

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039427**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.01.26

(21) Номер заявки
201990126

(22) Дата подачи заявки
2017.08.04

(51) Int. Cl. **A61K 39/385** (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(54) ПОЛИВАЛЕНТНАЯ ПНЕВМОКОККОВАЯ ПОЛИСАХАРИДНО-БЕЛКОВАЯ КОНЬЮГАТНАЯ КОМПОЗИЦИЯ

(31) **62/371,529**

(32) **2016.08.05**

(33) **US**

(43) **2019.08.30**

(86) **PCT/US2017/045479**

(87) **WO 2018/027123 2018.02.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**САНОФИ ПАСТЕР ИНК. (US); СК
БИОСАЙЕНС КО., ЛТД. (KR)**

(72) Изобретатель:
**Ан Гёнджун, Чхой Уён, Хам Донсу,
Ким Хун, Син Джинхван (KR),
Хопфер Роберт, Кенсингер Ричард Д.,
Чжо Мо (US), Десозье Эрик, Эль Герш
Себлен Клотильда, Талага Филипп
(FR)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **US-A1-20150265702**

US-A1-20110117123

(JAKOBSEN, H. et al.) Intranasal
Immunization with Pneumococcal Polysaccharide
Conjugate Vaccines Protects Mice against Invasive
Pneumococcal Infections. Infection and Immunity.
August 1999; Vol. 67, No. 8, pages 4128-4133; page
4129, 1st column, 3rd paragraph; page 4129, 1st
column, 5th paragraph

US-A1-20030099672

WO-A1-2013191459

WO-A1-2014118201

(57) Предложены поливалентные пневмококковые конъюгатные композиции со смешанным носителем, содержащие 16 различных пневмококковых капсульных полисахарид-белковых конъюгатов, в которых каждый из конъюгатов включает капсульный полисахарид из разных серотипов *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный либо со столбнячным анатоксинром, либо с CRM₁₉₇; причем серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, причем два из указанных капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксинром, а оставшиеся капсульные полисахариды конъюгированы с CRM₁₉₇, и при этом два капсульных полисахарида, конъюгированных со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5. Также предложены способы получения таких поливалентных пневмококковых конъюгатных композиций со смешанным носителем и способы их применения для профилактики инфекции *Streptococcus pneumoniae* или вызванного ей заболевания у субъекта.

B1**039427****039427****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/371529, поданной 5 августа 2016 года, полное раскрытие которой включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Область техники

Заявка в целом относится к композициям с поливалентным пневмококковым конъюгатом со смешанным носителем, вакцинам, содержащим их, и способам применения таких композиций и вакцин для профилактики инфекции *Streptococcus pneumoniae* или вызванного ей заболевания у субъекта.

Уровень техники

Пневмококк (*Streptococcus pneumoniae*) представляет собой грамположительные ланцетообразные факультативно-анаэробные бактерии с более чем 90 известными серотипами. Было показано, что большинство серотипов *S. pneumoniae* вызывают заболевание, причем 23 наиболее распространенных серотипа ответственны приблизительно за 90% инвазивных заболеваний во всем мире. Серотипы классифицируются на основе серологического ответа капсульных полисахаридов, наиболее важного фактора вирулентности для пневмококка. Капсульные полисахариды являются Т-независимыми антигенами, которые индуцируют выработку антител в отсутствие Т-хелперов. Т-независимые антигены обычно индуцируют антитела с низкой аффинностью и кратковременными иммунными реакциями практически без иммунологической памяти.

Первоначальные пневмококковые вакцины включали комбинации капсульных полисахаридов из разных серотипов. Указанные вакцины могут создавать иммунитет против *S. pneumoniae* у пациентов с развитой или здоровой иммунной системой, однако они неэффективны у младенцев, у которых отсутствует развитая иммунная система, и у пожилых людей, у которых иммунная функция часто нарушена. Для улучшения иммунного ответа на пневмококковые вакцины, особенно у младенцев и пожилых людей, которые подвержены более высокому риску развития инфекции *S. pneumoniae*, капсульные полисахариды конъюгировали с подходящими белками-носителями таким образом создавая пневмококковые конъюгатные вакцины. Конъюгирование с подходящим белком-носителем изменяет капсульный полисахарид с Т-независимого антигена на Т-зависимый антиген. Таким образом, иммунный ответ против конъюгированного капсульного полисахарида задействует Т-хелперные клетки, которые помогают индуцировать более мощный и быстрый иммунный ответ при повторном контакте с капсульным полисахаридом.

Существует по меньшей мере два подхода к разработке пневмококковых конъюгатных вакцин: подход с одним носителем и подход со смешанным носителем. Иммуногенность различных конъюгатов капсульного полисахарида может варьироваться в зависимости от используемого пневмококкового серотипа и белка-носителя. При подходе с одним носителем капсульные полисахариды из разных серотипов конъюгированы с одним белком-носителем. Примером подхода с использованием одного носителя является серия вакцин Pfizer PREVNAR, где различные капсульные полисахариды конъюгированы с белком-носителем CRM₁₉₇, нетоксичным вариантом анатоксина дифтерии, имеющим единственную аминокислотную замену глутаминовой кислоты на глицин. Семивалентная вакцина PREVNAR (PREVNAR) была впервые одобрена в 2000 году и содержит капсульные полисахариды из семи наиболее распространенных серотипов: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F. В 13-валентной вакцине, PREVNAR 13, к белку-носителю CRM₁₉₇ добавлены серотипы 1, 5, 7F, 3, 6A и 19A. Белок-носитель, CRM₁₉₇, используемый в качестве единственного носителя в вакцинах PREVNAR, никогда не использовался в качестве компонента системы смешанных носителей в пневмококковой конъюгатной вакцине.

Второй подход к пневмококковой вакцине включает использование смешанных носителей. В подходе со смешанным носителем вместо использования одного белка-носителя используются два или более белков-носителей, причем капсульные полисахариды определенных серотипов конъюгированы с первым белком-носителем, а капсульные полисахариды других серотипов конъюгированы по меньшей мере со вторым другим белком-носителем. Например, GlaxoSmithKline разработала SYNFLORIX, 10-валентную (серотипы 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F и 23F) пневмококковую конъюгатную вакцину со смешанным носителем, в которой в качестве белков-носителей используются белок D бактерии *H. influenzae*, столбнячный анатоксин и дифтерийный анатоксин. В SYNFLORIX серотипы 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 и 23F конъюгированы с белком D; серотип 18C конъюгирован со столбнячным анатоксином; а серотип 19F конъюгирован с дифтерийным анатоксином [7]. Серотип 3 был удален из 11-валентного прототипа вакцины SYNFLORIX, поскольку она не продемонстрировала специфическую для данного серотипа эффективность в испытаниях при остром среднем отите [1]. Другая группа, Aventis Pasteur, разработала 11-валентную (серотипы 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F и 23F) пневмококковую конъюгатную вакцину со смешанным носителем, с использованием дифтерийного анатоксина и столбнячного анатоксина в качестве белков-носителей [2, 3]. Капсульные полисахариды серотипов 3, 9V, 14 и 18C могут вызывать лучший ответ при конъюгировании с анатоксином дифтерии, чем при конъюгировании со столбнячным анатоксином [2, 6]. Поэтому серотипы 3, 6B, 14 и 18C были конъюгированы с токсинотоксином дифтерии, а серотипы 1, 4, 5, 7F, 9V, 19F и 23F были конъюгированы со столбнячным анатоксином. Разработка такой пневмококковой вакцины со смешанным носителем была прекращена, в частности, по техническим причинам

и из-за потенциальной возможности снижения ответа при сочетании с бесклеточными коклюшными вакцинами [3]. Недавно сообщалось, что серотип 5, как и 1, имеет один из самых низких наблюдаемых титров ОРА (опсонофагоцитирующая активность) из всех 13 серотипов PREVNAR, у которых была выявлена корреляция между титром IgG и активностью ОРА [4]. Также было высказано предположение, что в случае серотипа 3 для защиты потребуется гораздо более высокая сывороточная концентрация IgG [5].

Краткое описание изобретения

В настоящей заявке предложены новые и улучшенные поливалентные композиции пневмококковых конъюгатов со смешанным носителем, и вакцины, содержащие их. В одном аспекте настоящего изобретения предложена поливалентная композиция пневмококкового конъюгата со смешанным носителем, содержащая 16 различных пневмококковых капсульных полисахарид-белковых конъюгатов, в которой каждый пневмококковый капсульный полисахарид-белковый конъюгат содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из различных серотипов стрептококка, причем серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, а белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇ или столбняк анатоксин, причем два из указанных капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM₁₉₇, и при этом два капсульных полисахарида, конъюгированных со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5.

