

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190824** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.06.18

(22) Дата подачи заявки
2019.09.23

(51) Int. Cl. *A61K 39/09* (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)

(54) **ОЧИЩЕННЫЕ КАПСУЛЬНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE**

(31) **201841031653; 201841031654**

(32) **2018.09.23**

(33) **IN**

(86) **PCT/IB2019/058036**

(87) **WO 2020/058963 2020.03.26**

(71) Заявитель:
БАЙОЛОДЖИКАЛ И ЛИМИТЕД (IN)

(72) Изобретатель:

Бурки Раджендар, Кандималла Вивек

Бабу, Срираман Раджан, Матур

Рамеш Венкат, Мантена Нарендер

Дев, Датла Махима, Сангаредди

Веерапанду (IN)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к капсульным полисахаридам *Streptococcus pneumoniae*. Конкретнее, настоящее изобретение относится к очищенным капсульным полисахаридам заданного размера из серотипов 2, 15A, 15C и 35B *Streptococcus pneumoniae* и способу их получения.

202190824
A1

202190824

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567774EA/050

ОЧИЩЕННЫЕ КАПСУЛЬНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Эта заявка испрашивает приоритет по заявкам на патенты Индии с №№ 201841031653 и 201841031654, поданным 23 сентября 2018 года, которые таким образом включены сюда посредством ссылки в их полном объеме.

Область техники

Настоящее изобретение относится к очищенным капсульным полисахаридам *Streptococcus pneumoniae*. Конкретнее, настоящее изобретение относится к очищенным капсульным полисахаридам заданного размера из серотипов 2, 15А, 15С и 35В *Streptococcus pneumoniae* и способу их получения.

Предпосылки создания изобретения

Streptococcus pneumoniae представляет собой грамположительную бактерию, которая является основным возбудителем инвазивных инфекций у животных и людей, таких как сепсис, менингит, средний отит и крупозная пневмония. В ходе инфекционного процесса пневмококки легко связываются с не пораженными воспалением эпителиальными клетками верхних и нижних дыхательных путей человека, связываясь с эукариотическими углеводами лектиноподобным образом.

Пневмококк инкапсулируется с помощью химически связанного полисахарида, который придает серотипоспецифичность. Существует более 90 известных серотипов пневмококков, и капсула является основным фактором вирулентности пневмококков, поскольку капсула не только защищает внутреннюю поверхность бактерий от комплемента, но и сама является слабоиммуногенной. Уровень антител против полисахаридов считался прогностическим фактором защиты от инвазивной пневмококковой инфекции. В качестве вакцины полисахаридная оболочка пневмококка может обеспечивать приемлемую степень иммунитета к *Streptococcus pneumoniae* у индивидуумов со сформировавшимися или неповрежденными иммунными системами, но капсульный полисахарид, конъюгированный с подходящим белком-носителем, обеспечивает иммунный ответ у младенцев и пожилых людей, которые также подвержены наибольшему риску инфицирования пневмококками.

Пневмококковые вакцины включают пневмококковую полисахаридную вакцину и пневмококковые конъюгатные вакцины. Общепринято, что протективная эффективность коммерчески выпускаемой пневмококковой полисахаридной вакцины более или менее связана с концентрацией антител, индуцированных после вакцинации. Современные вакцины включают поливалентные пневмококковые полисахаридные вакцины (которые содержат пневмококковые полисахариды из двух или более серотипов) и пневмококковые конъюгатные вакцины.

Pneumovax[®]23 представляет собой поливалентную пневмококковую

полисахаридную вакцину и содержит неконъюгированные капсульные полисахариды из 23 серотипов пневмококков, включая серотипы 1, 2, 3, 4, 5, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 17F, 18С, 19F, 19А, 20, 22F, 23F и 33F. Pneumovax®23, лицензированный, доказал свою полезность в профилактике пневмококковой инфекции у взрослых, особенно пожилых людей и лиц из группы высокого риска. Однако младенцы и маленькие дети плохо реагируют на эти неконъюгированные пневмококковые полисахаридные вакцины.

Prevnar®-7 представляет собой вакцину на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок и включает полисахариды семи наиболее часто выделяемых серотипов (например, 4, 6В, 9V, 14, 18С, 19F и 23F, конъюгированные с CRM₁₉₇). С момента начала применения Prevnar®-7 в США в 2000 г. произошло значительное снижение инвазивной пневмококковой инфекции (IPD) у детей. 13-валентная конъюгатная вакцина Prevenar-13®, содержащая полисахариды тринадцати серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F и 23F, конъюгированные с CRM₁₉₇, была разработана и одобрена из-за ограничений охвата серотипов вакциной Prevnar®-7 в некоторых регионах мира.

Synflorix® представляет собой пневмококковую конъюгатную вакцину, которая включает десять полисахаридов серотипов 1, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 23F, конъюгированных с белком D (PD), серотипа 18С, конъюгированного со столбнячным анатоксином (ТТ), и серотипа 19F, конъюгированного с дифтерийным анатоксином (DT). Каждый из полисахаридов этих серотипов связан, используя тетрафторборат 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP) при контролируемом pH.

В патенте США с № 9492559В2 описывается иммуногенная композиция, содержащая по крайней мере один гликоконъюгат, выбранный из группы, состоящей из гликоконъюгата из серотипа 15В *Streptococcus pneumoniae*, гликоконъюгата из серотипа 22F *Streptococcus pneumoniae*, гликококонъюгата из серотипа 33F *Streptococcus pneumoniae*, гликококонъюгата из серотипа 12F *Streptococcus pneumoniae*, гликоконъюгата из серотипа 10А *Streptococcus pneumoniae*, гликоконъюгата из серотипа 11А *Streptococcus pneumoniae* и гликоконъюгата из серотипа 8 *Streptococcus pneumoniae*. В WO 2019/050813А1 описывается очищенный капсульный полисахарид из серотипа 16F *Streptococcus pneumoniae* и его конъюгат с белком.

В WO 2019/050814А1 описывается очищенный капсульный полисахарид из серотипов 23А и 23В *Streptococcus pneumoniae* и его конъюгат с белком.

В WO 2019/050815А1 описывается очищенный капсульный полисахарид из *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F и его конъюгат с белком.

В WO 2019/050816А1 описывается очищенный капсульный полисахарид из серотипа 31 *Streptococcus pneumoniae* и его конъюгат с белком.

Несмотря на эти вакцины, существует потребность в разработке дополнительных поливалентных пневмококковых вакцин на основе конъюгатов с полисахаридами, которые подвергнуты очистке и заданию размера простым и эффективным способом. Поэтому авторы настоящего изобретения просто и эффективно подвергли очистке и

заданию размера капсульные полисахариды серотипов 2, 15A, 15C и 35B *Streptococcus pneumoniae*.

Краткое описание настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к очищенному капсульному полисахариду заданного размера из серотипа 2 *Streptococcus pneumoniae*, имеющему среднюю молекулярную массу приблизительно от 50 до 1000 кДа.

Настоящее изобретение также относится к очищенному капсульному полисахариду заданного размера из серотипа 15A *Streptococcus pneumoniae*, имеющему среднюю молекулярную массу приблизительно от 50 до 1000 кДа.

Настоящее изобретение также относится к очищенному капсульному полисахариду заданного размера из серотипа 15C *Streptococcus pneumoniae*, имеющему среднюю молекулярную массу приблизительно от 50 до 1000 кДа.

Настоящее изобретение также относится к очищенному капсульному полисахариду заданного размера из серотипа 35B *Streptococcus pneumoniae*, имеющему среднюю молекулярную массу приблизительно от 50 до 1000 кДа.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1A: Одномерный (1D) спектр ^1H -ЯМР, 400 МГц, капсульного полисахарида серотипа 2 в D_2O при 50°C .

Фиг. 1B: Одномерная (1D) идентифицирующая область ^1H -ЯМР, используемая для идентификации серотипа 2.

Фиг. 2A: Одномерный (1D) спектр ^1H -ЯМР, 400 МГц, капсульного полисахарида серотипа 15A в D_2O при 50°C .

Фиг. 2B: Одномерная (1D) идентифицирующая область ^1H -ЯМР, используемая для идентификации серотипа 15A.

Фиг. 3A: Одномерный (1D) спектр ^1H -ЯМР, 400 МГц, капсульного полисахарида серотипа 15C в D_2O при 50°C .

Фиг. 3B: Одномерная (1D) идентифицирующая область ^1H -ЯМР, используемая для идентификации серотипа 15C.

Фиг. 4A: Одномерный (1D) спектр ^1H -ЯМР, 400 МГц, капсульного полисахарида серотипа 35B в D_2O при 50°C .

Фиг. 4B: Одномерная (1D) идентифицирующая область ^1H -ЯМР, используемая для идентификации серотипа 35B.

Фиг. 5A: SEC-HPLC хроматограмма (хроматограмма, полученная в ходе эксклюзионной ВЭЖХ), иллюстрирующая кинетику реакции конъюгации полисахарида серотипа 2 с CRM₁₉₇.

Фиг. 5B: SEC-HPLC хроматограмма, иллюстрирующая кинетику реакции конъюгации полисахарида серотипа 2 с PsaA.

Фиг. 6A: SEC-HPLC хроматограмма, иллюстрирующая кинетику реакции конъюгации (A) полисахарида серотипа 15A с CRM₁₉₇.

Фиг. 6B: SEC-HPLC хроматограмма, иллюстрирующая кинетику реакции

конъюгации полисахарида серотипа 15А с PsaA.

Фиг. 7А: SEC-HPLC хроматограмма, иллюстрирующая кинетику реакции конъюгации (А) полисахарида серотипа 15С с CRM₁₉₇.

Фиг. 7В: SEC-HPLC хроматограмма, иллюстрирующая кинетику реакции конъюгации полисахарида серотипа 15С с PsaA.

Фиг. 8А: SEC-HPLC хроматограмма, иллюстрирующая кинетику реакции конъюгации (А) полисахарида серотипа 35В с CRM₁₉₇.

Фиг. 8В: SEC-HPLC хроматограмма, иллюстрирующая кинетику реакции конъюгации полисахарида серотипа 35В с PsaA.

Фиг. 9: Титры антител в сыворотке кроликов, иммунизированных препаратом PCV.

Определения

На протяжении всего этого изобретения термины в единственном числе «а», «an» и «the» включают ссылки во множественном числе, если контекст явно не указывает иное. Точно так же, если значение слова «или» явно не ограничивается только одним элементом, исключая другие элементы, что касается списка из двух или более элементов, тогда использование «или» в таком списке следует интерпретировать как включение (а) любого отдельного элемента в списке, (b) всех элементов в списке, или (c) любой комбинации элементов в списке. Кроме того, используемые на протяжении всего этого изобретения термины «содержащий (включающий)» и подобные означают включение, по крайней мере, указанного(ых) признака(ов), так что любое большее числа таких же признаков и/или один или более дополнительных типов признаков не исключается. Кроме того, различные конкретные особенности, способы или характеристики могут быть объединены любым подходящим образом в одном или более вариантов осуществления.

Это изобретение, как подразумевается, не является исчерпывающим или не ограничивает настоящую технологию определенными формами, раскрытыми здесь. Хотя конкретные варианты осуществления раскрыты здесь с иллюстративной целью, возможны различные эквивалентные модификации без отклонения от настоящей технологии, как это будет понятно специалистам со средним уровнем компетентности в соответствующей области техники. В некоторых случаях хорошо известные структуры и функции не были указаны и/или описаны подробно во избежание излишнего отвлечения внимания от описания вариантов осуществления настоящей технологии. Хотя стадии способов могут быть представлены здесь в определенном порядке, в альтернативных вариантах осуществления стадии могут иметь другой подходящий порядок. Точно так же некоторые варианты осуществления настоящей технологии, раскрытые в контексте конкретных вариантов осуществления, могут быть объединены или исключены в других вариантах осуществления. Кроме того, хотя преимущества, связанные с некоторыми вариантами осуществления, могут быть раскрыты в контексте этих вариантов осуществления, другие варианты осуществления также могут демонстрировать такие преимущества, и не все варианты осуществления обязательно должны демонстрировать такие преимущества или другие преимущества, раскрытые здесь, чтобы находиться в пределах объема настоящей

технологии. Соответственно, это раскрытие и связанная с ним технология могут охватывать другие варианты осуществления, явно не указанные и/или не описанные здесь.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, в котором они обычно понимаются специалистом со средним уровнем компетентности в области, к которой относятся указанные способы.

Если предоставляется диапазон значений, понятно, что каждое промежуточное значение между верхним и нижним пределом этого диапазона и любое другое указанное или промежуточное значение в указанном диапазоне охватывается способами и композициями. Верхние и нижние пределы этих меньших диапазонов могут независимо включаться в меньшие диапазоны и также охватываются способами и композициями, с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включаются в способы, композиции и комбинации.

Используемый здесь термин «капсульный полисахарид» относится к слою полисахарида, внешнему по отношению к клеточной стенке серотипов 2, 15А, 15С и 35В *Streptococcus pneumoniae*, но прилегающему к ней.

Используемый здесь термин «белок-носитель» относится к любому белку, с которым полисахарид связан, присоединен или конъюгирован, обычно с целью усиления или облегчения обнаружения антигена иммунной системой. Примеры белков-носителей включают, но без ограничения этим, CRM₁₉₇, PsaA и столбнячный анатоксин.

Используемый здесь термин «конъюгат» или «конъюгированный» означает, что капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* ковалентно связан с белком-носителем.

Используемый в этом описании термин «полисахарид» относится к сложному углеводу, состоящему из сахаридных цепей, соединенных вместе гликозидными связями. Полисахарид может содержать по крайней мере 10, 20, 30, 40 или 50 или более сахаридов.

Используемый здесь термин «с заданным размером» или «задание размера» относится к уменьшению размера нативного полисахарида с помощью различных способов. Способы могут включать механические способы, такие как гомогенизация. Уменьшение размера нативного полисахарида или «задание размера» дает различные преимущества, которые включают: (1) придание большей гомогенности по сравнению с нативными полисахаридами, (2) возможность контроля соотношения полисахарида и белка в конъюгате, (3) возможность обеспечения полисахаридом заданного размера большей стабильности композиции. Для целей этого изобретения нативным капсульным полисахаридам серотипов 2, 15А, 15С и 35В *Streptococcus pneumoniae* были приданы размеры в виде средней молекулярной массы (Mw) от 50 до 1000 кДа.

Используемый здесь термин «молекулярная масса», или «размер молекулы», или «средний размер молекулы», или «средняя молекулярная масса» полисахарида относится к средневзвешенной молекулярной массе (Mw) полисахарида, определенной с помощью

MALLS (многоугольного рассеяния лазерного излучения).

Подробное описание настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к очищенным капсульным полисахаридам заданного размера серотипов 2, 15A, 15C и 35B *Streptococcus pneumoniae* и способу их получения.

Полисахариды в соответствии с настоящим изобретением получают путем культивирования *Streptococcus pneumoniae* в оптимизированной питательной среде в ферментере и лизиса клеток в конце ферментации путем добавления дезоксихолата натрия (DOC) или любого обычного лизирующего реагента. Собранный бульон лизата подвергается последующей очистке для удаления примесей, таких как белок, нуклеиновые кислоты, компоненты клеточной стенки и т.д.

