамположительных бактерий значительно различается между ними в отношении молекулярной архитектуры бактериальной клетки и биологических механизмов, посредством которых они индуцируют защитный иммунитет в хозяевах-млекопитающих. Например, в то время как защитный иммунитет, индуцированный против капсульного Ps грамотрицательной бактерии *N.meningitidis*, включает комплемент-зависимую бактерицидную активность, таковой, индуцированный грамположительной бактерией *S.pneumoniae*, включает опсонофагоцитарную активность, кроме того, комплемент-зависимую. В случае такой гибридной категории синтетических антигенов специфически индуцируются оба пути (Porro M. et al., *Molecular Immunol.*, 23: 385-391 (1986), что является продемонстрированным фундаментальным отличием от свойств каждого отдельного природного антигена.

Настоящее изобретение предполагает также связь антигенной мультивалентной молекулярной конструкции в соответствии с настоящим изобретением с классом вакцин на основе LPS, обозначенных как ослабленные эндотоксины. Ослабленные эндотоксины представляют собой нетоксические комплексы LPS с SAEP (синтетическими антиэндотоксиновыми пептидами), которые, как было показано, пригодны при введении LPS в качестве иммуногена млекопитающим (Rustici A. et al., *Science*, 259:361-365, 1993).

Такая связь может предполагать отдельное, одновременное или последовательное применение или введение антигенной мультивалентной молекулярной конструкции и ослабленного(ослабленных) эндотоксина(эндотоксинов) грамотрицательных бактерий. Ослабленный эндотоксин можно выбрать из ослабленного эндотоксина B (*N. meningitidis* группы B), ослабленного эндотоксина *E. coli*, *S. typhi*, *V. cholerae*, *S. enteritidis*, *B. pertussis*.

Гибридные молекулы в соответствии с описанной молекулярной конструкцией также могут включать капсульный полисахарид *Mycobacterium tuberculosis*, патоген, который постоянно распространяется в мире и для которого "стерилизующая" вакцина, которая представляет собой вакцину, обладающую защитными свойствами в кровотоке и в легких хозяина, пока не существует. Полисахаридная капсула *M. tuberculosis* состоит главным образом из α -D-(1 $\rightarrow$ 4)-глюканового полимера с α -(1 $\rightarrow$ 6) разветвлениями, который демонстрирует структурные сходства с цитозольным гликогеном. α -Глюкан микобактерий имеет видимую молекулярную массу $1,3 \times 10^7$ и экспрессируется *in vitro* и *in vivo* (Schwebach, J.R., et al. 2002. *Infect. Immun.* 70:2566-2575); также с полисахаридной капсулой возможно связаны сопутствующие антигены, например гликолипиды LAM (липоарабиноманнан) и PIM (фосфатидилинозитолманнозид). Один или все из этих углеводных антигенов, присутствующих в капсульном слое, могут затем быть конъюгированы с белком-переносчиком, например CRM197, как пример, и стать частью молекулярной конструкции настоящего изобретения.

Также возможно предусмотреть антигенную мультивалентную молекулярную конструкцию, в которой переносимыми углеводными структурами являются таковые, принадлежащие к *Mycobacterium bovis*, с целью предупреждения инфекции, влияющей, кроме людей, на крупный рогатый скот, свиней, домашних кошек, непарнокопытных и овец.

Другим случаем, где мультивалентная молекулярная конструкция настоящего изобретения может применяться со значительными преимуществами с точки зрения целесообразной разработки новой вакцины, является таковой, связанный с патогенными свойствами гриба *Candida albicans*. Гриб-комменсал *Candida albicans* вызывает кандидоз слизистых у пациентов с ослабленным иммунитетом, который включает орофарингеальные, эзофагальные, желудочно-кишечные и вагинальные инфекции. Вульвовагинальный кандидоз (VVC) и резистентный к антимикотикам рекуррентный VVC также является частой проблемой у здоровых женщин детородного возраста. Обе эти инфекции слизистых могут влиять на качество жизни, и поиск новой вакцины против кандидозных инфекций был бы новым важным средством для предупреждения кандидоза слизистых и был бы эффективным для многих пациентов. Для предупреждения таких хронических, рекуррентных инфекций эффективной системной и локальной вакцины пока не существует. Антигенный репертуар *C. albicans* содержит, помимо прочего, несколько антигенов глюцидной природы, а именно 1,3- β -глюкан (Bromuro et al., 2010), и L-маннаны, как β -1,2-маннотриоза (Han et al., 2010; Xin et al., 2008). Такие структурно различные углеводные антигены могут быть все конъюгированы с выбранным белком-переносчиком для получения мультивалентной структуры, например структуры, раскрытой в данном документе, которая в некоторой степени может имитировать всю антигенную углеводную структуру патогена, которая в случае с мочеполовыми инфекциями может быть также рационально связанной с углеводными антигенами *E. coli* в конъюгатной форме.

Кроме того, другим случаем, где мультивалентная молекулярная конструкция настоящего изобретения может применяться со значительными преимуществами с точки зрения целесообразной разработки новой вакцины, является таковой, связанной с патогенными свойствами *Staphylococcus aureus*. Этот патоген, описанный O'Riordan и Lee Clin. Microbiol. Rev., 17:218-234, 2004 и ниже синтезированный, является оппортунистическим бактериальным патогеном, ответственным за разнообразный спектр заболеваний человека и животных. *Staphylococcus* также является основной причиной раневых инфекций и имеет инвазивный потенциал индуцировать остеомиелит, эндокардит и бактеремию, приводя к вторичным инфекциям в любой из основных систем органов. Стафилококковые инфекции возникают наиболее часто, когда кожа или слизистые барьеры повреждаются с последующим введением чужеродного тела, и у хозяев с ослабленными иммунными системами. В связи с распространенностью устойчивых к антибиотикам штаммов и недавним появлением клинических изолятов, устойчивых к ванкомицину, контроль *S. aureus* стал постоянно усложняющимся. *Staphylococcus* играет основную роль в нозокомиальных инфекциях и недавно был признан важной причиной внебольничных инфекций. Внебольничные инфекции *S. aureus* часто возникают у здоровых в другом отношении индивидов, у которых отсутствуют ожидаемые факторы риска для инфекций *S. aureus*, например недавняя госпитализация или операция, проживание в лечебном учреждении для хронических больных или использование инъекционных лекарственных препаратов. Из других антигенов бактериальный компонент, который главным образом влияет на патогенез инфекций *S. aureus*, включает капсульный полисахарид, который позволяет стафилококкам прикрепиться к мембранам эукариот, противостоять опсонофагоцитозу, лизировать эукариотические клетки и активировать продукцию каскада иммуномодулирующих молекул хозяина. Были описаны капсулы от по меньшей мере 18 штаммов *S. aureus* и по меньшей мере четыре из них охарактеризованы. Каждая содержит гексозаминуриновые кислоты.

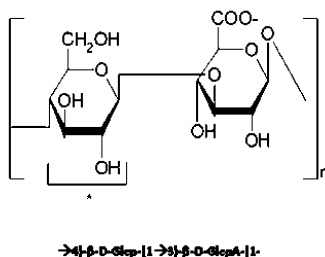
Биохимические характеристики изучали на некоторых очищенных полисахаридах. Штамм М экспрессирует капсулу 1 типа со следующей структурой: $(\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-d-GalNAcA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-d-GalNAcA-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-d-FucNAc-(1}\rightarrow)_n$; остаток таурина связан с помощью амида с каждым четвертым остатком d-GalNAcA. Два другие штамма, D и SA1 мукоид, продуцируют капсулы, которые серологически и биохимически подобны таковой, продуцируемой штаммом М. Капсула 2 серотипа имеет структуру: $(\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-d-GlcNAcA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-d-GlcNAcA-(1-аланил)-(1}\rightarrow)_n$. Капсульные полисахариды 5 и 8 типа (CP5 и CP8 соответственно) структурно очень подобны друг другу и капсуле, создаваемой штаммом Т. 5 тип имеет структуру $(\rightarrow 4)\text{-3-O-Ac-}\beta\text{-d-ManNAcA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-1-FucNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-d-FucNAc-(1}\rightarrow)_n$ и 8 тип имеет структуру $(\rightarrow 3)\text{-4-O-Ac-}\beta\text{-d-ManNAcA-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-1-FucNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-d-FucNAc-(1}\rightarrow)_n$. Полисахариды 5 и 8 типа отличаются только связями между сахарами и в областях О-ацетилирования остатков маннозаминуриновой кислоты, хотя серологически они являются различными.

Совсем недавно (Nanra et al., Human Vaccines and Immunotherapeutics, 9:3, 480-487, 2013) была описана роль капсульного Ps *S. aureus* в профилактике неспецифического лизиса посредством ОРА (опсонофагоцитоза) в присутствии различного количества комплемента, но в отсутствие специфических антител к Ps; в противоположность в присутствии специфических антител к Ps, индуцированных у макаков *rhesus* с помощью конъюгатов CRM197-Ps 5 и 8 типа, лизис посредством ОРА был очень эффективным в отношении *S. aureus*, подчеркивая фундаментальную роль антител к Ps-капсуле для активации иммунологических методов защиты в отношении этого патогена при нахождении в капсульной форме.

Соответственно, также объектом настоящей заявки является инновационная вакцина против *S. aureus*, содержащая молекулярную конструкцию в форме гликоконъюгата, несущую по меньшей мере три различных типоспецифических Ps-антигена *S. aureus* на выбранном белке-переносчике, наиболее предпочтительно CRM197.

В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления переносимыми углеводными структурами антигенов *S. pneumoniae*, выбранными в соответствии со специфическим вариантом осуществления настоящего изобретения, являются полисахариды 3, 6A, 7F типа.

Полисахарид 3 типа соответствует следующей структуре (Reeves R.E. and Goebels W.F., J. Biol. Chem., 139: 511-519, 1941):

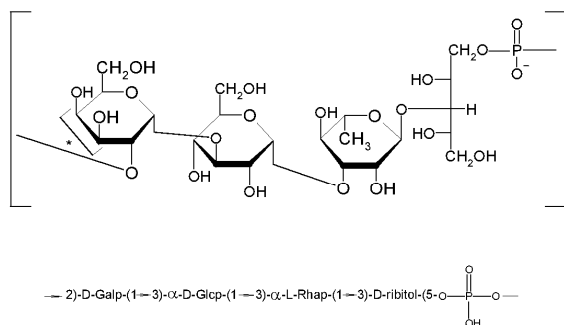
S. Pneumoniae 3 muna

Реакционноспособные группы:

*2,3-гидроксильные группы

Структура характеризуется одной парой -ОН-групп/основной повторяющейся единицы (BRU), которая означает, что существует возможность активации ее в различной степени с помощью способа, раскрытого заявителем в указанном выше патенте EP 1501542.

Полисахарид 6A типа соответствует следующей структуре (Rebers P.A. and Heidelberger M., J. Am. Chem. Soc, 83: 3056-3059, 1961):

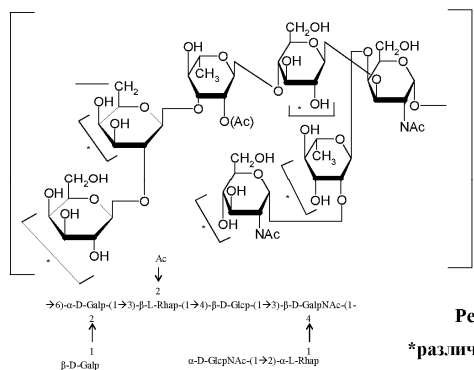
S. Pneumoniae 6A muna

Реакционноспособные группы:

*3,4-гидроксильные группы

Структура характеризуется одной парой -ОН-групп/основной повторяющейся единицы (BRU), которая означает, что существует большая возможность активации ее в различной степени с помощью способа, раскрытого заявителем в EP 1501542.

Полисахарид 7F типа соответствует следующей структуре (Moreau M. et al., Carbohydrate Res., 182(1):79-99, 1988):

S. Pneumoniae 7F muna

Реакционноспособные группы:

*различные vicinalные гидроксильные группы

Структура полностью характеризуется пятью парами -ОН-групп/основной повторяющейся единицы (BRU), которая означает, что существует огромная возможность активации ее в различной степени с помощью способа, раскрытого в EP 1501542.

Другие возможные мультивалентные конъюгаты (в дополнение или в качестве альтернативы к CRM197-3, 6A, 7F), где белок CRM197 (или любой другой иммуногенный белок) выполняет роль зависящего от Т-хелперов переносчика полисахаридов *S. pneumoniae*, выбирают между следующей неограничивающей конфигурацией триад: CRM197-4, 5, 9V; CRM197-1, 6B, 14; CRM197-18C, 19A, 23F; CRM197-6C, 19F, 22F; CRM197-12F, 15B, 33F.

Совершенно очевидно, что может предполагаться любая комбинация (триада, или квартет, или более) из Ps 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F типа *S. pneumoniae*.

В соответствии с другим иллюстративным вариантом осуществления мультивалентные конъюгаты настоящего изобретения могут предполагать следующие триады Ps: CRM197-3, 6A, 7F; CRM197-5, 9V, 19F; CRM197-1, 14, 19A; CRM197-22F, 23F, 33F; CRM197-4, 6B, 18C.

Антигенная мультивалентная молекулярная конструкция настоящего изобретения может находиться в мономерной или полимерной форме.

Настоящее изобретение также направлено на одну или несколько антигенных мультивалентных молекулярных конструкций, как определено выше, в вакцине для предупреждения у человека (предпочтительно ребенка) инфекций, обусловленных по меньшей мере одним патогеном, выбранным из *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *M. tuberculosis*, *S. typhi*, *S. aureus* и *E. coli*. Предпочтительно комбинация антигенной мультивалентной молекулярной конструкции настоящего изобретения будет выполняться путем выбора антигенной мультивалентной молекулярной конструкции, несущей Ps, принадлежащий к одному или нескольким патогенам, вызывающим системные и легочные заболевания (такие как *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae*), кроме Ps, принадлежащего к одному или нескольким патогенам, вызывающим кишечные заболевания (*Salmonella typhi* (Vi тип), *Escherichia Coli* (K1 тип, *V. cholerae*), или Ps, полученного из других патогенов, например гриба-комменсала *Candida albicans*, вызывающих мочеполовые инфекции также совместно с патогеном *E. coli*.

Фактически возможно предусмотреть вакцину против инфекций *Candida albicans* и *Escherichia coli* (предпочтительно для иммунизации женской популяции), содержащую одну или несколько антигенных мультивалентных молекулярных конструкций, в которых переносимыми углеводными структурами являются таковые, принадлежащие к *Candida albicans* and *Escherichia coli*.

Другой аспект настоящего изобретения предполагает вакцину против инфекций *Mycobacterium bovis* для иммунизации крупного рогатого скота, свиней, домашних кошек, непарнокопытных или овец.

Кроме того, настоящее изобретение характеризует вакцину, содержащую одну или несколько молекулярных конструкций различных антигенных специфичностей в соответствии с настоящим изобретением в физиологически допустимом носителе, необязательно, вместе с адъювантом и/или фармацевтически приемлемым наполнителем.

Настоящее изобретение дополнительно направлено на применение поливалентных вакцин широкого спектра, определенных выше, для вакцинации человека или животного против инфекций, обусловленных по меньшей мере одним патогеном, выбранным из *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *M. tuberculosis*, *S. typhi*, *E. coli*, *V. cholerae* и *C. albicans*.

Предпочтительно человек является ребенком.

Кроме того, молекулярная модель, раскрытая в настоящей заявке, является основой для поливалентной вакцины широкого спектра для предупреждения типоспецифических бактериальных инфекций *S. pneumoniae*, содержащих минимум от 7 типов (например, 9, 12, 15, 18, 21, 24) до 25 различных углеводных структур 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F типа.