В некоторых вариантах реализации капсульные полисахариды из серотипов 1 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды из серотипов 3, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇.

В другом варианте реализации капсульные полисахариды из серотипов 1 и 3 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды из серотипов 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇.

В еще одном варианте реализации капсульные полисахариды из серотипов 3 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды из серотипов 1, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇.

В некоторых вариантах данная поливалентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем дополнительно содержит адъювант, такой как адъювант на основе алюминия, включая, среди прочего, фосфат алюминия, сульфат алюминия и гидроксид алюминия. Другой аспект относится к применению указанной 16-валентной пневмококковой конъюгатной композиции со смешанным носителем в качестве вакцины.

Еще один аспект относится к вакцине, содержащей указанную 16-валентную пневмококковую конъюгатную композицию со смешанным носителем и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Еще один аспект относится к способу профилактики инфекции *Streptococcus pneumoniae* или соответствующего заболевания у субъекта, такого как человек, причем указанный способ включает введение профилактически эффективного количества 16-валентных пневмококковых конъюгатных композиций со смешанным носителем или содержащих их вакцин указанному субъекту.

В определенных вариантах реализации субъектом является человек, которому по меньшей мере 50 лет, и заболевание представляет собой пневмонию или инвазивное пневмококковое заболевание (IPD). В других вариантах реализации субъектом является человек, которому по меньшей мере 6 недель, и заболевание представляет собой пневмонию, инвазивное пневмококковое заболевание (IPD) или острый средний отит (ОСО). В некоторых вариантах реализации субъекту от 6 недель до 5 лет. В других вариантах реализации субъекту от 2 до 15 месяцев или от 6 до 17 лет. В некоторых вариантах реализации 16-валентную пневмококковую конъюгатную композицию или вакцину со смешанным носителем вводят внутримышечной инъекцией. В некоторых вариантах реализации 16-валентную пневмококковую конъюгатную композицию или вакцину со смешанным носителем вводят в рамках серии вакцинаций.

Вышеуказанные и другие цели, особенности и преимущества 16-валентных пневмококковых конъюгатных композиций со смешанным носителем станут более очевидными из следующего подробного описания.

Определения

Чтобы настоящее изобретение было более понятным, для начала ниже определены некоторые термины. Дополнительные определения для следующих терминов и других терминов могут быть приведены далее по ходу данной спецификации.

Используемые в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа с определенным и неопределенным предлогом также включают ссылки на множественное число, если только контекст явно не предписывает иное. Таким образом, например, упоминание "способа" включает один или несколько способов и/или этапов описанного в настоящей заявке типа и/или которые станут очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения настоящего изобретения, и так далее. Адъювант: Используемый в настоящей заявке термин "адъювант" относится к веществу или носителю, которые неспецифически усиливают иммунный ответ на антиген.

Введение. Используемый в настоящей заявке термин "введение" композиции субъекту означает да-

вать, наносить или приводить композицию в контакт с субъектом. Введение может осуществляться любым из ряда способов, таких как, например, местный, оральный, подкожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, интратекальный и внутрикожный. Приблизительно: Используемый в настоящей заявке термин "приблизительно" или "примерно" применительно к одному или нескольким рассматриваемым значениям относится к значению, которое близко к указанному номинальному значению. В некоторых вариантах реализации термин "приблизительно" или "примерно" относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или менее в любом направлении (больше или меньше) от заявленного номинального значения, если иное не указано или не очевидно из контекста (кроме случаев, когда такое число будет превышать 100% возможного значения).

Конъюгат. Используемые в настоящей заявке и понятные из надлежащего контекста термин "конъюгат(-ы)" или "гликоконъюгат(-ы)" относятся к полисахариду *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированному с белком-носителем путем любой ковалентной или нековалентной стратегии биоконъюгирования.

Вспомогательное вещество. Используемый в настоящей заявке термин "вспомогательное вещество" относится к нетерапевтическому агенту, который может быть включен в композицию, например, для обеспечения или содействия в достижении желаемой консистенции или стабилизирующего эффекта.

Смешанный носитель. Используемый в настоящей заявке термин "пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем" относится к пневмококковой конъюгатной композиции, имеющей более одного типа белка-носителя.

Поливалентный. Используемый в настоящей заявке термин "поливалентный" относится к пневмококковой конъюгатной композиции, содержащей пневмококковые капсульные полисахариды из более чем одного серотипа *Streptococcus pneumoniae*.

16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем. Используемый в настоящей заявке термин "16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем (композиции)" относится к композиции, содержащей 16 различных пневмококковых капсульных полисахарид-белковых конъюгатов, в которой каждый пневмококковый капсульный полисахарид-белковый конъюгат содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из различных серотипов *Streptococcus pneumoniae*, причем указанные серотипы *Streptococcus pneumoniae* представляют собой 1, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, причем белком-носителем является CRM₁₉₇ или столбнячный анатоксин, причем два из капсульных полисахаридов конъюгированы с столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM₁₉₇, и при этом два капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5. В некоторых вариантах реализации капсульные полисахариды из серотипов 1 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды из оставшихся серотипов конъюгированы с CRM₁₉₇. В другом варианте реализации капсульные полисахариды из серотипов 1 и 3 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM₁₉₇. В еще одном варианте реализации капсульные полисахариды серотипов 3 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM₁₉₇.

Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, используемые в данном описании, являются традиционными. Справочник Remington's Pharmaceutical Sciences, E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975), описывает композиции и составы, подходящие для фармацевтической доставки одной или нескольких терапевтических композиций, включая вакцины и дополнительные фармацевтические агенты.

Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают, например, крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, глицоль, воду, этанол и тому подобное. В общем, природа вспомогательного вещества будет зависеть от конкретного применяемого способа введения. Например, парентеральные препараты обычно содержат инъекционные жидкости, которые включают в качестве носителя фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как вода, физиологический раствор, сбалансированные солевые растворы, буферы, водный раствор декстрозы, глицерин или тому подобное. Для твердых композиций (например, в форме порошка, пилюли, таблетки или капсулы) традиционные нетоксичные твердые вспомогательные вещества могут включать, например, фармацевтические сорта маннита, лактозы, крахмала или стеарата магния. В дополнение к биологически нейтральным носителям фармацевтические композиции для введения могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, поверхностно-активный агент, консерванты и pH-буферные агенты и тому подобное, например ацетат натрия или сорбитан монолаурат.

Профилактически эффективное количество. В настоящей заявке термин "профилактически эффективное количество" или "профилактически эффективная доза" относится к количеству или дозе, необходимым для индукции иммунного ответа, достаточного для отсрочки наступления и/или снижения частоты и/или тяжести одного или нескольких симптомов, вызванных инфекцией *Streptococcus pneumoniae*.

Профилактика. Используемый в настоящей заявке термин "профилактика" относится к предотвращению проявления заболевания, задержке начала и/или снижению частоты и/или тяжести одного или нескольких симптомов конкретного заболевания, расстройства или состояния (например, инфекции *Streptococcus pneumoniae*). В некоторых вариантах реализации профилактика оценивается на популяционной основе, так что агент считается обеспечивающим профилактику против конкретного заболевания, расстройства или состояния, если наблюдается статистически значимое уменьшение развития, частоты и/или интенсивности одного или нескольких симптомов указанного заболевания, расстройства или состояния в популяции, восприимчивой к указанному заболеванию, расстройству или состоянию.

Субъект. Используемый в настоящей заявке термин "субъект" обозначает любое млекопитающее, включая мышей, кроликов и людей. В определенных вариантах реализации субъектом является взрослый, подросток или ребенок. В некоторых вариантах реализации используются термины "индивидуум" или "пациент", которые предназначены для взаимозаменяемости с термином "субъект".

Подробное описание

Нижеследующее описание раскрытых вариантов реализации и примеры носит исключительно иллюстративный характер по природе и никоим образом не предназначены для ограничения изобретения, его применимости или способов использования.

Настоящая заявка предлагает новые и улучшенные пневмококковые конъюгатные композиции со смешанным носителем и содержащие их вакцины. Хотя белок-носитель, CRM₁₉₇, и ранее использовался в пневмококковых конъюгатных вакцинах с одним носителем, в настоящей заявке впервые описывается применение CRM₁₉₇ в пневмококковой конъюгатной вакцине с со смешанным носителем.