После ферментации клеточный лизат с DOC центрифугируют на центрифуге периодического или непрерывного действия, и удаляют клеточный дебрис. pH бесклеточного бульона доводят до кислого состояния, и повышают температуру, после чего следует центрифугирование. После центрифугирования супернатант пропускают через фильтр глубинного типа, концентрируют и подвергают диафильтрации с использованием мембраны Ultra Filter (UF). Дополнительные примеси удаляют из препарата полисахарида (ретентата (концентрата)) путем добавления детергента(ов) с последующим центрифугированием. Впоследствии обработанный детергентом супернатант пропускают через угольный фильтр или колонку с активированным углем с последующим подверганием отфильтрованного полисахарида воздействию частиц SiO₂ и центрифугированием. Супернатант пропускают через фильтр глубинного типа, и глубинный фильтрат пропускают через угольный фильтр, а затем 0,22-0,6 мкм фильтр. Фильтрат концентрируют и подвергают диафильтрации на мембране Ultra-Filter и диафильтрации с использованием 0,5-2% раствора NaCl или в воде или буфере для получения полисахаридов, полученных по существу в чистом виде.

Очищенному полисахариду задают размер либо химически при высоком pH, либо механически с использованием гомогенизатора высокого давления. Препарат полисахарида заданного размера концентрируют до 5-25 мг/мл на мембране Ultra-Filter. Ретентат пропускают через 0,22-мкм фильтр и замораживают при температуре ниже -20°C.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предоставляются очищенные капсульные полисахариды заданного размера из серотипов 2, 15A, 15C и 35B *Streptococcus pneumoniae*, имеющие среднюю молекулярную массу (Mw) от 50 до 1000 кДа. Предпочтительно от 100 до 1000 кДа, от 200 до 800 кДа, от 250 до 600 кДа или от 300 до 400 кДа, от 70 до 150 кДа или от 75 до 125 кДа.

В некоторых вариантах осуществления очищенные капсульные полисахариды из серотипов 2, 15A, 15C и 35B *Streptococcus pneumoniae* до конъюгации имеют среднюю молекулярную массу от 50 кДа до 1000 кДа. В других таких вариантах осуществления полисахарид имеет среднюю молекулярную массу от 50 кДа до 750 кДа; от 50 кДа до 500

кДа; от 100 кДа до 1000 кДа; от 100 кДа до 750 кДа; от 100 кДа до 500 кДа.

Размер капсульных полисахаридов по настоящему изобретению уменьшают после процедур очистки, используя различные способы приведения размера до желаемого значения. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что очищенные капсульные полисахариды из серотипов 2, 15А, 15С и 35В, конъюгированные с белком-носителем, полученные в соответствии с настоящим изобретением, обладают высокой иммуногенностью.

В одном варианте осуществления капсульные полисахариды по настоящему изобретению включают полисахарид из серотипа 2 *Streptococcus pneumoniae*, имеющий среднюю молекулярную массу, составляющую приблизительно 80 кДа, 100 кДа, 200 кДа, 300 кДа, 400 кДа, 500 кДа, 700 кДа или 1000 кДа.

В одном варианте осуществления капсульные полисахариды по настоящему изобретению включают полисахарид из серотипа 15А *Streptococcus pneumoniae*, имеющий среднюю молекулярную массу, составляющую приблизительно 80 кДа, 100 кДа, 200 кДа, 300 кДа, 400 кДа, 500 кДа, 700 кДа или 1000 кДа.

В одном варианте осуществления капсульные полисахариды по настоящему изобретению включают полисахарид из серотипа 15С *Streptococcus pneumoniae*, имеющий среднюю молекулярную массу, составляющую приблизительно 80 кДа, 100 кДа, 200 кДа, 300 кДа, 400 кДа, 500 кДа, 700 кДа или 1000 кДа.

В одном варианте осуществления капсульные полисахариды по изобретению включают полисахарид из серотипа 35В *Streptococcus pneumoniae*, имеющий среднюю молекулярную массу, составляющую приблизительно 80 кДа, 100 кДа, 200 кДа, 300 кДа, 400 кДа, 500 кДа, 700 кДа или 1000 кДа.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предоставляется капсульный полисахарид заданного размера из серотипа 15А *Streptococcus pneumoniae*, характеризующийся содержанием глицерина в диапазоне 5-18%, предпочтительно 5-10%.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предоставляется капсульный полисахарид заданного размера из серотипа 15С *Streptococcus pneumoniae*, характеризующийся содержанием глицерина в диапазоне 5-18%, предпочтительно 5-10%.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предоставляется капсульный полисахарид заданного размера из серотипа 35В *Streptococcus pneumoniae*, характеризующийся содержанием ацетата в диапазоне 2-10%, предпочтительно 2-8%.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предоставляется капсульный полисахарид заданного размера из серотипа 15А *Streptococcus pneumoniae*, имеющий среднюю молекулярную массу от 50 до 1000 кДа и характеризующийся содержанием глицерина в диапазоне 5-18%.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предоставляется капсульный полисахарид заданного размера из серотипа 15С *Streptococcus pneumoniae*, имеющий среднюю молекулярную массу от 50 до 1000 кДа и характеризующийся содержанием глицерина в диапазоне 5-18%.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предоставляется выделенный капсульный полисахарид из серотипа 35В *Streptococcus pneumoniae*, имеющий среднюю молекулярную массу от 50 до 1000 кДа и характеризующийся содержанием ацетата в диапазоне 2-10%.

Присутствие боковых цепей глицерин-фосфата можно определить путем измерения глицерина с помощью высокоэффективной анионообменной хроматографии с импульсным амперометрическим детектированием (НРАЕС-PAD) после его высвобождения при обработке полисахарида плавиковой кислотой (HF).

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется пневмококковая конъюгатная вакцина, в которой очищенный полисахарид из серотипа 2 *Streptococcus pneumoniae*, имеющий среднюю молекулярную массу от 50 до 1000 кДа, конъюгирован с белком-носителем, выбранным из PsaA, CRM₁₉₇, PspA или столбнячного анатоксина (ТТ), причем композиция характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется пневмококковая конъюгатная вакцина, в которой очищенный полисахарид из серотипа 15А *Streptococcus pneumoniae*, имеющий среднюю молекулярную массу от 50 до 1000 кДа, конъюгирован с белком-носителем, выбранным из PsaA, CRM₁₉₇, PspA или столбнячного анатоксина (ТТ), причем композиция характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется пневмококковая конъюгатная вакцина, в которой очищенный полисахарид из серотипа 15С *Streptococcus pneumoniae*, имеющий среднюю молекулярную массу от 50 до 1000 кДа, конъюгирован с белком-носителем, выбранным из PsaA, CRM₁₉₇, PspA или столбнячного анатоксина (ТТ), причем композиция характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется пневмококковая конъюгатная вакцина, в которой очищенный полисахарид из серотипа 35В *Streptococcus pneumoniae*, имеющий среднюю молекулярную массу от 50 до 1000 кДа, конъюгирован с белком-носителем, выбранным из PsaA, CRM₁₉₇, PspA или столбнячного анатоксина (ТТ), причем композиция характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется иммуногенная композиция, содержащая по крайней мере один гликоконъюгат серотипа 2 *Streptococcus pneumoniae*, по крайней мере один гликоконъюгат серотипа 15А *Streptococcus pneumoniae*, по крайней мере один гликоконъюгат серотипа 15С

Streptococcus pneumoniae и по крайней мере один гликоконъюгат серотипа 35В *Streptococcus pneumoniae*.

В одном аспекте иммуногенная композиция по настоящему изобретению содержит, кроме того, гликоконъюгаты серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 14, 15В, 16F, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 31, 33F *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированные с белком-носителем, выбранным из PsaA, CRM197, PspA, столбнячного анатоксина (ТТ) или комбинации CRM₁₉₇ и PsaA, или комбинации CRM₁₉₇ и столбнячного анатоксина, или комбинации PsaA и столбнячного анатоксина, или комбинация CRM₁₉₇, PsaA и столбнячного анатоксина.

В другом аспекте иммуногенная композиция представляет собой 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18-, 19-, 20-, 22-, 24-, 25-валентную или более пневмококковую конъюгатную композицию.

В другом аспекте иммуногенная композиция является поливалентной и содержит восемь конъюгатов с пневмококковыми полисахаридами (является восьмивалентной), девять конъюгатов с пневмококковыми полисахаридами (является 9-валентной), десять конъюгатов с пневмококковыми полисахаридами (является 10-валентной), одиннадцать конъюгатов с пневмококковыми полисахаридами (является 11-валентной), двенадцать конъюгатов с пневмококковыми полисахаридами (является 12-валентной), тринадцать конъюгатов с пневмококковыми полисахаридами (является 13-валентной), четырнадцать конъюгатов с пневмококковыми полисахаридами (является 14-валентной), пятнадцать конъюгатов с пневмококковыми полисахаридами (является 15-валентной), шестнадцать конъюгатов с пневмококковыми полисахаридами (является 16-валентной), семнадцать конъюгатов с пневмококковыми полисахаридами (является 16-валентной), семнадцать конъюгатов с пневмококковыми полисахаридами (является 17-валентной), восемнадцать конъюгатов с пневмококковыми полисахаридами (является 18-валентной), девятнадцать конъюгатов с пневмококковыми полисахаридами (является 19-валентной), двадцать конъюгатов с пневмококковыми полисахаридами (является 20-валентной), двадцать один конъюгат с пневмококковыми полисахаридами (является 21-валентной), двадцать два конъюгата с пневмококковыми полисахаридами (является 22-валентной), двадцать три конъюгата с пневмококковыми полисахаридами (является 23-валентной), двадцать четыре конъюгата с пневмококковыми полисахаридами (является 24-валентной), двадцать пять конъюгатов с пневмококковыми полисахаридами (является 25-валентной), двадцать шесть конъюгатов с пневмококковыми полисахаридами (является 26-валентной).

В еще одном варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется иммуногенная композиция, содержащая очищенные капсульные полисахариды серотипов 2, 15А, 15С и 35В *Streptococcus pneumoniae*, имеющие среднюю молекулярную массу приблизительно от 50 до 1000 кДа, конъюгированные с белком-носителем.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенная композиция содержит полисахариды *Streptococcus pneumoniae*, причем размер полисахаридов этих серотипов задают с использованием коэффициента вплоть до x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9 или x10.

Термин «с размером, заданным с использованием коэффициента вплоть до x2» означает, что сахарид подвергается процессу, предназначенному для уменьшения размера сахара, но с сохранением размера, превышающего половину размера нативного полисахарида.

Полисахариды, которые не подвергаются процессу задания размера, называются нативными полисахаридами. Полисахарид может немного уменьшиться в размере во время обычных процедур очистки или в результате деградации во время конъюгации, и он все еще может называться нативным полисахаридом.

Размер капсульных полисахаридов можно уменьшить с помощью различных механических средств, известных в данной области техники, таких как методы высокого давления, такие как микрофлюидизация, Emulsiflex™, гомогенизация под высоким давлением, обработка ультразвуком или гомогенизация Gaulin.

Гомогенизация под высоким давлением обеспечивает высокие скорости сдвига за счет прокачки технологического потока через проточный канал с достаточно маленькими размерами. Скорость сдвига увеличивается за счет использования большего приложенного давления гомогенизации, а время воздействия может быть увеличено путем рециркуляции потока сырья через гомогенизатор.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется вакцинная композиция на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, содержащая капсульный полисахарид из серотипа 2 *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, причем конъюгат полисахарид-белок имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 500 кДа до приблизительно 10000 кДа и характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется вакцинная композиция на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, содержащая капсульный полисахарид из серотипа 15A *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, причем конъюгат полисахарид-белок имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 500 кДа до приблизительно 10000 кДа и характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется вакцинная композиция на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, содержащая капсульный полисахарид из серотипа 15C *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, причем конъюгат полисахарид-белок имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 500 кДа до приблизительно 10000 кДа и характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется вакцинная композиция на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, содержащая капсульный полисахарид из серотипа 35B *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, причем конъюгат полисахарид-белок имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 500 кДа до приблизительно 10000 кДа и характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

Конъюгат полисахарид-белок по настоящему изобретению имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 500 кДа до приблизительно 5000 кДа; от 1000 кДа до приблизительно 10000 кДа; от приблизительно 1500 кДа до приблизительно 15000 кДа; от приблизительно 2000 кДа до приблизительно 20000 кДа; от приблизительно 2500 кДа до приблизительно 25000 кДа; или от приблизительно 3000 кДа до приблизительно 30,000 кДа.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция, содержащая очищенные пневмококковые полисахариды и белки-носители, которая характеризуется процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В предпочтительном варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция, содержащая очищенные полисахариды из серотипов 2, 15A, 15C и 35B *Streptococcus pneumoniae*, имеющие среднюю молекулярную массу от 50 до 1000 кДа, конъюгированные с белком-носителем, выбранным из PsaA, CRM₁₉₇, PspA, столбнячного анатоксина (TT) или комбинации CRM₁₉₇ и PsaA, или комбинации CRM₁₉₇ и столбнячного анатоксина, или комбинации PsaA и столбнячного анатоксина, или комбинации CRM₁₉₇, PsaA и столбнячного анатоксина, причем композиция характеризуется процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция, содержащая очищенные капсульные полисахариды из одного или более серотипов пневмококков, каждый из которых по отдельности конъюгирован с белком-носителем, причем каждый конъюгат полисахарид-белок имеет среднюю молекулярную массу от приблизительно 1500 до приблизительно 15000 кДа.

В других вариантах осуществления очищенные пневмококковые полисахариды можно активировать (например, химически) перед конъюгацией с одним или более белков-носителей. Каждый активированный пневмококковый полисахарид может быть по отдельности конъюгирован с белком-носителем, образуя конъюгат полисахарид-белок (например, гликоконъюгат).

В некоторых вариантах осуществления очищенные пневмококковые полисахариды по настоящему изобретению можно химически активировать и впоследствии конъюгировать с белками-носителями в соответствии с известными методами, такими как методы, описанные в патентах США с №№ 4365170, 4673574 и 4902506. Например, пневмококковые полисахариды можно активировать путем окисления концевой гидроксильной группы до альдегида таким окислителем, как периодат (например, периодат натрия, периодат калия или йодная кислота), путем неспецифического окислительного расщепления одной или более vicинальных гидроксильных групп углеводов и образования одной или более реакционноспособных альдегидных групп.

Очищенные пневмококковые полисахариды по настоящему изобретению также можно активировать с помощью CDAP (тетрафторбората 1-циано-4-диметиламинопиридиния) и впоследствии конъюгировать с одним или более белков-носителей, таких как PsaA, CRM₁₉₇, PspA или их комбинация. В других вариантах осуществления пневмококковые полисахариды, активированные с помощью CDAP с образованием эфира циановой кислоты, можно непосредственно конъюгировать с одним или более белков-носителей или конъюгировать, используя спейсер (например, линкера). Спейсер может соединяться с аминогруппой белка-носителя. В некоторых вариантах осуществления спейсер может представлять собой цистамин или цистеамин, который образует тиолированный полисахарид, который может быть связан с белком-носителем посредством тиозфирной связи с активированным малеимидом белком-носителем (например, используя GMBS) или галогенацетилованным белком-носителем (например, используя йодацетимид, этилиодацетимида HCl, SIAB, SIA, SBAP и/или N-сукцинимидилбромацетат. В других вариантах осуществления эфир циановой кислоты связывают с использованием гександиамина или дигидразида адипиновой кислоты (ADH), а сахарид с дериватизированной аминогруппой конъюгируют с белком-носителем с использованием карбодиимидного (например, EDAC или EDC) химического метода через карбоксильную группу белка-носителя. Такие конъюгаты описаны в публикации PCT-заявки с № WO 93/15760, публикации PCT-заявки с № WO 95/08348, публикации PCT заявки с № WO 96/29094 и Chu et al., 1983, *Infect. Immunity* 40: 245-256.