Также возможно предусмотреть вакцину, предполагающую одну или несколько тетравалентных антигенных молекулярных конструкций (несущих три Ps) настоящего изобретения с одной бивалентной или тривалентной антигенной конструкцией (несущей один или два Ps) или альтернативно с одной пентавалентной антигенной конструкцией (несущей четыре Ps), когда конечное число углеводных структур, которого специалист намеревается достичь, отличается от величины, кратной трем.

При рассмотрении основного конъюгата, несущего 3 моль углеводных структур различной серологической специфичности на 1 моль белка-переносчика, количество белка-переносчика можно снизить до приблизительно 30% такового, присутствующего в любом из доступных в настоящее время конъюгатных составах для детей (например, *Prevna*, который является объектом патента EP 1868645, и *Synflorix*).

Практическим примером вакцины широкого спектра (например, 18-валентной) для предупреждения IPD (инвазивного пневмококкового заболевания), обусловленного *S. pneumoniae*, которая основана на антигенной мультивалентной молекулярной конструкции, раскрытой в настоящей заявке, является совокупность по меньшей мере трех, четырех, пяти или предпочтительно всех следующих мультивалентных конъюгатов, где белок CRM197 (или любой другой иммуногенный белок) выступает в качестве зависящего от Т-хелперов переносчика: CRM197-3, 6A, 7F; CRM197-4, 5, 9V; CRM197-1, 6B, 14; CRM197-18C, 19A, 23F; CRM197-6C, 19F, 22F; CRM197-12F, 15B, 33F.

В таком примере только шесть мультивалентных конъюгатов охватывают широкий спектр выбран-

ных серотипов.

Наоборот, доступным в настоящее время вакцинам потребовалась бы совокупность из восемнадцати конъюгатов.

Совершенно очевидно, что может предполагаться любая комбинация (триада или квартет) из Ps 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F типа *S. pneumoniae*.

Другой предпочтительный пример вакцины широкого спектра (например, 15-валентной) для предупреждения IPD (инвазивного пневмококкового заболевания), обусловленного *S. pneumoniae*, содержит мультивалентные конъюгаты настоящего изобретения, предполагающие следующие триады Ps: CRM197-3, 6A, 7F; CRM197-5, 9V, 19F; CRM197-1, 14, 19A; CRM197-22F, 23F, 33F; CRM197-4, 6B, 18C.

Вводимое количество белка-переносчика в первой вакцине составляет, таким образом, приблизительно 30 вес.% количества белка-переносчика, присутствующего в последней вакцине, при высокозначимом снижении его по меньшей мере на 70 вес.%.

Для сравнения общее количество белка-переносчика, присутствующего в настоящее время в 13-валентной вакцине "Prenaf (состоящей из 13-связанных моновалентных антигенов, объект патента EP 1868645), составляет приблизительно 32 мкг при клинической дозе приблизительно 2 мкг белка/приблизительно 2 мкг каждого конъюгированного Ps-антигена, при всем количестве 31 мкг Ps-антигенов [среднее отношение (R) белок/Ps (вес/вес) = 1,03]; при приблизительно таком же отношении белок/типоспецифический Ps (как показано с помощью раскрытого выше конъюгата CRM197-3, 6A, 7F), общее количество белка-переносчика в проиллюстрированной 18-валентной вакцине составляет только 12 мкг или 37,5% от такового, присутствующего в 13-валентной вакцине "Prenaf (данные о композиции вакцины "Prenaf" и вакцины "Synflorix" получены из имеющихся в открытом доступе документов, выпущенных US-FDA и EMA).

Дополнительные примеры вакцин основаны на антигенной мультивалентной молекулярной конструкции в соответствии с настоящим изобретением для предупреждения группоспецифических бактериальных инфекций *N. meningitidis* (группа A, C, W135, Y).

Такая же стратегия в отношении способа конъюгации и контроля, раскрытая выше, для мультивалентной антигенной молекулярной конструкции *S. pneumoniae* 3, 6A и 7F типа может применяться для других углеводных структур, например таковых *N. meningitidis*.

В этом случае только один мультивалентный антиген, содержащий группоспецифические углеводные структуры (полисахариды A, C, W135 и Y), может составлять вакцину.

Таким образом, другим объектом настоящего изобретения является вакцина широкого спектра для предупреждения инфекции, обусловленной *Neisseria meningitidis*, содержащая антигенную мультивалентную молекулярную конструкцию, содержащую группоспецифические углеводные структуры A, C, W135 и Y.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящее изобретение направлено на вакцину широкого спектра для предупреждения легочной инфекции (предпочтительно преимущественно у детей), обусловленной несколькими патогенами, выбранными из *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *M. tuberculosis*, содержащей несколько антигенных мультивалентных молекулярных конструкций, включающих специфические для указанных патогенов углеводные структуры.

Альтернативно, настоящее изобретение относится к вакцине широкого спектра для предупреждения кишечных инфекций (у ребенка или взрослого человека), обусловленных несколькими патогенами, выбранными из *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* и *Vibrio cholera*.

Другой вариант осуществления предусматривает вакцину широкого спектра для предупреждения системных или мочеполовых инфекций, обусловленных патогенами, например грибом-комменсала *C. albicans* и *Escherichia coli*, причем указанная вакцина содержит несколько антигенных мультивалентных молекулярных конструкций, включающих специфические для указанных патогенов углеводные структуры.

В соответствии с особым вариантом осуществления настоящего изобретения указанные выше вакцины можно вводить отдельно, одновременно или последовательно с антигеном ослабленного эндотоксина грамотрицательных бактерий, указанный ослабленный эндотоксин выбирают из группы, включающей ослабленный эндотоксин *N. meningitidis* группы B, *E. coli*, *S. typhi*, *V. cholerae*, *S. enteritidis*, *B. pertussis*.

При рассмотрении основной конъюгатной конструкции, несущей четыре структурно различных углеводных антигена, количество белка-переносчика можно снизить по меньшей мере до 25% от такового, присутствующего в любой из доступных в настоящее время связанных конъюгатных составов (например, "Menactra" и "Menveo") в соответствии с имеющимися в открытом доступе документами об их композиции и составе (всего 48 и 47 мкг/дозу дифтерийного токсина и CRM197 соответственно), выпущенными US-FDA и EMA.

Иммуногенная доза поливалентных молекулярных конструкций, раскрытых в настоящей заявке, относится к дозе каждой переносимой углеводной структуры. В этом отношении доза может варьировать

от 0,1 до 10 мкг, предпочтительно 1 мкг каждого конъюгированного углеводного антигена у детей грудного и раннего возраста. Эксперты в клинической области помогут найти оптимальную дозу в целевой популяции.

Предпочтительно указанные вакцины дополнительно содержат минеральный, или химически синтезированный, или биологический адъювант. Минеральные, или химически синтезированные, или биологические адъюванты можно использовать с молекулярной конструкцией, раскрытой в настоящей заявке, с целью получения эффекта от любого иммунологического буста, что может быть эффективным при снижении оптимальной иммуногенной дозы у людей, чтобы дополнительно снизить общее количество белка-переносчика. В частности, предпочтительные неорганические адъюванты в составах вакцин в соответствии с настоящим изобретением для применения у людей выбирают из фосфата алюминия ($AlPO_4$) и гидроксида алюминия; предпочтительные органические адъюванты выбирают из адъювантов на основе сквалена, таких как MF59, QF 21, Addavax; предпочтительные бактериальные антигены выбирают из монофосфорил-липидов А, дикориномиколата трегалозы (адъюванта Рибиди).

В вакцинах для применения в области ветеринарии предпочитают адъювант Фройнда (полный или неполный). Доза адъюванта может находиться в диапазоне 0,1-1 мг/доза, предпочтительно составлять 0,5 мг/доза.

Более предпочтительно такая вакцина пригодна для введения подкожным, или внутримышечным, или внутривенным, или чрескожным путем. В целях удобства такое введение можно выполнять с помощью традиционной инъекции шприцем или безыгольными средствами.

Вакцины в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в соответствии с протоколом, который требует однократных или повторных введений, в соответствии с указаниями врача, педиатра или ветеринара.

Настоящее изобретение дополнительно направлено на способ получения антигенной мультивалентной молекулярной конструкции путем конъюгации, в которой используется химизм, раскрытый в патенте EP 1501542, где, по меньшей мере, каждая из трех углеводных структур химически активируется с обеспечением монофункциональности или полифункциональности путем отсоединения водорода от О посредством окислительно-восстановительного аминирования с образованием восстановленных иминовых связей с алкилдиаминовым спейсером, затем дериватизируется до активных сложных эфиров, причем такие углеводные структуры на основе производных сложных эфиров в конечном итоге одновременно связываются или поэтапно связываются с аминокетонами полифункционального белка-переносчика посредством образования амидных связей.

Предпочтительно указанные углеводные структуры химически активируются до своих соответствующих производных с диаминомасляной кислотой и активными сложными эфирами являются сукцинимидовые сложные эфиры.

В качестве примера химическую активацию триады полисахаридов 3, 6A, 7F типа (или другой предпочтительной триады 4, 5, 9V; 1, 6B, 14; 18C, 19A, 23F; 6C, 19F, 22F; 12F, 15B, 33F; 5, 9V, 19F; 1, 14, 19A; 22F, 23F, 33F; 4, 6B, 18C) *S.pneumoniae* с гомологичным Ps-DAB (производное с диаминомасляной кислотой) выполняли в соответствии со способом, раскрытым заявителем в п.1 EP 1501542, и полифункциональным белком-переносчиком был/выступал CRM197.

Альтернативно, способ получения антигенной мультивалентной молекулярной конструкции путем конъюгации использует химизм, раскрытый в п.8 EP 1501542, включающий одновременное связывание или поэтапное связывание аминокетонных полифункционального белка-переносчика по меньшей мере с тремя различными углеводными структурами посредством восстановительного аминирования, образуя восстановленную иминную связь, такие углеводные структуры предварительно активируют с обеспечением монофункциональности или полифункциональности со спейсерами или без спейсеров путем отщепления водорода от О посредством окисления. Как можно предположить, раскрытая выше молекулярная модель может быть дополнительно разработана с целью содержания более трех (например, четырех или пяти) различных углеводных структур на 1 моль (или его доли) белка-переносчика, эта возможность зависит от трех основных параметров молекулярной конструкции:

а) физико-химических свойств белка-переносчика, структура которого должна характеризовать наибольшее возможное количество остатков лизина (источник функциональных групп $-NH_2$);

б) "специально" подобранной полидисперсной MW различных углеводных структур, характеризующихся оптимальной скоростью активации при ограничении отрицательных эффектов явлений стерического несоответствия в реакции связывания, и

в) эффективности используемого химизма для активации различных углеводных структур и для синтеза молекулярной конструкции (предпочтительным химизмом для высокой эффективности оптимальной активации углеводных структур является отщепление водорода от О посредством окисления, со спейсером или без спейсера, в то время как таковой для высокой эффективности реакции конъюгации происходит посредством образования амидной связи с помощью активных сложных эфиров между углеводными структурами и белком-переносчиком; также предпочтительным для реакции конъюгации является химизм, при котором используется образование восстановленной иминной связи между окисленными углеводными структурами посредством отщепления водорода от О со спейсерами или без спейсеров

и белком-переносчиком посредством прямого восстановительного аминирования).

Способ конъюгации, используемый в соответствии с настоящим изобретением, предусматривает многоступенчатую активацию (по меньшей мере трех) полисахаридов (которые, соответственно, могут иметь любую, но однотипно низкую или высокую MW) с целью улучшения эффективности связывания с белком-переносчиком. Этот способ отличается от способа конъюгации предшествующего уровня техники (см. Porro et al. *Molecular Immunology*, Vol. 23, стр. 385-391, 1986), включающего конечную активацию при низкой температуре используемых Ps низкой MW, которая, соответственно, приводила к образованию низкой эффективности связывания, при этом не включая молекулярное поперечное связывание конъюгата.

Другое отличие с предшествующей моделью заключается в стехиометрических свойствах этой предшествующей конструкции (вес./вес. отношение белок/Ps), а также в определении используемого Ps, которое выполняют с помощью иммунохимического анализа в настоящем изобретении в противоположность химическому подходу, используемому в предшествующем уровне техники. Это дало возможность в настоящем изобретении определить количество Ps, имеющих очень подобные структуры при нахождении в такой же молекулярной конструкции.

В конечном итоге, настоящее изобретение направлено на антигенные мультивалентные молекулярные конструкции, которые получают с помощью способов, раскрытых выше.

Настоящее изобретение будет дополнительно иллюстрировано в соответствии с предпочтительными вариантами осуществления с конкретной ссылкой на заключенные фигуры, где

на фиг. 1 представлено сравнение ^1H -ЯМР спектра нативного Ps 3 (серый) и активированного Ps 3-DAB 50% Ох (черный) Ps 3 и производного Ps3-DAB;

на фиг. 2 - ^1H -ЯМР спектры Ps 3-DAB 50% Ох с диффузионными фильтрами. Спектр черного цвета 60% GRAD, спектр серого цвета 2% GRAD определяют отсутствие свободной DAB в производном;

на фиг. 3 - производное Ps 3-DAB, 50% Ох, ^1H -ЯМР спектр и количественное определение активации DAB (2% в молярном отношении);

на фиг. 4 - сравнение ^1H -ЯМР спектра нативного Ps 6A (серый) и активированного производного Ps 6A-DAB 50% Ох (черный);

на фиг. 5 - ^1H -ЯМР спектры Ps 6A-DAB 50% Ох с диффузионными фильтрами. Спектр черного цвета 60% GRAD, спектр серого цвета 2% GRAD определяют отсутствие свободной DAB в производном;

на фиг. 6 - производное Ps 6A-DAB, 50% Ох, ^1H -ЯМР спектр и количественное определение активации DAB (2,3% в молярном отношении);

на фиг. 7 - сравнение ^1H -ЯМР спектра нативного Ps 7F (серый) и активированного производного Ps 7F-DAB 10% Ох (черный). Сигнал при 1,92 ppm, присутствующий только в нативном Ps, имеется вследствие свободного ацетат-иона. Сигнал ОАс при 2,24 ppm сохраняется таким же после активации DAB;

на фиг. 8 - ^1H -ЯМР спектры Ps 7F-DAB 10% Ох с диффузионными фильтрами. Спектр черного цвета 60% GRAD, спектр серого цвета 2% GRAD определяют отсутствие свободной DAB в производном;

на фиг. 9 - производное Ps 7F-DAB, 10% Ох, ^1H -ЯМР спектр и количественное определение активации DAB (1,7% в молярном отношении). Стрелка указывает стандартный сигнал при 5,65 ppm (α -протон глюкозы или галактозы) для количественного определения активации DAB;

на фиг. 10 - GPC-анализ антигенной мультивалентной молекулярной конструкции CRM197-3, 6A, 7F;

на фиг. 11 - GPC-анализ четырех компонентов непосредственно после совместного смешивания (CRM197 + Ps 3-DAB + Ps 6A-DAB + Ps 7F-DAB) для того, чтобы показать отсутствие какого-нибудь значимого количества образования комплекса из отдельных антигенов;

на фиг. 12 - SEC-HPLC анализ мультивалентного антигена после очистки на сефарозе 4B-CL с конкретной ссылкой на профиль белка-переносчика CRM197;

на фиг. 13 - SEC-HPLC анализ CRM197 в качестве нативного белка при смешивании с Ps 3-DAB, Ps 6A-DAB и Ps 7F-DAB;