Как обсуждалось выше, иммуногенность различных капсульных полисахаридных конъюгатов может варьироваться в зависимости от используемого пневмококкового серотипа и белка-носителя. В данной заявке описывается успешное конъюгирование серотипа 3 со столбнячным анатоксином в составе вакцины со смешанным носителем, несмотря на предыдущие представления о том, что серотип 3 является более иммуногенным при конъюгировании с дифтерийным анатоксином, а не со столбнячным анатоксином [2, 6]. В данной заявке также раскрывается неожиданное открытие, заключающееся в том, что ответ антител на серотип 3, конъюгированный с столбнячным анатоксином в 16-валентной пневмококковой конъюгатной композиции со смешанным носителем, был приблизительно в 4 раза выше, чем когда серотип 3 был конъюгирован с CRM₁₉₇ в 13-валентной пневмококковой конъюгатной композиции с одним носителем (PREVNAR 13).

Далее, это неожиданное открытие не ограничивалось серотипом 3, но также наблюдалось для других серотипов, конъюгированных со столбнячным анатоксином в 16-валентной пневмококковой конъюгатной композиции со смешанным носителем. Как показано в примерах, конъюгирование серотипов 1 и 3, 1 и 5 или 3 и 5 со столбнячным анатоксином в пневмококковой конъюгатной композиции со смешанным носителем с остальными серотипами, конъюгированными с CRM₁₉₇ (PVC16-13TT, PVC16-15TT и PVC16-35TT, соответственно) последовательно индуцировало значительно усиленные ответы антител на серотипы, конъюгированные со столбнячным анатоксином, по сравнению с ответами антител (IgG-ответ или титры МОНА) против тех же серотипов, конъюгированных с CRM₁₉₇ в пневмококковой конъюгатной композиции с одним носителем (PREVNAR 13), как показано в таблице ниже.

Таблица 1. Кратное увеличение ответа антител на серотипы, конъюгированные со столбнячным анатоксином в вакцине со смешанным носителем, по сравнению с PREVNAR 13

	Кратное увеличение ответа антител по сравнению с PREVNAR 13		
Серотип	PVC16-13TT	PVC16-15TT	PVC16-35TT
1 (IgG)	3X	3,9X	N/A
1 (МОНА)	6,3X	6,3X	N/A
3 (IgG)	5,5X	N/A	2,8X
3 (МОНА)	4X	N/A	4X
5 (IgG)	N/A	8,7X	3,2X
5 (МОНА)	N/A	5X	4X

Описанная в настоящей заявке 16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем также включает пневмококковые серотипы, не охваченные тремя пневмококковыми конъюгатными вакцинами, в настоящее время доступными на мировом рынке: PREVNAR (в некоторых странах называемая Prevenar), SYNFLORIX и PREVNAR 13. Число заболеваний, вызванных пневмококковыми серотипами, которые в настоящее время не охвачены, растет, отчасти из-за развития антибактериальной резистентности, увеличения числа пациентов с ослабленным иммунитетом и отсутствия иммунного давления. Например, ни одна из доступных в настоящее время пневмококковых конъюгатных вакцин не включает серотип 12F. Кроме того, ни одна из доступных в настоящее время пневмококковых

конъюгатных вакцин не включает серотипы 22F и 33F. Настоящее изобретение демонстрирует успешное внедрение серотипов 12F, 22F и 33F в пневмококковую конъюгатную вакцину со смешанным носителем.

Поливалентные пневмококковые конъюгатные композиции со смешанным носителем и способы их изготовления

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает поливалентную пневмококковую конъюгатную композицию со смешанным носителем, содержащую 16 различных пневмококковых конъюгатов капсульного полисахарида с белком, где каждый пневмококковый конъюгат капсульного полисахарида с белком содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из различных серотипов *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* представляют собой 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, где белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇ или столбняк анатоксин, причем два капсульных полисахарида конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM₁₉₇, и при этом два капсульных полисахарида конъюгированы со столбнячным анатоксином выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5. В некоторых вариантах реализации капсульные полисахариды из серотипов 1 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды из остальных серотипов конъюгированы с CRM₁₉₇. В другом варианте реализации капсульные полисахариды из серотипов 1 и 3 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM₁₉₇. В еще одном варианте реализации капсульные полисахариды серотипов 3 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM₁₉₇. В вакцине с конъюгатом полисахарид-белок белок-носитель конъюгирован с полисахаридным антигеном, главным образом, для усиления иммунного ответа (например, ответа антитела) на полисахаридный антиген.

Белки-носители предпочтительно представляют собой нетоксичные белки, имеющие небольшую или нулевую иммуногенность. Белки-носители должны поддаваться конъюгированию с пневмококковым полисахаридом с использованием стандартных процедур конъюгирования, как более подробно обсуждается ниже. Белки-носители, используемые в 16-валентной пневмококковой конъюгатной композиции со смешанным носителем, представляют собой столбнячный анатоксин (TT) и CRM₁₉₇, каждый из которых уже использовался при разработке пневмококковых конъюгатных вакцин, но никогда не использовался в одной вакцине со смешанным носителем. CRM-₁₉₇ представляет собой нетоксичный вариант (то есть, анатоксин) дифтерийного токсина, который сохраняет иммунологические свойства дифтерийного токсина дикого типа. CRM₁₉₇ отличается от дифтерийного токсина дикого типа по одному основанию в структурном гене, что приводит к единственной аминокислотной замене глутаминовой кислоты на глицин. CRM₁₉₇ обычно выделяют из культур штамма *Corynebacterium diphtheria* C7 (β197), выращенных на казеинокислотах и среде на основе дрожжевого экстракта. CRM₁₉₇ может быть очищен ультрафильтрацией, осаждением сульфатом аммония и ионообменной хроматографией. В альтернативном варианте, CRM₁₉₇ может быть получен рекомбинантным способом в соответствии с патентом США № 5614382, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. CRM₁₉₇ ранее использовался при разработке пневмококковых конъюгатных вакцин, но никогда не был компонентом вакцины со смешанным носителем.

Столбнячный анатоксин получают и используют во всем мире для крупномасштабной иммунизации против столбняка, вызванного *Clostridium tetani*. Столбнячный анатоксин также используется как отдельно, так и в сочетании с вакцинами против дифтерии и/или коклюша. Исходный белок, столбнячный токсин, обычно получают в культурах *Clostridium tetani*. Токсин столбняка представляет собой белок приблизительно 150 кДа и состоит из двух субъединиц (приблизительно 100 кДа и приблизительно 50 кДа), связанных сульфидной связью. Токсин обычно детоксифицируют формальдегидом и очищают от культуральных фильтратов с применением известных способов, таких как осаждение сульфатом аммония (см., например, [7], [8]), или методов хроматографии, как описано, например, в WO 1996/025425.

Токсин столбняка также может быть инактивирован с помощью рекомбинантных генетических средств.

Столбнячный анатоксин также использовали в качестве белка-носителя также в других вакцинах, в том числе в пневмококковых конъюгатных вакцинах. Но он никогда не использовался в пневмококковой конъюгатной композиции со смешанным носителем в сочетании с CRM₁₉₇. В данной области техники также не рекомендуется конъюгирование серотипа 3 со столбнячным анатоксином в пневмококковой конъюгатной композиции со смешанным носителем, поскольку было показано, что серотип 3 является более иммуногенным при конъюгировании с анатоксином дифтерии по сравнению со столбнячным анатоксином [2, 6].

Пневмококковые капсульные полисахариды, используемые в описанных в настоящей заявке композициях и вакцинах, включая капсульные полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, могут быть получены из *Streptococcus pneumoniae* с использованием любого доступного способа, включая стандартные способы, известные специалисту в данной области, в том числе, например, способы, раскрытые в WO 2006/110381, WO 2008/118752, WO 2006/110352 и опубликованной заявке на патент США №№ 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, 2008/0102498 и 2008/0286838, и все они включены в качестве ссылки в полном объеме.

Например, каждый серотип пневмококкового капсульного полисахарида может быть выращен в культуральной среде (например, среде на основе сои). Клетки лизируют, и отдельные полисахариды могут быть очищены от лизата путем центрифугирования, осаждения, ультрафильтрации и/или колоночной хроматографии. Кроме того, пневмококковый капсульный полисахарид может быть получен с использованием протоколов синтеза.

Капсульные полисахариды *Streptococcus pneumoniae* содержат повторяющиеся олигосахаридные звенья, которые могут содержать до 8 сахарных остатков. Капсульный сахаридный антиген может представлять собой полисахарид полной длины или он может быть уменьшен в размере (например, единственное олигосахаридное звено или короче, чем природная длина сахаридной цепи повторяющихся олигосахаридных звеньев). Размер капсульных полисахаридов может быть уменьшен различными способами, известными в данной области, такими как обработка кислотным гидролизом, обработка перекисью водорода, разделение по размерам с помощью гомогенизатора высокого давления, необязательно с последующей обработкой перекисью водорода для получения фрагментов олигосахарида или микрофлюидизации.