Другие подходящие способы активации и/или связывания для использования с конъюгатами полисахарид-белок и вакцинными композициями по настоящему изобретению включают использование карбодиимидов, гидразидов, активных сложных эфиров, норборана, п-нитробензойной кислоты, N-гидроксисукцинимиды, S-NHS, EDC, TSTU и других способов, описанных в публикации PCT-заявки с № WO 98/42721. Например, конъюгация может включать карбонильный линкер, который может быть образован в результате реакции свободной гидроксильной группы сахара с CDI (смотрите Bethell et al., 1979, *J. Biol. Chem.* 254:2572-4; Hearn et al., 1981, *J. Chromatogr.* 218:509-18), с последующим связыванием с белком с образованием карбаматной связи. В некоторых вариантах осуществления аномерный конец может приводиться к первичной гидроксильной группе, необязательной защите/снятию защиты с первичной

гидроксильной группы, реакции первичной гидроксильной группы с CDI с образованием промежуточного продукта в виде карбамата CDI и связывания промежуточного продукта в виде карбамата CDI с аминогруппой белка.

Например, другие подходящие методы активации и/или связывания для использования с конъюгатами полисахарид-белок и вакцинными композициями по настоящему изобретению включают следующий метод: пневмококковые полисахариды заданного размера (например, приблизительно 6 мк полисахарида заданного размера с концентрацией, составляющей приблизительно 10 мг/мл) и CDAP (например, приблизительно 100 мг/мл в ацетонитриле (в отношении веса к объему) можно смешать в стеклянном сосуде в соотношении приблизительно 1 к приблизительно 1 (например, путем перемешивания в течение приблизительно 1 минуты). При необходимости pH раствора полисахарида можно довести (например, до приблизительно 9,25 с помощью приблизительно 0,2 М триэтиламина и перемешивания в течение 3 мин при комнатной температуре). Кроме того, PsaA (например, приблизительно 4 мг раствора с концентрацией, составляющей приблизительно 15 мг/мл) можно медленно добавить к активированным пневмококковым полисахаридам (например, в соотношении приблизительно 1 к приблизительно 1 (Ps: белок-носитель). pH реакции можно довести (например, приблизительно до 9,05, используя 0,2 М триметиламин), и реакция может быть продолжена (например, путем перемешивания в течение 5 часов при комнатной температуре). Реакционную смесь можно погасить (например, путем добавления глицина в избыточной концентрации).

В некоторых вариантах осуществления реакционная смесь может быть подвергнута диафильтрации с использованием мембраны (например, мембраны с номинальным отсечением по молекулярной массе (MWCO) = 100 К) и может быть очищена с помощью эксклюзионной хроматографии. Подвергнутые диафильтрации и очищенные фракции можно проанализировать, используя SEC-MALLS и антроновый метод. Анализируемые фракции, содержащие конъюгаты, можно объединить и подвергнуть стерилизации фильтрованием (например, используя 0,2-мкм фильтр).

После конъюгирования пневмококковых полисахаридов с одним или более белков-носителей конъюгаты полисахарид-белок могут быть очищены (например, обогащены по количеству конъюгата полисахарид-белок) различными способами. Эти способы включают, но без ограничения этим, операции концентрирования/диафильтрации, осаждение/элюирование, колоночную хроматографию и фильтрацию глубинного типа. Например, после очистки конъюгатов конъюгаты могут быть составлены для получения композиций на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок по настоящему изобретению, которые могут использоваться в качестве вакцин.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется 17-валентная пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция, содержащая полисахариды серотипов *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированные с белком-носителем, причем серотипы включают 2, 15A, 15C и 35B и дополнительные серотипы 1,

3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется 17-валентная пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция, содержащая полисахариды серотипов *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированные с белком-носителем, причем серотипы включают 2, 15A, 15C и 35B и дополнительные серотипы 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, причем белок-носитель выбран из PsaA, CRM₁₉₇, PspA, столбнячного анатоксина (ТТ).

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется 24-валентная пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция, содержащая полисахариды по крайней мере 3 серотипов пневмококков, выбранных из 2, 15A, 15C и 35B, и дополнительных серотипов, состоящих из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 14, 18C, 19A, 19F, 20A, 20B, 22F, 23F, 24F, 33F, причем полисахариды 24 серотипов конъюгированы с белком-носителем, причем белок-носитель выбран из PsaA, CRM₁₉₇, PspA, столбнячного анатоксина (ТТ) или комбинации CRM₁₉₇ и PsaA, или комбинации CRM₁₉₇ и столбнячного анатоксина, или комбинации PsaA и столбнячного анатоксина, или комбинации CRM₁₉₇, PsaA и столбнячного анатоксина.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется 24-валентная пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция, содержащая полисахариды по крайней мере 2 серотипов пневмококков, выбранных из 2, 15A, 15C и 35B, и дополнительных серотипов, состоящих из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, причем полисахариды 24 серотипов конъюгированы с белком-носителем, причем белок-носитель выбран из PsaA, CRM₁₉₇, PspA, столбнячного анатоксина (ТТ) или комбинации CRM₁₉₇ и PsaA, или комбинации CRM₁₉₇ и столбнячного анатоксина, или комбинации PsaA и столбнячного анатоксина, или комбинации CRM₁₉₇, PsaA и столбнячного анатоксина.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется поливалентная пневмококковая конъюгатная вакцинная композиция, содержащая полисахариды по крайней мере 2 серотипов пневмококков, выбранных из 2, 15A, 15C и 35B, и одного или более дополнительных серотипов, выбранных из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, причем полисахариды этих серотипов конъюгированы с белком-носителем, причем белок-носитель выбран из PsaA, CRM₁₉₇, PspA, столбнячного анатоксина (ТТ) или комбинации CRM₁₉₇ и PsaA, или комбинации CRM₁₉₇ и столбнячного анатоксина, или комбинации PsaA и столбнячного анатоксина, или комбинации CRM₁₉₇, PsaA и столбнячного анатоксина.

В некоторых вариантах осуществления настоящим изобретением предоставляется способ получения конъюгата полисахарид-белок пневмококковой вакцинной композиции, описанной здесь, причем способ включает, кроме того, составление конъюгата полисахарид-белок в пневмококковую вакцинную композицию, включающую адъювант, наполнитель и буфер.

В некоторых вариантах осуществления настоящим изобретением предоставляется способ получения конъюгата полисахарид-белок пневмококковой вакцинной композиции, описанной здесь, причем адъювант представляет собой фосфат алюминия.

В другом варианте осуществления вакцина или иммуногенная композиция по этому изобретению используется для профилактики инфекции, вызываемой штаммами *Streptococcus pneumoniae*.

В некоторых вариантах осуществления настоящим изобретением предоставляется способ лечения нуждающегося в этом субъекта, включающий введение пневмококковой вакцинной композиции, описанной здесь, нуждающемуся в этом субъекту.

В некоторых вариантах осуществления субъект страдает заболеванием, опосредованным *Streptococcus pneumoniae*, таким как инвазивная пневмококковая инфекция (IPD). В одном варианте осуществления субъект представляет собой человека, такого как младенец (в возрасте менее приблизительно 1 года), начинающий ходить ребенок (в возрасте от приблизительно 12 месяцев до приблизительно 24 месяцев), маленький ребенок (в возрасте от приблизительно 2 лет до приблизительно 5 лет), ребенок постарше (в возрасте от 5 до 13 лет), подросток (в возрасте от приблизительно 13 до приблизительно 18 лет), взрослый (в возрасте от 18 до 65 лет) или пожилой человек (в возрасте старше приблизительно 65 лет).

В некоторых вариантах осуществления настоящим изобретением предоставляется способ индукции иммунного ответа на конъюгат с капсульным полисахаридом из *Streptococcus pneumoniae*, включающий введение субъекту иммунологически эффективного количества пневмококковой конъюгатной вакцинной композиции, описанной здесь.

В одном варианте осуществления способ индукции иммунного ответа на конъюгат с капсульным полисахаридом из *Streptococcus pneumoniae* включает введение пневмококковой конъюгатной вакцинной композиции, описанной здесь, субъекту системно, подкожно и/или в слизистую оболочку.

В некоторых вариантах осуществления количество каждого конъюгата в дозе вакцинных композиций по настоящему изобретению является количеством, достаточным для индукции иммунопротективного ответа, такого как иммунопротективный ответ без значительных побочных эффектов. Хотя количество каждого конъюгата может меняться в зависимости от серотипа пневмококка, каждая доза вакцинных композиций может содержать от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 50 мкг каждого пневмококкового полисахарида, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 10 мкг или от приблизительно 1 мкг до приблизительно 5 мкг каждого пневмококкового полисахарида, конъюгированного с каждым белком-носителем, включая от приблизительно 1,5 мкг до приблизительно 5 мкг белка-носителя.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется вакцинная композиция на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок, содержащая от 0,1 мкг до приблизительно 10 мкг капсульного полисахарида из серотипа 2

Streptococcus pneumoniae, конъюгированного с 1,5 мкг -приблизительно 5 мкг белка-носителя, причем конъюгат полисахарид-белок имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 500 кДа до приблизительно 15000 кДа и характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется вакцинная композиция на основе конъюгата пневмококковой полисахарид-белок, содержащая от 0,1 мкг до приблизительно 10 мкг капсульного полисахарида из серотипа 15A *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированного с 1,5 мкг -приблизительно 5 мкг белка-носителя, причем конъюгат полисахарид-белок имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 500 кДа до приблизительно 15000 кДа и характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется вакцинная композиция на основе конъюгата пневмококковой полисахарид-белок, содержащая от 0,1 мкг до приблизительно 10 мкг капсульного полисахарида из серотипа 15C *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированного с 1,5 мкг - приблизительно 5 мкг белка-носителя, причем конъюгат полисахарид-белок имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 500 кДа до приблизительно 15000 кДа и характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется вакцинная композиция на основе конъюгата пневмококковой полисахарид-белок, содержащая от 0,1 мкг до приблизительно 10 мкг капсульного полисахарида из серотипа 35B *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированного с 1,5 мкг - приблизительно 5 мкг белка-носителя, причем конъюгат полисахарид-белок имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 500 кДа до приблизительно 15000 кДа и характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется вакцинная композиция на основе конъюгата пневмококковой полисахарид-белок, содержащая от 0,5 мкг до приблизительно 5 мкг капсульного полисахарида из серотипа 2 *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированного с 1,5 мкг - приблизительно 5 мкг белка-носителя CRM₁₉₇, причем конъюгат полисахарид-белок имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 500 кДа до приблизительно 15000 кДа и характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется вакцинная композиция на основе конъюгата пневмококковой полисахарид-белок, содержащая от 0,5 мкг до приблизительно 5 мкг капсульного полисахарида из серотипа

15A *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированного с 1,5 мкг - приблизительно 5 мкг белка-носителя CRM₁₉₇, причем конъюгат полисахарид-белок имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 500 кДа до приблизительно 15000 кДа и характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется вакцинная композиция на основе конъюгата пневмококковой полисахарид-белок, содержащая от 0,5 мкг до приблизительно 5 мкг капсульного полисахарида из серотипа 15C *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированного с 1,5 мкг - приблизительно 5 мкг белка-носителя CRM₁₉₇, причем конъюгат полисахарид-белок имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 500 кДа до приблизительно 15000 кДа и характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется вакцинная композиция на основе конъюгата пневмококковой полисахарид-белок, содержащая от 0,5 мкг до приблизительно 5 мкг капсульного полисахарида из серотипа 2 *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированного с 1,5 мкг - приблизительно 5 мкг белка-носителя PsaA, причем конъюгат полисахарид-белок имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 500 кДа до приблизительно 15000 кДа и характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется вакцинная композиция на основе конъюгата пневмококковой полисахарид-белок, содержащая от 0,5 мкг до приблизительно 5 мкг капсульного полисахарида из серотипа 15A *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированного с 1,5 мкг - приблизительно 5 мкг белка-носителя PsaA, причем конъюгат полисахарид-белок имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 500 кДа до приблизительно 15000 кДа и характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется вакцинная композиция на основе конъюгата пневмококковой полисахарид-белок, содержащая от 0,5 мкг до приблизительно 5 мкг капсульного полисахарида серотипа 15C *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированного с 1,5 мкг - приблизительно 5 мкг белка-носителя PsaA, причем конъюгат полисахарид-белок имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 500 кДа до приблизительно 15000 кДа и характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В другом варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется вакцинная композиция на основе конъюгата пневмококковой полисахарид-белок, содержащая от 0,5 мкг до приблизительно 5 мкг капсульного полисахарида из серотипа

35B *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированного с 1,5 мкг - приблизительно 5 мкг белка-носителя PsaA, причем конъюгат полисахарид-белок имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 500 кДа до приблизительно 15000 кДа и характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

В предпочтительном варианте осуществления настоящим изобретением предоставляется поливалентная конъюгатная вакцинная композиция, содержащая по крайней мере два полисахарида из серотипов 2, 15A, 15C и 35B *Streptococcus pneumoniae*, имеющих среднюю молекулярную массу от 50 до 1000 кДа, конъюгированных с белком-носителем, выбранным из PsaA, CRM₁₉₇, PspA, столбнячного анатоксина (ТТ), причем композиция характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2, и содержит дополнительные конъюгаты полисахарид-белок из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 14, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированные с белком-носителем, выбранным из PsaA, CRM₁₉₇, PspA, столбнячного анатоксина (ТТ) или комбинации белков-носителей.

Вакцинные композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок по настоящему изобретению могут быть изготовлены с использованием известных способов. Например, вакцинные композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок могут быть составлены с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем, например водой или физиологическим раствором. Кроме того, вакцинные композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок могут дополнительно включать одно или более из следующего: буфер, консервант или стабилизатор, полисорбат, адъювант, такой как соединение алюминия, например гидроксид алюминия, фосфат алюминия или гидроксифосфат алюминия и/или наполнитель для лиофилизации. Включение любого из вышеуказанных соединений в вакцинные композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок по настоящему изобретению может быть выбрано в зависимости от способа и пути введения нуждающемуся в этом субъекту и может дополнительно основываться на стандартной фармацевтической практике.

Вакцинные композиции на основе конъюгата пневмококковый полисахарид-белок по настоящему изобретению при введении субъекту индуцируют образование антител, способных связываться с серотипами 2, 15A, 15C и 35B *Streptococcus pneumoniae*, как определено с помощью стандартного анализа ELISA. ELISA проводился в соответствии с протоколом, предложенным ВОЗ. Вкратце, планшеты Maxisorp™ для ELISA покрывали PnCPS данного серотипа (1 мкг/50 мкл/лунку с использованием PBS; стерильного без эндотоксина с 0,02% азида натрия). Планшеты помещали в камеру с увлажненными бумажными полотенцами для увлажнения и инкубировали при 37°C±2°C в течение 5 час, затем планшеты хранили при 5°C±3°C до использования.

ПРИМЕРЫ

Следующие ниже примеры представлены для иллюстрации настоящего изобретения и предназначены только для иллюстративных целей и не должны истолковываться как ограничивающие объем изобретения.

Пример 1:

а. Получение капсульных полисахаридов из серотипов 2, 15А, 15С и 35В пневмококков.

Банки клеток - штаммов *Streptococcus pneumoniae* (для серотипов 2, 15А, 15С и 35В) были получены из Центра по контролю и профилактике заболеваний, США.