на фиг. 14 - SDS-PAGE анализ (9% глициновый буфер), показывающий паттерн очищенного мультивалентного антигена CRM197-3, 6A, 7F. Подпись загруженных образцов: 1: CRM197 в качестве стандартного образца; 2: полидисперсная MW очищенного мультивалентного конъюгатного антигена CRM197-3, 6A, 7F; 3: смесь CRM197+Ps 3-DAB+Ps 6A-DAB+Ps 7F-DAB в качестве стандартного образца;

на фиг. 15 - иммуноблоттинг (вестерн-блоттинг) мультивалентного антигена, как качественно обнаружено по типоспецифическому сывороточному поликлональному антителу. Подпись загруженных образцов: 1: мультивалентный конъюгат CRM197-3, 6A, 7F (от линии 2 фиг. 14, выше); 2: смесь CRM197+Ps 3-DAB+Ps 6A-DAB+Ps 7F-DAB в качестве стандартного образца;

на фиг. 16 - сравнение % ингибирования (выраженное в виде MIC_{50}) для CRM197, нативного и в его конъюгированной форме в виде CRM197-Ps 3, 6A, 7F;

на фиг. 17 - сигмоидальная кривая (логарифмическая шкала), относящаяся к графику фиг. 16;

на фиг. 18 - сравнение % ингибирования (выраженное в виде MIC_{50}) Ps 3-DAB и CRM-3, 6A, 7F и нативного Ps 3, показывающее антигенность или антигенную идентичность 1 типа Ps 3 после активации

или конъюгации DAB;

на фиг. 19 - сигмоидальная кривая (логарифмическая шкала), относящаяся к графику фиг. 18;

на фиг. 20 - сравнение % ингибирования (выраженное в виде MIC_{50}) Ps 6A-DAB и CRM-3, 6A, 7F и нативного Ps 6A, показывающее антигенность или антигенную идентичность 1 типа Ps 6A после активации или конъюгации DAB;

на фиг. 21 - сигмоидальная кривая (логарифмическая шкала), относящаяся к графику фиг. 20;

на фиг. 22 - сравнение % ингибирования (выраженное в виде MIC_{50}) Ps 7F-DAB и CRM-3, 6A, 7F и нативного Ps 7F, показывающее антигенность или антигенную идентичность 1 типа Ps 7F после активации или конъюгации DAB;

на фиг. 23 - сигмоидальная кривая (логарифмическая шкала), относящаяся к графику фиг. 22.

В следующем экспериментальном разделе настоящее изобретение будет раскрыто более подробно в соответствии с предпочтительными вариантами осуществления, что должно рассматриваться не ограничивающим с точки зрения объема правовой охраны, а только имеющим иллюстративный характер.

Примеры

Пример 1. Синтез тетравалентного конъюгатного антигена, содержащего полисахариды 3, 6A, 7F S. pneumoniae и белок-переносчик CRM197.

Химическая активация Ps 3, 6A, 7F с гомологичным Ps-DAB (производным с диаминамасляной кислотой).

Этот этап выполняли в соответствии со способом, раскрытым заявителем в п.1 (этап A1) указанного выше патента EP 1501542, включенного в данный документ с помощью ссылки.

Специфический контроль такой активации, а также полученные характеристики активированных Ps-структур описаны в данном документе ниже с помощью 1H -ЯМР спектроскопии.

1H -ЯМР анализ Ps 3-DAB, Ps 6A-DAB, Ps 7F-DAB.

1. Раствор Ps и производных Ps-DAB для ЯМР анализа.

3-4 мг образца полисахарида (Ps) или Ps-DAB растворяют в 0,7 мл D_2O -фосфатном буфере и переносят в 5 мм пробирку для ЯМР. Концентрация фосфатного буфера, приготовленного в D_2O , составляет 100 мМ, pH 7. Натриевую соль триметилсилилпропионовой кислоты (TSPA), $(CH_3)_3Si(CD_2)_2COONa$ используют в качестве внутреннего стандарта. Концентрация TSPA составляет 1 мМ.

2. Оборудование для ЯМР.

Используют высокочастотный ЯМР-спектрометр (600 МГц). Используют 5 мм головку зонда высокого разрешения с z-градиентной петлей, способной к образованию градиентов в z-направлении (параллельно магнитному полю) с силой по меньшей мере $55 \text{ Гс} \cdot \text{см}^{-1}$.

3. Организация экспериментов с ЯМР.

После введения образца внутрь магнита выполняли все стандартные процедуры: настройку и сопоставление, регулировку магнитного поля, калибровку 90-градусного импульса. Для подавления остаточного HDO-сигнала можно использовать предварительное насыщение. Для надлежащего предварительного насыщения центр спектра (01) должен быть установлен точно на HDO-сигнал (приблизительно 4,80 ppm), также желательна надлежащая регулировка магнитного поля.

После настройки параметров для предварительного насыщения проверяют параметры экспериментов диффузионных градиентов. Используют последовательность стимулированных эхо-импульсов с помощью биполярных градиентов с задержкой продольных вихревых токов.

4. Фингерпринтинг DAB-активации.

Группа $-CH_2-NH_2$ при 3,08 ppm.

Группа $-CH_2-NH-CH_2-$ при 3,17 ppm.

5. % DAB-активации в отношении Ps.

Находится в диапазоне значений 0,5-5,0% моль DAB/моль BRU (основной повторяющейся единицы группоспецифического Ps) при оптимальном молярном диапазоне 1,5-3,0%.

Дериватизация Ps 3-DAB, Ps 6A-DAB, Ps 7F-DAB с их гомологичными активными сложными эфирами в качестве производных Ps-DAB-MSE.

Этот этап выполняли в соответствии со способом, раскрытым заявителем в п.8 европейского патента EP 1501542, включенного в данный документ с помощью ссылки.

Одновременное связывание трех активированных (полифункциональных) Ps с (полифункциональным) белком-переносчиком CRM197.

Химический синтез конъюгата, также известный как реакция связывания, выполняли в соответствии со способом, раскрытым заявителем в п.8 европейского патента EP 1501542, включенного в данный документ с помощью ссылки.

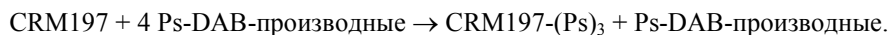
Способ, однако, можно рассматривать в данном документе как инновационный, поскольку три реакции связывания протекают одновременно, а не предшествуя одной реакции связывания во времени (или в виде поэтапного процесса).

Этот способ может быть предпочтительным по отношению к поэтапному связыванию каждого Ps-активированного антигена по простой причине укорочения времени реакции, таким образом, повышая эффективность реакции, при условии, что три активированных Ps находятся в надлежащем состоянии

для сравнительного конкурирования при равновесном состоянии для реакции связывания (это свойство включает сопоставимую среднюю MW, сопоставимый диапазон активации Ps-DAB и сопоставимые стехиометрические отношения среди функциональных групп белка и таковых активированных Ps).

Соответствующая стехиометрия реакции сохраняет принцип общего количества сукцинимидиловых сложных эфиров по отношению к трем активированным Ps-антигенам и аминогруппам доступного белка-переносчика. Стехиометрию предпочтительно определяют так, чтобы учитывать реактивность не более 20% (или 8 из 40) аминогрупп, доступных в структуре CRM197 (как пример) для того, чтобы белок оптимально сохранял свой антигенный репертуар.

На основании экспериментальных данных реакция связывания согласуется со следующей стехиометрией:



В случае всей структуры Ps-DAB-производные относятся к общему количеству равных частей каждой из трех типоспецифических углеводных структур в реакции, приводя к образованию конъюгата, равного в среднем 1 моль белка на общее количество 3 моль типоспецифических переносимых Ps, совместно с соответствующим избытком Ps-DAB-производных, определенным с помощью константы равновесия

$$K_{eq} = \frac{[\text{CRM197} - (\text{DAB} - \text{Ps})_3][\text{Ps} - \text{DAB} - \text{производные}]}{[\text{CRM197}][\text{Ps} - \text{DAB} - \text{производные}]^4} = \frac{[\text{CRM197} - (\text{DAB} - \text{Ps})_3]}{[\text{CRM197}][\text{Ps} - \text{DAB} - \text{производные}]^3}.$$

Химическое уравнение свидетельствует в пользу полного гликозилирования белка-переносчика CRM197. Уравнение также показывает, что реакция конъюгации зависит от концентрации обоих реагентов, нуклеофила (CRM197 посредством эpsilon-NH₂ групп его остатков лизина) и электрофила (карбонильной части эфирных групп Ps-DAB-производного), поэтому она определяется как реакция S_N2.

Приведенные выше рассуждения согласуются с экспериментальным наблюдением того, что наибольшая эффективность реакции гликозилирования, полученная с применением CRM197 в качестве белка-переносчика, была при 100% присутствии белка-переносчика и приблизительно 80% (вес./вес.) в присутствии Ps-DAB-производных в реакционной смеси, при этом оставшаяся их часть представляет небольшое количество несвязанных Ps-производных, необходимых для сдвига к соответствующей стороне равновесия.

В этом типе реакций растворитель влияет на скорость реакции, поскольку растворители могут окружать или могут не окружать нуклеофил, таким образом, препятствуя или не препятствуя его приближению к атому углерода. Полярные апротонные растворители, как правило, являются более подходящими растворителями для этой реакции, чем полярные протонные растворители, поскольку полярные протонные растворители будут сольватироваться с помощью водородной связи растворителя для нуклеофила и, таким образом, препятствовать его атаке на углерод оставшейся группой. Полярный апротонный растворитель с низкой диэлектрической константой или блокированным дипольным концом будут способствовать механизму реакции нуклеофильного замещения S_N2 (предпочтительными примерами являются DMSO, DMF, тетрагидрофуран и др.). Однако в данном случае использование CRM197 в качестве белка-переносчика, полярных протонных растворителей и полярных апротонных растворителей влияет очень хорошо при экспериментальном сравнении vis-a-vis.

Температура реакционной смеси, которая влияет на K_{eq}, является наименьшей совместимой с использованием выбранного растворителя, с учетом того, что реакция является спонтанной (соответственно, являясь экзотермической) и, соответственно, как правило, протекает при температуре от 4 до 20°C.

Кроме химизма конъюгации, подробно представленного выше, можно использовать другие варианты химизма для осуществления синтеза мультивалентного конъюгатного антигена; среди них прямое связывание белка (посредством восстановительного аминирования) с окисленным Ps (путем отщепления водорода от O) или использование гетерологических или химически комплементарных линкеров, которые могут служить для активации Ps и белка.

Также кроме стратегии использования вариантов химизма, ведущих к получению мультивалентных поперечно-связанных конъюгатов белка-Ps посредством полифункциональности белка и Ps-компонентов такового, можно рассмотреть синтез раскрытой в данном документе антигенной мультивалентной молекулярной конструкции, основанный на полисахаридах, активированных в их концевой восстанавливающей группе для последующего связывания с белком-переносчиком, как заявитель показал ранее в другой модели конъюгатного антигена в указанной выше работе Porro M. et al. в Molecular Immunology, 23: 385-391, 1986, включенной в данный документ с помощью ссылки.

В конечном итоге считается, что раскрытая молекулярная конструкция должна быть получена с помощью ферментативного гликозилирования в бактериальных или дрожжевых клетках или других, разработанных инженерным путем, живых клетках, с использованием "специальных" методик рекомбинантной ДНК.

Пример 2. Физико-химический анализ антигенной мультивалентной молекулярной конструкции CRM197-3, 6A, 7F.

GPC-анализ (гель-проникающая хроматография) использовали для выполнения физического анали-

за антигенной мультивалентной молекулярной конструкции примера 1. На фиг. 10 представлен GPC-анализ мультивалентного антигена, полученного в результате реакции конъюгации, перед очисткой. Хроматограмму получают с использованием сефарозы 4B-CL, кондиционированной в 0,14M NaCl, забуференном при pH 7,50. Очистку мультивалентного антигена получают просто путем сбора и объединения элюированных фракций от $K_d = 0,00$ до $K_d = 0,30$.

Методика SEC-MALLS способствует определению дисперсности (D) полученной молекулярной системы, рассчитанной с помощью уравнения $D = M_w/M_n$, где M_w соответствует среднемассовой молекулярной массе и M_n соответствует среднечисловой молекулярной массе, а также позволяет определить некоторые внутренние свойства указанной выше молекулярной системы, поскольку интенсивность углов светорассеяния несет информацию о молярной массе, в то время как угловая зависимость несет информацию о размере макромолекулы. Фактически, если определенная макромолекула массой M состоит из элементов m_i , то основное уравнение светорассеяния показывает, что

$$\langle r_g^2 \rangle = \sum_i r_i^2 m_i / \sum_i m_i = \frac{1}{M} \sum_i r_i^2 m_i$$

где r_i равняется расстоянию элемента m_i от центра массы молекулы общей массой M . В соответствии с этим уравнением определяют связь между массой, размером и измеренными количествами.

В следующей ниже табл. 1 представлена характеристика дисперсной молекулярной массы указанного ранее очищенного мультивалентного антигена (доли в диапазоне $K_d = 0,00-0,30$), анализируемая с помощью SEC-MALLS.

Таблица 1

Верхняя масса (г/моль)	Средняя масса (г/моль)	Нижняя масса (г/моль)
$5,92 \times 10^6$	$9,67 \times 10^6$	$2,69 \times 10^6$
(66,4%)	(26,6%)	(7,0%)

Экспериментальные данные, собранные с помощью SEC-MALLS, показывают, что дисперсная масса антигенной мультивалентной молекулярной конструкции охватывает основную единицу [CRM197-3, 6A, 7F]_{n=1} на приблизительно 7% от дисперсии массы и ее полимеры с составом [CRM197-3, 6A, 7F]_{n=3,6} на приблизительно 27% от дисперсии массы и до [CRM197-3, 6A, 7F]_{n=22} для оставшейся части дисперсии массы, которая представляет основную форму (66%) молекулярной конструкции в отношении продукта реакции. Полимеры основной единицы молекулярной конструкции получают в виде поперечно-связанных молекулярных структур в связи с полифункциональностью Ps-антигенов (приблизительно 2% от DAB-активации в молярном отношении, как показано с помощью ¹H-ЯМР спектроскопии) и полифункциональностью белка-переносчика (40 функциональных аминогрупп/моль, доступных в виде 39 остатков лизина + 1 аминоконцевая аминокислота в структуре, охватывающей все 535 аминокислот последовательности).

На фиг. 11 представлен GPC-анализ, как пример, на таком же геле сефарозы 4B-CL четырех компонентов непосредственно после совместного смешивания (CRM197 + Ps 3-DAB + Ps 6A-DAB + Ps 7F-DAB) для того, чтобы показать отсутствие какого-нибудь значимого количества образования комплекса из отдельных антигенов. Химические методы титрования трех Ps-структур включали анализ урановой кислоты (3 тип), фосфора (6A тип) и гексозаминов (7F тип) в соответствии с требованиями руководства WHO.

В следующей ниже табл. 2 представлена характеристика дисперсных молекулярных масс трех смешанных типоспецифических Ps-DAB-производных, анализированных с помощью SEC-MALLS в качестве стандартного образца.

Таблица 2

Верхняя масса (г/моль)	Средняя масса (г/моль)	Нижняя масса (г/моль)
$2,75 \times 10^5$	$7,27 \times 10^4$	$1,81 \times 10^4$
(17,0%)	(70,5%)	(12,5%)
Необходимо учитывать различную BRU трех Ps-структур, среднее количество $\pm$ SD BRU/Ps равняется 112 ± 62 .		