Пневмококковый конъюгат каждого из серотипов может быть получен путем конъюгирования капсульного полисахарида каждого серотипа с белком-носителем. Различные пневмококковые конъюгаты могут быть составлены в композицию, включающую композицию разовой дозы.

Для получения конъюгата полисахарид-белок капсульные полисахариды, полученные из каждого пневмококкового серотипа, могут быть химически активированы, так чтобы капсульные полисахариды могли прореагировать с белком-носителем. После активации каждый капсульный полисахарид может быть отдельно конъюгирован с белком-носителем с образованием гликоконъюгата. Химическая активация полисахаридов и последующее конъюгирование с белком-носителем могут быть достигнуты традиционными способами. Например, вицинальные гидроксильные группы на конце капсульных полисахаридов могут быть окислены до альдегидных групп с помощью окислителей, таких как периодаты (включая периодат натрия, периодат калия или периодическую кислоту), как описано, например, в патенте США No. N 4365170, 4673574 и 4902506, которые полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Полисахариды также могут быть активированы тетрафторборатом 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP) с образованием цианатного эфира. Затем активированный полисахарид связывают непосредственно или через спейсерную или линкерную группу с аминогруппой на белке-носителе.

Такой спейсер может представлять собой, например, цистамин или цистеамин для получения тиолированного полисахарида, который может быть связан с носителем через тиоэфирную связь, полученную после реакции с белком-носителем, активированным малеимидом (например, с использованием N-[γ -малеимидобутирлокси] сложного эфира сукцинимид (GMBS), или галоацетилованный белком-носителем (например, с использованием йодоацетимида, N-сукцинимидилбромацетата (SBA; SIB), N-сукцинимидил(4-йодоацетил)аминобензоата (SIAB), сульфосукцинимидил(4-йодобензоацетил(4-йодоацетил)аминобензоата (сульфо-SIAB), N-сукцинимидилийодоацетата (SIA) или сукцинимидил-3-[бромацетамидо]пропионат (SBAP)). Предпочтительно, цианатный эфир (необязательно полученный с помощью COAP) связывают с гександиамином или дигидразидом адипиновой кислоты (АОН), а аминопроизводный сахарид конъюгируют с белком-носителем с использованием карбодиимида (например, EОAC или EOC) через карбоксильную группу на белке-носителе. Такие конъюгаты описаны, например, в WO 93/15760, WO 95/08348 и WO 96/129094. Конъюгирование активированных капсульных полисахаридов и белков-носителей может быть достигнуто, например, путем восстановительного аминирования, как описано, например, в опубликованных заявках на патент США № 2006/0228380, 2007/0231340, 2007/0184071 и 2007/0184072, WO 2006/110381, WO 2008/079653 и WO 2008/143709, все из которых включены в качестве ссылки во всей своей полноте. Например, активированные капсульные полисахариды и белок-носитель могут реагировать с восстановителем с образованием конъюгата. Подходящие восстанавливающие агенты включают борогидриды, такие как цианоборогидрид натрия, боранпиридин, триацетоксиборгидрид натрия, борогидрид натрия или борогидридная обменная смола. В конце реакции восстановления в конъюгатах могут оставаться непрореагировавшие альдегидные группы. Непрореагировавшие альдегидные группы могут быть копированы с использованием подходящего копирующего агента, такого как борогидрид натрия (NaBH_4). В одном варианте реализации реакцию восстановления проводят в водном растворителе. В другом варианте реализации реакцию проводят в апротонном растворителе. В одном варианте реализации реакцию восстановления проводят в растворителе ДМСО (диметилсульфоксид) или в растворителе ДМФА (диметилформамид). Активированные капсульные полисахариды могут быть конъюгированы непосредственно с белком-носителем или косвенно посредством использования спейсера или линкера, такого как бифункциональный линкер. Линкер необязательно является гетеробифункциональным или гомобифункциональным, имеющим, например, реакционноспособную аминогруппу и реакционноспособную группу карбоновой кислоты, 2 реакционноспособные аминогруппы или две реакционноспособные группы карбоновой кислоты.

В других подходящих способах конъюгирования используют карбодиимиды, гидразиды, активные сложные эфиры, норборан, *p*-нитробензойную кислоту, N-гидроксисукцинимид, S-NHS, EOC, TSTU, как

описано, например, в опубликованной международной заявке на патент № WO 98/42721. Конъюгирование может включать карбонильный линкер, который может быть образован реакцией свободной гидроксильной группы сахара с 1,1'-карбонилдиимидазолом (CDI) (см. Bethell et al. (1979) J. Biol. Chem. 254: 2572-2574; Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218: 509-518) с последующей реакцией с белком с образованием карбаматной связи. Это может включать восстановление аномерного конца до первичной гидроксильной группы, необязательную защиту/снятие защиты с первичной гидроксильной группы, реакцию первичной гидроксильной группы с CDI с образованием промежуточного соединения карбамата CDI и связывание промежуточного соединения карбамата CDI с аминогруппой на белке.

Отношение полисахарида к белку-носителю для пневмококковых конъюгатных вакцин обычно находится в диапазоне 0,3-3,0 (в весовом соотношении), но может варьироваться в зависимости от серотипа. Указанное соотношение может быть определено либо независимым измерением количества присутствующего белка и полисахарида, либо способами, обеспечивающим прямое измерение указанного соотношения, известными в данной области. Указанные способы включают 1H ЯМР-спектроскопию или использование SEC-HPLC-UV/RI (эксклюзионная ВЭЖХ - УФ/показатель преломления) с двойным мониторингом (т.е., показателя преломления и УФ-излучения для определения общего количества материала и содержания белка соответственно), чтобы профилировать соотношение сахарид/белок по распределению конъюгатов по размерам, а также с помощью SEC-HPLC-MALLS (эксклюзионная хроматография с детектированием рассеивания лазерного излучения с кратными углами) или MALDI-TOF-MS (временнó-пролётная масс-спектрометрия с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы). Полученные таким образом конъюгаты полисахарид-белок могут быть очищены и обогащены различными способами. Указанные способы включают концентрирование/диалфильтрацию, колоночную хроматографию и глубинную фильтрацию. Очищенные полисахаридно-белковые конъюгаты объединяют вместе для получения 16-валентной пневмококковой конъюгатной композиции со смешанным носителем, которую можно использовать в качестве вакцины. Составление вакцинной композиции может быть выполнено с использованием известных в данной области способов. Состав вакцины выбран так, чтобы он был совместим с предполагаемым способом введения. Отдельные пневмококковые капсульные полисахарид-белковые конъюгаты могут быть смешаны с физиологически приемлемым носителем для приготовления такой композиции. Примеры таких носителей включают, среди прочего, воду, забуференный солевой раствор, полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и растворы декстрозы. В некоторых вариантах реализации 16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем дополнительно содержит адъювант. Адъюванты могут включать суспензию минералов (квасцы, соли алюминия, такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия, гидроксифосфат алюминия сульфат и т.д.), на которых адсорбируется антиген; или водно-масляную эмульсию, в которой раствор антигена эмульгирован в минеральном масле (например, неполный адъювант Фрейнда), иногда с включением убитых микобактерий (полный адъювант Фрейнда) для дальнейшего усиления антигенности. Иммуностимулирующие олигонуклеотиды (например те, которые включают мотив CpG) также могут быть использованы в качестве адъювантов (например, см. патенты США №№ 6 194 388; 6 207 646; 6 214 806; 6 218 371; 6 239 116; 6 339 068; 6 406 105; и 6 429 199). Адъюванты также включают биологические молекулы, такие как липиды и костимулирующие молекулы. Типичные биологические адъюванты включают AS04 [9], IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L и 41 BBL.

В некоторых вариантах адъювантом является адъювант на основе алюминия.

В частных вариантах реализации адъювант выбран из группы, состоящей из фосфата алюминия, сульфата алюминия и гидроксида алюминия. В частных вариантах адъювантом является фосфат алюминия. В некоторых вариантах реализации композиция предназначена для применения в качестве вакцины против инфекции *Streptococcus pneumoniae*.

Способы профилактики и применения

В одном аспекте данное изобретение относится к вакцине, содержащей 16-валентную пневмококковую конъюгатную композицию со смешанным носителем и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество включает, по меньшей мере, буфер, такой как сукцинатный буфер, соль, такую как хлорид натрия, и/или поверхностно-активное вещество, такое как сложный эфир полиоксиэтиленсорбитана (например, полисорбат 80). В некоторых вариантах реализации капсульные полисахариды из серотипов 1 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды из серотипов 3, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇. В другом варианте реализации капсульные полисахариды из серотипов 1 и 3 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды из серотипов 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇. В еще одном варианте реализации капсульные полисахариды из серотипов 3 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды из серотипов 1, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇. В некоторых вариантах реализации вакцина вызывает у человека защитный иммунный ответ против заболевания, вызванного инфекцией *Streptococcus pneumoniae*.