Приготовление предпосевной культуры:

0,4 мкл изолята культуры (*Streptococcus pneumoniae* серотипа 2) инокулировали в 60 мл полной среды Mueller-Hinton (МН). Колбу с инокулятом инкубировали в течение 2-8 часов при $35\pm 1^\circ\text{C}$, $5\pm 0,5\%$ CO_2 . Образцы отбирали и проверяли на оптическую плотность при 600 нм. Как только желаемая ОП достигала $0,8\pm 0,2$, образцы отбирали и проверяли на рН и окрашивание по Граму.

Приготовление посевного материала:

После подтверждения чистоты предпосевной культуры с помощью микроскопии (окрашивание по Граму) 40 мл предпосевной культуры инокулировали в литровую колбу, содержащую 760 мл среды МН. Инокулированный посевной материал инкубировали в течение 3-11 часов при $35\pm 1^\circ\text{C}$, $5\pm 0,5\%$ CO_2 . Образцы отбирали и проверяли на оптическую плотность (ОП) при 600 нм. Как только желаемая ОП достигала 4 ± 2 , образцы отбирали для окрашивания по Граму, рН. Чистоту подтверждали посевом на чашку с кровавым агаром.

Ферментация/культивирование:

750 мл посевного материала инокулировали в 15 литров среды МН, и добавляли 30-50% глюкозы со скоростью 3-5 мл в минуту до тех пор, пока ОП при 600 нм не достигала 6 ± 2 при $35\pm 1^\circ\text{C}$ при скорости вращения 100-140 оборотов в минуту (об./мин) при рН $7,1\pm 0,3$.

Инактивация:

13% исходный раствор дезоксихолата натрия (DOC) добавляли к бульону ферментера для инактивации культурального бульона и инкубировали в течение 10 ± 2 час.

Центрифугирование:

Культуру, обработанную DOC, собирали и центрифугировали при относительной центробежной силе (RCF) = 14000 при 20°C . После центрифугирования супернатант собирали и обрабатывали для стадий очистки.

в. Очистка капсульных полисахаридов серотипа 2 пневмококков

Лизат клеток *Streptococcus pneumoniae* серотипа 2 с DOC центрифугировали на центрифуге периодического действия, и клеточный дебрис удаляли. Затем рН бесклеточного бульона доводили до 5,0, инкубировали в течение 4 часов и центрифугировали в течение 45 минут при $14000\times g$. После центрифугирования

супернатант пропускали через фильтр глубинного типа. Затем фильтрат подвергали концентрированию до 4,2х и диафильтрации (4-15 объемов для диафильтрации), используя мембрану Ultra-Filter с MWCO=30-300 кДа. Дополнительные примеси удаляли из препарата полисахарида (ретентата) путем добавления детергента (1% СТАВ), и инкубацию осуществляли в течение 30-90 минут при 6°C с последующим центрифугированием в течение 15-60 минут при 9000-14500хg. Впоследствии обработанный СТАВ супернатант пропускали через колонку с активированным углем (препарат полисахарида с концентрацией 30-300 г/л). Пропущенный через уголь препарат полисахарида подвергали воздействию частиц SiO₂ (диоксида кремния) (3-10%, с солью) и инкубировали в течение 15-120 минут при 2-40°C с последующим центрифугированием в течение 15-60 мин при 9000-14500хg. Супернатант пропускали через 2-50 мкм фильтр глубинного типа, а глубинный фильтрат пропускали через угольный фильтр, а затем через 0,22-0,6 мкм фильтр. Затем фильтрат (0,22-0,6 мкм) подвергали концентрированию и диафильтрации на мембране Ultra-Filter с MWCO=30-300 кДа и подвергали диафильтрации с использованием 0,5-2% раствора NaCl или без соли в воде или буфере для получения капсульного полисахарида серотипа 2 в по существу чистом виде.

Очистку капсульных полисахаридов серотипов 15А и 15С пневмококков выполняли с использованием процедуры, аналогичной процедуре, описанной выше для серотипа 2.

с. Очистка капсульных полисахаридов серотипа 35В пневмококка

Лизат клеток Streptococcus pneumoniae серотипа 35В с DOC центрифугировали на центрифуге периодического действия, и клеточный дебрис удаляли. Затем pH бесклеточного бульона доводили до 5,0, инкубировали в течение 4 часов и центрифугировали в течение 45 минут при 14000хg. После центрифугирования супернатант пропускали через фильтр глубинного типа. Затем фильтрат подвергали концентрированию до 7,5х и диафильтрации (4-15 объемов для диафильтрации), используя мембрану Ultra-Filter с MWCO=30-300 кДа. Дополнительные примеси удаляли из препарата полисахарида (ретентата) путем добавления детергента (1% СТАВ), и инкубацию осуществляли в течение 30-90 минут при 6°C с последующим центрифугированием в течение 15-60 минут при 9000-14500хg. Впоследствии обработанный СТАВ супернатант пропускали через колонку с активированным углем (препарат полисахарида с концентрацией 30-300 г/л). Пропущенный через уголь препарат полисахарида подвергали воздействию частиц SiO₂ (диоксида кремния) (3-10%, с солью) и инкубировали в течение 15-120 минут при 2-40°C с последующим центрифугированием в течение 15-60 минут при 9000-14500хg. Супернатант пропускали через 2-50 мкм фильтр глубинного типа, а глубинный фильтрат пропускали через угольный фильтр, а затем через 0,22-0,6 мкм фильтр. Затем фильтрат (0,22-0,6 мкм) подвергали концентрированию и диафильтрации на мембране Ultra-Filter с MWCO=30-300 кДа и подвергали диафильтрации с использованием 0,5-2% раствора NaCl или без соли в воде или буфере для получения капсульного полисахарида серотипа 35В в по существу чистом виде.

d. Задание размера очищенного капсульного полисахарида из серотипа 2 пневмококков

Задание размера очищенного капсульного полисахарида серотипа 2 пневмококков, полученного выше, осуществляли механически с использованием гомогенизатора высокого давления при 1000 бар в течение 1-20 циклов. Препарат полисахарида заданного размера снова концентрировали до 15 мг/мл на мембране Ultra-Filter с MWCO=30 кДа. Ретентат пропускали через 0,22-мкм фильтр и замораживали при температуре ниже -20°C.

Задание размера капсульного полисахарида из серотипа 35В пневмококков осуществляли с использованием процедуры, аналогичной процедуре, описанной выше для серотипа 2.

e. Задание размера очищенного капсульного полисахарида из серотипа 15А пневмококков

Задание размера очищенного капсульного полисахарида из серотипа 15А пневмококков осуществляли механически с использованием гомогенизатора высокого давления при 1500 бар в течение 1-20 циклов. Препарат полисахарида заданного размера из серотипа 15А пневмококков снова концентрировали до 15 мг/мл на мембране Ultra-Filter с MWCO=30 кДа. Ретентат пропускали через 0,22-мкм фильтр и замораживали при температуре ниже -20°C.

f. Задание размера очищенного капсульного полисахарида из серотипа 15С пневмококков.

Задание размера очищенного капсульного полисахарида из серотипа 15С пневмококков осуществляли механически с использованием гомогенизатора высокого давления при 1200 бар в течение 1-20 циклов. Препарат полисахарида заданного размера из серотипа 15С пневмококков снова концентрировали до 15 мг/мл на мембране Ultra-Filter с MWCO=30 кДа. Ретентат пропускали через 0,22-мкм фильтр и замораживали при температуре ниже -20°C.

ЯМР-анализы структуры капсульных полисахаридов серотипов 2, 15А и 15С пневмококков.

Подтверждение идентичности полисахаридов серотипов 2, 15А и 15С осуществляли с помощью ЯМР-анализа. Анализ проводили, основываясь на методологии, опубликованной в Abeysunawardana et.al., Development and Validation of an NMR based Identity Assay for polysaccharides, Analytical Biochemistry, 279, 226-240 (2000). На основании данных ЯМР на фиг. 1-3 аномерная область спектров ЯМР подтверждает идентичность полисахаридов, и пики идентифицированы для сахаров, содержащихся в соответствующих полисахаридах серотипов 2, 15А и 15С.

ЯМР-анализы структуры капсульных полисахаридов серотипа 35В пневмококков

Подтверждение идентичности полисахаридов серотипа 35В проводили с помощью ЯМР-анализа. Анализ проводили, основываясь на методологии, опубликованной в Abeysunawardana et.al., Development and Validation of an NMR based Identity Assay for

polysaccharides, Analytical Biochemistry, 279, 226-240 (2000). На основании данных ЯМР на фиг. 4. Приписывание пиков в ¹H-ЯМР-спектрах серотипа 35В было выполнено в соответствии с опубликованными данными в L. M. Beynon., J. C. Richards., M. V. Perry., P. J. Kniskern, Characterization of the capsular antigen of Streptococcus pneumoniae serotype 35В, Canadian Journal of Chemistry, 73(1): 41-48 (1995).

Основные характеристики очищенных полисахаридов заданного размера из пневмококков серотипов 2, 15А, 15С и 35В, полученных, как описано выше, упомянуты в таблице 1 ниже.

Таблица 1

Сероти п	До задания размера	После задания размера						
	Средня я молеку лярная масса (кДа)	Средня я молеку лярная масса (кДа)	% приме си белков	% приме си нукле иновы х кислот	% CWP S	О- Ацети л (%)	Гексозами н (%)	Содер жание глице рина (%)
2	545	261	<1	0,1	0,82	NA	NA	NA
15А	813	187	<1	0,09	1,88	<0.5	22.15	7,53
15С	649	202	<1	0,01	0,38	<0.5	13	8,12
35В	343	229	<1	0,12	0,71	5.47	13	N.A.

NA - нет данных

Пример 2: Приготовление белков-носителей

а. Получение CRM₁₉₇

CRM₁₉₇ можно получить рекомбинантными методами в соответствии со способами, описанными в патенте США с № 5614382. Альтернативно, CRM₁₉₇ получают рекомбинантно в соответствии со способами, известными в литературе, или в соответствии со способом, раскрытым в публикации РСТ-заявки WO 2016/079755, WO 2017/081700 и WO 2018/193475. CRM₁₉₇ можно очистить с помощью ультрафильтрации, осаждения сульфатом аммония и ионообменной хроматографии, способов, хорошо известных в данной области техники.

б. Получение PsaA

Ген PsaA амплифицировали с помощью ПЦР из Streptococcus pneumoniae серотипа 4 без его гидрофобной лидерной пептидной последовательности. Последовательность гена была проверена и клонирована в Escherichia coli с использованием вектора, созданного собственными силами (pVE66) для более высокой экспрессии.

Исходную культуру, кодирующую ген PsaA, в глицерине оживляли в 20 мл среды LB, содержащей 1 мл исходной культуры в глицерине, в конической колбе на 150 мл. Культуру инкубировали в течение приблизительно 6 час при 37°C и скорости вращения 200 об./мин до конечной ОП_{600нм} не менее 3,5. Оживленную культуру переносили в 1 л посевной культуры в конической колбе на 5 л. Культуру выращивали в течение приблизительно 10 час при 37°C и скорости вращения 200 об./мин до конечной ОП_{600нм}, равной 3. Посевную культуру в асептических условиях переносили в ферментер объемом 20 л, содержащий следующие компоненты среды: НуPeptone 6 г/л, дрожжевой экстракт 12 г/л, гидроортофосфат калия 13,5 г/л, гидрофосфат аммония 4 г/л, лимонную кислоту 1,7 г/л, MgSO₄·7H₂O 1,2 г/л, глюкозу 4 г/л, тиамина HCl 10 мг/л вместе с 1 мл/л микроэлементов (например, микроэлементов для 100 мл композиции: FeCl₃ 2,7 г, ZnCl₂ 0,2 г, CoCl₂·6H₂O 0,2 г, Na₂MoO₄·2H₂O 0,2 г, CuSO₄ 5H₂O 0,1 г, борная кислота 0,05 г, CaCl₂ 2H₂O 0,1 г, концентрированная, HCl 10 мл.). Начальная ферментация началась с ОП_{600нм}=0,2. pH поддерживали на уровне 7±0,2 на протяжении всей ферментации с помощью 20% ортофосфорной кислоты и 12,5% гидроксида аммония. Когда уровень глюкозы опускался ниже 0,5 г/л, начинали периодическую подпитку с постоянной скоростью 3-4 г/л/час, содержание O₂ поддерживали на уровне >20% на протяжении всей ферментации с помощью обогащения кислородом. Клетки выращивали в ферментере, и осадок клеток собирали центрифугированием. Клетки лизировали с использованием устройства для разрушения клеток (Panda). Лизат центрифугировали при 100000xg, осветленный супернатант подвергали очистке.

Очистку PsaA проводили аналогично процедуре, описанной в Larentis et.al, 2011 (Protein expression and Purification 78 (2011) 38). Очистку дополнительно оптимизировали с использованием смешанной хроматографии (на керамическом гидроксипатите типа II) после DEAE для достижения более высокой степени чистоты PsaA.

Анионообменная хроматография: 30 мл смолы DEAE-сефарозы (GE) помещали в колонку XK16/20. Смолу промывали 5 объемами колонки стерильной дистиллированной воды, а затем 10 объемами колонки 20 mM Трис, 1 mM EDTA, pH 8,0 (буфера для уравнивания). 30 мл супернатанта разбавляли до 100 мл буфером для уравнивания и загружали в колонку, и несвязавшийся материал собирали. Колонку промывали 5 объемами буфера для уравнивания. PsaA элюировали 12 объемами линейного градиента (0-100% В). (Буфер А содержит 20 mM Трис, 1 mM EDTA, pH 8,0; Буфер В - 20 mM Трис, 1 mM EDTA, 250 mM NaCl, pH 8,0.) Затем колонки промывали 20 mM Трис, 1 mM EDTA, 1 M NaCl pH 8,0.

Смешанная (мультимодалная) хроматография:

25 мл керамического гидроксипатита типа II (СНТ-II) набивали в колонку. Смолу промывали объемами стерильной дистиллированной воды, а затем 10 объемами 20 mM Трис, pH 6,8. Фракции элюирования со смолы DEAE, которые показали четкую основную видимую полосу, соответствующую приблизительно 37 кДа, с хорошей концентрацией PsaA при электрофорезе в SDS-ПААГ, объединяли и загружали на смолу СНТ-II.

Несвязавшийся материал собирали, и колонку промывали 5 объемами колонки буфера для уравнивания. Белок элюировали ступенчатым градиентом 5 объемов колонки (15% В, 20% В, 50% В и 100% В). Буфер А содержит 20 мМ Трис рН 6,8, а буфер В содержит 250 мМ фосфатный буфер рН 6,8.

Все фракции элюирования, показывающие четкую полосу ожидаемого размера PsaA, объединяли, концентрировали с помощью кассеты с MWCO=10 кДа и подвергали диафильтрации против 20 мМ фосфатного буфера, рН 7,5. Очищенный белок наносили на SDS-ПААГ для электрофореза для оценки степени чистоты.

Пример 3: Конъюгирование капсульных полисахаридов из серотипов 2, 15А, 15С и 35В пневмококков.

а. Конъюгирование капсульных полисахаридов из серотипа 2 пневмококков с CRM₁₉₇

1000 мг (200 мл с концентрацией 5,0 мг/мл) полисахарида механически уменьшенного размера серотипа 2 и 5,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (в отношении веса к объему)) смешивали в стеклянной колбе в соотношении 1,0:0,5 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. рН раствора полисахарида доводили до 9,0 с помощью 12,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (RT). 1000 мг CRM (66,7 мл с концентрацией 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:1,0 (PnPs:CRM).

