

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037373**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.22

(51) Int. Cl. **A61K 39/09** (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)

(21) Номер заявки
201890431

(22) Дата подачи заявки
2016.06.21

(54) ПОЛИВАЛЕНТНАЯ ПНЕВМОКОККОВАЯ КОНЬЮГИРОВАННАЯ ВАКЦИНА

(31) **3140/CHE/2015**

(32) **2015.06.23**

(33) **IN**

(43) **2018.06.29**

(86) **PCT/IN2016/000157**

(87) **WO 2016/207905 2016.12.29**

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

(72) Изобретатель:
**Матур Рамеш Венкат, Тирумени
Нагараджан, Бурки Раджендар,
Мантена Нарендер Дев, Датла
Махима (IN)**

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

(56) XINHONG YU ET AL.: "Immunity to Cross-Reactive Serotypes Induced by Pneumococcal Conjugate Vaccines in Infants", JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES. JID, vol. 180, no. 5, 1 November 1999 (1999-11-01), pages 1569-1576, XP055311673, CHICAGO, IL. ISSN: 0022-1899, DOI: 10.1086/315096 page 1569, section "Materials and Methods"; abstract

HAUSDORFF WILLIAM P. ET AL.: "Do pneumococcal conjugate vaccines provide any cross-protection against serotype 19A?", BMC PEDIATRICS, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 10, no. 1, 2 February 2010 (2010-02-02), page 4, XP021067048, ISSN: 1471-2431 section "Background"

IN H. PARK ET AL.: "Differential Effects of Pneumococcal Vaccines against Serotypes 6A and 6C", THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, vol. 198, no. 12, 15 December 2008 (2008-12-15), pages 1818-1822, XP055163663, ISSN: 0022-1899, DOI: 10.1086/593339 Page 198, right column, second paragraph

WO-A1-2014092378

WO-A1-2013191459

(57) Изобретение относится к композиции поливалентной пневмококковой конъюгированной вакцины (PCV), содержащей: 1) по меньшей мере 12 капсульных полисахаридов, выбранных из серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9N, 9V, 15B, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F S. pneumoniae, активированных CDAP и конъюгированных с белком-носителем, выбранным из CRM197, пневмококкового поверхностного протеина A (PspA), пневмококкового адгезина (PsaA) или их комбинации и 2) фармацевтически приемлемый носитель, где композиция не содержит капсульного полисахарида серотипа 6A.

B1**037373****037373 B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к новой композиции поливалентной пневмококковой конъюгированной вакцины и способу ее получения.

Уровень техники

Streptococcus pneumoniae (пневмококк) представляют собой грамположительные бактерии, ответственные в значительной степени за заболеваемость и смертность (особенно у молодых и пожилых людей), вызванные инвазивными заболеваниями, такими как пневмония, бактериемия и менингит, и заболеваниями, связанными с колонизацией, такими как острый средний отит. Уровень пневмококковой пневмонии в США для лиц старше 60 лет оценивается как 3-8 случаев на 100000 человек. В 20% случаев это приводит к бактериемии и другим проявлениям, таким как менингит, со смертностью около 30% даже при лечении антибиотиками.

Пневмококк инкапсулирован с химически связанным полисахаридом, который придает специфичность серотипу.

Существует более 90 известных серотипов пневмококков, и капсула является основной детерминантой вирулентности для пневмококков, поскольку капсула не только защищает внутреннюю поверхность бактерий от системы комплемента, но и сама слабо иммуногенна.

Пневмококковые вакцины включают пневмококковую полисахаридную вакцину и пневмококковые конъюгированные вакцины. Общеизвестно, что защитная эффективность коммерциализированной пневмококковой полисахаридной вакцины более или менее связана с концентрацией антител, индуцированных при вакцинации; действительно, было одобрено 23 полисахарида, которые выпускаются под товарным наименованием Pneumovax® 23 компанией Merck исключительно на основе иммуногенности каждого компонента полисахарида. Pneumovax® 23 содержит неконъюгированные полисахариды, принадлежащие к серотипам 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F и 33F.

Доказано, что поливалентные пневмококковые полисахаридные вакцины, которые лицензировались в течение многих лет, имеют ценность для профилактики пневмококкового заболевания у взрослых, особенно у пожилых людей и лиц с высоким риском заболеваемости. Однако младенцы и маленькие дети плохо реагируют на неконъюгированные пневмококковые полисахариды. Пневмококковая конъюгированная вакцина Prevnar®, содержащая 7 наиболее часто выделяемых серотипов (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19 F и 23F), вызывающих инвазивное пневмококковое заболевание (IPD) у маленьких детей, а также у младенцев, была впервые лицензирована в США в феврале 2000 года. После универсального использования Prevnar®-7 в США, было отмечено значительное снижение у детей IPD, вызванных серотипами, присутствующими в Prevnar®-7. Из-за ограничений по охвату серотипов Prevnar®-7 в некоторых регионах мира была разработана и апробирована 13-валентная конъюгированная вакцина под товарным наименованием Prevenar-13®, содержащая серотипы 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, конъюгированные с CRM197. Активацию полисахаридов осуществляют путем частичного окисления смежных (видциальных) гидроксильных групп в повторных единицах углеводов с использованием периодата натрия или йодной кислоты.

Была апробирована десятивалентная пневмококковая вакцина под товарным наименованием Synflorix®, содержащая серотипы полисахаридов 1, 4, 5, 6B, 7, 9, 14, 23 F, конъюгированные с протеином D (PD), серотип 18C, конъюгированный со столбнячным анатоксином (TT), и серотип 19F, конъюгированный с дифтерийным анатоксином (DT). Для получения конъюгата связывание каждого из полисахаридов серотипа *S. pneumoniae* либо с PD, DT либо с TT проводят с использованием CDAP (1-циано-4-диметиламинопиридинийтетрафторборат) в качестве химического реагента при контролируемом pH.