В соответствии с другим аспектом данное изобретение предлагает способ для профилактики инфекции или заболевания, вызванного *Streptococcus pneumoniae*, включающий введение субъекту-человеку профилактически эффективного количества 16-валентной пневмококковой конъюгатной композиции со смешанным носителем или вакцины, содержащей ее. 16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем или вакцина, содержащая ее, может вводиться любым способом, включая, например, системное введение или через слизистую оболочку, как более подробно описано ниже.

В некоторых вариантах реализации указанным субъектом-человеком является субъект пожилого возраста, и заболевание представляет собой пневмонию или инвазивное пневмококковое заболевание (IPD). В определенных вариантах реализации указанному пожилому субъекту по меньшей мере 50 лет. В других вариантах реализации пожилому субъекту по меньшей мере 55 лет. В еще других вариантах реализации пожилому субъекту по меньшей мере 60 лет.

В других вариантах реализации указанным субъектом-человеком является младенец, и заболевание представляет собой пневмонию, инвазивное пневмококковое заболевание (IPD) или острый средний отит (ОСО). В определенных вариантах реализации младенцу 0-2 года. В других вариантах реализации младенцу от 2 до 15 месяцев.

В еще одном варианте реализации указанному субъекту-человеку от 6 недель до 17 лет, и заболевание представляет собой пневмонию, инвазивное пневмококковое заболевание (IPD) или острый средний отит (ОСО). В определенных вариантах реализации указанному субъекту-человеку от 6 недель до 5 лет. В других вариантах реализации субъекту от 5 до 17 лет. Количество конъюгата в каждой дозе вакцины или профилактически эффективное количество поливалентной пневмококковой конъюгатной композиции со смешанным носителем может быть выбрано как количество, которое обеспечивает профилактику без значительных побочных эффектов. Такое количество может варьироваться в зависимости от пневмококкового серотипа. Как правило, каждая доза может включать от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 100 мкг полисахарида, в частности от приблизительно 0,1 до 10 мкг и более конкретно от приблизительно 1 мкг до приблизительно 5 мкг. Оптимальные количества компонентов для конкретной вакцины могут быть установлены с помощью стандартных исследований, включающих наблюдение соответствующих иммунных ответов у субъектов. Например, количество для вакцинации человека может быть определено путем экстраполяции результатов тестов на животных. Кроме того, доза может быть определена опытным путем.

В некоторых вариантах реализации вакцина или 16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем может представлять собой однократную дозу 0,5 мл, составленную так, чтобы она содержала от приблизительно 1 мкг до приблизительно 5 мкг каждого капсульного полисахарида; от приблизительно 1 мкг до приблизительно 25 мкг ТТ; от приблизительно 20 до приблизительно 75 мкг CRM₁₉₇; и, необязательно, от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5 мг адьюванта в виде элементарного алюминия. В некоторых вариантах реализации вакцина или 16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем может представлять собой однократную дозу 0,5 мл, составленную так, чтобы она содержала от приблизительно 2 мкг до приблизительно 2,5 мкг каждого капсульного полисахарида, кроме серотипа 6В; от приблизительно 4 до приблизительно 5 мкг капсульного полисахарида серотипа 6В; от приблизительно 5 до приблизительно 15 мкг ТТ; от приблизительно 30 до приблизительно 60 мкг CRM₁₉₇; и, необязательно, от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,2 мг элементарного алюминиевого адьюванта. В некоторых вариантах реализации 16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем или вакцина, содержащая ее, в качестве вспомогательных веществ дополнительно содержит хлорид натрия и сукцинат натрия.

В некоторых вариантах реализации 16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем может быть составлена в виде жидкого состава, в котором каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 1 и 3 конъюгирован с ТТ, а каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9В, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгирован с CRM₁₉₇. Каждая доза 0,5 мл может быть составлена в виде жидкой композиции, содержащей: приблизительно 2,2 мкг каждого полисахарида, за исключением 6В в количестве приблизительно 4,4 мкг; от приблизительно 10 мкг до приблизительно 15 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 1 и 3) и от приблизительно 40 мкг до приблизительно 50 мкг белка-носителя CRM₁₉₇; 0,125 мг элементарного алюминия (0,5 мг фосфата алюминия) в качестве адьюванта; и хлорид натрия и сукцинат натрия в качестве вспомогательных веществ.

В некоторых вариантах реализации 16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем может быть составлена в виде жидкого состава, в котором каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 1 и 5 конъюгирован с ТТ, а каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 3, 4, 6А, 6В, 7F, 9В, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгирован с CRM₁₉₇. Каждая доза 0,5 мл может быть составлена в виде жидкой композиции, содержащей: приблизительно 2,2 мкг каждого сахара, за исключением 6В в количестве приблизительно 4,4 мкг; от приблизительно 5 мкг до приблизительно 10 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 1 и 5) и от приблизительно 40 мкг до приблизительно 50 мкг белка-носителя CRM₁₉₇; приблизительно 0,125 мг эле-

ментарного алюминия в качестве адъюванта (0,5 мг фосфата алюминия); и хлорид натрия и сукцинат натрия в качестве вспомогательных веществ. В некоторых вариантах реализации 16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем может быть составлена в виде жидкого состава, в котором каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 3 и 5 конъюгирован с ТТ, а каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 1, 4, 6А, 6В, 7F, 9В, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгирован с CRM₁₉₇. Каждая доза 0,5 мл может быть составлена в виде жидкой композиции, содержащей: приблизительно 2,2 мкг каждого сахара, за исключением 6В в количестве приблизительно 4,4 мкг; от приблизительно 10 мкг до приблизительно 15 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 3 и 5) и от приблизительно 40 мкг до приблизительно 50 мкг белка-носителя CRM₁₉₇; приблизительно 0,125 мг элементарного алюминия в качестве адъюванта (0,5 мг фосфата алюминия); и хлорид натрия и сукцинат натрия в качестве вспомогательных веществ. В некоторых вариантах реализации указанным жидким составом может быть заполнен шприц с однократной дозой без консерванта. После встряхивания указанная жидкая композиция становится вакциной, представляющей собой однородную белую суспензию, готовую для внутримышечного введения.

Данная 16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем может быть введена в виде одной инъекции или как часть серии иммунизации. Например, 16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем может вводиться 2, 3, 4 или более раз с подходящими интервалами, например 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев или их комбинацией. В некоторых вариантах реализации 16-валентную пневмококковую конъюгатную композицию со смешанным носителем вводят младенцу 4 раза в течение первых 15 месяцев после рождения, включая, например, введение в возрасте приблизительно 2, 3, 4 и 12-15 месяцев; в возрасте 3, 4, 5 и 12-15 месяцев; или в возрасте приблизительно 2, 4, 6 и 12-15 месяцев. Эту первую дозу можно вводить уже в возрасте 6 недель. В другом варианте реализации 16-валентную пневмококковую конъюгатную композицию со смешанным носителем вводят младенцу 3 раза в течение первых 15 месяцев после рождения, включая, например, введение в возрасте 2, 4 и 11-12 месяцев.

Поливалентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем может также включать один или несколько белков *Streptococcus pneumoniae*. Примеры белков *Streptococcus pneumoniae*, подходящих для включения, включают белки, которые определены в международной заявке на патент WO 02/083855, а также те, которые описаны в международной заявке на патент WO02/053761.

Данная 16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем может быть введена субъекту одним или несколькими способами введения, известными специалисту в данной области, такими как парентеральный, трансдермальный или трансмукозальный, интраназальный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутрикожный, внутривенный или подкожный способ, и составлена соответствующим образом. Данная 16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем может быть составлена так, чтобы она соответствовала предполагаемому способу введения.