На фиг. 12 представлен SEC-HPLC анализ мультивалентного антигена после очистки на сефарозе 4B-CL с конкретной ссылкой на профиль белка-переносчика CRM197.

В SEC-HPLC анализе использовали следующие экспериментальные условия:

колонка: Phenomenex, Biosep-SEC-S3000, 300×7,80 мм (V_0 6,92 мин; V_t 12,5 мин);
 размерный диапазон MW: 700 K-5 K;
 элюент: NaCl 0,14M + NaH_2PO_4 0,05M pH 6,80;
 поток: 1 мл/мин;
 детектор: 280 нм (определения белка CRM197).

На фиг. 13 представлен SEC-HPLC анализ CRM197 в качестве нативного белка при смешивании с Ps 3-DAB, Ps 6A-DAB и Ps 7F-DAB. Экспериментальные условия такие же, как описаны выше для анализа, выполненного в фиг. 12.

В свете указанного выше анализируемый конъюгат является полидисперсным, от мономерного до полимерного, молекулярная структура которого содержит основную единицу молекулярной конструкции, описанной в химическом уравнении $[\text{CRM197}-(\text{Ps})_3]$, с рассчитанной средней MW приблизительно $2,7 \times 10^5$ с учетом средней MW (определенной с помощью SEC-MALLS) полифункциональных DAB-активированных Ps-структур (приблизительно $0,7 \times 10^5$) и таковой CRM197 ($5,85 \times 10^4$), насчитывающей 535 аминокислот); соответственно, несколько поперечно-связанных единиц такой основной структуры достигают MW приблизительно 6 млн, как определено с помощью SEC-MALLS. Вес./вес. отношение между белком-переносчиком и каждым из трех типоспецифических Ps составляет приблизительно 1,0; это вес./вес. отношение дает среднее молярное отношение (R) белок/типоспецифический Ps 1,0, соответствующее среднему отношению 1 моль белка/1 моль типоспецифических Ps, как соответствующим образом предложено с помощью химического уравнения.

Соответственно, экспериментально полученная поперечно-связанная молекулярная структура соответствует молекулярной модели, составленной несколькими полимерными единицами основной единицы, состоящей только из 1 моль белка-переносчика, несущего все 3 моль типоспецифических Ps (1 моль для каждого типоспецифического Ps).

Пример 3. Иммунохимический анализ антигенной мультивалентной молекулярной конструкции CRM197-3, 6A, 7F.

Иммунохимический анализ антигенной мультивалентной молекулярной конструкции CRM197-3, 6A, 7F выполняли с помощью SDS-PAGE с использованием аналитических условий в соответствии с Laemmli U.K., *Nature* 227, 680-685 (1970), включенным в данный документ с помощью ссылки.

На фиг. 14 представлен SDS-PAGE анализ (9% глициновый буфер), показывающий паттерн очищенного мультивалентного антигена.

На фиг. 15 представлен иммуноблоттинг (вестерн-блоттинг) мультивалентного антигена, как качественно обнаружено по типоспецифическому сывороточному поликлональному антителу. Используемые аналитические условия были в соответствии с Towbin H. et al., *PNAS* 76: 4350-4354 (1979). Окрашивание серебром проводилось в соответствии с Porro M. et al., *Anal. Biochem.* 118: 301-306 (1981).

Сывороточные поликлональные, Ps-типоспецифические антитела описаны в следующем ниже разделе, посвященном методу ингибиторного ELISA.

Качественное и количественное определение каждого антигенного Ps-компонента на основе ингибиторного ELISA с использованием поликлональных (или моноклональных) антител.

Как хорошо известно, со времени появления иммунохимии, ответвления более широкой области иммунологии в тридцатые годы прошлого столетия, капсульные Ps-антигены состоят из основных повторяющихся единиц (BRU), которые могут быть образованы гомологичными моносахаридами (например, менингококковым Ps), а также более сложными гетерополисахаридными последовательностями, включающими би/три/тетра/пента/экса/эптасахаридные остатки (например, пневмококковый Ps). Средняя последовательность от 5 (предпочтительно 8) до 12 остатков моносахаридов образует основной структурный эпитоп (Ps)-углеводных антигенов, которые придают соответствующую иммунологическую специфичность каждой (Ps)-структуре. Этот размер, типичный для одного эпитопа в системе ABO человека или для последовательности из эпитоп-повторяющихся структур в сложном бактериальном капсульном Ps, согласуется с размером сайта связывания антитела (Kabat E.A., "The nature of an antigenic determinant" *J. Immunol.* 97: 1-11, 1966), и на этом основании было возможным описать реактивность Ps-структуры в отношении конкретной поликлональной популяции антител, посредством ингибирования реакции связывания системы Ps-Ab с использованием различной MW Ps-полидисперсной системы, с целью подтверждения связи, существующей между антигенностью Ps-структуры, содержащей повторяющуюся BRU (таким образом, образуя повторяющиеся эпитопы идентичной антигенности), и специфичностью гомологичной для нее поликлональной иммунной сыворотки (Porro M. et al, *Mol. Immunol.* 22: 907-919, 1985); с помощью сравнения MIC_{50} различной MW полидисперсии определенного Ps, затем стало возможным определить относительную специфичность поликлональной (или моноклональной) популяции антител для такой MW и в конечном итоге рассчитать относительную концентрацию различных Ps-структур для ее количественного определения.

При наличии надежного иммунохимического метода картирования и титрования Ps-структур, присутствующих в такой молекулярной конструкции, существуют практические преимущества определения качественных и количественных характеристик такой модели конъюгатов посредством химических ме-

тодов, особенно в случаях Ps с очень близкими структурными свойствами в отношении их последовательностей, например в случае 6A и 6B типа или 19A и 19F типа или в любом другом случае, где присутствуют структурные сходства среди Ps-антигенов, как в случае типоспецифических Ps, принадлежащих к определенной стандартной группе (например, группа 6 включает типоспецифические Ps 6A, 6B, 6C, 6D; группа 19 включает типоспецифические Ps 19A, 19B, 19C, 19F; группа 23 включает типоспецифические Ps 23A, 23B, 23F). Фактически, тонкая специфичность антитела может легко распознавать такие структурные сходства однозначно и в короткое время в отличие от химических методов.

Недавнее получение моноклональных антител к Ps-антигенам *S. pneumoniae* (Pride M.W. et al., Clin. And Vaccine Immunol. 19(8): 1131-1141, 2012) дополнительно повысила бы потенциал этого мощного метода анализа.

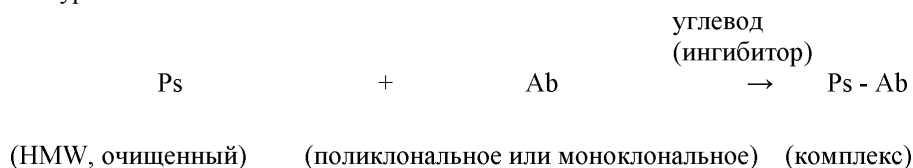
Сравнение химического титрования и иммунохимического титрования углеводных антигенов для исследования их количественной эквивалентности, выполняют с использованием ингибиторного ELISA, путем экспериментально определенного параметра MIC_{50} (минимальной ингибирующей концентрации выбранного углеводного антигена, функционирующего в качестве ингибитора реакции гомологичного стандартного Ps-Ab) с целью определения точности и прецизионности иммунохимического метода по отношению к химическому методу при аналитическом контроле такого рода молекулярной конструкции.

Протокол ингибиторного ELISA.

Следующий ниже протокол ELISA применяли с целью определения значения MIC_{50} каждого из трех Ps-DAB-производных и белка CRM197 или мультивалентного конъюгата CRM197-3, 6A, 7F в качестве ингибиторов реакции гомологичного стандартного типоспецифического полисахарида-антитела (Ps-Ab) или белка-антитела (Prot-Ab).

Стандартное типоспецифическое Ps-производное (Ps-DAB) и мультивалентный конъюгат CRM197-3, 6A, 7F готовили в соответствии с указанным способом, описанным Porro M. в п.8 патента EP 1501542.

Химические методы титрования трех Ps-структур включают анализ уроновой кислоты (3 тип), фосфора (6A тип) и гексозаминов (7F тип) в соответствии с требованиями руководств WHO. Реакция ингибирования основана на принципе для определенной углеводной структуры определенной молекулярной массы ингибирования реакционной системы гомологичных стандартных образцов в соответствии с иммунохимическим уравнением



Таким образом, различие в реактивности между стандартной реакцией и ингибированной реакцией характеризует различную или идентичную специфичность популяции антител для ингибитора. С помощью углеводных структур различной молекулярной массы можно описать сигмоидальную кривую, типичную для этой конкретной реакции и рассчитать MIC_{50} ингибитора для дальнейшего ее сравнения с таковой углеводной структуры стандартного образца и установления параметра антигенности ингибитора (на качественной основе) и специфичности антитела (на количественной основе). Все эти концепции и соответствующее практическое применение описаны в следующих публикациях, включенных в данный документ в виде ссылок:

Berzofsky J.A. and Schechter A.N. Mol. Immunol., 18: 751-763 (1981);

Porro M. et al. Mol. Immunol., 22 : 907-919 (1985).

Метод анализа (иллюстративный).

Основные растворы

Ps-DAB или CRM197 при 1 мг/мл в PBS pH 7,2-7,4

PBS 1× (1 л)

8,0 г NaCl,

0,31 г KH_2PO_4 ,

2,06 г $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$,

0,16 г KCl,

не доводить pH;

TBS-Brij 0,1% (об./об.)

TBS 10× (1 л)

80 г NaCl,

1,6 г KCl,

0,94 г Tris,

14,56 г Tris-HCl,

33 мл Brij-35 (30% об./об.),

стабильный при комнатной температуре в течение 12 месяцев,

развести 50 мл буфера в 500 мл воды MilliQuf,

PBS-Tween 20 0,05% (об./об.),
 козье антитело к мышинному IgG или IgM, меченое пероксидазой,
 фосфатно-цитратный буфер 0,05M pH 5,0,
 H_2O_2 30% (об./об.),
 О-фенилендиамин 1 мг/мл в фосфатно-цитратном буфере 0,05M pH 5,0,
 H_2SO_4 3M.

Процедура.

- Планшеты с покрытием (полистирольный планшет GREINER 65001 SIGMA код M4436) Ps при 20 мкг/мл PBS pH 7,4 37°C 2 ч + на ночь 4°C.
 CRM197 при 10 мкг/мл PBS pH 7,4 на ночь 4°C.
 Покрытие 100 мкл/лунка.
- Промывка 5× TBS-Brij 0,1% (об./об.) (1st промывка 20 с).
- Стандартные поликлональные сыворотки пневмококка из Государственного института сывороток, Копенгаген, Дания (www.ssi.dk) в PBS-Tween 0,05% (об./об.) 2 ч 37°C.
 Конечные разведения (как примеры):
 а) кроличья иммунная сыворотка к группе 3 1:100000 об./об. (положительная ~1,0 OD_{490nm});
 б) кроличья иммунная сыворотка к группе 6A 1:25000 об./об. (положительная ~1,0 OD_{490nm});
 с) кроличья иммунная сыворотка к группе 7F 1:800000 об./об. (положительная ~1,0 OD_{490nm}).
- Неизвестные образцы: неизвестные образцы, интерполированные по отношению к стандартной сигмоидальной кривой регрессии, полученной с помощью стандартной реакции.
- Мышиная сыворотка анти-CRM197, конечное разведение, 1:100000 об./об. (положительная ~1,0 OD_{490nm}).

Таблица 3

Готовый ингибитор/ лунка	Основной раствор ингибитора										Основной раствор антител к Ps
	1 нг/мл	10 нг/мл	100 нг/мл	1 мкг/мл	10 мкг/мл	100 мкг/мл	200 мкг/мл	400 мкг/мл	1 мг/мл	2 мг/мл	
0,5 нг/мл	50 мкл										50 мкл
5 нг/мл		50 мкл									50 мкл
50 нг/мл			50 мкл								50 мкл
0,5 мкг/мл				50 мкл							50 мкл
5 мкг/мл					50 мкл						50 мкл
50 мкг/мл						50 мкл					50 мкл
100 мкг/мл							50 мкл				50 мкл
200 мкг/мл								50 мкл			50 мкл
500 мкг/мл									50 мкл		50 мкл
1 мг/мл										50 мкл	50 мкл

- Время инкубации × время ингибирования: 15 мин.
- Промывка 5× TBS-Brij 0,1% (об./об.) (1-я промывка 20 с).
- Козье антитело к кроличьему или мышинному IgG, меченое пероксидазой, в PBS-Tween 0,05% (об./об.) 2 ч 37°C.
- Промывка 5× TBS-Brij 0,1% (об./об.) (1-я промывка 20 с).
- О-фенилендиамин 1 мг/мл в фосфатно-цитратном буфере 0,05M pH 5,0, H_2O_2 0,03% (об./об.).
- Через 5 мин остановите реакцию с использованием H_2SO_4 3M 50 мкл/лунка.
- Снимите показания при OD 490 нм.
- Интерполируйте неизвестные величины по отношению к стандартной сигмоидальной линии регрессии, полученной с помощью стандартной реакции.

Расчет % ингибирования

$$\frac{\text{Значение ингибированного OD} - \text{значение холостого OD}}{\text{Значение положительного OD} - \text{значение холостого OD}} \times 100 = (\%)$$

Таким образом, ингибированный % = 100 - (%).

Расчет MIC₅₀.

Эту ингибирующую концентрацию определяют при 50% регрессионной функции или соответствующей сигмоидальной кривой. SD способа находится в пределах 20% средней величины.

Результаты.

Результаты MIC_{50} для CRM197, нативного и в его конъюгированной форме в виде CRM197-Ps, 3, 6A, 7F, показывают, что реакция конъюгации не влияет на антигенные свойства CRM197 (антигенная идентичность 1 типа), как можно предположить из анализа графиков, изложенных в фиг. 16-17. Фиг. 17 иллюстрирует нелинейную регрессионную функцию сигмоидальной кривой.

Результаты MIC_{50} для каждой из трех конъюгированных Ps-DAB-производных показаны в графиках, изложенных в фиг. 18-23. Фиг. 19, 21 и 23 иллюстрируют нелинейную регрессионную функцию сигмоидальной кривой.

Пример 4. Определение концентрации углеводного антигена в активированной или мультивалентной конъюгированной форме: сравнение химического титрования с иммунохимическим титрованием.

Иммунохимические титры получают в соответствии со способом, описанным ранее в примере 3, посвященном методу ингибиторного ELISA; химические титры получают в соответствии со способами, описанными ранее в примере 2; иммунохимические титры неизвестных образцов каждого из трех специфических в отношении углеводов антигенов, в активированной или конъюгированной форме, определяют путем интерполяции линейной части кривой стандартного образца, построенной с помощью ингибиторного ELISA с использованием известного количества химически титрованного углеводного антигена. Описанные величины являются средним нескольких независимых анализов. Результаты определения количественной эквивалентности двух методов обобщены в следующей далее табл. 4.