В патенте США 5360897 описан иммуногенный конъюгат, содержащий продукт восстановительно-аминирования интактного капсульного полимера бактериального патогена *S. pneumoniae*, содержащего по меньшей мере две карбонильные группы, и бактериального токсина или анатоксина, причем указанный конъюгат содержит сшитый конъюгат, в котором имеется прямая ковалентная связь между капсульным полимером и токсином или анатоксином.

В патенте США 7862823 заявлена композиция поливалентной конъюгированной вакцины, содержащая по меньшей мере два различных белка-носителя.

В патенте США 7955605 раскрыт способ получения иммуногенного конъюгата, состоящего из 19A, где активированный полисахарид серотипа 19A и белок-носитель ресуспендируют в диметилсульфоксиде (ДМСО) с образованием конъюгата.

В патенте США 8603484 раскрыт способ получения поливалентной иммуногенной композиции, где серотип 3 вступает в реакцию с мягкой кислотой для его гидролиза, этот гидролизованный серотип вступает в реакцию с окислителем в присутствии двухвалентных катионов, что приводит к получению активированного серотипа 3, а затем его конъюгируют с белком-носителем, который включает реакцию этих активированных продуктов с восстановителем, в результате чего образуется конъюгат полисахарид серотипа 3:белок-носитель.

В патенте США 8808708 B2 раскрыта 13-валентная иммуногенная композиция, состоящей из конъю-

югатов полисахарид-белок, где серотипы состоят из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F и 23F, и где белок-носитель представляет собой CRM197.

В патентной публикации США 2009/0017059 раскрыта иммуногенная композиция, в которой серотипы 19А и 19F конъюгированы с различными бактериальными анатоксинами.

В патентной публикации США 2010/0074922 раскрыта иммуногенная композиция, содержащая 10 или более серотипов, где капсульный сахарид 19F конъюгирован с дифтерийным анатоксином (DT), капсульный сахарид серотипа 18С конъюгирован со столбнячным анатоксином, и капсульные сахараиды серотипов 1, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14 и 23F конъюгированы с протеином D из *Haemophilus influenzae*.

В патентной публикации США 2010/0239604 раскрыта композиция, содержащая конъюгаты поливалентных капсульных сахаридов *S. pneumoniae*, где серотип 19А конъюгирован с первым бактериальным анатоксином, а 19F конъюгирован со вторым бактериальным анатоксином, и 2-9 капсульных сахаридов *S. pneumoniae* конъюгированы с протеином D.

В патентной публикации США 2012/321658 А1 (2010) раскрыта иммуногенная композиция, в которой серотипы 1, 3, 19А и 19F связаны с белком-носителем(ями) прямо или косвенно посредством химических взаимодействий, отличных от восстановительного аминирования, и один или более различных сахаридов выбирают из второй группы, состоящей из серотипов 4, 5, 6А, 6В, 7F, V, 14, 18С и 23F, который/которые связаны с белками-носителями путем восстановительного аминирования.

В патенте США № 8192746 раскрыта поливалентная иммуногенная композиция, содержащая капсульные полисахариды из серотипов 1, 3,4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F, конъюгированные с CRM197.

В WO 2013/191459 А1 раскрыта конъюгированная 15-валентная композиция, содержащая различные серотипы *S. pneumoniae*, полученные из капсульных полисахаридов 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9N, 9V, 14, 18С, 19А, 19F и 23F.

В WO 2014/092378 А1 раскрыта иммуногенная конъюгированная композиция, где 12 серотипов выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F и 23F, и один оставшийся из 22F или 33F.

В WO 2014/092377 А1 раскрыта 13-валентная композиция, где 12 серотипов выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F и 23F, а последний серотип представляет собой либо 12, либо 9N.

В публикации заявки на патент Китая № CN 101590224 описана 14-валентная пневмококковая конъюгированная вакцина, содержащая конъюгат полисахарид-белок, и содержащая серотипы 1, 2, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9N, 9V, 14, 18С, 19А, 19F и 23F.

В публикации заявки на патент Китая № CN 103623401 раскрыта композиция 14-валентной конъюгированной вакцины, содержащей конъюгат капсульный полисахарид-белок, где указанные 14 различных серотипов крови представляют собой: 1, 3, 4, 5,6А, 6В, 9V, 14,18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F.

В публикации заявки на патент Китая № CN 103656632 раскрыта поливалентная композиция пневмококковых капсульных полисахаридов, содержащая серотип 6А и по меньшей мере один дополнительный серотип, выбранный из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6В, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 17F, 18С, 19А, 19F, 20, 22F, 23F и 33F. Поливалентная композиция пневмококковых капсульных полисахаридов, предложенная в настоящем документе, может быть использована для индукции генерации организмом гуморального иммунитета, и может генерировать относительно хороший защитный эффект при инфекционных заболеваниях, вызванных 24 обычными серотипами пневмококков.

В публикации заявки на патент Китая № CN 103656631 раскрыта поливалентная композиция конъюгата капсульный полисахарид-белок и способ ее получения. Конъюгированную композицию получают из пневмококковых капсульных полисахаридов 24 различных серотипов и белка-носителя путем образования ковалентной связи, где 24 различных серотипов представляют собой 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 17F, 18С, 19А, 19F, 20, 22F, 23F и 33F.

В публикации заявки на патент Китая № CN 104069488 раскрыта поливалентная композиция пневмококковых капсульных полисахаридов 14 различных серотипов и белка-носителя, где 14 серотипов включают 1, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F.

Цианилирующие агенты хорошо известны в данной области (Wilcheck et al., *Affinity chromatography. Meth. Enzymol.*, 104C:3-55; Wakelsman et al, *J.C.S Chem. Comm.*, 1976:21 (1976).

Сообщалось о мягком реагенте, который может быть использован для модификации белковых цистеиновых групп. Хотя были Kohn et al., (*Anal. Biochem*, 115: 375, 1981), которые сравнивали CDAP, N-цианотриэтиламмонийтетрафторборат (СТЕА) и п-нитрофенилцианат (Pnrc). Эта работа была проведена для сравнения активации агарозы этими агентами. CDAP также использовался для активации нерастворимых частиц, таких как сефароза и контролируемое глицерином пористое стекло (Carpenter et al., *Journal of Chromatography*, 573: 132-135, 1992).