В некоторых вариантах реализации 16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем может вводиться в виде жидкого состава путем внутримышечной, внутрибрюшинной, подкожной, внутривенной, внутриартериальной или трансдермальной инъекции или инъекции в слизистую оболочку дыхательных путей. 16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем может быть составлена в жидкой форме или в лиофилизированной форме. В некоторых вариантах реализации инъекционные композиции готовят в традиционных формах, либо в виде жидких растворов или суспензий, в твердых формах, пригодных для приготовления раствора или суспензии в жидкости перед инъекцией, или в виде эмульсий. В некоторых вариантах инъекционные растворы и суспензии получают из стерильных порошков или гранул. Общие соображения по составлению и производству фармацевтических агентов для введения такими путями можно найти, например, в справочнике Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995; включенном в настоящую заявку посредством ссылки. В настоящее время для доставки терапевтических агентов непосредственно в легкие и дыхательную систему наиболее часто используются пероральный или аэрозольный способ или назальный спрей (например, путем ингаляции). В некоторых вариантах реализации 16-валентную пневмококковую конъюгатную композицию со смешанным носителем вводят с помощью устройства, доставляющего дозированную дозу композиции. Подходящие устройства для применения при доставке внутрикожных фармацевтических композиций, описанных в настоящей заявке, включают устройства с короткими иглами, такие как устройства, описанные в патенте США № 4886499, патенте США № 5 190 521, патенте США № 5 328 483, патенте США № 5 527 288, патенте США № 4 270 537, патенте США № 5 015 235, патенте США № 5 141 496, патенте США № 5 417 662 (все из которых включены в настоящую заявку посредством ссылки). Композиции для внутрикожного введения также могут вводиться с помощью устройств, которые ограничивают эффективную длину проникновения иглы в кожу, таких как описанные в WO 1999/34850, включенной в настоящую заявку в качестве ссылки, и их функциональные эквиваленты. Также пригодны струйные инъекционные устройства, которые доставляют жидкие вакцины в дерму через инжектор жидкой струи или через иглу, которая прокалывает роговой слой и создает струю, достигающую дермы. Струйные инъекционные устройства описаны, например, в

патенте США № 5480381, патенте США № 5599302, патенте США № 5344444, патенте США № 5 993 412, патенте США № 5 649 912, патенте США № 5 569 189, патенте США № 5 704 911, патенте США № 5,383,851, патенте США № 5,893,397, патенте США № 5466220, патенте США № 5,339,163, патенте США № 5,312,335, патенте США № 5,503,627, патенте США № 5064413, патенте США № 5520639, патенте США № 4595556, патенте США № 4790824, патенте США № 4944880, патенте США № 4940460, WO1997/37705 и WO1997/13537 (все из которых включены в настоящую заявку посредством ссылки). Также пригодны баллистические устройства для доставки порошка/частиц, которые используют сжатый газ для ускоренного введения вакцины в форме порошка через внешние слои кожи в дерму. Кроме того, могут быть использованы обычные шприцы в классическом методе Манту внутрикожного введения.

Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Примеры масла включают растительное или животное масло, арахисовое масло, соевое масло, оливковое масло, подсолнечное масло, печеночное масло, синтетическое масло, такое как рыбий жир, и липиды, полученные из молока или яиц. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и забуференные среды. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или нелетучие масла. Внутривенные носители включают наполнители жидкости и питательных веществ, наполнители электролитов (например, основанные на декстрозе Рингера) и тому подобное. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные препараты, антиоксиданты, хелатообразующие агенты, инертные газы и тому подобное.

Данная 16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем может быть изготовлена в форме флакона с однократной дозой, флакона с многократной дозой или предварительно заполненного шприца. Фармацевтически приемлемые носители для жидкого состава включают водный или неводный растворитель, суспензию, эмульсию или масло. Композиция может быть изотонической, гипертонической или гипотонической. Однако желательно, чтобы композиция для инфузии или инъекции была в основном изотонической. Так, изотоничность или гипертоничность могут быть выгодны для хранения композиции. Когда композиция является гипертонической, перед введением эту композицию можно разбавить до изотоничности. Тонизирующий агент может представлять собой ионный регулятор тоничности, такой как соль, или неионный регулятор тоничности, такой как углевод. Ионные регуляторы тоничности включают, среди прочего, хлорид натрия, хлорид кальция, хлорид калия и хлорид магния. Неионогенные регуляторы тоничности включают, среди прочего, сорбит и глицерин. Предпочтительно включен по меньшей мере один фармацевтически приемлемый буфер. Например, когда композиция представляет собой инфузию или инъекцию, предпочтительно составлять ее в буфере с буферной способностью от pH 4 до pH 10, например pH от 5 до pH 9 или от 6 до pH 8. Буфер может быть выбран из подходящих согласно Фармакопее США (USP). Например, буфер может быть выбран из группы, состоящей из одноосновной кислоты, такой как уксусная кислота, бензойная кислота, глюконовая кислота, глицириновая кислота и молочная кислота; двухосновной кислоты, такой как аконитовая кислота, адипиновая кислота, аскорбиновая кислота, угольная кислота, глутаминовая кислота, яблочная кислота, янтарная кислота и винная кислота; многоосновной кислоты, такой как лимонная кислота и фосфорная кислота; и основания, такого как аммиак, диэтанолламин, глицин, триэтанолламин и ТРИС.

Данная 16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем может содержать поверхностно-активное вещество. Примеры поверхностно-активного вещества включают, среди прочего, сложный эфир полиоксиэтиленсорбитана (обычно называемый Твин), в частности, полисорбат 20 и полисорбат 80; сополимеры (такие как DOWFAX) этиленоксида (EO), пропиленоксида (PO), бутиленоксида (BO); октоксинолы с разными повторами этокси(окси-1,2-этандинил) группы, в частности октоксинол-9 (тритон-100); этилфеноксиполиэтоксиэтанол (IGEPAL CA-630/NP-40); фосфолипид, такой как лецитин; этоксилат нонилфенола, такой как серия TERGITOL NP; полиоксиэтиленовые простые эфиры жирных спиртов - лаурилового, цетилового, стеарилового, олеилового (поверхностно-активное вещество Brij), в частности монолауриловый простой эфир триэтиленгликоля (Brij 30); эфир сорбита, известный как SPAN, в частности, триолеат сорбита (Span 85) и монолаурат сорбита.

Могут использоваться смеси поверхностно-активных веществ, таких как Твин 80/Span 85. Также пригодна комбинация сложного эфира полиоксиэтиленсорбитана, такого как Твин 80, и октоксинола, такого как Тритон X-100. Также является предпочтительной комбинация лаурет 9 и Твин и/или октоксина. Предпочтительно количество включенного сложного эфира полиоксиэтиленсорбитана (такого как Твин 80) может составлять от 0,01 до 1% (вес./об.), от 0,01 до 0,1% (вес./об.), от 0,01 до 0,05% (вес./об.), или приблизительно 0,02%; количество включенного октилфеноксиполиоксиэтанола или нонилфеноксиполиоксиэтанола (такого как Тритон X-100) может составлять от 0,001 до 0,1% (вес./об.), в частности, от 0,005 до 0,02%; и количество включенного полиоксиэтиленового эфира (такого как лаурет 9) может составлять от 0,1 до 20% (вес./об.), возможно от 0,1 до 10%, в частности от 0,1 до 1% или приблизительно 0,5%. В некоторых вариантах реализации 16-валентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем может быть доставлена через систему с контролем высвобождения. Например,

для введения могут быть использованы внутривенная инфузия, трансдермальный пластырь, липосома или другие способы. В одном аспекте можно использовать макромолекулы, такие как микросфера или имплантат.

Вышеупомянутое описание характеризует настоящее изобретение в целом. Более полное понимание может быть получено со ссылкой на следующие конкретные примеры. Указанные примеры описаны исключительно с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Примеры

Пример 1. Получение капсульных полисахаридов *S. Pneumoniae*.

Культивирование *S. pneumoniae* и очистку капсульных полисахаридов проводили способами, известными специалисту в данной области. Серотипы *S. pneumoniae* были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC) (серотип 1: ATCC № 6301; серотип 3: ATCC № 6303; серотип 4: ATCC № 6304; серотип 5: ATCC № 6305; серотип 6A: ATCC № 6306, серотип 6B: ATCC № 6326, серотип 7F: ATCC № 10351, серотип 9V: ATCC № 10368, серотип 12F: ATCC № 6312, серотип 14: ATCC № 6314, серотип 18C: ATCC № 10356; серотип 19A: ATCC № 10357; серотип 19F: ATCC № 6319; серотип 22F: ATCC № 6322; серотип 23F: ATCC № 6323; серотип 33F: ATCC № 10370). *S. pneumoniae* были охарактеризованы наличием капсул и неподвижностью, грамположительным диплококком в форме ланцета и альфа-гемолизом в среде с агаром крови. Серотипы были идентифицированы с помощью теста Келлинга с использованием специфических анти-сывороток (патент США № 5847112).

Приготовление банков клеток.