Таблица 4

Химическое определение (мкг/мл)		Иммунохимическое определение* (мкг/мл)
Ps1	1,0	0,9 (-10,0%)
	2,0	2,3 (+13,1%)
	4,0	3,7 (-7,5%)
	*Наименьшее обнаруженное количество Ps1: 0,02 мкг	
Ps3	0,80	0,91 (+13,4%)
	1,60	1,77 (+10,6%)
	3,20	3,31 (+3,4%)
	6,40	6,71 (+4,8%)
	*Наименьшее обнаруженное количество Ps3: 0,01 мкг	
Ps4	2,0	2,25 (+11,2%)
	4,0	3,80 (-5,0%)
	8,0	7,40 (-7,5%)
	*Наименьшее обнаруженное количество Ps4: 0,01 мкг	
Ps5	3,1	3,3 (+6,1%)
	6,25	5,7 (-8,8%)
	12,5	10,8 (-13,6%)
	*Наименьшее обнаруженное количество Ps5: 0,015 мкг	
Ps6A	0,63	0,60 (-4,8%)
	1,72	1,92 (+11,6%)
	3,43	3,63 (+5,8%)
	6,87	7,31 (+6,4%)
	*Наименьшее обнаруженное количество Ps6A: 0,01 мкг	
Ps6B	2,0	2,4 (+16,7%)
	4,0	4,3 (+7,0%)
	8,0	9,2 (+13,0%)
	*Наименьшее обнаруженное количество Ps6B: 0,10 мкг	
Ps7F	1,34	1,43 (+6,7%)
	2,68	3,00 (+11,9%)
	5,37	5,47 (+1,9%)
	10,75	11,07 (+3,0%)
	*Наименьшее обнаруженное количество Ps7F: 0,01 мкг	

Ps9V	3,8	4,2 (+9,6%)
	7,5	6,4 (-15,0%)
	15,0	12,2 (-18,7%)
*Наименьшее обнаруженное количество Ps9V: 0,10 мкг		
Ps14	3,4	3,8 (+10,6%)
	6,8	6,5 (-5,0%)
	13,5	16,2 (+16,5%)
*Наименьшее обнаруженное количество Ps14: 0,10 мкг		
Ps18C	2,5	2,8 (+10,8%)
	5,0	4,7 (-6,0%)
	10,0	8,9 (-11,0%)
*Наименьшее обнаруженное количество Ps18C: 0,02 мкг		
Ps19A	3,8	4,1 (+8,7%)
	7,5	6,5 (-13,4%)
	15,0	13,3 (-11,4%)
*Наименьшее обнаруженное количество Ps19A: 0,02 мкг		
Ps19F	3,8	3,5 (-7,9%)
	7,5	8,3 (+9,4%)
	15,0	17,0 (+11,8%)
*Наименьшее обнаруженное количество Ps19F: 0,02 мкг		
Ps23F	3,8	4,3 (+11,7%)
	7,5	6,6 (-12,0%)
	15,0	13,3 (-11,4%)
*Наименьшее обнаруженное количество Ps23F: 0,02 мкг		
CRM ₁₉₇	1,3	1,2 (-7,7%)
	2,5	2,7 (+11,7%)
	5,0	5,3 (+5,7%)
	10,0	9,6 (-4,0%)
*Наименьшее обнаруженное количество CRM ₁₉₇ : 0,10 мкг		
*Наименьшее иммунохимический обнаруженное количество типоспецифического Ps в условиях анализа.		

Примечание: физико-химическое определение белка CRM197 выполняли с помощью реактива Фолина и/или анализа аминокислот с использованием гидрофобной обращенно-фазовой ВЭЖХ для разделения меченных флуоресцеином аминокислот после гидролиза (метод Pico-Tag от Millipore). SD для физико-химических определений находится в пределах 10% средних значений; SD для иммунохимических определений находится в пределах 20% средних значений, что находится в пределах рассчитанного SD ежедневной вариации метода ELISA и в соответствии с указаниями Европейской фармакопеи 5-го издания (2008) для полисахаридной конъюгатной вакцины против пневмококка.

Таковую же методологию, описанную для качественного и количественного иммунохимического анализа каждой описанной выше молекулярной конструкции, затем используют для характеристики конечного состава поливалентной вакцины, содержащей совокупность нескольких (4, или 5, или 6, или более) молекулярных конструкций, с целью получения полной характеристики иллюстративной 12-валентной или 15-валентной, или 18-валентной вакцины.

Пример 5. Иммунологический анализ в мышинной модели антигенной мультивалентной конструкции, представленной в качестве примера.

Состав вакцин.

Среднее отношение белок/каждый из типоспецифических Ps: $1,1 \pm 0,1$ (вес./вес.).

Доза молекулярной конструкции CRM197-3, 6A, 7F.

Вводимая доза составляет 0,01 и 0,1 мкг каждого типоспецифического конъюгированного Ps, с или без AlPO_4 в качестве адьюванта в фиксированной дозе 0,5 мг/доза (эквивалентно приблизительно 0,120 мг алюминия). Адсорбция мультивалентной молекулярной конструкции к минеральному адьюванту прохо-

дила при ≥ 80 вес.%, как определено с помощью ELISA.

В соответствии со стехиометрией мультивалентного конъюгата общая доза CRM197 составляет приблизительно 0,01 мкг в случае наименьшей дозы каждого типоспецифического конъюгированного Ps и приблизительно 0,1 мкг в случае наибольшей дозы каждого типоспецифического конъюгированного Ps.

Замечено, что доза, вводимая в количестве 0,01 мкг типоспецифического Ps, является наименьшей дозой, иммуногенной у мышей, которая одобрена US-FDA и EMEA для лицензированных в настоящее время пневмококковых конъюгатных вакцин, которые используют фосфат алюминия в качестве адьюванта.

Животные.

Каждая группа животных, содержащая 10 самок мышей Balb/c (альтернативно, CD1) и 6 самок белых новозеландских кроликов.

Путь введения.

i.p. (мышь) и s.c. (кролик)

Схема иммунизации.

0, 2, 4 недели; кровопускание на 0, 2, 4, 6 неделе (мышь).

0, 4 недели; кровопускание на 0, 4, 6 неделе (кролик).

Контрольную иммунизацию обычными Ps-антигенами исключали на основании литературных данных о том, что высокоочищенные Ps-антигены не являются значимо иммуногенными у млекопитающих и не "бустируют" антитела изотипа IgG после их повторных введений.

Титры ELISA.

Титры выражали в виде конечной реакционной смеси, показывающей O.D. $\geq 2,0$ по отношению к контрольным реакционным смесям для каждого типоспецифического Ps и CRM197 или DT (дифтерийного анатоксина), антиген иммуногенно идентичный и в статистической связи с CRM197 (Porro M. et al. J. Infect. Dis., 142 (5), 716-724, 1980). Разведения смеси сывороток выполняли последовательно, двукратно, начиная с разведения 1/200.

МОРА (анализ функциональности).

Для исследования опсонической активности мышинных и кроличьих поликлональных антител, индуцированных после иммунизации мультивалентной молекулярной конструкцией, проводили тест МОРА-4 (4-кратный мультиплексный опсоно-фагоцитарный киллерный тест), рекомендованный руководствами WHO, с использованием клеток HL60. Титры выражали в виде геометрического среднего конечного разведения, показывающего $\geq 50\%$ киллерной активности для каждой смеси сывороток в каждой дозе, относящейся к стандартной кривой, построенной параллельно для расчета значений титров различных образцов с помощью линейной интерполяции.

Иммунологические результаты.

Доза составляет 0,01 мкг Ps/типоспецифический конъюгированный Ps. Геометрическое среднее титров IgG или IgM к типоспецифическим Ps или к CRM197 в мышинной смеси сывороток определяли с помощью ELISA. SD находится в пределах $\pm 25\%$ описанного геометрического среднего. Титры МОРА указывают в скобках, рассчитанные с помощью линейной интерполяции в методике анализа. Если не указано иное, статистическая значимость в пределах титров сывороток (определенная с помощью t-критерия) составляла $<0,01$. Результаты обобщены в следующей ниже табл. 5.

Таблица 5

Ag	Без адьюванта				С адьювантом			
	W0	W2	W4	W6	W0	W2	W4	W6
3	<200	<200	200	800	<200 <200	200 <200	800 <200 (12)	3200 <200 (124)
6A	<200	<200	200	800	<200 <200	200 <200	400 <200 (6)	3200 <200 (135)
7F	<200	<200	200	800	<200 <200	200 <200	1600 200 (26)	6400 400 (248)
CRM197	<200	<200	800	3200	<200 <200	1600 200	12800 800	25600 800

Доза составляет 0,10 мкг/типоспецифический конъюгированный Ps. Геометрическое среднее титров IgG или IgM к типоспецифическим Ps или к DT в мышинной смеси сывороток определяли с помощью ELISA. SD находится в пределах $\pm 25\%$ описанного геометрического среднего. Титры МОРА указывают в скобках, рассчитанные с помощью линейной интерполяции в методике анализа. Результаты обобщены в следующей ниже табл. 6.

Таблица 6

Тип Ps	Без адьюванта				С адьювантом			
	W0	W2	W4	W6	W0	W2	W4	W6
3	<200	200	800	6400	<200 <200	800 200 (16)	6400 400 (254)	25600 800 (1824)
6A	<200	200	800	3200	<200 <200	800 200 (22)	3200 200 (120)	12500 800 (1150)
7F	<200	200	1600	3200	<200 <200	1600 200 (48)	6400 400 (168)	25600 800 (1580)
CRM197	<200	800	3200	12800	<200 <200	6400 200	25600 800	102400 1600

Приведенные выше табл. 5 и 6 показывают анамнестическую индукцию биологически функциональных антител изотипа IgG для каждого из четырех компонентов мультивалентной молекулярной конструкции.

В частности, любую индуцирующую активность в отношении иммунной системы, наблюдаемую для белка-переносчика, параллельно наблюдали для каждого из переносимых Ps-антигенов, что является типичным и хорошо известным поведением зависимых от Т-хелперов антигенов.

Влияние минерального адьюванта является особенно очевидным при таких низких дозах мультивалентного антигена, что является другим свойством зависимых от Т-хелперов антигенов, например белков, которые генерируют более сильный иммунный ответ, пользуясь дополнительным преимуществом от медленного высвобождения антигенов в течение длительного времени в теле хозяина.

Кроме того, влияние гликозилирования на белок-переносчик CRM197, как общеизвестно для гликопротеинов, может быть полезным для повышенной устойчивости этого белка к протеолитическим ферментам, поскольку CRM197 является малоустойчивым белком под воздействием серин-протеаз, широко распространенных у млекопитающих (Porro M. et al., J. Infect. Dis., 142 (5), 716-724, 1980).

Бустер-эффект, полученный в отношении CRM197, также в значительной степени подтверждает факт, что мультивалентная молекулярная структура имеет потенциал функционировать в качестве антигена у людей для предупреждения токсичности вследствие дифтерийного токсина, хорошо описанного свойства CRM197 в животных моделях (см. приведенную выше библиографическую ссылку), в случае чего мультивалентный антиген мог бы также быть использован для иммунизации детей грудного и раннего возраста при замещении вакцины дифтерийного анатоксина (присутствующей в вакцине DTP), для того, чтобы антигенный груз применяемых вакцин для детей мог дополнительно снизиться. В конечном итоге, в соответствии с иммунологическими свойствами зависимых от Т-хелперов антигенов, белок-переносчик или переносимые Ps мультивалентной молекулярной конструкции ни индуцировали, ни бустировали антитела изотипа IgM в значительной степени.

Кролиčky сыворотки использовали специфическим образом для определения четырехкратного повышения титров ELISA антител изотипа IgG к типоспецифическим Ps при параллельном повышении титров ОРА после первой бустер-дозы молекулярной конструкции. Были собраны следующие результаты, выраженные в кратном повышении GMT сывороток, полученном в отношении титров, обнаруженных после иммунологической прайминг-дозы и описанных в следующей ниже табл. 7.

Таблица 7

Тип Ps	Ab IgG к Ps (кратность увеличения)	ОРА к Ps (кратность увеличения)
3	12	40
6A	18	48
7F	28	52

Пример 6. Состав вакцин квадριвалентной менингококковой конъюгатной вакцины (QMCV) и до 25-валентной пневмококковой поливалентной конъюгатной вакцины (PPCV).

Композицию/состав QMCV можно ограничить одной отдельной молекулярной конструкцией, где 1 моль (или его доли) белка-переносчика переносит по меньшей мере 1 моль (или его доли) каждого из четырех различных углеводных структур. Соответствующее взвешенное количество мультивалентного антигена зависит от выбранной MW активированных углеводных структур, которые могут варьировать

от гаптенон LMW, составленных несколькими (8-12) остатками моносахаридов или BRU (основными повторяющимися единицами), охватывающих соответствующие основные эпитопы [Porro M. et al. Molecular Immunology, 22: 907-919 (1985); Porro M. et al. Molecular Immunology, 23: 385-391 (1986)], до углеводных структур HMW, состоящих из 200 BRU или более, содержащих повторяющуюся структуру основного эпитопа.

В таком случае количество белка-переносчика на человеческую дозу можно снизить по меньшей мере до 25% от количества, присутствующего в составе, который использует совокупность отдельных группоспецифических конъюгатов.

Композиция PPCV зависит от ее поливалентного состава. Например, для 15-валентной вакцины, содержащей выбранные 15 серотипов, или для 18-валентной вакцины, содержащей 18 серотипов, как рассматривалось выше, потребуется только от пяти до шести структур мультивалентной антигенной молекулярной конструкции, поскольку в каждой из них 1 моль (или его доли) белка-переносчика будет переносить в среднем 1 моль (или его доли) каждой из трех различных типоспецифических углеводных структур. Соответствующее взвешенное количество мультивалентного антигена зависит от выбранной MW активированных углеводных структур, которые могут варьировать от гаптенон LMW, составленных несколькими BRU (основными повторяющимися единицами), охватывающих соответствующие основные эпитопы (Arndt B. и Porro M. в: Immunobiology of Proteins and Peptides, Edited by M.Z. Atassi, Plenum Press, New York and London, pg. 129-148 (1991)), до углеводных структур HMW, состоящих из 200 BRU или более, содержащих повторяющуюся структуру основного эпитопа. В любом случае количество белка-переносчика на человеческую дозу можно снизить по меньшей мере до 30% от количества, присутствующего в составе, который использует совокупность отдельных типоспецифических конъюгатов.

Новыми серотипами *S. pneumoniae* в соответствии с имеющимися в открытом доступе данными по эпидемиологии и устойчивости к антибиотикам являются 6C, 6D тип (Satzke C. et al., J. Clin. Microbiol., 48(11): 4298, 2010; Yao K.H. et al., Diag. Microbiol. Infect. Dis., 70(3):291-8, 2011); серогруппы 11 (11A, 11B, 11C, 11F тип) (Richter S. et al., Clin. Infect. Dis., 48:23-33, 2009); Calix J.J. et al. J. Bacteriol. 193:5271-5278, 2011); серогруппа 15 (15B тип и 15C тип); 23A тип, серогруппы 33 (33F) 35 (35B тип) (Swanson D., IDSA meeting, Boston, 2011); такой антиген Ps можно было бы, по-видимому, включать в дополнительно обновленный вакцинный состав широкого спектра, полученной в соответствии с молекулярной конструкцией, раскрытой в настоящей заявке.

В то время как лицензированная 13-валентная вакцина покрывает приблизительно 61% IPD у детей младше 5 лет, обновленный состав, содержащий Ps от новых типов *S. pneumoniae*, мог бы поднять барьер по покрытию до 75-80%; фактически было подсчитано, что состав, содержащий 23-валентные типы Ps, присутствующие в настоящее время в полисахаридной вакцине, отвечают за 88% бактериальных пневмококковых заболеваний, которые затем перекрестно реагируют с типами Ps, вызывающими дополнительные 8% заболеваний вследствие *S. pneumoniae* (источник Центр США по контролю заболеваний: www.cdc.gov.). Такой вид обновленных составов очень широкого спектра можно легко получить с использованием молекулярных конструкций настоящего изобретения, которые обеспечивают снижение применение белка-переносчика для переноса такого возрастного числа Ps-антигенов. Например, при рассмотрении дозы 2 мкг CRM197 (подобной композиции Prevnar)/молекулярную конструкцию, шесть молекулярных конструкций, несущих 18 Ps-антигенов, содержали бы общее количество 12 мкг белка, что составляет приблизительно 40% от такового, присутствующего в 13-валентной вакцине Prevnar, состоящей из отдельных конъюгатов каждого типоспецифического Ps-антигена.