В патенте США № 5693326 приведен обобщенный способ получения конъюгированной вакцины, где для активации вирусных, грибковых или бактериальных полисахаридов используют органический цианилирующий агент, выбранный из группы, состоящей из тетрафторбората 1-циано-4-(диметиламино)пиридиния, тетрафторбората N-цианотриэтиламмония и п-нитрофенилцианата, с образованием активированного углевода, который затем присоединяют к белку или белку-носителю.

В патенте США 8465749 раскрыт способ получения конъюгированной вакцины путем реакции по-

лисахарида с CDAP и реакции белка с гидразином или дигидразидом адипиновой кислоты в определенном диапазоне pH.

В патенте США 8557250 В2 раскрыт способ, который включает контактирование смеси из множества активированных цианатом иммуногенных полисахаридов по меньшей мере с одним белком, активированным гидразидом.

Anderson P et al, (2003, Vaccine, 21 (13-14): 1554-9) раскрыли сравнительное исследование тетравалентных конъюгированных вакцин с каждым типом полисахарида А, 14, 19F и 23F, по отдельности соединенных со столбнячным анатоксином или дифтерийным CRM197 или смесь половинных доз полисахаридов типов 6А, 14, 19F и 23F, по отдельности связанных со столбнячным анатоксином и дифтерийным CRM197.

Предполагая, что поливалентные полисахаридные конъюгированные вакцины будущего будут использоваться в младенчестве, эта стратегия будет иметь два гипотетических преимущества, заслуживающих дальнейшего изучения, - избежание «эпитопной перегрузки носителей» путем уменьшения дозы каждого носителя и рекрутинг активности Т-хелперов обоими носителями для каждого полисахарида.

Wuorimaa et al. (2001, The Paediatric Infectious Disease Journal, Volume 20(3), pp 272-277) раскрыли исследование для оценки переносимости и иммуногенности у здоровых детей в возрасте до 3 лет 11-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины, которая использует как столбнячные, так и дифтерийные анатоксины в качестве носителей.

Gatchalian et al. (2001, 17th Annual Meeting of the Eur. Soc. Paed. Inf. Dis (ESPID), постер № 4, PIA Постерная сессия 1, Istanbul Turkey) раскрыли результаты ОРА, полученные от младенцев, получавших дозы 11-валентной вакцины, у которых отсутствовал ответ антитела для серотипа 3 на уровне, сравнимом с другими тестируемыми серотипами.

Nurkka et al. (2004, Ped. Inf. Dis. J., 23: 1008-1014) раскрыли исследование иммуногенности и безопасности 11-валентной конъюгированной вакцины, содержащей пневмококковой протеин D, где не наблюдали эффекта примирования для серотипа 3 у младенцев, которые получали три дозы вакцины с последующей бустерной дозой либо той же вакцины, либо пневмококковой полисахаридной вакцины.

Вышеупомянутые ссылки раскрывают полисахариды, принадлежащие к различным серотипам, и их конъюгацию с белками-носителями, следуя различным методам. Но необходимо получить новую композицию серотипов с учетом их распространенности в данном регионе, и ее производство простым и эффективным способом. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что комбинация серотипов 22F и 33F вместе с другими серотипами без 6А улучшает иммуногенность по отношению к серотипам.

Цель изобретения

Основной целью настоящего изобретения является получение новой поливалентной полисахаридной конъюгированной вакцины.

Еще одной целью настоящего изобретения является разработка способа получения новой поливалентной полисахаридной конъюгированной вакцины.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к композиции поливалентной пневмококковой конъюгированной вакцины (PCV), содержащей:

1) по меньшей мере 12 капсульных полисахаридов, выбранных из серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9N, 9V, 15B, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F *S. pneumoniae*, активированных CDAP, и конъюгированных с белком-носителем, выбранным из CRM197, пневмококкового поверхностного протеина А (PspA), пневмококкового адгезина (PsaA) или их комбинации и 2) фармацевтически приемлемый носитель, где композиция не содержит капсульного полисахарида из серотипа 6А.

Настоящее изобретение относится к композиции поливалентной пневмококковой конъюгированной вакцины (PCV), содержащей:

(1) по меньшей мере, 14 капсульных полисахаридов, выбранных из серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F *S. pneumoniae*, активированных CDAP и конъюгированных с CRM 197, PspA, PsaA или их комбинацией и

(2) фармацевтически приемлемый носитель, где композиция не содержит капсульного полисахарида из серотипа 6А.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Титр IgG к индивидуальным пневмококковым капсульным полисахаридам, индуцированно-го Композицией А у кроликов, измеренный с помощью косвенного ИФА.

Фиг. 2. Титр IgG к индивидуальным пневмококковым капсульным полисахаридам, индуцированно-го Композицией В у кроликов, измеренный с помощью косвенного ИФА.

Фиг. 3. Титр IgG к индивидуальным пневмококковым капсульным полисахаридам, индуцированно-го Композицией С у кроликов, измеренный с помощью косвенного ИФА.

Фиг. 4. Титр IgG к индивидуальным пневмококковым капсульным полисахаридам, индуцированно-го Plevnar 13™ у кроликов, измеренный с помощью косвенного ИФА.

Фиг. 5. Титр IgG к индивидуальным пневмококковым капсульным полисахаридам, индуцированно-го Плацебо у кроликов, измеренный с помощью косвенного ИФА

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к иммуногенной поливалентной композиции серотипов, более конкретно к композиции конъюгированной пневмококковой вакцины, содержащей по меньшей мере 13 пневмококковых полисахаридных серотипов, которые индивидуально конъюгированы с фармацевтически приемлемым белком-носителем CRM197, где композиция не содержит капсульного сахара из серотипа 6А. Серотипы 6А и 6В структурно и серологически сходны. Капсулы серотипов 6А и 6В представляют собой изополимеры, отличающиеся только по связи рамноза-рибит, из-за чего антитела, специфичные к капсульному полисахариду серотипа 6В, перекрестно реагируют с капсульным полисахаридом серотипа 6А. Поэтому исключение серотипа 6А обеспечивает рычаг для включения дополнительного эпидемиологически значимого серотипа для расширения защиты от пневмококкового заболевания без необходимости увеличения валентности поливалентной PCV.