рН реакции доводили до 9,0 с помощью 2,8 мл 0,2 М триэтиламина, и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 часов при комнатной температуре с последующим гашением реакции путем добавления глицина в избыточной концентрации (100 мМ). Кинетику реакций конъюгации (фиг. 5А) контролировали с помощью SEC-HPLC каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрированию, используя мембрану TFF с MWCO=100 кДа. Концентрат очищали с помощью эксклюзионной хроматографии. Фракции анализировали с помощью SEC-MALLS, антронового метода, и фракции, содержащие конъюгаты, объединяли и подвергали стерилизации фильтрованием с помощью 0,2-м фильтров. Средняя молекулярная масса полученного конъюгата составляла 8168 кДа.

б. Конъюгирование капсульных полисахаридов из серотипа 2 пневмококков с PsaA

1000 мг (200 мл с концентрацией 5,0 мг/мл) полисахарида механически уменьшенного размера серотипа 2 и 5,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (в отношении веса к объему)) смешивали в стеклянной колбе в соотношении 1,0:0,5 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. рН раствора полисахарида доводили до 9,0 с помощью 16 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (RT). 800 мг PsaA (53,33 мл с концентрацией 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:0,8 (PnPs:PsaA).

рН реакции доводили до 9,0 с помощью 3,5 мл 0,2 М триэтиламина, и реакцию

продолжали при перемешивании в течение 3-5 часов при комнатной температуре с последующим гашением реакции путем добавления глицина в избыточной концентрации (100 мМ). Кинетику реакций конъюгации (фиг. 5B) контролировали с помощью SEC-HPLC каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрированию, используя мембрану TFF с MWCO=100 кДа. Концентрат очищали с помощью эксклюзионной хроматографии. Фракции анализировали с помощью SEC-MALLS, антронового метода, и фракции, содержащие конъюгаты, объединяли и подвергали стерилизации фильтрованием с помощью 0,2-м фильтров. Средняя молекулярная масса полученного конъюгата составляла 6295 кДа.

с. Конъюгирование капсульных полисахаридов из серотипа 15А пневмококков с CRM₁₉₇.

1000 мг (66,7 мл с концентрацией 15,0 мг/мл) полисахарида механически уменьшенного размера серотипа 15А и 10,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (в отношении веса к объему)) смешивали в стеклянной колбе в соотношении 1,0:1,0 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 с помощью 18,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (RT). 1000 мг CRM197 (53,3 мл с концентрацией 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:0,8 (PnPs:CRM).

pH реакции доводили до 9,0 с помощью 1,0 мл 0,2 М триэтиламина, и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 часов при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением глицина в избыточной концентрации (100 мМ). Кинетику реакций конъюгации (фиг. 6А) контролировали с помощью SEC-HPLC каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрированию, используя мембрану TFF с MWCO=100 кДа. Концентрат очищали с помощью эксклюзионной хроматографии. Фракции анализировали с помощью SEC-MALLS, антронового метода, и фракции, содержащие конъюгаты, объединяли и подвергали стерилизации фильтрованием с помощью 0,2-м фильтров. Средняя молекулярная масса полученного конъюгата составляла 4272 кДа.

d. Конъюгирование капсульных полисахаридов из серотипа 15А пневмококков с PsaA

1000 мг (7,14 мл с концентрацией 14,0 мг/мл) полисахарида механически уменьшенного размера серотипа 15А и 10,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (в отношении веса к объему)) смешивали в стеклянной колбе в соотношении 1,0:1,0 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 с помощью 20,5 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (RT). 1000 мг PsaA (66,6 мл с концентрацией 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:1,0 (PnPs:PsaA).

pH реакции доводили до 9,0 с помощью 0,9 мл 0,2 М триэтиламина, и реакцию

продолжали при перемешивании в течение 3-5 часов при комнатной температуре с последующим гашением реакции путем добавления глицина в избыточной концентрации (100 мМ). Кинетику реакций конъюгации (фиг. 6B) контролировали с помощью SEC-HPLC каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрированию, используя мембрану TFF с MWCO=100 кДа. Концентрат очищали с помощью эксклюзионной хроматографии. Фракции анализировали с помощью SEC-MALLS, антронового метода, и фракции, содержащие конъюгаты, объединяли и подвергали стерилизации фильтрованием с помощью 0,2-м фильтров. Средняя молекулярная масса полученного конъюгата составляла 9776 кДа.

е. Конъюгирование капсульных полисахаридов из серотипа 15С пневмококков с CRM₁₉₇.

1000 мг (100,0 мл с концентрацией 10,0 мг/мл) полисахарида механически уменьшенного размера серотипа 15С и 15,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (в отношении веса к объему)) смешивали в стеклянной колбе в соотношении 1,0:1,5 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 с помощью 24,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (RT). 1000 мг CRM₁₉₇ (66,6 мл с концентрацией 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:1,0 (PnPs:CRM).

pH реакции доводили до 9,0 с помощью 2,8 мл 0,2 М триэтиламина, и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 часов при комнатной температуре с последующим гашением реакции путем добавления глицина в избыточной концентрации (100 мМ). Кинетику реакций конъюгации (фиг. 7A) контролировали с помощью SEC-HPLC каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрированию, используя мембрану TFF с MWCO=100 кДа. Концентрат очищали с помощью эксклюзионной хроматографии. Фракции анализировали с помощью SEC-MALLS, антронового метода, и фракции, содержащие конъюгаты, объединяли и подвергали стерилизации фильтрованием с помощью 0,2-м фильтров. Средняя молекулярная масса полученного конъюгата составляла 10490 кДа.

f. Конъюгирование капсульных полисахаридов из серотипа 15С пневмококков с PsaA.

1000 мг (100,0 мл с концентрацией 10,0 мг/мл) полисахарида механически уменьшенного размера серотипа 15С и 15,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (в отношении веса к объему)) смешивали в стеклянной колбе в соотношении 1,0:1,5 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 с помощью 24,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (RT). 1000 мг PsaA (66,6 мл с концентрацией 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:1,0 (PnPs:PsaA).

pH реакции доводили до 9,0 с помощью 2,8 мл 0,2 М триэтиламина, и реакцию

продолжали при перемешивании в течение 3-5 часов при комнатной температуре с последующим гашением реакции путем добавления глицина в избыточной концентрации (100 мМ). Кинетику реакций конъюгации (фиг. 7B) контролировали с помощью SEC-HPLC каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрированию, используя мембрану TFF с MWCO=100 кДа. Концентрат очищали с помощью эксклюзионной хроматографии. Фракции анализировали с помощью SEC-MALLS, антронового метода, и фракции, содержащие конъюгаты, объединяли и подвергали стерилизации фильтрованием с помощью 0,2-м фильтров. Средняя молекулярная масса полученного конъюгата составляла 8719 кДа

g. Конъюгирование капсульных полисахаридов из серотипа 35B пневмококков с CRM₁₉₇

1000 мг (100,0 мл с концентрацией 10,0 мг/мл) полисахарида механически уменьшенного размера серотипа 35B и 5,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (в отношении веса к объему)) смешивали в стеклянной колбе в соотношении 1,0:0,5 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 с помощью 5,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (RT). 1000 мг CRM₁₉₇ (66,7 мл с концентрацией 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:1,0 (PnPs:CRM).

pH реакции доводили до 9,0 с помощью 1,6 мл 0,2 М триэтиламина, и реакцию продолжали при перемешивании в течение 3-5 часов при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением глицина в избыточной концентрации (100 мМ). Кинетику реакций конъюгации (фиг. 8A) контролировали с помощью SEC-HPLC каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрированию, используя мембрану TFF с MWCO=100 кДа. Концентрат очищали с помощью эксклюзионной хроматографии. Фракции анализировали с помощью SEC-MALLS, антронового метода, и фракции, содержащие конъюгаты, объединяли и подвергали стерилизации фильтрованием с помощью 0,2-м фильтров. Средняя молекулярная масса полученного конъюгата составляла 8572 кДа

h. Конъюгирование капсульных полисахаридов из серотипа 35B пневмококков с PsaA

1000 мг (142,8 мл с концентрацией 7,0 мг/мл) полисахарида механически уменьшенного размера серотипа 35B и 6,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонитриле (в отношении веса к объему)) смешивали в стеклянной колбе в соотношении 1,0:0,6 (PS:CDAP) и перемешивали в течение 1 мин. pH раствора полисахарида доводили до 9,0 с помощью 7,0 мл 0,2 М триэтиламина и перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре (RT). 1000 мг PsaA (66,6 мл с концентрацией 15,0 мг/мл) медленно добавляли к активированному полисахариду в соотношении 1,0:1,0 (PnPs:PsaA).

pH реакции доводили до 9,0 с помощью 2,2 мл 0,2 М триэтиламина, и реакцию

продолжали при перемешивании в течение 3-5 часов при комнатной температуре с последующим гашением реакции добавлением глицина в избыточной концентрации (100 мМ). Кинетику реакций конъюгации (фиг. 8В) контролировали с помощью SEC-HPLC каждый час реакции.

Реакционную смесь подвергали диафильтрации и концентрированию, используя мембрану TFF с MWCO=100 кДа. Концентрат очищали с помощью эксклюзионной хроматографии. Фракции анализировали с помощью SEC-MALLS, антронового метода, и фракции, содержащие конъюгаты, объединяли и подвергали стерилизации фильтрованием с помощью 0,2-м фильтров. Средняя молекулярная масса полученного конъюгата составляла 6944 кДа.

ПРИМЕР 4: Приготовление вакцины на основе конъюгата пневмококковой капсульной полисахарид-белок

Поливалентную конъюгатную вакцину готовили в виде дозы 0,5 мл, содержащей 2,2 мкг полисахарида каждого из серотипов 2, 15А, 15С и 35В пневмококков, конъюгированного с ~8-10 мкг белка CRM₁₉₇, полученного в примере 3. Все конъюгаты были адсорбированы на фосфате алюминия в виде геля, эквивалентном 0,5 мг Al³⁺ на дозу 0,5 мл. Физический раствор 0,9% (в отношении веса к объему) использовали в качестве разбавителя и носителя для приготовления препарата, и pH конечного препарата доводили до pH 6 с помощью 1 н соляной кислоты. Для эффективной адсорбции после доведения pH препарат перемешивали в течение 2 часов при постоянном перемешивании. После 2 часов перемешивания полученной смесью в асептических условиях наполняли стерильные несиликонизированные флаконы на 3 мл, из расчета 0,58 мл на флакон, флаконы закрывали стерильными 13-миллиметровыми резиновыми пробками и закрывали 13-миллиметровыми стерильными отрывными алюминиевыми колпачками розового цвета с последующим оптическим контролем и маркировкой наполненных флаконов. Из партии несколько флаконов случайным образом отбирали и анализировали их внешний вид, pH, осмотическую концентрацию раствора, общее содержание полисахарида и белка (мкг/SHD), % адсорбции, содержание алюминия (мг/SHD).

ПРИМЕР 5: Приготовление вакцины на основе конъюгата пневмококковой капсульной полисахарид-белок

Поливалентную конъюгатную вакцину готовили в виде дозы 0,5 мл, содержащей 2,2 мкг полисахарида каждого из серотипов 2, 15А, 15С и 35В пневмококков, конъюгированного с ~8-10 мкг белка-носителя PsaA, полученного в примере 3. Все конъюгаты были адсорбированы на фосфате алюминия в виде геля, эквивалентном 0,5 мг Al³⁺ на дозу 0,5 мл. Физический раствор 0,9% (в отношении веса к объему) использовали в качестве разбавителя и носителя для приготовления препарата, и pH конечного препарата доводили до pH 6 с помощью 1 н соляной кислоты. Для эффективной адсорбции после доведения pH препарат перемешивали в течение 2 часов при постоянном перемешивании. После 2 часов перемешивания полученной смесью в асептических условиях наполняли стерильные несиликонизированные флаконы на 3 мл, из расчета 0,58 мл на флакон,

флаконы закрывали стерильными 13-миллиметровыми резиновыми пробками и закрывали 13-миллиметровыми стерильными отрывными алюминиевыми колпачками розового цвета с последующим оптическим контролем и маркировкой наполненных флаконов. Из партии несколько флаконов случайным образом отбирали и анализировали их внешний вид, pH, осмотическую концентрацию раствора, общее содержание полисахарида и белка (мкг/SHD), % адсорбции, содержание алюминия (мг/SHD).

ПРИМЕР 5: Приготовление вакцины на основе конъюгата пневмококковый капсульный полисахарид-белок

24-валентную конъюгированную вакцину готовили в виде дозы 0,5 мл, содержащей 2,2 мкг полисахарида каждого из серотипов 1, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F пневмококков, за исключением 4,4 мкг полисахарида серотипа 6В, конъюгированного с 25-40 мкг CRM₁₉₇, и 2,2 мкг полисахарида каждого из серотипов 3, 6А, 8, 10А, 11А, 12F, 15А, 23А, 23В, 24F и 35В пневмококков конъюгировали с 25-40 мкг PsaA. Все конъюгаты были адсорбированы на фосфате алюминия в виде геля, эквивалентном 0,5 мг Al³⁺ на дозу 0,5 мл. Физический раствор 0,9% (в отношении веса к объему) использовали в качестве разбавителя и носителя для приготовления препарата, и pH конечного препарата довели до pH 6 с помощью 1 н соляной кислоты. Для эффективной адсорбции после доведения pH препарат перемешивали в течение 2 часов при постоянном перемешивании. После 2 часов перемешивания полученной смесью в асептических условиях наполняли стерильные несиликонизированные флаконы на 3 мл, из расчета 0,58 мл на флакон, флаконы закрывали стерильными 13-миллиметровыми резиновыми пробками и закрывали 13-миллиметровыми стерильными отрывными алюминиевыми колпачками розового цвета с последующим оптическим контролем и маркировкой наполненных флаконов. Из партии несколько флаконов случайным образом отбирали и анализировали их внешний вид, pH, осмотическую концентрацию раствора, общее содержание полисахарида и белка (мкг/SHD), % адсорбции, содержание алюминия (мг/SHD).

ПРИМЕР 6: Иммунизация кроликов дозой 0,5 мл

А) Иммунизация и ELISA.

Здоровых кроликов весом от 1,5 до 2 кг каждый размножали и выращивали в изолированном помещении. Кроликов иммунизировали однократной 0,5-мл дозой поливалентной PCV, как описано в примерах 4 и 5. Каждую группу, состоящую из 7 кроликов, иммунизировали препаратом в дни 1, 15 и 29. Образцы крови отбирали в дни 0 (до иммунизации), 15 (пробный спуск крови) и 36 (окончательный спуск крови). Сыворотки кроликов, собранные в день 0 (PD1) и день 40 (PD3), анализировали на серотипоспецифический иммунный ответ, используя ELISA. ELISA проводили в соответствии с протоколом, предложенным ВОЗ. Вкратце, планшеты Maxisorp™ для ELISA покрывали PnCPS данного серотипа. ELISA проводили в соответствии с протоколом, предложенным ВОЗ. Вкратце, планшеты Maxisorp™ для ELISA покрывали PnCPS данного серотипа (1 мкг/50 мкл/лунку с использованием PBS; стерильного, без

эндотоксина, с 0,02% азидом натрия). Планшеты помещали в камеру с увлажненными бумажными полотенцами для увлажнения и инкубировали при $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 5 час, затем планшеты хранили при $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ до использования.

Исследуемые сыворотки подвергали предварительной адсорбции на CWPS Multi™ для устранения фоновой реактивности, происходящей от полисахарида клеточной стенки. Для достижения этого 2 мкл исследуемой и положительной контрольной сыворотки разводили с использованием 998 мкл раствора для предварительной адсорбции (1 мл - 1 мкл CWPS Multi™ в 999 мкл 10% SuperBlock™ в PBST) до конечного разведения 1:500. Разведенные образцы инкубировали при комнатной температуре ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) в течение 1 часа при непрерывном встряхивании. Несвязавшийся PnCPS удаляли встряхиванием планшета, а свободные сайты в лунках блокировали добавлением 200 мкл блокатора (20% SuperBlock™ в PBS). Планшеты инкубировали при комнатной температуре ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) в течение 1 часа без встряхивания.