Как специально указывалось в иллюстративном составе PPCV, содержащей 15-валентный состав, который включает наиболее распространенные в настоящее время эпидемиологически значимые типоспецифические капсульные полисахариды *S. pneumoniae*, следующие молекулярные конструкции были синтезированы и проанализированы в качестве расширенного примера предпочтительных вариантов осуществления, в соответствии со способами, описанными выше в примере 1, 2 и 3 для молекулярной конструкции CRM197-3, 6A, 7F. Общее количество белка-переносчика, иллюстрируемого в качестве примера в этой иллюстративной 15-валентной вакцине, полученной и составленной в соответствии с процедурами, описанными в настоящей заявке и определенными с помощью стехиометрии полученных в результате пяти молекулярных конструкций, каждая из которых экспрессирует встроенные множественные эпитопы, согласуется со следующей молярной композицией в отношении дозы каждой молекулярной конструкции, содержащей приблизительно 1 мкг белка-переносчика CRM197 (MW = 58,5 К) и приблизительно 1 мкг каждого из трех выбранных DAB-активированных типоспецифических полисахаридных антигена (средняя MW = 70,0 К на основе двух различных критериев анализа, т.е. оценки размера с помощью молекулярной фильтрации на калиброванных фильтровальных мембранах и оценки размера с помощью SEC-MALLS, во всех случаях с использованием стандартных углеводных молекул, например декстранов различной MW).

Таблица 8

Молекулярная конструкция	Среднее отношение (вес/вес) CRM197/Ps	Среднее молярное отношение CRM197/Ps*
CRM197-3, 6A, 7F	CRM197/Ps3 = 1,20	1,44
	CRM197/Ps6A = 0,98	1,17
	CRM197/Ps7F = 1,09	1,30
CRM197-5, 9V, 19F	CRM197/Ps5 = 1,03	1,23
	CRM197/Ps9V = 0,93	1,11
	CRM197/Ps19F = 1,05	1,26
CRM197-1, 14, 19A	CRM197/Ps1 = 1,19	1,42
	CRM197/Ps14 = 0,97	1,16
	CRM197/Ps19A = 0,92	1,10
CRM197-22F, 23F, 33F	CRM197/Ps22F = 1,00	1,20
	CRM197/Ps23F = 1,14	1,37
	CRM197/Ps33F = 1,11	1,32
CRM197-4, 6B, 18C	CRM197/Ps4 = 1,18	1,41
	CRM197/Ps6B = 1,19	1,42
	CRM197/Ps18C = 1,08	1,20

В иллюстративных молекулярных конструкциях среднее отношение (вес./вес.) белок/типоспецифический Ps составляет $1,07 \pm 0,097$ (9,1%), соответствующее среднему отношению (моль/моль): $1,27 \pm 0,12$.

В случае, если выбранным белком-переносчиком является CRM197 и средняя MW каждого Ps-антигена вдвое больше указанной выше величины, или 140 К, молярное отношение белка к каждому Ps повышается до средней величины 2,5; в противоположность, если средняя MW каждого Ps-антигена равняется половине указанной выше величины, или 35 К, молярное отношение белка к каждому Ps снижается до средней величины 0,64.

Концепция расчета и сравнения свойств конъюгатных антигенов на молярной основе является фундаментальной, поскольку иммунная система обрабатывает антигены на молярной основе, как происходит в природе в каждой химической или биохимической реакции преобразования материи, таким образом, в отношении MW антигена. Соответственно, в зависимости от средней MW каждого типоспецифического Ps-антигена и таковой белка-переносчика молярные отношения конъюгатных антигенов подвержены изменению при выборе их антигенных компонентов. Наиболее предпочтительно, чтобы молярные отношения между белком-переносчиком и каждым типоспецифическим Ps-антигеном равнялись или были больше 1,0 для вероятной оптимальной экспрессии Т-хелперной зависимости. Кроме этого молярного параметра, также важно учитывать среднее количество ковалентных связей, расположенных между белком и каждым типоспецифическим углеводным антигеном, которое соответствует скорости активации типоспецифических полисахаридов, поскольку этот гибридный молекулярный участок является участком, как экспериментально предположено, ответственным за приобретенные свойства зависимости от Т-хелперов конъюгатной молекулы (Arndt and Porro, 1991).

В соответствии с приведенными выше рассуждениями другим подходом к изменению стехиометрии, и, таким образом, молярного отношения среди компонентов (белка-переносчика и каждого из переносимых углеводных антигенов) молекулярной конструкции, без изменения средней MW выбранных Ps-антигенов, является подход, который относится к следующей иллюстративной молекулярной модели. Эта модель была разработана благодаря модифицированной стехиометрии в реагентах описанной выше химической реакции, в пользу белкового компонента, который присутствует в реакционной смеси в обратном (вес./вес.) отношении описанной реакционной смеси в приведенном выше химическом уравнении с каждым из Ps-активированных антигенов, для подтверждения гибкости такой химической реакции, которая может также приводить к продукту, демонстрирующему молярное отношение между белком-переносчиком и переносимыми Ps-антигенами в пользу первого компонента. В отношении дозы вакци-

ны, соответствующей стехиометрии этой иллюстративной молекулярной конструкции, она по-прежнему содержит приблизительно 1,0 мкг белка-переносчика CRM197 (MW = 58,5 К), однако только приблизительно 0,3 мкг каждого из трех выбранных DAB-активированных типоспецифических полисахаридных антигена (средняя MW = 70,0 К).

Таблица 9

Молекулярная конструкция	Среднее отношение (вес/вес) CRM197/Ps	Среднее молярное отношение CRM197/Ps
CRM197-3, 6A, 7F	CRM197/Ps3 = 2,85	3,41
	CRM197/Ps6A = 3,15	3,77
	CRM197/Ps7F = 2,70	3,22
CRM197-5, 9V, 19F	CRM197/Ps5 = 3,20	3,82
	CRM197/Ps9V = 2,90	3,47
	CRM197/Ps19F = 3,47	4,15
CRM197-1, 14, 19A	CRM197/Ps1 = 2,87	3,43
	CRM197/Ps14 = 3,15	3,77
	CRM197/Ps19A = 3,45	4,13
CRM197-22F, 23F, 33F	CRM197/Ps22F = 3,25	3,89
	CRM197/Ps23F = 2,80	3,35
	CRM197/Ps33F = 3,05	3,64
CRM197-4, 6B, 18C	CRM197/Ps4 = 2,90	3,47
	CRM197/Ps6B = 3,41	4,07
	CRM197/Ps18C = 3,10	3,71

В иллюстративных молекулярных конструкциях среднее отношение (вес./вес.) белок/типоспецифический Ps составляет $3,08 \pm 0,24$ (7,8%), соответствующее среднему отношению (моль/моль) $3,69 \pm 0,29$.

Приведенные выше примеры доказывают, что различные стехиометрии синтеза, рассматриваемые по количеству реагентов, участвующих в описанном химическом равновесии в приведенном выше химическом уравнении, могут приводить к молекулярной конструкции различной стехиометрии, где количество зависящего от Т-хелперов белка-переносчика в молекулярной конструкции можно оптимально выбирать в соответствии с оптимальной экспрессией иммуногенности такой молекулярной конструкции в различных возрастных группах популяции людей. В обоих иллюстрированных выше 15-валентных составах, содержащих пять молекулярных конструкций, каждая из которых содержит типоспецифические Ps, общее количество белка-переносчика CRM197 составляет приблизительно 5 мкг, в то время как конъюгированные типоспецифические Ps находятся в количестве приблизительно 1,0 и приблизительно 0,3 мкг соответственно. Таким образом, в дозе CRM197, эквивалентной таковой, присутствующей в вакцине Prevnar для каждого типоспецифического Ps, конъюгированного приблизительно по 2 мкг/доза, общее количество иллюстрированного в данном документе CRM197 в 15-валентных составах составило бы 10 мкг или приблизительно 33% от общего количества, присутствующего в дозе 13-валентной вакцины Prevnar. Даже в предположении 23-валентного состава конъюгатной вакцины, в которой использовали бы молекулярную модель, описанную в данном документе, при сопоставимом количестве белка/доза общее количество белка-переносчика было бы значительно ниже (приблизительно 50%) от количества, присутствующего в описанных в настоящее время 13-валентной или 15-валентной вакцинах, составленных совокупностью разделенных отдельных типоспецифических конъюгатных антигенов.

Соответственно, целью описанных выше вариантов осуществления является подтверждение того факта, что раскрытую мультивалентную антигенную молекулярную конструкцию с встроенными эпитопами можно синтезировать в широком диапазоне стехиометрических параметров для того, чтобы затем определить надлежащим образом в млекопитающих хозяевах оптимальную дозу конструкции даже при учете различных возрастных групп, подлежащих иммунизации вакцинным составом широкого спектра. В данном документе представляется важным напомнить, что прошедшие клинические исследования показали, что у взрослых и детей иммунная система в отношении иммуногенности не разграничивает между различными размерами конъюгированных Ps с белком-переносчиком CRM197, а также между много-

точечными (поперечно-связанными) или однотоочечными (не связанными поперечно) моделями конъюгатов (Eby R. et al., в: Modern Approaches to New Vaccines, CSH Ed., 119-123, 1994) даже, несмотря на то, что такие исследования отсутствуют в открытом доступе для детей в возрастном диапазоне 2-24 месяца.

Пример 7. Мультивалентная молекулярная конструкция с встроенными эпитопами на основе белка-переносчика столбнячного токсина.

Кроме белка-переносчика CRM197, в поливалентном составе, который подразумевает молекулярную конструкцию, раскрытую в настоящей заявке, можно использовать другие общепризнанные зависимые от Т-хелперов белки-переносчики. В качестве примера заявитель рассмотрел в данном документе столбнячный токсин (ТТ) в качестве белка-переносчика, универсальный иммуноген, безопасно применяемый в детской иммунизации уже много десятилетий назад. В противоположность белку-переносчику CRM197, ТТ никогда не находился в составах в 13- или 15-валентной конъюгатной вакцине, поэтому впоследствии придется определить безопасность такой потенциальной вакцины с высокой дозой белка у людей. Соответственно, применение раскрытой мультивалентной молекулярной конструкции для белка, например ТТ, представляет рациональный подход с целью ограничения количества белка-переносчика в 13- или 15-валентном (или более) возможном составе на основе зависимого от Т-хелперов белка-переносчика.

ТТ является производным гомологичного токсина, химически обработанного для получения токсина, намеренно обезвреженного для применения у человека в качестве иммуногена. MW очищенного столбнячного токсина вполне сопоставима с таковой для токсина, что составляет $1,51 \times 10^5$, включая 1375 аминокислот. Однако среди других свойств имеется выраженное различие между анатоксином и остатками токсина в количестве первичных аминокислот от остатков лизина, которые сохраняются в структуре токсина после химического обезвреживания. В среднем в столбнячном анатоксине можно обнаружить 50 функциональных аминокислот или около 50% от таковых, изначально присутствующих в структуре токсина, которые функционируют в качестве нуклеофильных групп в реакции связывания с активированными бактериальными Ps. При сравнении структуры ТТ с таковой CRM197 в отношении возможности конкурировать в реакции связывания в качестве нуклеофильного реагента можно определить, что ТТ имеет приблизительно 50 аминокислот/молекулу (MW = $1,51 \times 10^5$ на 1375 аминокислот), в то время как CRM197 имеет 40 аминокислот/молекулу (MW = $58,5 \times 10^4$ на 535 аминокислот), поэтому молярная плотность их (которую определяют как "молярную нуклеофильную активность") составляет 3,6% в ТТ и 7,5% в CRM197, что показывает намного большую способность последнего белка выполнять роль нуклеофильного реагента в определенной реакции связывания. Однако учитывая значимое различие в MW двух белков (по сути коэффициент = 2,6 в пользу ТТ), молярные отношения белка-переносчика для каждого из выбранных переносимых углеводных антигенов в молекулярных конструкциях могут являться преимущественными для ТТ при стремлении ограничить количество белка/доза в поливалентном составе. Фактически при сопоставимой по массе дозе двух белков-переносчиков ТТ по массе требуется в 2,6 раза меньше, чем CRM197. В противоположность необходимо уделить внимание тому факту, что его MW может ограничивать возможность получения молярного отношения ТТ/типоспецифический Ps с величиной $\geq 1,0$ для оптимальной индукции зависимости от Т-хелперов в иммунной системе хозяина.

Ниже в данном документе заявитель описывает физико-химические свойства такой молекулярной конструкции с использованием ТТ в качестве белка-переносчика, синтезированного в соответствии со способом, используемым для молекулярной конструкции на основе CRM197, при стехиометрии в реагентах, которая обеспечивает полное гликозилирование белка-переносчика. Такую молекулярную конструкцию можно рассматривать в качестве основного компонента поливалентного состава на основе белка-переносчика ТТ:

Таблица 10

Молекулярная конструкция	Среднее отношение (вес/вес) ТТ/Ps	Среднее молярное отношение ТТ/Ps
ТТ-6A, 9V, 23F	ТТ/Ps 6A = 2,08	0,96
	ТТ/Ps 9V = 1,90	0,90
	ТТ/Ps 23F = 2,15	1,00

В случае мультивалентных конъюгатов Ps N. meningitidis и Ps H. influenzae в качестве дополнительных примеров ниже в данном документе проводится сравнение между белком-переносчиком CRM197 и ТТ, при этом акцентируется внимание на соответствии белка-переносчика в различных конструкциях (синтезированных в соответствии со стехиометриями, разрешенными описанным выше общим химическим уравнением), относительно их MW при определении молярного отношения (белок/Ps), с учетом описанных выше величин MW для белка и Ps в табл. 8-9.

Таблица 11

Молекулярная конструкция	Среднее отношение (вес/вес)	Среднее молярное отношение
	ТТ/Ps или CRM/Ps	ТТ/Ps или CRM/Ps
ТТ-A, C, Hib	ТТ/PsA = 1,79	0,83
	ТТ/PsC = 2,05	0,95
	ТТ/PsHib = 1,91	0,89
CRM197-A, C, Hib	CRM197/PsA = 2,18	2,60
	CRM197/PsC = 1,87	2,24
	CRM197/PsHib = 1,95	2,33
CRM197-A, C, W135, Y	CRM197/PsA = 0,78	0,93
	CRM197/PsC = 0,97	1,16
	CRM197/PsW135 = 0,75	0,90
	CRM197/PsY = 0,88	1,05

Список литературы.

- Arndt and Porro, Immunobiology of Proteins and Peptides, Edited by M.Z. Atassi, Plenum Press, New York and London, страницы 129-148, 1991.
- Berzofsky J.A. and Schechter A.N. Mol. Immunol., 18: 751-763, 1981.
- Besnard J. et al., Nature, 492: 215-220, 2012.
- Bromuro, C., et al. (2010). *Vaccine* 28, 2615–2623.
- Calix J. J. et al. J.Bacteriol. 193:5271-5278, 2011.
- Dagan R. et al., Vaccine 28 (34): 5513-5523, 2010.
- Eby R. et al., Modern Approaches to New Vaccines, CSH Eds., 119-123, 1994.
- European patent EP 1868645.
- European patent EP 1501542.
- European Pharmacopoeia 5th Edition (2008).
- Giannini G. et al., Nucl. Acid Res., 12, 4063-4069, 1984.
- Han, Y. et al. (2000). *Infect. Immun.* 68, 1649–1654.
- Kabat E.A., *J. Immunol.* 97: 1-11, 1966.
- Laemmli U.K., Nature 227, 680-685, 1970.
- Moreau M. et al., Carbohydrate Res., 182(1):79-99, 1988.
- Nanra J.S. et al., Human Vaccines and Immunotherapeutics, 9:3, 480-487, 2013.
- O’Riordan K. and Lee J.C., Clin. Microbiol. Rev., 17: 218-234, 2004.
- Porro M. et al., J. Infect. Dis., 142 (5), 716-724, 1980.
- Porro M. et al., *Anal. Biochem.* 118: 301-306, 1981.