Настоящее изобретение также относится к иммуногенной поливалентной композиции серотипов, где капсульные полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 9N, 9V, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F *S. pneumoniae* конъюгированы с белком-носителем CRM197, где композиция не содержит капсульного полисахарида из серотипа 6А. Кроме того, настоящее изобретение может дополнительно содержать один или более серотипов, выбранных из 6С, 8, 10А, 11А, 12F, 15А, 23А, 23В и 35В *S. pneumoniae*.

Предпочтительно, настоящее изобретение относится к 13-валентной, 14-валентной или 15-валентной иммуногенной композиции, где композиция не содержит капсульного полисахарида из серотипа 6А.

Серотип 22F и серотип 3 являются наиболее часто встречающимися серотипами, вызывающими IPD, из-за распространения определенных клональных типов. Серотип 33F также относится к наиболее часто встречающимся серотипам.

CRM197 является вариантом дифтерийного токсина и сам по себе является нетоксичным (то есть анатоксином) для использования в вакцинах. CRM197 выделяют из культур *Corynebacterium diphtheriae* штамма С7 (β 197), выращенного на казиминокислотах и в среде на основе дрожжевых экстрактов. CRM197 может быть получен рекомбинантно в соответствии со способами, описанными в патенте США No. 5614382. Альтернативно, CRM197 получают рекомбинантно в соответствии со способами, известными в литературе, или в соответствии со способом, раскрытым в нашей публикации PCT WO 2016/079755. CRM197 может быть очищен ультрафильтрацией, осаждением сульфатом аммония и ионообменной хроматографией, хорошо известными в данной области.

Полисахарид может быть экстрагирован из микроорганизма в соответствии с общепринятыми способами и очищен аналогичным образом. Этот полисахарид может быть использован в нативной форме после экстракции/очистки. Альтернативно, он может быть фрагментирован с получением полисахарида со средней молекулярной массой, меньшей, чем у первоначально выделенного полисахарида.

Полученный таким образом полисахарид затем активируют CDAP и затем конъюгируют с белками-носителями, такими как CRM197, PspA, PsaA или их комбинация.

В другом варианте осуществления, способ конъюгации зависит от активации сахара с CDAP с образованием цианатного эфира. Таким образом, активированный сахарид может быть конденсирован непосредственно или через спейсерную (линкерную) группу с аминогруппой на белке-носителе. Например, спейсером может быть цистамин или цистеамин с получением тиолированного полисахарида, который может быть связан с носителем посредством тиоэфирной связи, полученной после реакции с активированным малеимидами белком-носителем (например, с использованием GMBS) или галогенацетилированным белком-носителем (например, с использованием иодацетимида [например, этилйодацетимид HCl] или N-сукцинимидилбромацетата или SLAB, или SIA, или SBAP). Предпочтительно, сложный эфир цианата соединен с гександиамином или дигидразидом адипиновой кислоты (ADH), а аминомодифицированный сахарид конъюгируют с белком-носителем с использованием карбодимида (например, EDAC или EDC) с помощью карбоксильной группы на белке-носителе. Такие конъюгаты описаны в WO 93/15760, WO 95/08348 и WO 96/29094; и Chu et al, 1983, Infect. Immunity 40:245-256.

После конъюгации капсульного полисахарида с белком-носителем конъюгаты полисахарид-белок очищают (обогащают по отношению к количеству конъюгата полисахарид-белок) различными методами. Эти методы включают операции концентрирования/диализации, осаждения/элюирования, колоночной хроматографии и глубокой фильтрации.

После того, как отдельные гликоконъюгаты очищают, их смешивают для приготовления иммуногенной композиции по настоящему изобретению, которая может быть использована в качестве вакцины.

В предпочтительном варианте осуществления, изобретение относится к композиции поливалентной пневмококковой конъюгированной вакцины (PCV), содержащей

а) по меньшей мере 13 капсульных полисахаридов, выбранных из серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 9N, 9V, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F *Streptococcus pneumoniae*, активированных CDAP и конъюгированных с CRM197, PspA, PsaA или их комбинацией, и

б) фармацевтически приемлемый носитель, где композиция не содержит капсульного сахара из серотипа 6А.

В другом варианте осуществления количество полисахарида из каждого из серотипов 1, 3, 4, 5, 6В,

7F, 9N, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F составляет 1-10 мкг, предпочтительно 1-5 мкг, конъюгированного с 3-30 мкг белка-носителя CRM197. Отношение полисахарида к белку-носителю составляет 0,3:3.

Композиция согласно изобретению может быть получена традиционным способом. Конкретно, в ее состав может быть включен фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель, например вода или солевой раствор. Кроме того, композиция может содержать такие ингредиенты, как буфер, консервант или стабилизатор, полисорбат, адъювант, такой как соединение алюминия, например гидроксид алюминия, фосфат алюминия или гидроксифосфат алюминия, и вспомогательное вещество лиофилизации. В общем, эти продукты могут быть выбраны как функция от режима и пути введения и основаны на стандартных фармацевтических практиках.

Композицию по настоящему изобретению можно получить в виде стандартной лекарственной формы, во флаконе, флаконе с несколькими дозами или в виде предварительно заполненного шприца. Композиция может дополнительно содержать один или более консервантов, выбранных из тиомерсала, 2-феноксизанола и тому подобного. Количество консерванта может составлять от 4 до 20 мг/мл.

Композицию согласно изобретению можно вводить любым обычным способом, который используется в области вакцин, конкретно системным, то есть парентеральным путем, например, подкожным, внутримышечным, внутрикожным или внутривенным путем или через слизистую оболочку, например, пероральным или назальным путем.