В) Добавление исследуемых образцов и контролей

50 мкл разбавителя (10% SuperBlock™ в PBST) добавляли во все лунки, кроме A1-A12. После этого 100 мкл/лунку подвергнутых предварительной адсорбции образцов исследуемой сыворотки добавляли в A1-A10, контрольные образцы сыворотки добавляли в A11 и A12. Двукратное последовательное разведение исследуемых образцов выполняли путем переноса 50 мкл из 1-ой лунки во 2 лунку и так далее, т.е. из A1-A10 в H1-H10. Аналогичным образом было выполнено последовательное разведение контрольных образцов (007SP) из A11 и A12 в E11 и E12. Лунки с F11 и F12 до H11 и H12 без разведения обеспечивались пустыми. Планшеты инкубировали при комнатной температуре ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) в течение 2 часов без встряхивания. После стадии инкубации содержимое удаляли, и планшеты трижды промывали PBST (~250 мкл/лунку) вручную или с помощью устройства для промывки планшетов.

С) Добавление первых антител

50 мкг/лунку рекомбинантного белка A/G пероксидазы (разведенного 1:20000 с использованием 10% SuperBlock™ в PBST) добавляли во все лунки, и планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) без встряхивания. После этого планшеты трижды промывали PBST (250 мкл/лунку) вручную или с помощью устройства для промывки планшетов.

Д) Проявление и считывание

Хромогенную реакцию развивали добавлением 50 мкл/лунку субстрата ТМВ и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) без встряхивания. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл/лунку 1,25 М серной кислоты. Измеряли ОП при 450 нм.

Е) Определение титра

Титр антител у иммунизированных животных рассчитывали как величину, обратную коэффициенту разведения. Наибольшее разведение, которое давало $\text{ОП}_{450\text{нм}}$, вдвое превышающую значение $\text{ОП}_{450\text{нм}}$, соответствующее титру до иммунизации

(приблизительно 0,2), сообщалось как титр. Титр сывороточных антител против каждого серотипа наносили на график и сравнивали с разными группами лечения.

Е) Иммунный ответ у кроликов

Кроликов иммунизировали препаратом, описанным в примере 5. План исследования состоял из двух групп по 7 кроликов в каждой. Животных иммунизировали тремя дозами приготовленных вакцин.

Сыворотку иммунизированных кроликов собирали через указанные интервалы. Уровни титров серотипоспецифичных IgG оценивали в ELISA, который был адаптирован исходя из рекомендованного ВОЗ ELISA, для оценки титров антител в сыворотке человека. Титры антител оценивали как максимальное разведение сыворотки, которое давало значение ОП_{450нм} выше порогового значения. Значение титра IgG у животного до вакцинации использовали для расчета среднего геометрического увеличения (GMFR) титра сывороточного IgG. После введения 24-валентного препарата PCV, описанного выше, у животных были обнаружены антитела против полисахарида каждого серотипа конъюгата в вакцине, и, следовательно, эти вакцины являются иммуногенными.

Как показано на (фиг. 9), титр оценивается как максимальное разведение сыворотки, при котором ОП_{450нм} в ELISA выше порогового значения ($2 \times \text{ОП}_{450\text{нм}}$, наблюдаемую в преиммунных сыворотках; значения ОП, составляющего приблизительно 0,1). Среднее геометрическое увеличение (GMFR) для каждого серотипа наносили на график. Сыворотку, полученную после 3 доз иммунизации (после дозы 3), использовали для оценки иммуногенности. Сплошные черные столбцы указывают на пневмококковые полисахариды, конъюгированные с CRM₁₉₇, а белые столбцы - на пневмококковые полисахариды, конъюгированные с PsaA.

Из вышеизложенного будет понятно, что конкретные варианты осуществления настоящего изобретения были описаны здесь с целью иллюстрации, но что различные модификации могут быть осуществлены без отклонения от объема изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Очищенный капсульный полисахарид заданного размера из серотипа 2, 15А, 15С или 35В *Streptococcus pneumoniae*, имеющий среднюю молекулярную массу (Mw) от 50 до 1000 кДа.

2. Очищенный капсульный полисахарид серотипа 2, 15А, 15С или 35В *Streptococcus pneumoniae* по п. 1, имеющий среднюю молекулярную массу (Mw) от 50 до 750 кДа; от 50 до 500 кДа; от 100 до 1000 кДа; от 100 до 750 кДа; от 100 кДа до 500 кДа.

3. Очищенный капсульный полисахарид серотипа 15А или 15С *Streptococcus pneumoniae* по п. 1, характеризующийся содержанием глицерина в диапазоне 5-18%.

4. Очищенный капсульный полисахарид серотипа 15А *Streptococcus pneumoniae* по п.3, характеризующийся содержанием глицерина от 5 до 10%.

5. Очищенный капсульный полисахарид серотипа 15С *Streptococcus pneumoniae* по п. 3, характеризующийся содержанием глицерина от 5 до 10%.

6. Очищенный капсульный полисахарид серотипа 35В *Streptococcus pneumoniae* по п. 1, характеризующийся содержанием ацетата в диапазоне 2-10%, предпочтительно 2-8%.

7. Способ получения очищенных капсульных полисахаридов заданного размера из серотипов *Streptococcus pneumoniae*, включающий стадии:

а. культивирование *Streptococcus pneumoniae* серотипа 2, 15А, 15С или 35В в подходящей культуральной среде;

б. инактивацию культурального бульона *Streptococcus pneumoniae*;

с. центрифугирование культурального бульона *Streptococcus pneumoniae*;

д. очистку капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* из культурального бульона; и

е. подвергание очищенного капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* гомогенизации под высоким давлением для получения капсульных полисахаридов заданного размера, имеющих среднюю молекулярную массу (Mw) от 50 до 1000 кДа.

8. Способ по п. 7, в котором гомогенизацию проводят под давлением в диапазоне от 500 до 2000 бар.

9. Очищенный капсульный полисахарид серотипа 2, 15А, 15С или 35В *Streptococcus pneumoniae*, имеющий среднюю молекулярную массу (Mw) от 50 до 1000 кДа, полученный способом по п. 7.

10. Пневмококковая конъюгатная вакцина, содержащая по крайней мере один очищенный капсульный полисахарид заданного размера из серотипа 2, 15А, 15С или 35В *Streptococcus pneumoniae*, имеющий среднюю молекулярную массу от 50 до 1000 кДа, конъюгированный с белком-носителем, причем композиция характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0.

11. Конъюгатная вакцина по п. 10, в которой белок-носитель выбран из PsaA, CRM₁₉₇, PspA, столбнячного анатоксина (ТТ) или их комбинации.

12. Пневмококковая конъюгатная вакцина по п. 10, содержащая полисахарид

серотипа 2, имеющий среднюю молекулярную массу от 50 до 1000 кДа, конъюгированный с PsaA, CRM₁₉₇, PspA или столбнячным анатоксином (ТТ), причем композиция характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

13. Пневмококковая конъюгатная вакцина по п. 10, содержащая полисахарид серотипа 15А, имеющий среднюю молекулярную массу от 50 до 1000 кДа, конъюгированный с белком-носителем, выбранным из PsaA, CRM₁₉₇, PspA или столбнячного анатоксина (ТТ), причем композиция характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

14. Пневмококковая конъюгатная вакцина по п. 10, содержащая полисахарид серотипа 15С, имеющий среднюю молекулярную массу от 50 до 1000 кДа, конъюгированный с белком-носителем, выбранным из PsaA, CRM₁₉₇, PspA или столбнячного анатоксина (ТТ), причем композиция характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

15. Пневмококковая конъюгатная вакцина по п. 10, содержащая полисахарид серотипа 35В, имеющий среднюю молекулярную массу от 50 до 1000 кДа, конъюгированный с белком-носителем, выбранным из PsaA, CRM₁₉₇, PspA или столбнячного анатоксина (ТТ), причем композиция характеризуется (весовым) процентным соотношением белка и полисахарида (белок/PS), составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 2,0, предпочтительно от 0,7 до 1,2.

16. Пневмококковая конъюгатная вакцина по п. 10, в которой конъюгат имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 500 кДа до 5000 кДа; от 1000 кДа до 10000 кДа; от 1500 кДа до 15000 кДа; от 2000 кДа до 20000 кДа; от 2500 кДа до 25000 кДа; или от 3000 до 30 000 кДа.

17. Иммуногенная композиция, содержащая по крайней мере один гликоконъюгат серотипа 2, 15А, 15С или 35В *Streptococcus pneumoniae*, причем полисахарид в гликоконъюгате представляет собой очищенный капсульный полисахарид по п. 1.

18. Иммуногенная композиция по п. 17, которая, кроме того, содержит гликоконъюгаты серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 14, 15В, 16F, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 31, 33F *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированные с белком-носителем, выбранным из PsaA, CRM₁₉₇, PspA, столбнячного анатоксина (ТТ) или комбинации белков-носителей.

19. Композиция по п. 17 или 18, которая представляет собой поливалентную иммуногенную композицию и представляет собой 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18-, 19-, 20-, 22-, 24-, 25-валентную или более валентную пневмококковую конъюгатную композицию.

20. Иммуногенная композиция по п. 19, которая представляет собой 24-валентную

пневмококковую конъюгатную композицию, содержащую полисахариды из по крайней мере 3 серотипов пневмококков, выбранных из 2, 15А, 15С и 35В, и дополнительных серотипов, состоящих из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 14, 18С, 19А, 19F, 20А, 20В, 22F, 23F, 24F, 33F, причем полисахариды указанных серотипов конъюгированы с белком-носителем, причем белок-носитель выбран из PsaA, CRM₁₉₇, PspA, столбнячного анатоксина (ТТ).

21. Иммуногенная композиция по п. 19, которая представляет собой 24-валентную пневмококковую конъюгатную композицию, содержащую полисахариды из по крайней мере 2 серотипов пневмококков, выбранных из 2, 15А, 15С и 35В, и дополнительных серотипов, состоящих из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F, причем полисахариды указанных серотипов конъюгированы с белком-носителем, выбранным из PsaA, CRM₁₉₇, PspA, столбнячного анатоксина (ТТ).

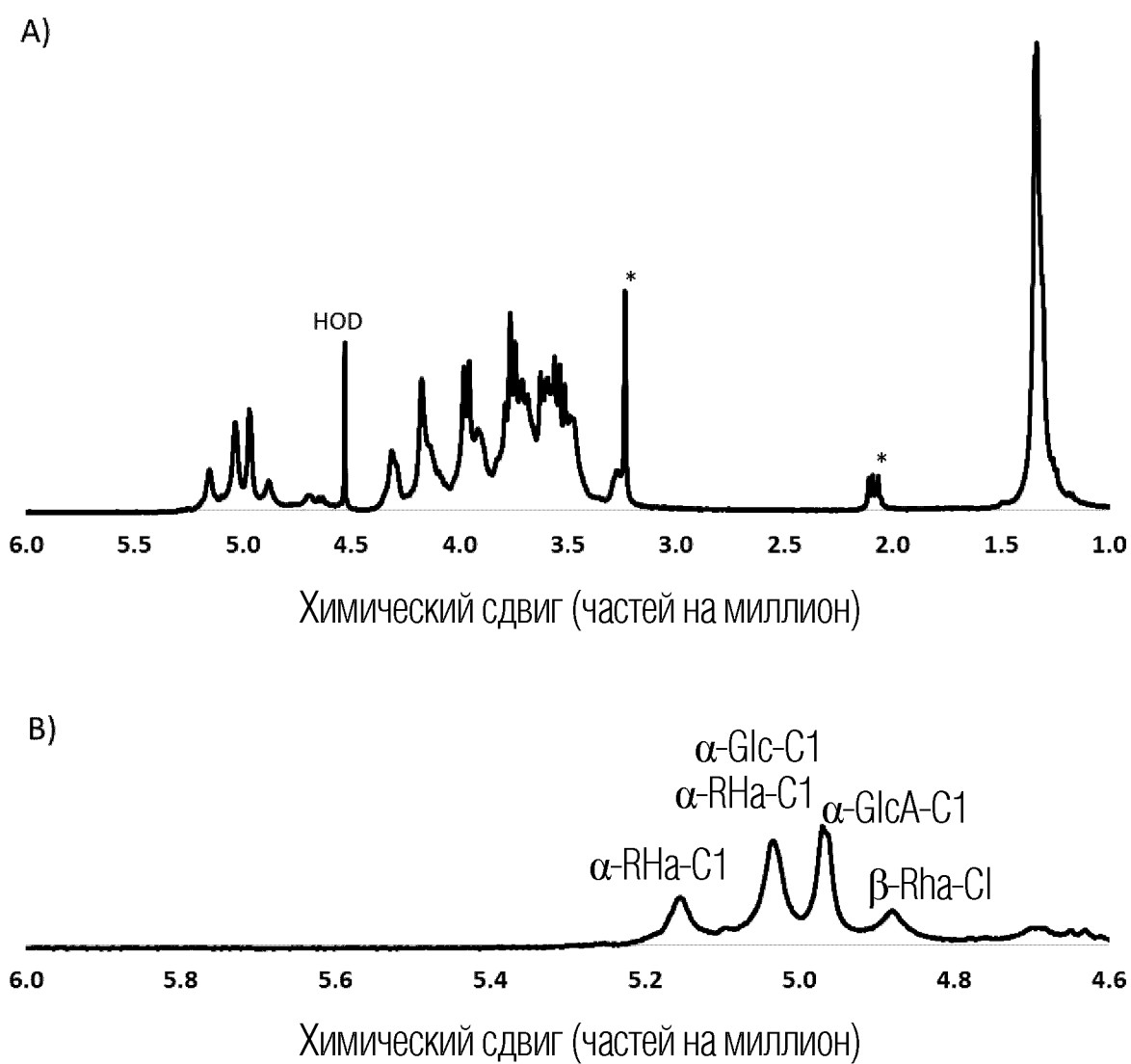
22. Иммуногенная композиция по п. 19, которая представляет собой поливалентную пневмококковую конъюгатную вакцинную композицию, содержащую полисахариды из по крайней мере 2 серотипов пневмококков, выбранных из 2, 15А, 15С и 35В, и одного или более дополнительных серотипов, выбранных из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 20А, 20В, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F, причем полисахариды указанных серотипов конъюгированы с белком-носителем, выбранным из PsaA, CRM₁₉₇, PspA, столбнячного анатоксина (ТТ).

23. Иммуногенная композиция по п. 19, которая представляет собой 17-валентную пневмококковую конъюгатную вакцинную композицию, содержащую полисахариды серотипов *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированные с белком-носителем, причем серотипы включают 2, 15А, 15С и 35В и дополнительные серотипы 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F, 23F, и причем белок-носитель выбран из PsaA, CRM₁₉₇, PspA, столбнячного анатоксина (ТТ).