- Porro M. et al. *Medecine Tropicale*, 43: 129-132, 1983.
- Porro M. et al. *Molecular Immunology*, 22: 907-919, 1985.
- Porro M. et al. *Molecular Immunology*, 23: 385-391, 1986.
- Porro M. Edited by R. Bell and G. Torrigiani (WHO), страницы 279-306; New York 1987.
- Pride M.W. et al., *Clin. And Vaccine Immunol.* 19 (8):1131-1141, 2012.
- Rebers P.A. and Heidelberger M., *J. Am. Chem. Soc.*, 83: 3056-3059, 1961.
- Reeves R.E. and Goebels W.F., *J. Biol. Chem.*, 139: 511-519, 1941.
- Richter S. et al., *Clin. Infect. Dis.*, 48:23-33, 2009.
- Rustici A. et al., *Science* 259: 361-365, 1993.
- Satzke C. et al., *J. Clin. Microbiol.*, 48(11): 4298, 2010.
- Schwebach, J. R., et al. 2002. *Infect Immun* 70:2566-2575.
- Swanson D., IDSA meeting, Boston, 2011.
- Towbin H. et al., *PNAS* 76: 4350-4354, 1979.
- Uchida T. et al., *J. Biol. Chem.* 248, 3838-3844, 1973.
- US Patent No. 4,711,779.
- US Patent No. 5,306,492.
- Xin, H. et al. (2008). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 13526-13531.
- Yao KH et al., *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 70(3):291-8, 2011.
- Zucker D. and Murphy J.R., *Mol. Immunol.* 21, 785-793, 1984.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенная мультивалентная молекулярная конструкция, представляющая собой компонент вакцины для человека или животного против инфекций, обусловленных по меньшей мере одним патогеном, выбранным из *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* и *Candida albicans*, включающая зависимый от Т-хелперов белок-переносчик, ковалентно связанный по меньшей мере с тремя углеводными структурами различной серологической специфичности посредством линкера, содержащего восстановленную иминную и амидную связь, где каждая углеводная структура содержит по меньшей мере один из повторяющихся основных эпитопов, включающих по меньшей мере от пяти до двенадцати остатков моносахаридов, причем на один моль белка-переносчика приходится по меньшей мере один моль каждой из по меньшей мере трех углеводных структур различной серологической специфичности, при этом указанный белок-переносчик выбран из природного дифтерийного мутантного белка CRM197, дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, белка D из *Haemophilus influenzae*, пневмококковых поверхностных белков, пневмококкового токсина и их вариантов или производных, таких как столбнячный анатоксин, химически дериватизированный спейсером на основе дигидразида адипиновой кислоты,

при этом указанные углеводные структуры различной серологической специфичности представляют собой капсульные полисахариды, выбранные из полисахаридов типа 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 11B, 11C, 11F, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23A, 23F, 33F, 35B из *Streptococcus pneumoniae*, и/или из полисахаридов группы A, C, W135 и Y из *Neisseria meningitidis*, и/или полисахаридов типа b из *Haemophilus influenzae*, и/или полисахаридных антигенов K из *Klebsiella pneumoniae*, и/или полисахаридных антигенов из *Staphylococcus aureus*, и/или полисахаридных антигенов из *Mycobacterium tuberculosis*, и/или полисахаридных антигенов из *Salmonella typhi*, и/или полисахаридных антигенов из *Escherichia coli*, и/или полисахаридных антигенов из *Vibrio cholerae*, и/или полисахаридных антигенов из *Candida albicans* и/или *Mycobacterium bovis*.

2. Антигенная мультивалентная молекулярная конструкция по п.1, где указанный повторяющийся основной эпитоп включает по меньшей мере от восьми до двенадцати остатков моносахаридов.

3. Антигенная мультивалентная молекулярная конструкция по п.1, содержащая белок-переносчик CRM197 и три углеводные структуры из *Streptococcus pneumoniae*, выбранные из следующих триад капсульных полисахаридов: 3,6A,7F; 4,5,9V; 1,6B,14; 18C,19A,23F; 6C,19F,22F; 12F,15B,33F; 5,9V,19F; 1,14,19A; 22F,23F,33F; 4,6B,18C.

4. Антигенная мультивалентная молекулярная конструкция по п.3, содержащая белок-переносчик CRM197 и три углеводные структуры из *Streptococcus pneumoniae*, выбранные из следующих триад капсульных полисахаридов: 3,6A,7F; 5,9V,19F; 1,14,19A; 22F,23F,33F; 4,6B,18C.

5. Антигенная мультивалентная молекулярная конструкция по любому из предыдущих пунктов в мономерной или полимерной форме.

6. Применение антигенной мультивалентной молекулярной конструкции по любому из предыдущих пунктов для вакцинации человека или животного против инфекций, обусловленных по меньшей мере одним патогеном, выбранным из *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* и *Candida albicans*.

7. Вакцина, содержащая по меньшей мере одну антигенную мультивалентную молекулярную конструкцию по любому из пп.1-5 в физиологически приемлемом носителе вместе с адъювантом или фармацевтически приемлемым наполнителем.

8. Вакцина по п.7, в которой доза каждой углеводной структуры различной серологической специфичности находится в диапазоне от 0,1 до 10 мкг.

9. Вакцина по п.8, в которой доза каждой углеводной структуры различной серологической специфичности составляет 1,0 мкг.

10. Вакцина по любому из пп.7-9, где указанный адъювант выбран из минерального адъюванта, такого как фосфат алюминия или гидроксид алюминия; органического адъюванта, такого как MF59, QF21, Addavax или адъювант на основе сквалена, и биологического адъюванта, такого как монофосфориллипид A или дикориномиколат трегалозы.

11. Вакцина по любому из пп.7-10, где количество адъюванта находится в диапазоне от 0,1 до 1 мг/доза.

12. Вакцина по п.11, где количество адъюванта составляет 0,5 мг/доза.

13. Вакцина по любому из пп.7-12, подходящая для введения подкожным, внутримышечным, внутрикожным или чрескожным путем.

14. Применение вакцины по любому из пп.7-13 для предупреждения у человека или животного инфекций, обусловленных по меньшей мере одним патогеном, выбранным из *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Candida albicans* и *Mycobacterium bovis*.

15. Применение по п.14, где человек является ребенком.

16. Применение по п.14 или 15 для предупреждения у человека инвазивных пневмококковых инфекций, обусловленных *Streptococcus pneumoniae*, причем вакцина содержит одну или несколько антигенных мультивалентных молекулярных конструкций, выбранных из CRM197-3,6A,7F; CRM197-4,5,9V; CRM197-1,6B,14; CRM197-18C,19A,23F; CRM197-6C,19F,22F; CRM197-12F,15B,33F; CRM197-5,9V,19F; CRM197-1,14,19A; CRM197-22F,23F,33F; CRM197-4,6B,18C.

17. Применение по п.14 или 15 для предупреждения у человека инфекций, обусловленных *Neisseria meningitidis*, причем вакцина содержит антигенную мультивалентную молекулярную конструкцию, включающую группоспецифические углеводные структуры A, C, W135 и Y.

18. Применение по п.14 для предупреждения системных и легочных инфекций, обусловленных более чем одним патогеном, выбранным из *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, причем вакцина содержит более чем одну антигенную мультивалентную молекулярную конструкцию, включающую специфические для указанных патогенов углеводные структуры.

19. Применение по п.14 для предупреждения кишечных инфекций, обусловленных более чем одним патогеном, выбранным из *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* и *Vibrio cholerae*, причем вакцина содержит более чем одну антигенную мультивалентную молекулярную конструкцию, включающую специфиче-

ские для указанных патогенов углеводные структуры.

20. Применение по п.14 для предупреждения у человека системных и мочеполовых инфекций, обусловленных *Candida albicans* и *Escherichia Coli*, причем вакцина содержит более чем одну антигенную мультивалентную молекулярную конструкцию, включающую специфические для указанных патогенов углеводные структуры.

21. Способ получения антигенной мультивалентной молекулярной конструкции по любому из пп.1-5 путем конъюгации, включающий следующие стадии:

а) химическая активация по меньшей мере трех углеводных структур различной серологической специфичности посредством окислительно-восстановительного аминирования с образованием восстановленных иминовых связей с последующей дериватизацией в активные сложные эфиры;

б) одновременное связывание или поэтапное связывание по меньшей мере трех углеводных структур на основе производного сложного эфира с аминокгруппами полифункционального белка-переносчика посредством образования амидных связей;

причем реакцию осуществляют в стехиометрии, при которой на один моль белка-переносчика приходится по меньшей мере один моль каждой из по меньшей мере трех углеводных структур различной серологической специфичности.

22. Способ по п.21, при котором углеводные структуры химически активируют в их соответствующие производные с диаминомасляной кислотой, причем активными сложными эфирами являются сукцинимидиловые сложные эфиры.

23. Способ по любому из пп.21, 22, при котором указанный полифункциональный белок-переносчик представляет собой CRM197.

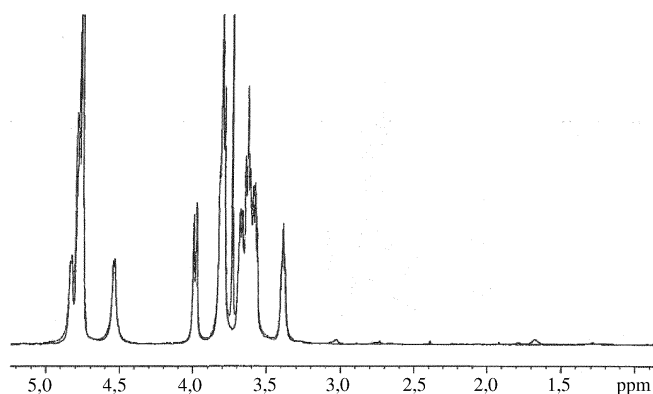
24. Способ по любому из пп.21-23, при котором указанные по меньшей мере три углеводные структуры из *Streptococcus pneumoniae*, выбраны из следующих триад капсульных полисахаридов: 3,6A,7F; 4,5,9V; 1,6B,14; 18C,19A,23F; 6C,19F,22F; 12F,15B,33F; 5,9V,19F; 1,14,19A; 22F,23F,33F; 4,6B,18C.

25. Способ по любому из пп.21-24, при котором углеводные структуры со стадии а) содержат по меньшей мере один из повторяющихся основных эпитопов, включающих по меньшей мере от пяти до двенадцати остатков моносахаридов согласно оценке молекулярной массы и ЯМР-спектроскопии.

26. Способ получения антигенной мультивалентной молекулярной конструкции по любому из пп.1-5 путем конъюгации, включающий одновременное связывание или поэтапное связывание аминокгрупп полифункционального белка-переносчика по меньшей мере с тремя углеводными структурами различной серологической специфичности, предварительно активированными посредством окисления посредством восстановительного аминирования с образованием восстановленных иминовых связей,

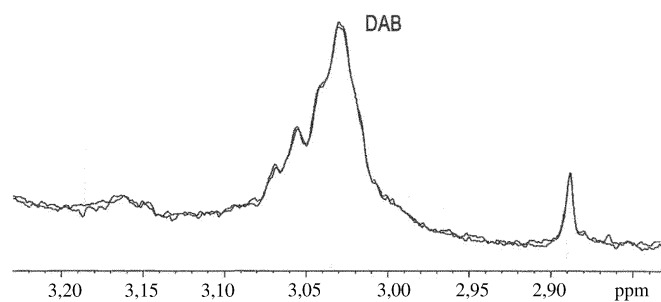
причем реакцию осуществляют в стехиометрии, при которой на один моль белка-переносчика приходится по меньшей мере один моль каждой из по меньшей мере трех углеводных структур различной серологической специфичности.

¹H-ЯМР спектр производного Ps3 и Ps3-DAB

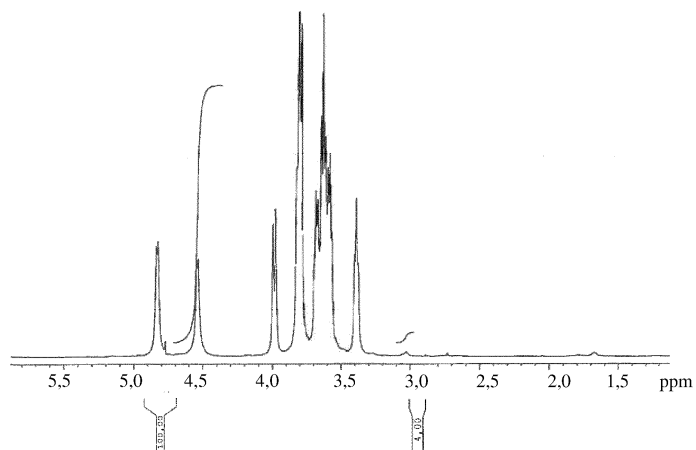


Фиг. 1

034157

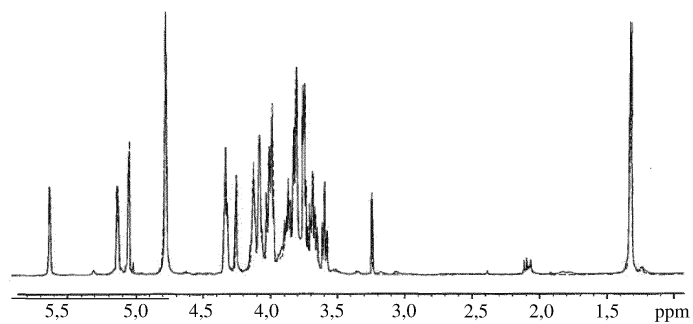


Фиг. 2

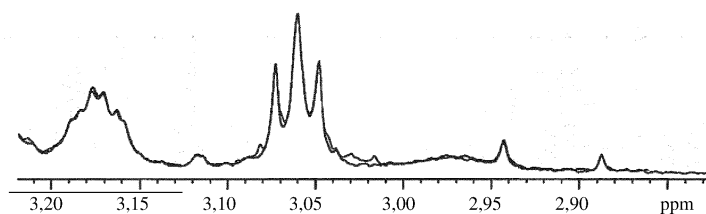


Фиг. 3

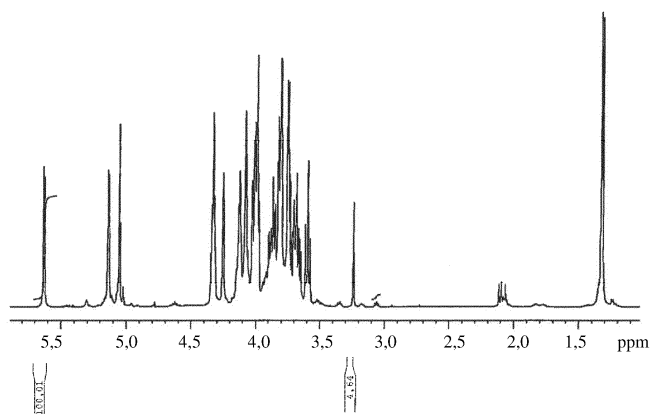
¹H-ЯМР спектр производного Ps6A и Ps6A-DAB