"Эффективное количество" композиции по изобретению относится к дозе, требуемой для индукции антител, которые значительно снижают вероятность или тяжесть инфекционности *S. pneumoniae* во время последующего заражения.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение дополнительно относится к иммуногенной композиции, вводимой в виде однократной дозы 0,5 мл, полученной таким образом, что она содержит: 2 мкг каждого полисахарида; 30-40 мкг белка-носителя CRM197; 0,2-1 мг адъюванта фосфата алюминия; хлорид натрия и буфер в качестве вспомогательных веществ.

Еще в одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции серотипов для получения 13-валентной PCV, включающего:

индивидуальную конъюгацию пневмококковых капсульных полисахаридов известного размера, принадлежащих к 13 серотипам, активированных с использованием CDAP, с иммуногенным белком-носителем CRM197,

диафильтрацию индивидуальных одновалентных пневмококковых конъюгатов с последующей очисткой с использованием эксклюзионной хроматографии,

анализ фракций с помощью SEC-HPLC и объединение фракций, содержащих одновалентные пневмококковые конъюгаты, до стерилизации фильтрацией с использованием фильтров 0,2 мкм и

получение 13-валентной PCV с использованием 13 одновалентных пневмококковых конъюгатов; 4 мкг для серотипа 6B; 2 мкг для оставшихся серотипов, и адъювант Adju-Phos® вместе с соответствующим вспомогательным веществом и буфером с последующим стерильным наполнением.

Композиция серотипов PCV 13 содержит серотипы 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F и 33F.

Еще в одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции серотипов для получения 14-валентной PCV, включающего:

индивидуальную конъюгацию пневмококковых капсульных полисахаридов известного размера, принадлежащих к 13 серотипам, активированных с использованием CDAP, с иммуногенным белком-носителем CRM197,

диафильтрацию индивидуальных одновалентных пневмококковых конъюгатов с последующей очисткой с использованием эксклюзионной хроматографии, анализ фракций с помощью SEC-HPLC и объединение фракций, содержащих одновалентные пневмококковые конъюгаты, до стерилизации фильтрацией с использованием фильтра 0,2 мкм и

получение 14-валентных PCV с использованием одновалентных пневмококковых конъюгатов; 4,4 мкг для серотипа 6B; 2 мкг для оставшихся серотипов, и адъювант Adju-Phos® вместе с соответствующим вспомогательным веществом и буфером с последующим асептическим наполнением.

Композиция серотипов PCV 14 содержит серотипы 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F.

Белки-носители предпочтительно представляют собой белки, которые являются нетоксичными и не реактогенными и которые могут быть получены в достаточном количестве и с достаточной степенью чистоты. Белок-носитель может быть конъюгирован с полисахаридом *S. pneumoniae* для усиления иммуногенности полисахарида. Белки-носители должны поддаваться стандартным процедурам конъюгации. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения CRM197 используют в качестве белка-носителя. В одном варианте осуществления каждый капсульный полисахарид конъюгирован с одним белком-носителем. В другом варианте осуществления капсульные полисахариды конъюгированы с двумя или более белками-носителями.

В другом варианте осуществления капсульные полисахариды из *S. pneumoniae* могут быть конъюгированы с одним или более белками-носителями, такими как инактивированные бактериальные токсины, такие как столбнячный анатоксин, коклюшный анатоксин; холерный анатоксин/экзотоксин А из *Pseudomonas aeruginosa*, бактериальные белки внешней мембраны, такие как комплекс с внешней мембраны (ОМРС), порины, трансферрин-связывающие белки, пневмолизин, пневмококковый поверхностный протеин А (PspA), пневмококковый адгезин (PsaA), пептидаза С5а из группы А или группы В стрептококка или протеин D *Haemophilus influenzae*. Другие белки, такие как овальбумин, гемоцианин лимфы улитки (KLH), бычий сывороточный альбумин (BSA) или очищенное белковое производное туберкулина (PPD) также могут быть использованы в качестве белков-носителей.

Количество конъюгата в каждой дозе вакцины выбирают в виде количества, которое индуцирует защитный иммунный ответ без значительных побочных эффектов. Такое количество может варьироваться в зависимости от пневмококкового серотипа. Как правило, каждая доза вакцины будет содержать 0,1-50 мкг каждого полисахарида, предпочтительно 0,1-10 мкг и более предпочтительно 1-5 мкг.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, PCV представляет собой 14-валентную стерильную жидкую композицию, состоящую из капсульных полисахаридов серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F, индивидуально конъюгированных с CRM197. Каждая доза 0,5 мл приготовлена так, что она содержит: 2 мкг каждого полисахарида, за исключением 6В 4 мкг; примерно 32 мкг белка-носителя CRM197; 0,125 мг адьюванта элементарного алюминия (0,5 мг фосфата алюминия); и хлорид натрия и L-гистидиновый буфер.

Еще в одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, PCV представляет собой 13-валентную стерильную жидкую композицию, состоящую из капсульных полисахаридов серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 22F и 33F, индивидуально конъюгированных с CRM197. Каждая доза 0,5 мл приготовлена так, что она содержит: 2 мкг каждого полисахарида за исключением 6В 4 мкг; примерно 32 мкг белка-носителя CRM197; 0,125 мг адьюванта элементарного алюминия (0,5 мг фосфата алюминия); и хлорид натрия и L-гистидиновый буфер.

Еще в одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, PCV представляет собой 13-валентную стерильную жидкую композицию, состоящую из капсульных полисахаридов серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 23F и 33, индивидуально конъюгированных с CRM197. Каждая доза 0,5 мл приготовлена так, что она содержит: 2 мкг каждого полисахарида, за исключением 6В 4 мкг; примерно 32 мкг белка-носителя CRM197; 0,125 мг адьюванта элементарного алюминия (0,5 мг фосфата алюминия); и хлорид натрия и L-гистидиновый буфер.