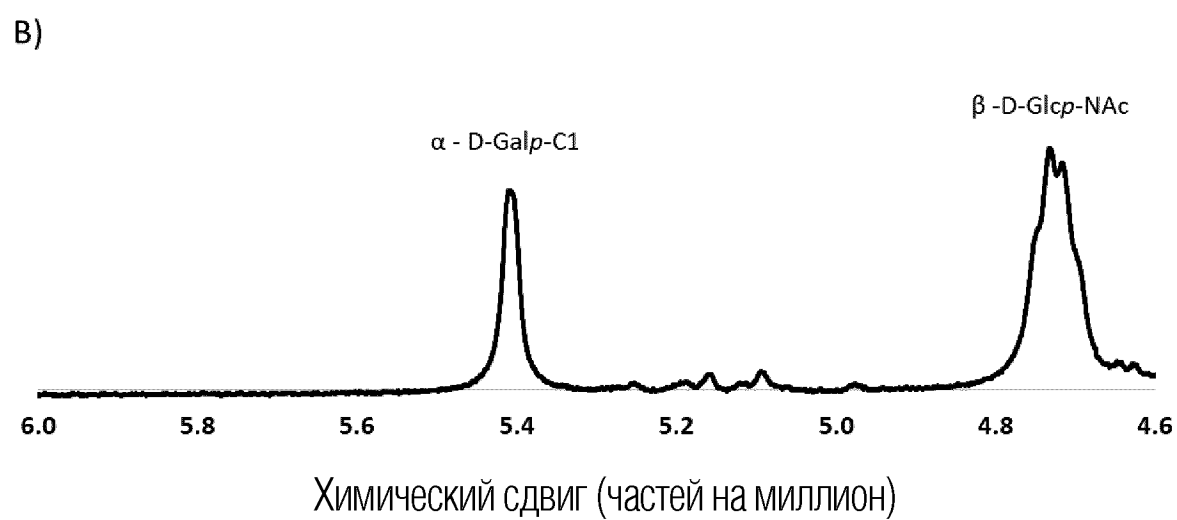
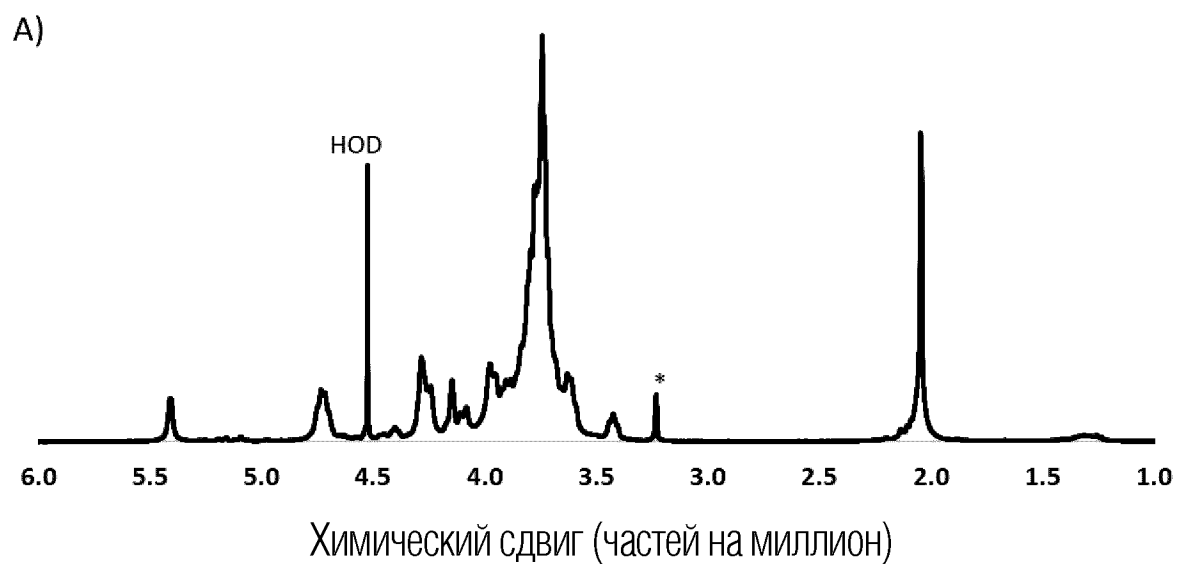
24. Очищенный капсульный полисахарид по п. 1, который применим для приготовления вакцины или иммуногенной композиции.

25. Вакцина по любому из п.п. 10-16 или иммуногенная композиция по любому из пп.17-23, причем вакцина или иммуногенная композиция применима для профилактики инфекции, вызываемой *Streptococcus pneumoniae*.

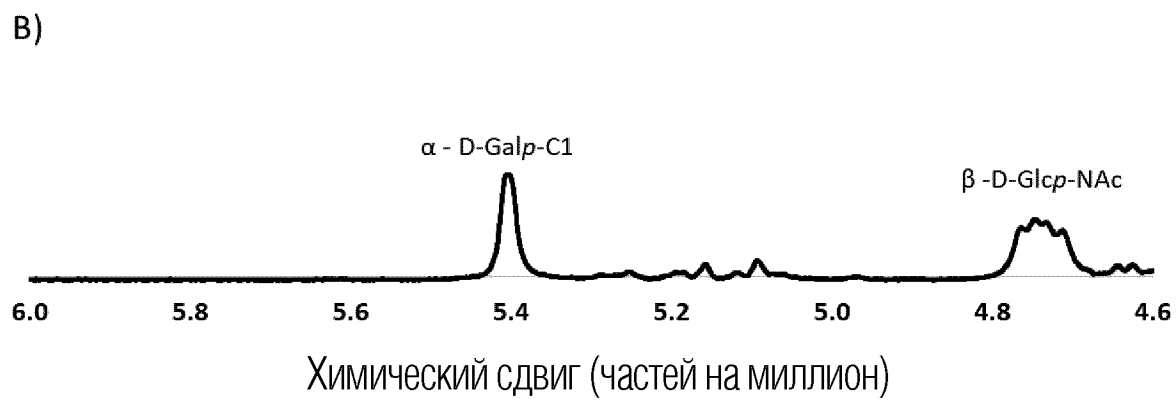
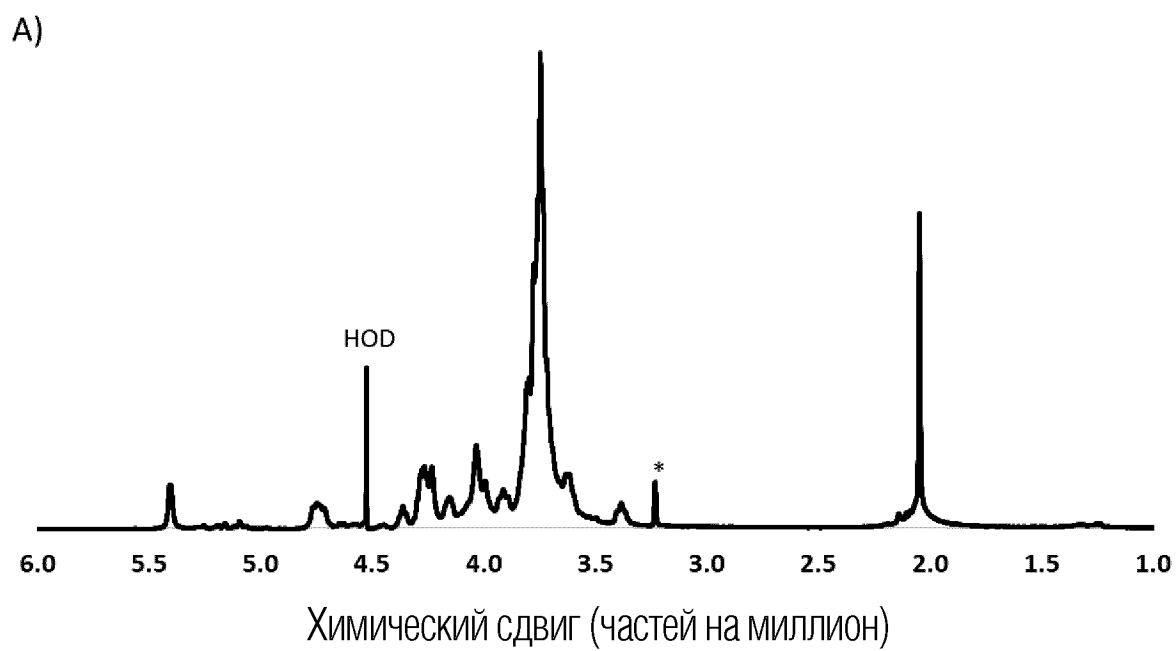
По доверенности



ФИГ. 1

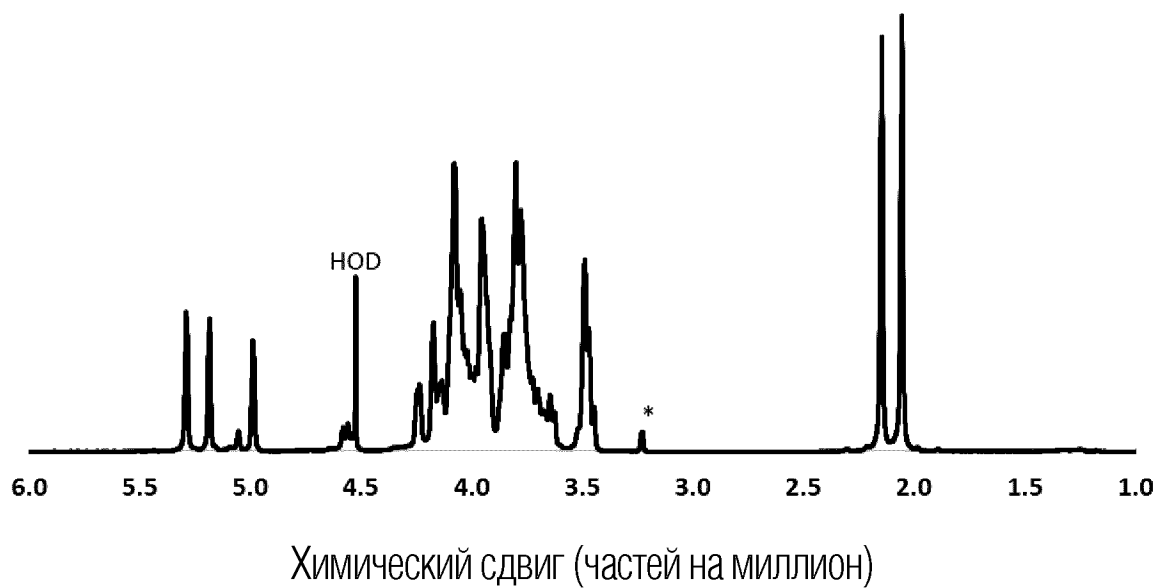


ФИГ. 2

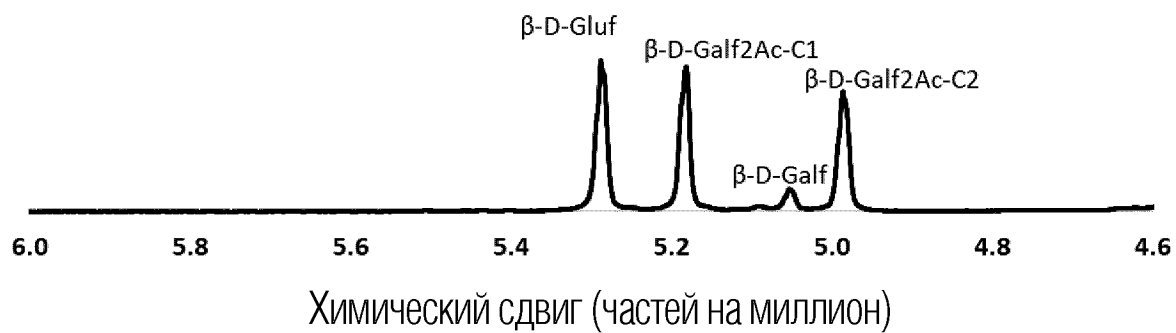


ФИГ. 3

A)

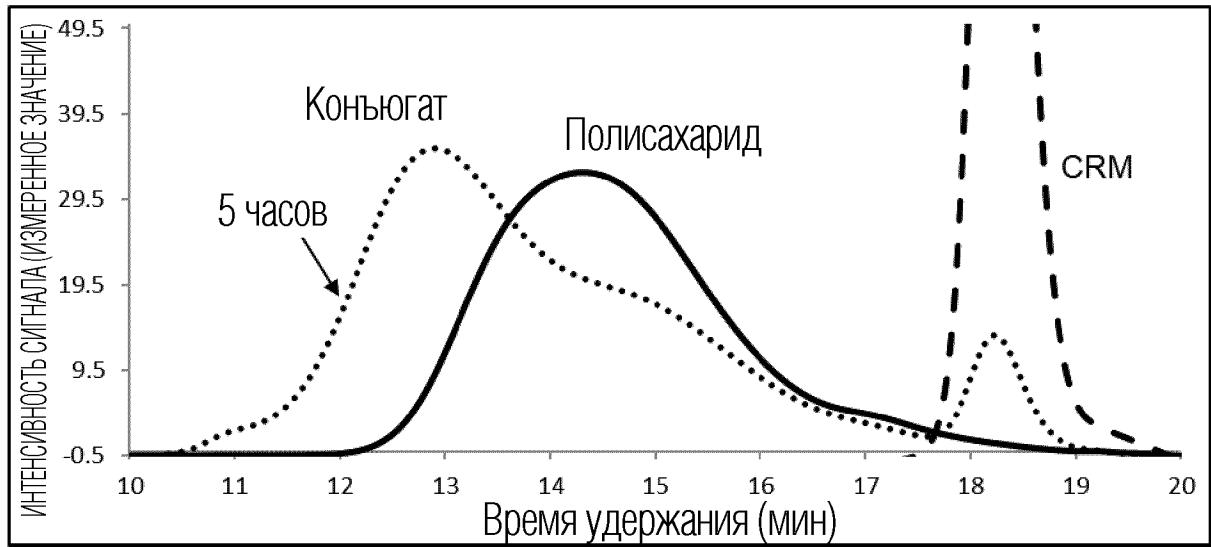


B)

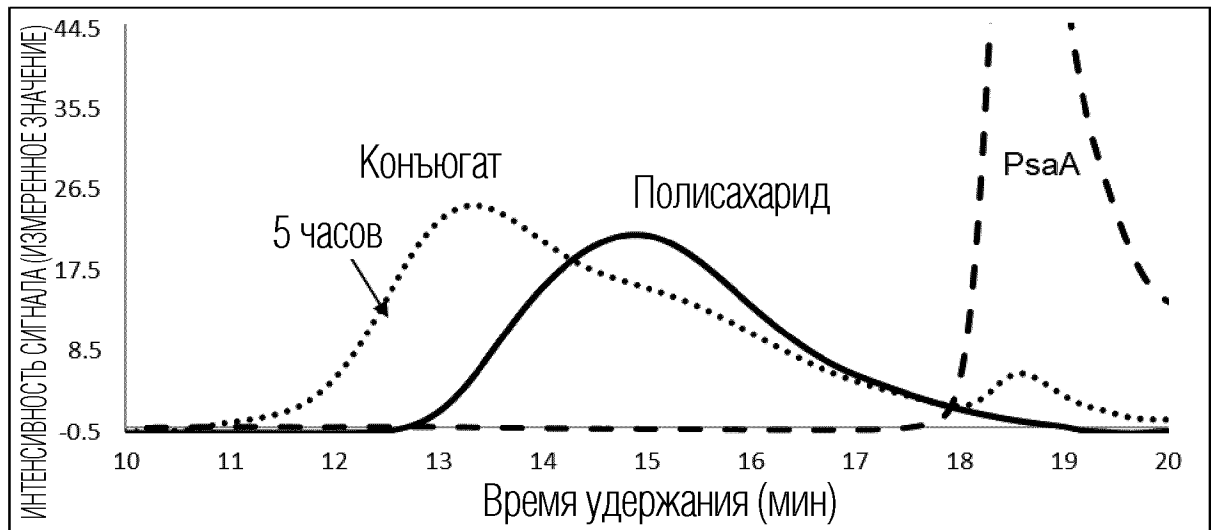


ФИГ. 4

(A)