Было создано несколько поколений посевного материала для наработки штаммов и удаления компонентов животного происхождения (поколения F1, F2 и F3). Было произведено два дополнительных поколения посевного материала. Первое дополнительное поколение культивировали из флакона F3, а последующее поколение культивировали из флакона первого дополнительного поколения. Флаконы посевного материала хранили замороженными (ниже -70°C) с синтетическим глицерином в качестве криоконсерванта. Для приготовления банка клеток все культуры выращивали в среде на основе сои. Перед замораживанием клетки концентрировали центрифугированием, отработанную среду удаляли и клеточные осадки ресуспендировали в свежей среде, содержащей криоконсервант (такой как синтетический глицерин).

Культивирование и сбор.

Культуры из рабочего банка клеток инокулировали в флаконы посевного материала, содержащие среду на основе сои, и культивировали. После достижения целевой оптической плотности (поглощения света) флакон посевного материала использовали для инокуляции ферментера, содержащего среду на основе сои. Культивирование прекращали, когда значение оптической плотности становилось постоянным. После прекращения культивирования в культуру добавляли дезоксихолат натрия для лизиса клеток. Полученное содержимое ферментера охлаждали и индуцировали осаждение белка. Затем смесь центрифугировали для удаления осажденных белков и клеточного дебриса.

Очистка.

Раствор, полученный в результате центрифугирования, фильтровали через глубинный фильтр для удаления белков и клеточного дебриса, которые не выпали в осадок при центрифугировании. Фильтрат концентрировали на мембране с молекулярной массой 100 кДа и концентрат подвергали диафильтрации с 10 объемами 25 mM натрий-фосфатного буфера (pH 7,2) для получения образца. Образец фильтровали для сбора супернатанта, из которого осаждали и фильтровали полисахариды. Фильтрат концентрировали на мембране 30 кДа, а концентрат подвергали диафильтрации с использованием приблизительно 10 объемов трижды дистиллированной воды. После проведения диафильтрации оставшийся раствор фильтровали через фильтр 0,2 мкм. В ходе процесса фильтрат подвергали контрольному тестированию (внешний вид, оставшиеся белки, оставшиеся нуклеиновые кислоты, эндотоксины, молекулярные веса и общее количество полисахаридов). Концентрат стерильно фильтровали и хранили при -20°C.

Пример 2. Приготовление конъюгата капсульного полисахарида *S.pneumoniae* с белком-носителем.

Полисахариды разных серотипов активировали различными путями и затем конъюгировали с белком-носителем, CRM₁₉₇ или TT. В частности, конъюгаты получали путем конъюгирования каждого из капсульных полисахаридов всех серотипов с CRM₁₉₇ и путем конъюгирования каждого из капсульных полисахаридов серотипов 1, 3 и 5 с TT. Процесс активации включает уменьшение размера каждого капсульного полисахарида до целевого молекулярного веса, химическую активацию и замену буфера посредством ультрафильтрации. Конъюгаты очищали с использованием ультрафильтрации и, наконец, фильтровали через фильтр 0,2 мкм. Параметры процесса, такие как pH, температура, концентрация и время, указаны ниже.

(1) Процесс активации. Стадия 1: гидролиз.

Восстановительное аминирование является известным способом конъюгирования полимеров, при котором амидная связь образуется между первичной аминогруппой (-NH₂) белка и альдегидом сахара. Однако поскольку полисахариды *S. pneumoniae* не имеют альдегидных групп, к пневмококковому капсульному полисахариду добавляют альдегидную группу. Диольная структура моносахарида может быть

окислена периодатом натрия (NaIO_4) с образованием альдегидной группы. Капсульные полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 6A, 12F, 14, 18C, 22F и 33F предварительно обрабатывали следующим образом.

В случае серотипа 1 к раствору капсульного полисахарида добавляли гидроксид натрия (при конечной концентрации основания 0,05 М) и раствор инкубировали при $50 \pm 2^\circ\text{C}$. Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от приблизительно 21°C до приблизительно 25°C и добавляли к нему соляную кислоту до конечного pH $6,0 \pm 0,1$, тем самым останавливая гидролиз.

В случае серотипа 3, к раствору капсульного полисахарида добавляли соляную кислоту (при конечной концентрации кислоты 0,01 М) и раствор инкубировали при $60 \pm 2^\circ\text{C}$. Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от приблизительно 21°C до приблизительно 25°C и добавляли к нему 0,1 М фосфат натрия до конечного значения pH $6,0 \pm 0,1$, тем самым останавливая гидролиз.

В случае серотипа 4, к раствору капсульного полисахарида добавляли соляную кислоту (при конечной концентрации кислоты 0,1 М), и раствор инкубировали при $45 \pm 2^\circ\text{C}$. Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от приблизительно 21°C до приблизительно 25°C и добавляли к нему 1 М фосфат натрия до конечного значения pH $6,0 \pm 0,1$, тем самым останавливая гидролиз.

В случае серотипа 6A к раствору капсульного полисахарида добавляли ледяную уксусную кислоту (при конечной концентрации кислоты 0,1 М), и раствор инкубировали при $60 \pm 2^\circ\text{C}$. Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от приблизительно 21°C до приблизительно 25°C и добавляли к нему 1 М гидроксид натрия до конечного значения pH $6,0 \pm 0,1$. В случае серотипа 12F к раствору капсульного полисахарида добавляли соляную кислоту (при конечной концентрации кислоты 0,01 М), и раствор инкубировали при $70 \pm 2^\circ\text{C}$. Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от приблизительно 21°C до приблизительно 25°C и добавляли к нему 0,1 М фосфат натрия до конечного значения pH раствора $6,0 \pm 0,1$, тем самым останавливая гидролиз.

В случае серотипов 14 и 18C к раствору капсульного полисахарида добавляли ледяную уксусную кислоту (при конечной концентрации кислоты 0,2 М), и раствор инкубировали при температуре приблизительно $91-96^\circ\text{C}$. Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от приблизительно 21°C до приблизительно 25°C и добавляли к нему 1 М фосфат натрия, так чтобы конечный pH раствора составлял $6,0 \pm 0,1$. В случае серотипов 22F и 33F к раствору капсульного полисахарида добавляли соляную кислоту (при конечной концентрации кислоты 0,01 М), и раствор инкубировали при $60 \pm 2^\circ\text{C}$. Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от приблизительно 21°C до приблизительно 25°C и добавляли к нему 0,1 М фосфат натрия до конечного значения pH $6,0 \pm 0,1$, тем самым останавливая гидролиз.

Каждый из полученных капсульных полисахаридов разбавляли в воде для инъекций (ВДИ) с ацетатом натрия и фосфатом натрия до конечной концентрации от приблизительно 1,0 мг/мл до приблизительно 2,0 мг/мл.

Этап 2. Реакция с периодатом.

Молярный эквивалент периодата натрия для каждой активации пневмококкового сахара определяли, используя общее содержание сахара. Тщательно перемешивая, реакции окисления давали протекать в течение 16-20 часов при $21-25^\circ\text{C}$ для всех серотипов, кроме 1, 7F и 19F, для которых температура составляла 10°C или менее. Во время процесса конъюгирования поддержание концентрации альдегида на соответствующем уровне обеспечивает последовательное и стабильное получение конъюгатов. Степень образования альдегида определяется соотношением между концентрацией образующегося альдегида и концентрацией сахара, и данная степень связана со степенью окисления (Do), которая установлена для каждого серотипа, как показано в табл. 2 и табл. 3.

Таблица 2. Диапазон Do для всех серотипов, которые должны быть конъюгированы с CRM₁₉₇

Серотип	Диапазон Do	Серотип	Диапазон Do
Серотип 1	4 - 0	Серотип 12F	1 - 9
Серотип 3	2 - 8	Серотип 14	6 - 13
Серотип 4	1 - 5	Серотип 18C	6 - 14
Серотип 5	2 - 6	Серотип 19A	7 - 13
Серотип 6A	5 - 15	Серотип 19F	6 - 12
Серотип 6B	7 - 13	Серотип 22F	1 - 16
Серотип 7F	2 - 8	Серотип 23F	6 - 14
Серотип 9V	4 - 9	Серотип 33F	1 - 15

Таблица 3. Диапазон Do для серотипов 1, 3 и 5, которые должны быть конъюгированы с ТТ

Серотип	Диапазон Do
Серотип 1	1 - 15
Серотип 3	2 - 14
Серотип 5	1 - 15

Стадия 3. Ультрафильтрация.

Окисленный сахарид концентрировали и подвергали диафильтрации с ВДИ на ультрафильтре MWC0 100 кДа (ультрафильтр 30 кДа для серотипа 1 и ультрафильтр 5 кДа для серотипа 18С). Диафильтрацию проводили с использованием 0,9% раствора хлорида натрия для серотипа 1, 0,01 М натрий-ацетатного буфера (рН 4,5) для серотипов 7F и 23F и 0,01 М натрий-фосфатного буфера (рН 6,0) для серотипа 19F. Пермеат отбрасывали, а ретентат фильтровали через фильтр 0,2 мкм.