Согласно способам согласно настоящему изобретению пациентом является человек. В некоторых вариантах осуществления пациентом является младенец (менее 1 года), ребенок ясельного возраста (приблизительно от 12 до 24 месяцев) или маленький ребенок (приблизительно от 2 до 5 лет). В других вариантах осуществления, пациентом является пожилой человек (> 65 лет).

Композиции по настоящему изобретению также пригодны для использования более старшими детьми, подростками и взрослыми (например, от 18 до 45 лет или от 18 до 65 лет).

Настоящее изобретение также относится к способу индукции иммунного ответа на конъюгат капсульного полисахарида *S. pneumoniae*, включающему введение человеку иммунологически эффективно количества вышеуказанной поливалентной иммуногенной композиции.

Эффективное количество здесь относится к дозе, которая является достаточной или наиболее вероятной для индукции антител, так что уменьшает тяжесть инфекции у иммунизированного пациента. Следующие примеры приведены для иллюстрации изобретения и предназначены только для иллюстративных целей и не должны толковаться как ограничивающие объем изобретения.

Пример 1. Конъюгация индивидуального пневмококкового полисахарида с белком-носителем с образованием конъюгатов полисахарид-CRM197.

Уменьшение размера полисахарида.

На первой стадии раствор полисахарида (Ps) пропускали через гомогенизатор высокого давления для уменьшения молекулярного размера полисахарида с последующей стадией концентрирования и диафильтрации с использованием мембраны с порогом MWCO 100 кДа. Полученный полисахарид соответствующего размера использовали для конъюгации.

Активация полисахарида и конъюгация с белком-носителем: приблизительное соотношение 1:1 полисахарида и (6 мл Ps, концентрация 10 мг/мл) CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (масс./об.)) смешивали в стеклянном флаконе и перемешивали в течение 1 мин. Доводили pH полисахарида до 9,25 с помощью 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 3 мин при комнатной температуре (RT). Медленно добавляли (4 мл конц. 15 мг/мл) CRM197 к активированному полисахариду в соотношении 1:1,5 (Ps:белок-носитель). Доводили pH реакции до 9,05 с помощью 0,2 М триэтиламина и продолжали реакцию при перемешивании в течение 5 часов при комнатной температуре и, наконец, гасили реакцию добавлением избыточной концентрации глицина.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации с использованием мембраны с порогом MWCO 100 кДа и очищали с помощью эксклюзионной хроматографии. Фракции анализировали с помощью SEC-HPLC, и фракции, содержащие конъюгаты, объединяли и стерильно фильтровали с использованием

фильтров 0,2 мкм. Этот материал обозначили как одновалентная конъюгированная масса. Всю одновалентную конъюгированную массу для 14 серотипов получали с помощью аналогичного процесса.

Пример 2. Приготовление поливалентный полисахарид-CRM197 в виде вакцины.

Готовили три индивидуальных композиции, а именно, Композиция А (13-валентный: 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 22F и 23F), Композиция В (13-валентный: 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 23F и 33F) и Композиция С (14-валентный: 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F). В приведенных выше композициях в соответствии с их составом точно отмеряли 2,2 мкг каждой стерильной массы одновалентных конъюгатов 13 серотипов (1, 3, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F) и 4,4 мкг стерильной массы одновалентного конъюгата 6В. Каждую массу одновалентных конъюгатов медленно переносили (по каплям) один за другим в сосуд для смешивания при непрерывном перемешивании (150 об/мин) и продолжали перемешивание в течение 2 мин при pH 6,5.

К вышеуказанной смеси Adju-Phos® точно отмеряли и медленно переносили по каплям в вышеуказанный сосуд для смешивания при непрерывном перемешивании 50 об/мин) до конечной концентрации Al^{+3} до 1 мг/мл. После завершения добавления Adju-Phos® систему оставляли перемешиваться в течение 2 мин. Конечное pH раствора доводили до $5,8 \pm 0,2$ и продолжали перемешивание в течение 2 ч при около 150 об/мин/ $5^{\circ} \pm 3^{\circ}C$ в холодильнике. После завершения перемешивания вакцину асептически заполняли во флаконы внутри блока с ламинарным потоком воздуха и хранили в камере с температурой $5^{\circ} \pm 3^{\circ}C$.

Пример 3. Исследования иммуногенности.

Иммуногенность пневмококковых конъюгированных композиций, полученных в соответствии с настоящим изобретением, оценивали на кроличьей модели иммунитета. Для этого исследования отбирали пять групп самок-кроликов (взрослые, нерожавшие и небеременные, 2-2,5 кг масса тела) с размером группы 7. Три композиции, а именно: В это исследование включали Композицию А, Композицию В, Композицию С; сравнительную вакцину (Pnevnar 13™) и Плацебо (Табл.1). Кролики получали однократную эквивалентную человеческую дозу независимо от валентности композиций с объемом дозы 0,5 мл. Каждая группа кроликов получала 3 дозы с интервалом 14 дней с использованием соответствующей композиции через внутримышечный путь в дни 1, 15 и 29 после надлежащей подготовки участка введения. Их гуманно тестировали с использованием забора крови в дни 0, 12, 26 и 40, ровно через 1 день после введения композиций. Образцы сыворотки отделяли от образцов свернувшейся крови перед их хранением при $-20^{\circ}C$ в виде аликвот. Образцы сыворотки были обозначены как преиммунная сыворотка (PIS, день 0), иммунная сыворотка - пост-доза 1 (PD1, день 12), иммунная сыворотка - пост-доза 2 (PD2, день 26) и иммунная сыворотка -пост-доза 3 (PD3, день 40).