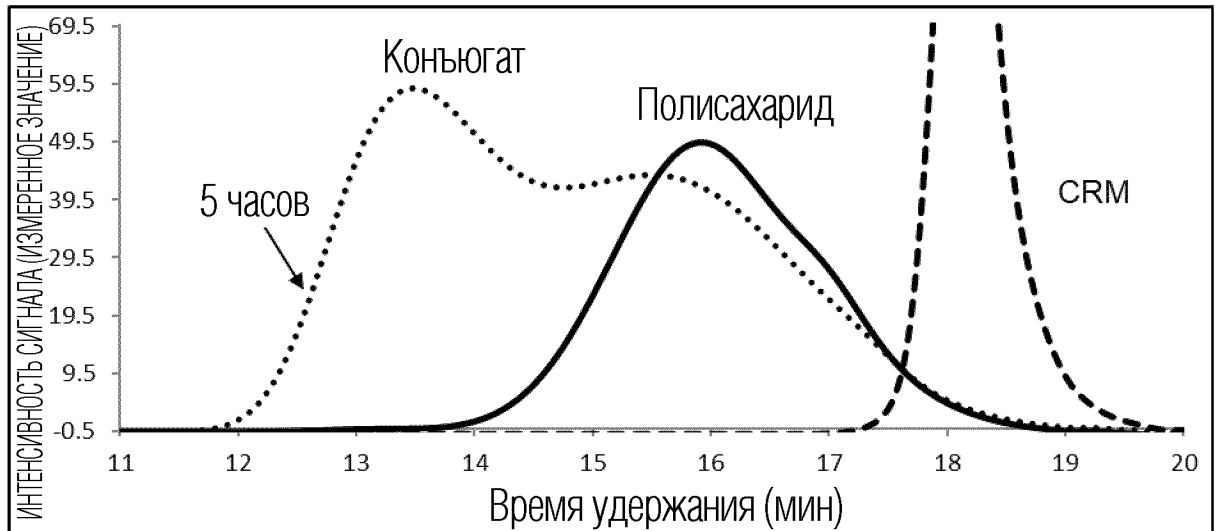


(B)

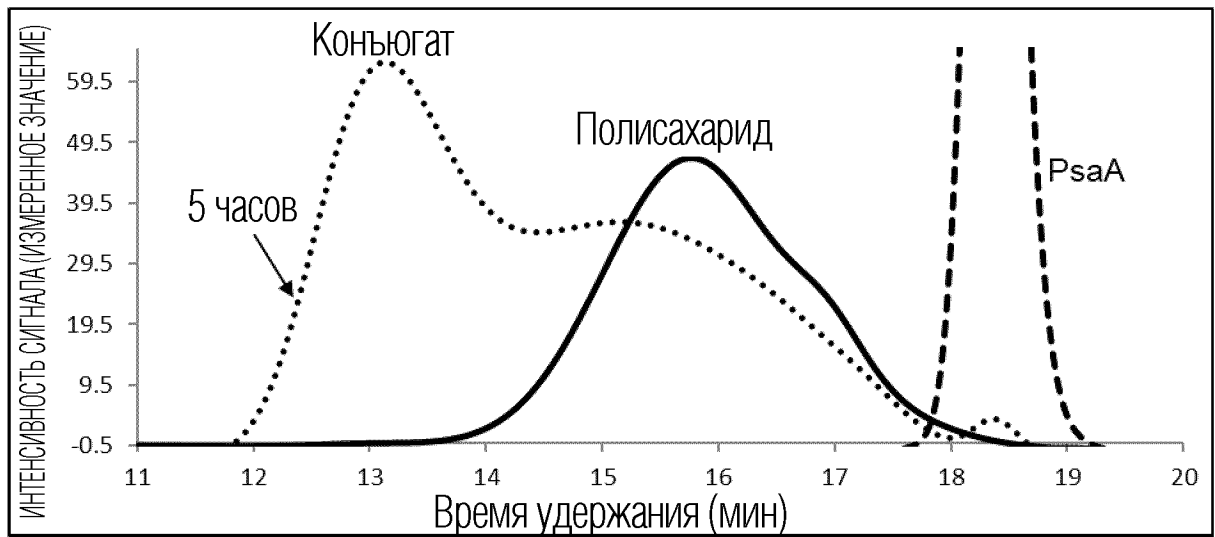


ФИГ. 5

(A)

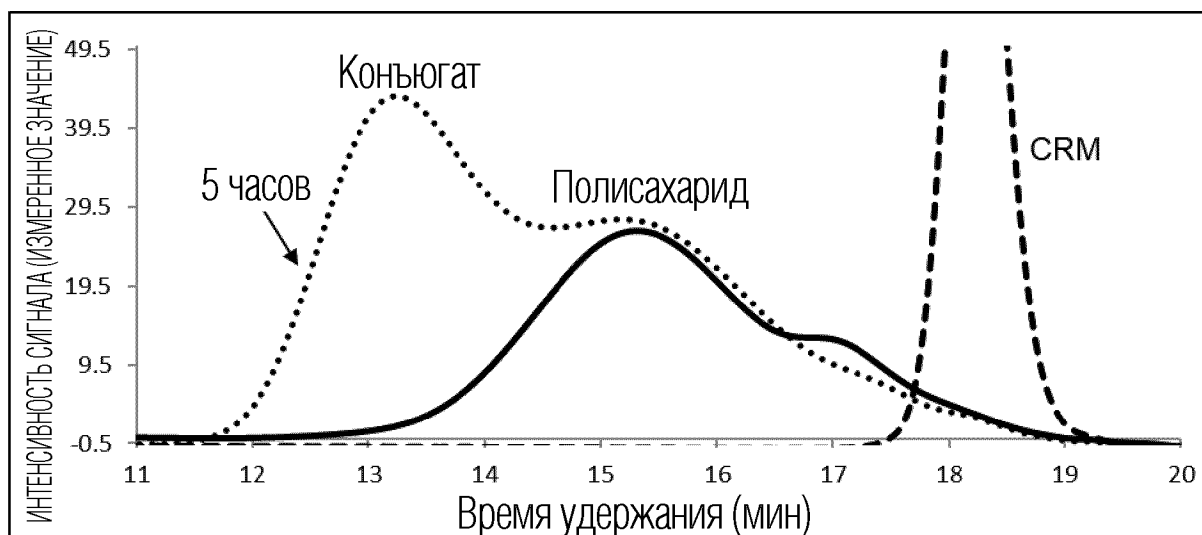


(B)

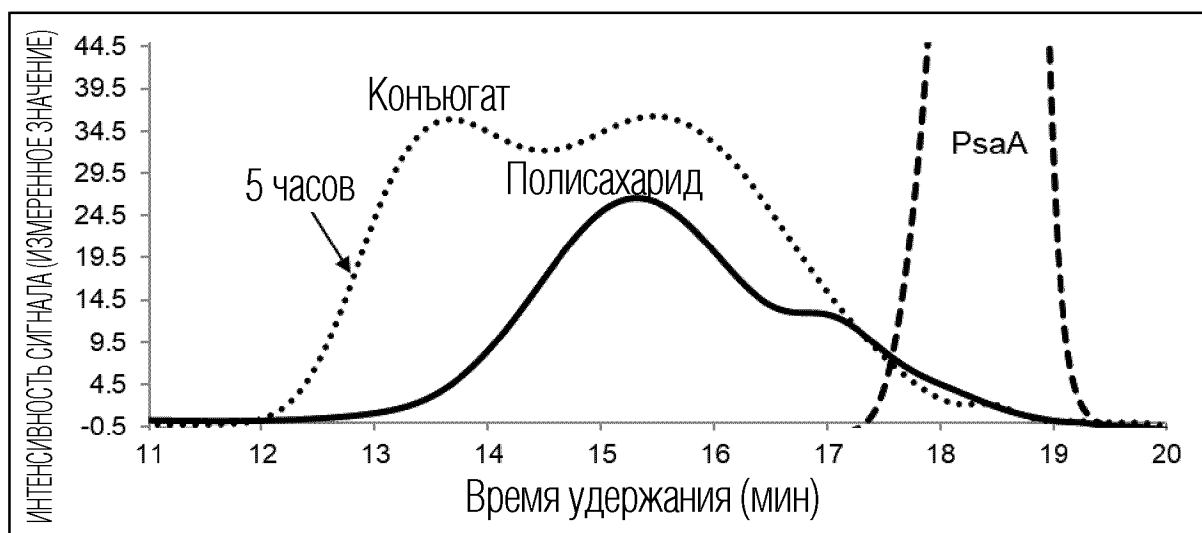


ФИГ. 6

(A)

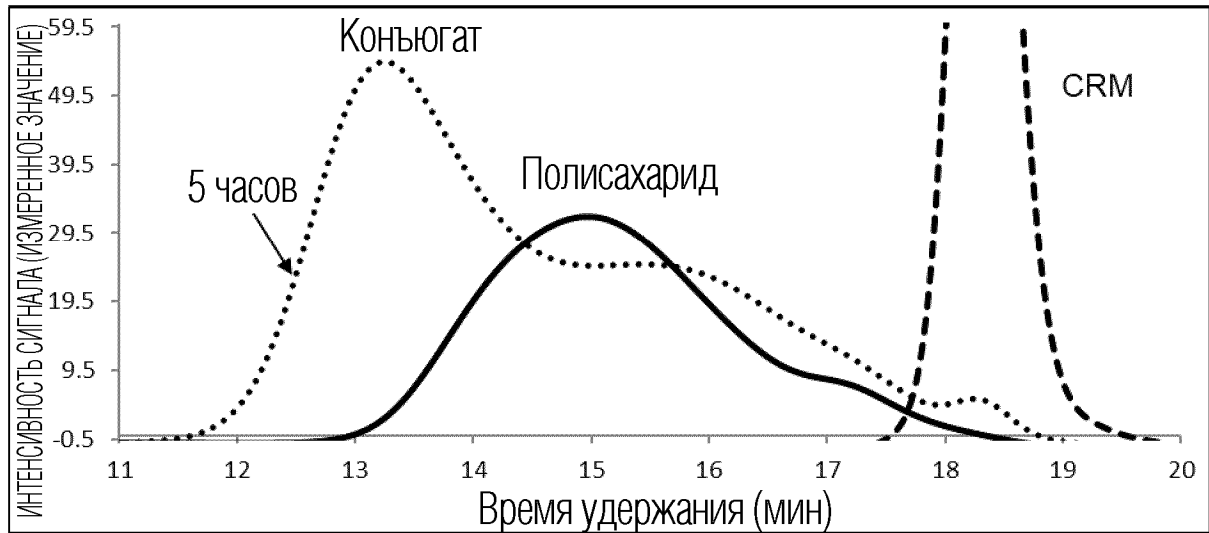


(B)

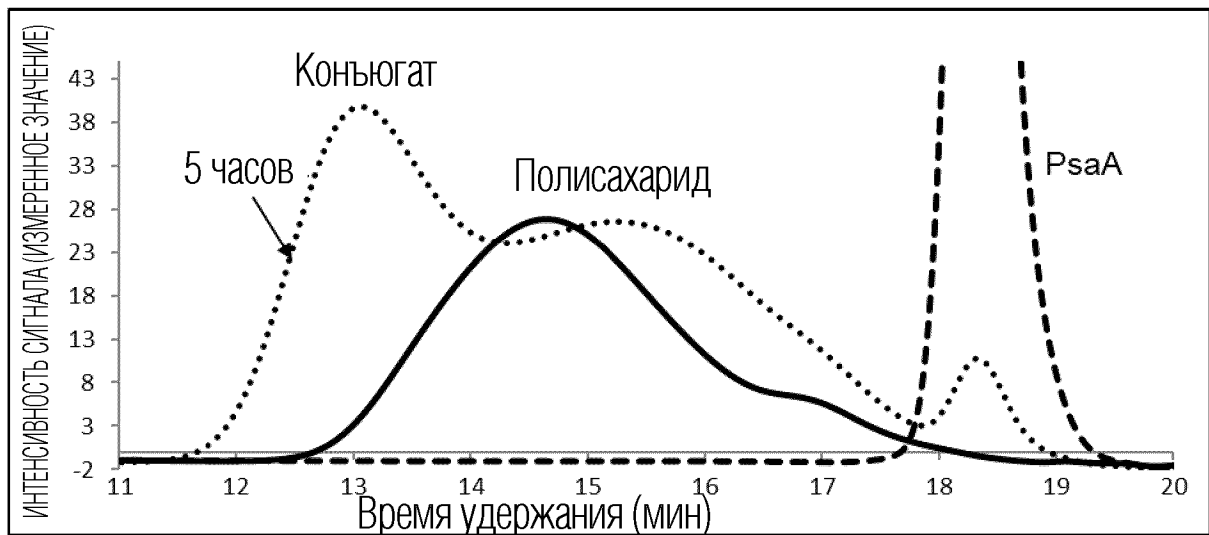


ФИГ. 7

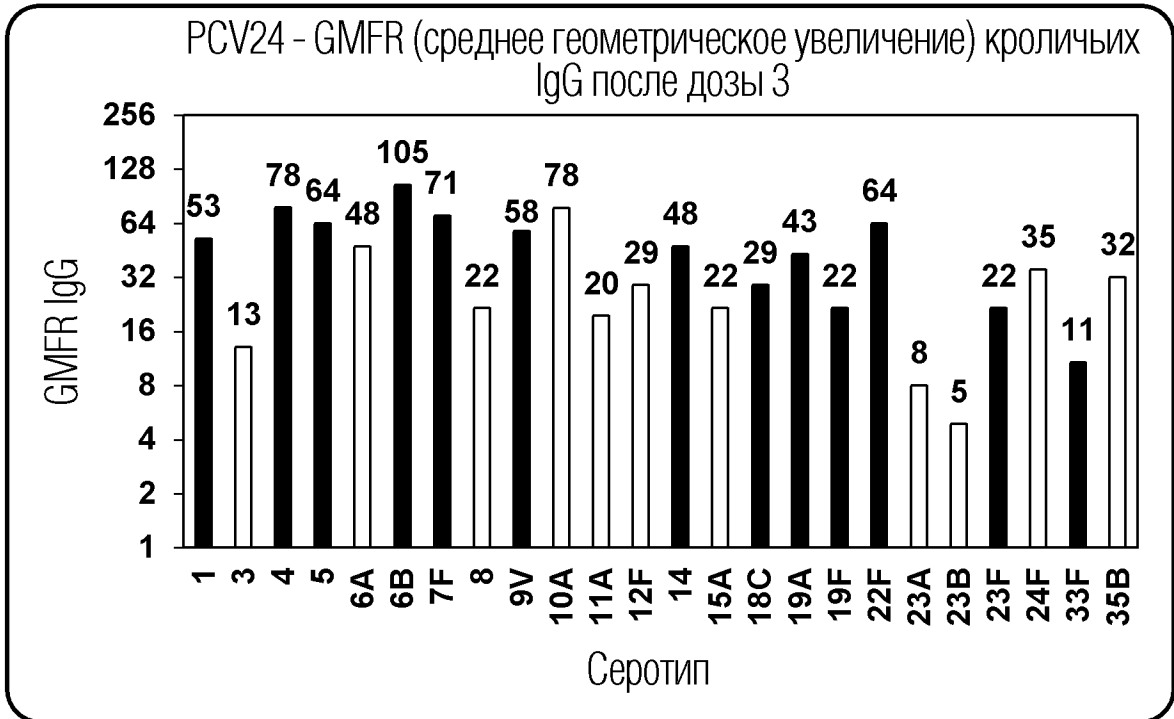
(A)



(B)



ФИГ. 8



ФИГ. 9