Фиг. 4

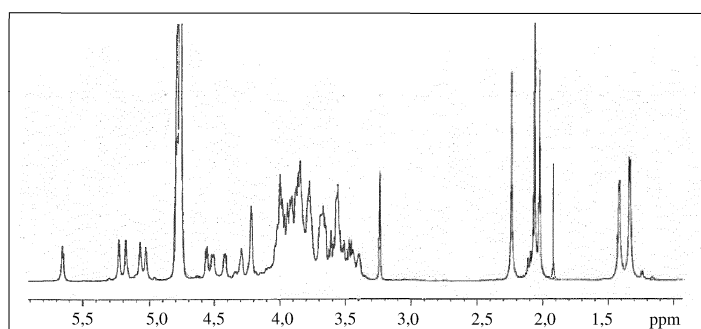


Фиг. 5

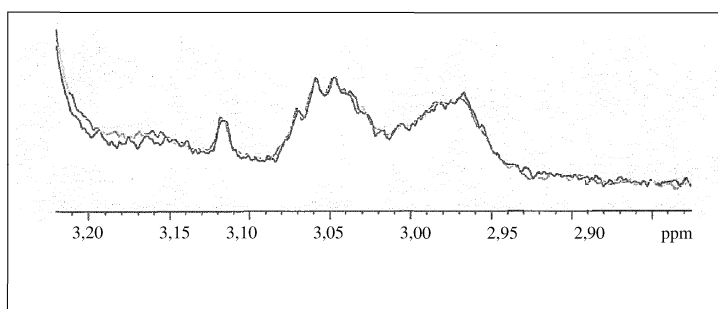


Фиг. 6

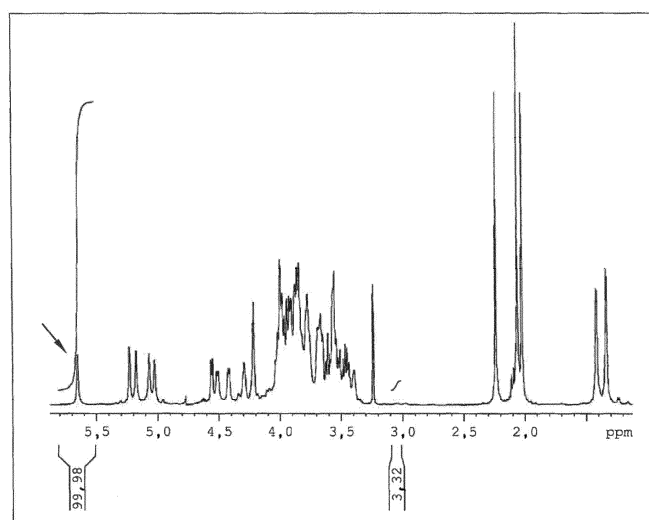
¹H-ЯМР спектр производного Ps7F и Ps7F-DAВ



Фиг. 7

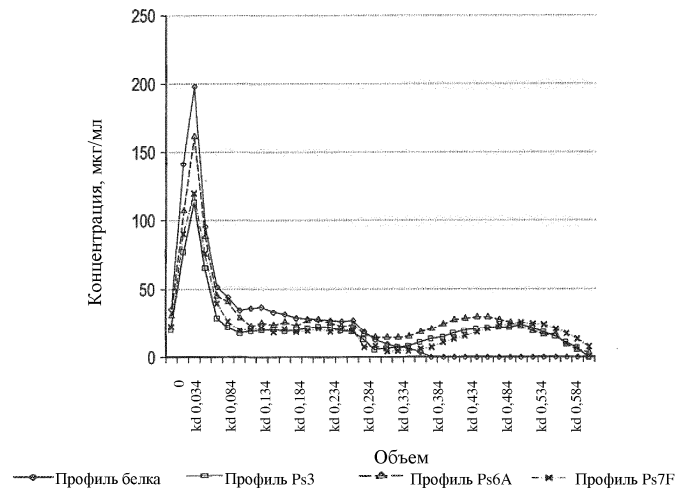


Фиг. 8

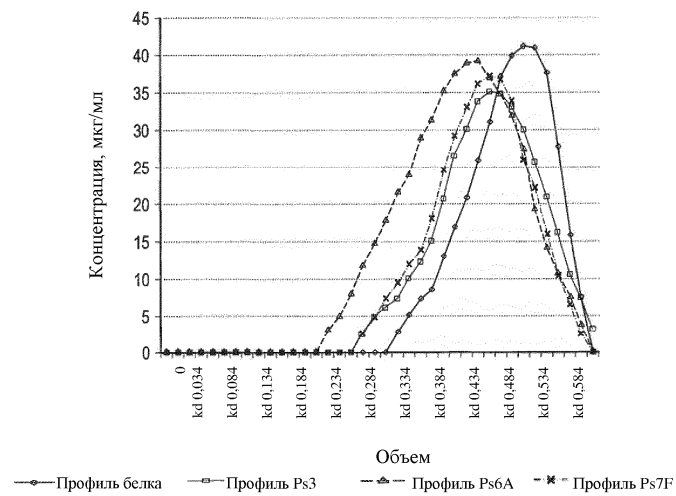


Фиг. 9

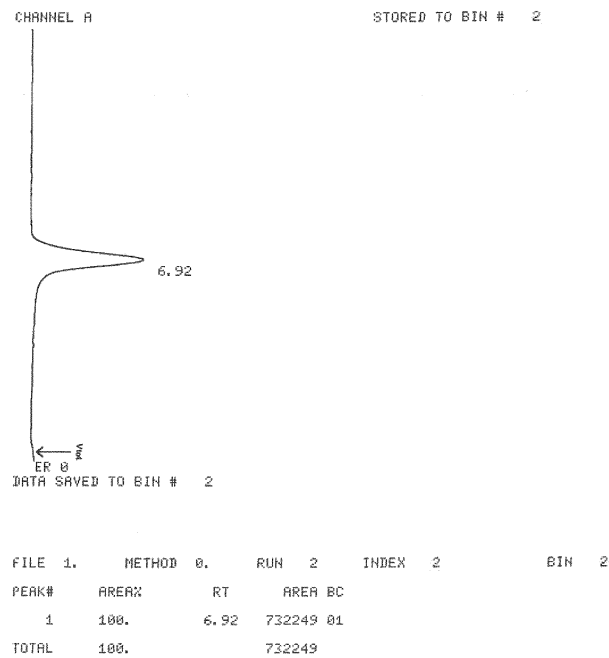
034157



Фиг. 10

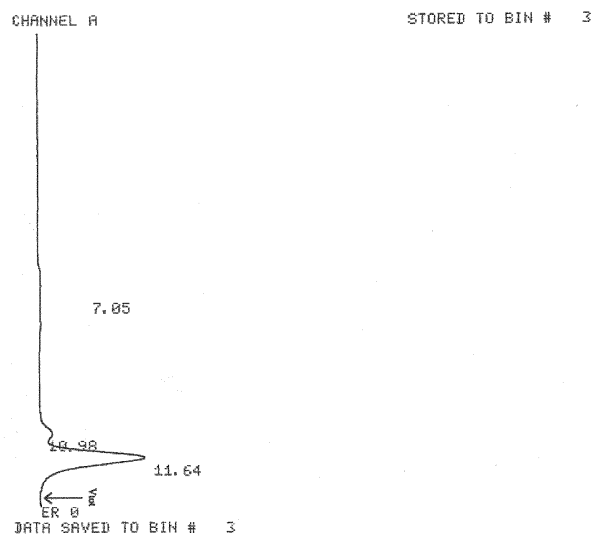


Фиг. 11



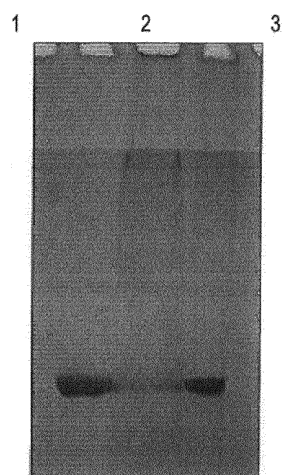
Фиг. 12

034157

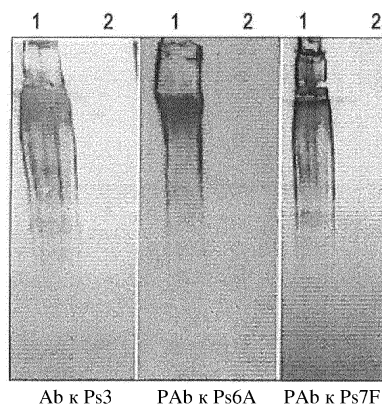


FILE	1.	METHOD	0.	RUN	3	INDEX	3	BIN	3
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC					
1	7.2	7.05	43170	01					
2	8.12	10.98	48686	02					
3	84.68	11.64	507727	03					
TOTAL	100.		599583						

Фиг. 13

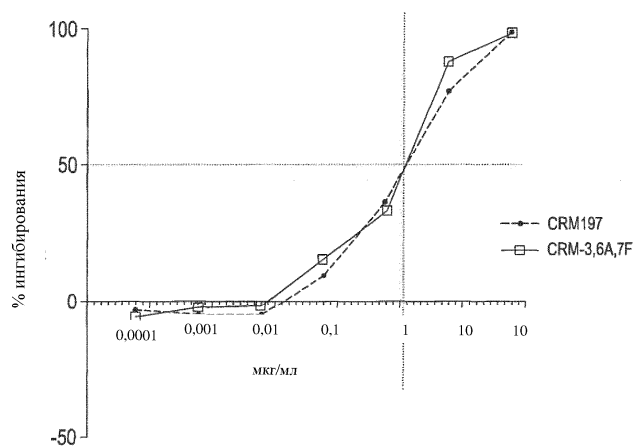


Фиг. 14

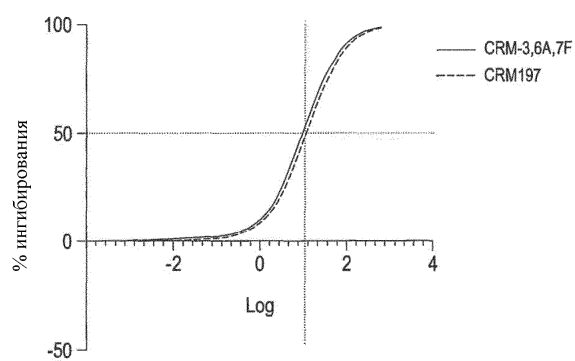


Фиг. 15

034157

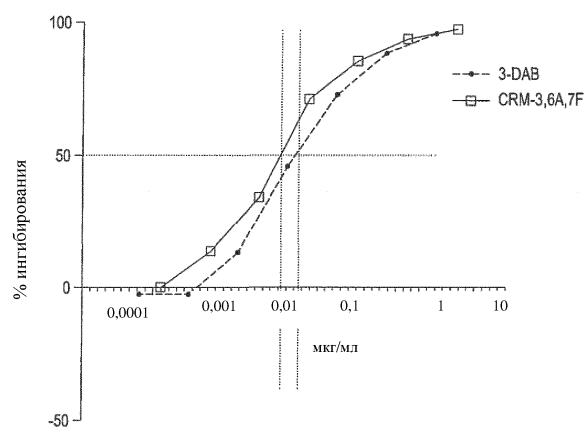


Фиг. 16

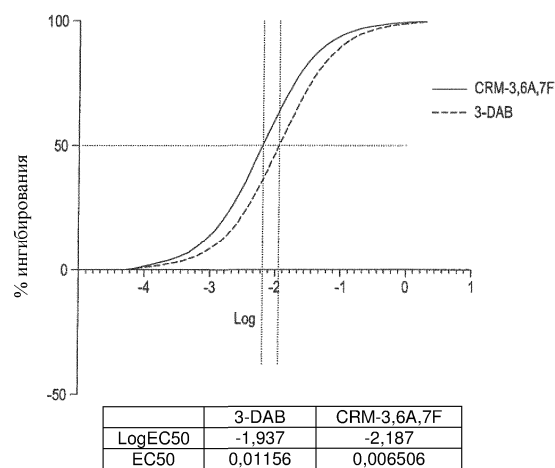


	CRM197	CRM-3,6A,7F
LogEC50	1,084	1,008
EC50	12,14	10,19

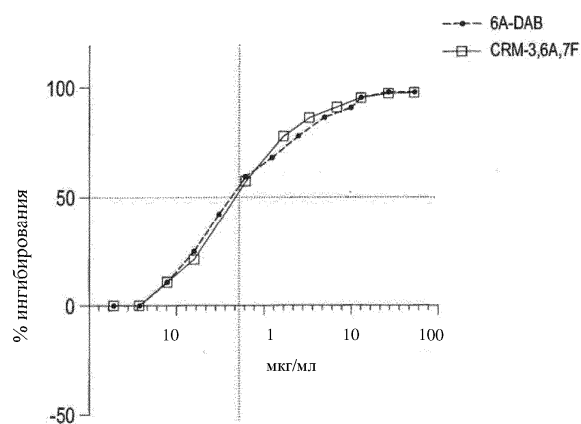
Фиг. 17



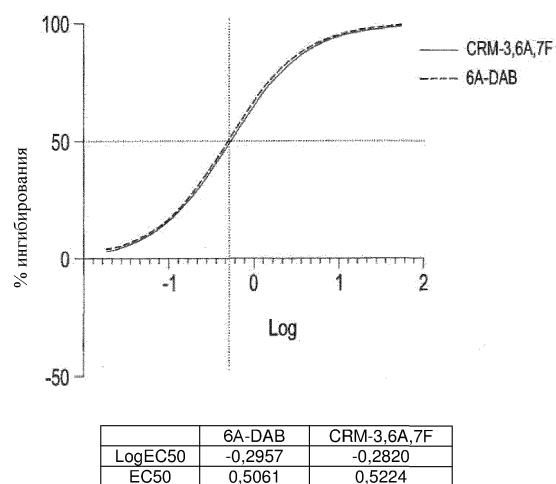
Фиг. 18



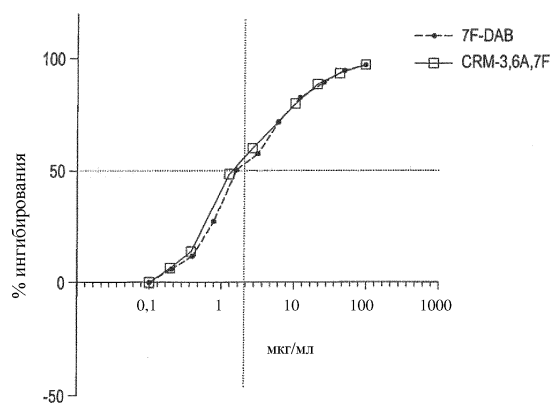
Фиг. 19



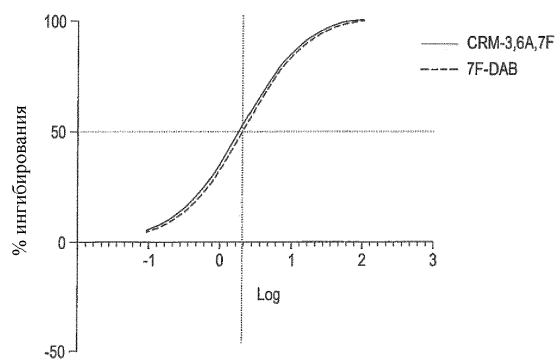
Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22



	7F-DAB	CRM-3,6A,7F
LogEC50	0,3390	0,3023
EC50	2,183	2,006

Фиг. 23