Таблица 1. Подробная информация о группах обработки кроликов, выбранных для оценки иммуногенности

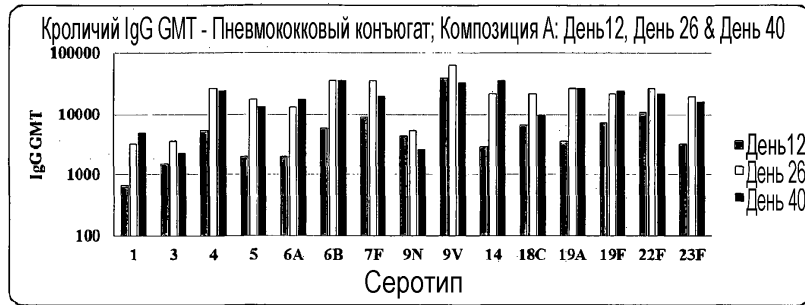
S.No	Композиция	Группа	Размер группы	Схема	
				Иммунизация	Забор крови
1	Композиция А	I	7	День 1, День 15 и День 29	День 0, День 12, День 26 и День 40
2	Композиция В	II	7		
3	Композиция С	III	7		
4	Pnevnar 13™	IV	7		
5	Плацебо	V	7		

Титр для индивидуальных пневмококковых капсульных полисахаридов (CPS) измерялся с помощью ИФА, по существу, в соответствии со стандартизованным протоколом WHO ИФА с небольшими изменениями. Планшеты Nunc Maxisorp® использовали для иммобилизации очищенного пневмококкового CPS из ATCC, США/Государственный институт сыворотки, Дания. В качестве положительного контроля использовали международную пневмококковую контрольную сыворотку 007sp, которая, как известно, содержит анти-CPS IgG для 23 серотипов 23-валентной пневмококковой полисахаридной вакцины. Нефункциональный IgG, реактивный в отношении полисахарида клеточной стенки (CWPS), был истощен путем адсорбции тестируемых и контрольных образцов сыворотки с помощью CWPS Multi™ в соответствии с инструкцией производителя перед их тестированием с помощью косвенного ИФА. Конъюгат рекомбинантного протеина А/Г и пероксидазы, который сочетает специфичность связывания протеина А и протеина Г, использовали для универсального детектирования кроличьего и человеческого IgG. Индивидуальные титры анти-CPS IgG для кроликов из данной группы определяли на основании порога, который рассчитывали по формуле: [Среднее значение OD пустого контроля × 2]. Наконец, рассчитывали геометрическое среднее титра (GMT) анти-CPS IgG, индуцированных Композицией А, Композицией В, Композицией С, Pnevnar 13™ и Плацебо (фиг. 1-5).

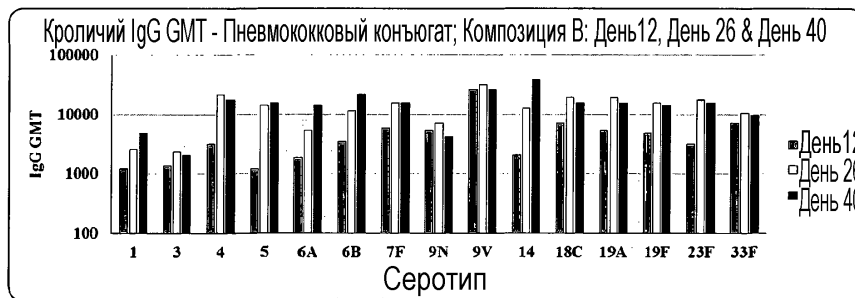
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция поливалентной пневмококковой конъюгированной вакцины, содержащая:
 - а) по меньшей мере 12 капсульных полисахаридов, выбранных из серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9N, 9V, 15B, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F *Streptococcus pneumoniae*, активированных CDAP и конъюгированных с белком-носителем, выбранным из CRM197, пневмококкового поверхностного протеина A (PspA), пневмококкового адгезина (PsaA), или их комбинацией и
 - б) фармацевтически приемлемый носитель, где композиция не содержит капсульного полисахарида серотипа 6A.
2. Композиция поливалентной пневмококковой конъюгированной вакцины, содержащая:
 - а) по меньшей мере 14 капсульных полисахаридов, выбранных из серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F *Streptococcus pneumoniae*, активированных CDAP и конъюгированных с белком-носителем, выбранным из CRM197, PspA, PsaA или их комбинацией и
 - б) фармацевтически приемлемый носитель, где композиция не содержит капсульного полисахарида серотипа 6A.
3. Композиция по п.1 или 2, дополнительно содержащая один или более капсульных полисахаридов серотипов, выбранных из 6C, 8, 10A, 11A, 12F, 15A, 23A, 23B и 35B *Streptococcus pneumoniae*.
4. Композиция по п.1 или 2, в которой количество полисахарида каждого из серотипов составляет 1-10 мкг.
5. Композиция по п.1 или 2, в которой количество белка-носителя, конъюгированного с полисахаридом, составляет 3-30 мкг.
6. Композиция по п.1, в которой однократная доза 0,5 мл содержит 2,0 мкг каждого полисахарида, 30-40 мкг белка-носителя CRM197, 0,2-1,0 мг адьюванта фосфата алюминия, хлорид натрия и буфер.
7. Композиция 14-валентной стерильной жидкой пневмококковой конъюгированной вакцины, содержащая 2,0 мкг каждого капсульного полисахарида серотипов 1, 3, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, 4,0 мкг серотипа 6B, причем каждый полисахарид индивидуально конъюгирован примерно с 32 мкг CRM197; 0,125 мг адьюванта элементарного алюминия (0,5 мг фосфата алюминия); и хлорид натрия и L-гистидиновый буфер, где композиция не содержит капсульного полисахарида серотипа 6A.
8. Композиция 13-валентной стерильной жидкой пневмококковой конъюгированной вакцины, содержащая по 2,0 мкг каждого капсульного полисахарида серотипов 1, 3, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F и 33F, 4,0 мкг серотипа 6B, причем каждый полисахарид индивидуально конъюгирован примерно с 32 мкг CRM197; 0,125 мг адьюванта элементарного алюминия (0,5 мг фосфата алюминия); и хлорид натрия и L-гистидиновый буфер, где композиция не содержит капсульного полисахарида серотипа 6A.
9. Композиция 13-валентной стерильной жидкой пневмококковой конъюгированной вакцины, содержащая по 2,0 мкг каждого капсульного полисахарида серотипов 1, 3, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F и 33F, 4,0 мкг серотипа 6B, причем каждый полисахарид индивидуально конъюгирован примерно с 32 мкг CRM197; 0,125 мг адьюванта элементарного алюминия (0,5 мг фосфата алюминия); и хлорид натрия и L-гистидиновый буфер, где композиция не содержит капсульного полисахарида серотипа 6A.
10. Способ получения композиции 13-валентной стерильной жидкой пневмококковой конъюгированной вакцины по п.8, включающий стадии:
 - а) конъюгации пневмококковых капсульных полисахаридов известного размера серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F и 33F, активированных с использованием CDAP, индивидуально с иммуногенным белком-носителем CRM197;
 - б) очистки полученных индивидуальных одновалентных пневмококковых конъюгатов путем диалитриции с последующей эксклюзионной хроматографией,
 - в) анализа фракций с помощью SEC-HPLC и объединения фракций, содержащих одновалентные пневмококковые конъюгаты, с последующей стерилизацией фильтрацией с использованием фильтра 0,2 мкм, и
 - г) смешивания одновалентных конъюгатов 13 серотипов *S. pneumoniae* из расчета 4 мкг для серотипа 6B и по 2,2 мкг для серотипов 1, 3, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F и 33F, и адьюванта Adju-Phos® вместе с соответствующим эксципиентом, в частности, буфером с получением композиции 13-валентной стерильной жидкой пневмококковой конъюгированной вакцины.
11. Способ получения композиции 14-валентной стерильной жидкой пневмококковой конъюгированной вакцины (PCV) по п.7, включающий стадии:
 - а) конъюгации пневмококковых капсульных полисахаридов известного размера серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, активированных с использованием CDAP, индивидуально с иммуногенным белком-носителем CRM197;
 - б) очистки полученных индивидуальных одновалентных пневмококковых конъюгатов путем диалитриции с последующей эксклюзионной хроматографией;
 - в) анализа фракций с помощью SEC-HPLC и объединения фракций, содержащих одновалентные пневмококковые конъюгаты, с последующей стерилизацией фильтрацией с использованием фильтра 0,2 мкм; и

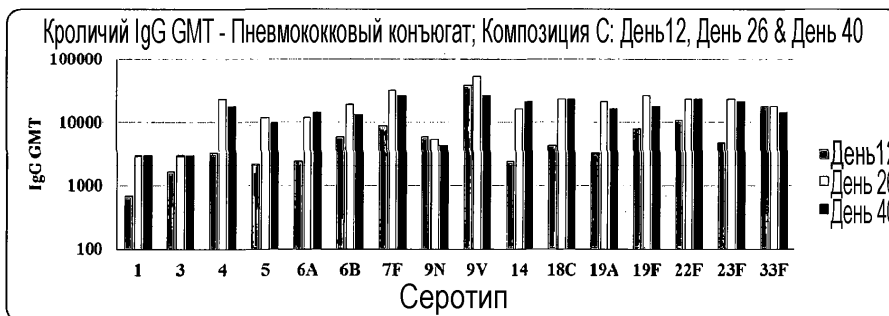
д) смешивания одновалентных конъюгатов 14 серотипов *S. pneumoniae* из расчета 4 мкг для серотипа 6В и по 2 мкг для серотипов 1, 3, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F, и адъюванта Adju-Phos® вместе с соответствующим эксципиентом, в частности, буфером с получением композиции 14-валентной стерильной жидкой пневмококковой конъюгированной вакцины.



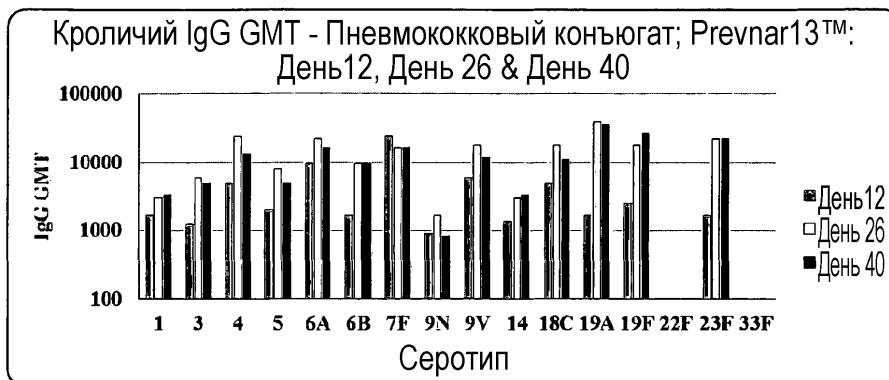
Фиг. 1



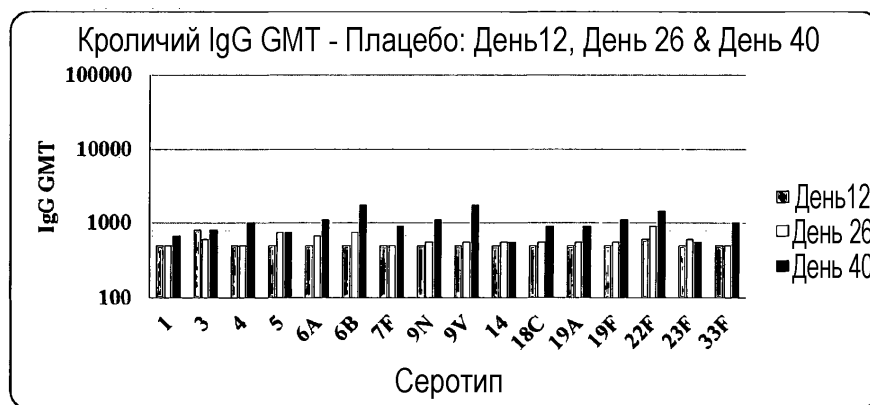
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