Стадия 4. Лиофилизация.

Для капсульных полисахаридов серотипов 3, 4, 5, 9V, 14, 22F и 33F, которые должны быть конъюгированы с белком-носителем с использованием водного растворителя, готовили смешанный раствор полисахаридов и белка-носителя без добавления сахарозы, лиофилизировали, а затем хранили при температуре $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Для капсульных полисахаридов серотипов 1 и 18С, которые должны быть конъюгированы с белком-носителем с использованием водного растворителя, полисахариды и белок-носитель готовили независимо без добавления сахарозы, лиофилизировали и затем хранили при $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Для капсульных полисахаридов серотипов 6A, 6B, 7F, 19A, 19F и 23F, которые должны быть конъюгированы с белком-носителем с использованием растворителя ДМСО, к активированным сахаридам добавляли предварительно определенное количество сахарозы до достижения конечной концентрации сахарозы $5 \pm 3\%$, затем образцы независимо готовили, лиофилизировали и затем хранили при $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Для капсульного полисахарида серотипа 12F к активированному сахариду добавляли заранее определенное количество сахарозы для достижения конечной концентрации сахарозы $10\% \pm 5\%$, затем образец помещали в стеклянные флаконы, лиофилизировали и хранили при $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

(2) Процесс конъюгирования.

Конъюгирование в водной среде проводили для серотипов 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 18С, 22F и 33F, а конъюгирование в ДМСО проводили для серотипов 6A, 6B, 7F, 12F, 19A, 19F и 23F. Каждый из капсульных полисахаридов конъюгировали с белком-носителем в соотношении от 0,2 до 2 :1.

Стадия 1. Растворение.

Конъюгирование в водной среде.

Для серотипов 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 18С, 22F и 33F лиофилизированный образец оттаивали и уравнивали при комнатной температуре. Лиофилизированный образец восстанавливали до реакционной концентрации с использованием натрий-фосфатного буферного раствора при $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ в соотношении, установленном для каждого серотипа.

Конъюгирование в диметилсульфоксиде (ДМСО).

Для серотипов 6A, 6B, 7F, 12F, 19A, 19F и 23F лиофилизированный образец оттаивали, уравнивали при комнатной температуре и восстанавливали в ДМСО.

Стадия 2. Реакция конъюгирования.

Конъюгирование в водной среде.

Для серотипов 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 18С, 22F и 33F, подлежащих конъюгированию с CRM₁₉₇, реакцию конъюгирования инициировали путем добавления раствора цианоборогидрида натрия (100 мг/мл) к 1,0-1,4. моль цианоборогидрида натрия на моль сахара. Однако для серотипов 1 и 3 реакцию инициировали добавлением раствора цианоборогидрида натрия к 0,5 моль цианоборогидрида натрия на моль сахара.

Для серотипов 1, 3 и 5, подлежащих конъюгированию с ТТ, реакцию конъюгирования инициировали добавлением раствора цианоборогидрида натрия (100 мг/мл) к 1,0-1,4 моль цианоборогидрида натрия на моль сахара, за исключением серотипа 1 - добавление 0,5 моль цианоборогидрида натрия на моль сахара.

Реакционную смесь инкубировали при температуре от 23 до 37°C в течение от 44 до 106 ч. Температура и время реакции были подобраны по серотипу. Затем температуру снижали до $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, и в реактор добавляли 0,9% хлористого натрия. Добавляли раствор борогидрида натрия (100 мг/мл) для получения 1,8-2,2 молярных эквивалентов борогидрида натрия на моль сахара. Смесь инкубировали при $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 3-6 часов. Данная процедура позволила уменьшить количество непрореагировавших альдегидов, присутствующих на сахарах. Затем смесь разбавляли хлоридом натрия 0,9%, и разбавленную смесь конъюгирования фильтровали с использованием предварительного фильтра 0,8 или 0,45 мкм.

Конъюгирование в ДМСО.

Для капсульных полисахаридов серотипов 6А, 6В, 7F, 12F, 19А, 19F и 23F реакцию конъюгирования инициировали добавлением раствора цианоборогидрида натрия (100 мг/мл) до соотношения 0,8-1,2 молярных эквивалентов цианоборогидрида натрия на один моль активированного сахара. К реакционной смеси добавляли ВДИ до целевой концентрации 1% (об./об.), и смесь инкубировали в течение 12-26 ч при $23 \pm 2^\circ\text{C}$. К реакционной смеси добавляли 100 мг/мл раствора боргидрида натрия (обычно 1,8-2,2 молярных эквивалента боргидрида натрия на моль активированного сахара) и ВДИ (целевое 5% об./об.), и смесь инкубировали в течение 3-6 ч при $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Данная процедура позволила уменьшить количество непрореагировавших альдегидов, присутствующих на сахарах. Затем реакционную смесь разбавляли хлоридом натрия 0,9% и разбавленную смесь конъюгирования фильтровали с использованием предварительного фильтра 0,8 или 0,45 мкм.

Стадия 3. Ультрафильтрация.

Разбавленную смесь конъюгата концентрировали и подвергали диафильтрации на ультрафильтрационном фильтре MWCO 100 кДа или ультрафильтрационном фильтре MWCO 300 кДа с минимум 15 объемами 0,9% хлорида натрия или буфера. Кроме того, тип и pH используемого буфера в процессе варьировали в зависимости от каждого из серотипов.

Стадия 4. Стерильная фильтрация.

Ретентат после ультрафильтрации подвергали стерильной фильтрации (0,2 мкм) и в ходе процесса отфильтрованные конъюгаты подвергали контрольному тестированию (на внешний вид, свободный белок, свободный сахарид, распределение по размерам молекул, стерильность, содержание сахаридов, содержание белка, pH, эндотоксин, остаточный цианид, остаточный ДМСО, идентичность сахаридов, идентичность ТТ и идентичность CRM₁₉₇). Конечный концентрат охлаждали и хранили при температуре от 2 до 8°C .

Пример 3. Состав поливалентной пневмококковой конъюгатной вакцины.

Требуемые объемы конечных объемных концентратов, полученных из примера 2, рассчитывали на основании объема партии и концентраций нерасфасованных сахаридов. После добавления 0,85% хлорида натрия (физиологический раствор), полисорбата 80 и сукцинатного буфера в предварительно маркированный сосуд для составления композиции добавляли нерасфасованные концентраты. Затем препарат тщательно перемешивали и стерильно фильтровали через мембрану 0,2 мкм. Составленную массу осторожно перемешивали во время и после добавления нерасфасованного фосфата алюминия. Проверляли pH и при необходимости корректировали.

Смешанный нерасфасованный продукт хранили при температуре от 2 до 8°C .

Были приготовлены следующие четыре типа составов поливалентной пневмококковой конъюгатной вакцины, названные PCV16-CRM197, PCV16-13TT, PCV16-15TT и PCV16-35TT, соответственно.

CV16-CRM197 включал полисахаридные конъюгаты, полученные конъюгированием каждого из полисахаридов 16 серотипов (серотипы 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9В, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F) с CRM₁₉₇; PCV16-13TT включал полисахаридные конъюгаты, полученные конъюгированием каждого полисахарида серотипов 1 и 3 с ТТ и каждого полисахарида серотипов 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9В, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F с CRM₁₉₇; PCV16-15TT включал полисахаридные конъюгаты, полученные конъюгированием каждого полисахарида серотипов 1 и 5 с ТТ и каждого полисахарида серотипов 3, 4, 6А, 6В, 7F, 9В, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F с CRM₁₉₇; и PCV16-35TT включал полисахаридные конъюгаты, полученные конъюгированием каждого полисахарида серотипов 3 и 5 с ТТ и каждого полисахарида серотипов 1, 4, 6А, 6В, 7F, 9В, 12F, 14, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F с CRM₁₉₇.

Полученная вакцинная композиция PCV16-13TT и PCV16-35TT включала 2,2 мкг каждого сахара, за исключением серотипа 6В в количестве 4,4 мкг; 10-15 мкг ТТ (для серотипов 1 и 3) и 40-50 мкг CRM₁₉₇; 0,125 мг адьюванта элементарного алюминия (0,5 мг фосфата алюминия); 4,25 мг хлорида натрия; приблизительно 295 мкг сукцинатного буферного раствора; и приблизительно 100 мкг полисорбата 80 в суммарной дозе 0,5 мл. Композиция PCV16-15TT в суммарной дозе 0,5 мл включала от 5 мкг до 10 мкг ТТ и от 40 мкг до 50 мкг CRM₁₉₇ и, соответственно, с другими компонентами и их содержанием, идентичными таковым в PCV16-13TT и PCV16-35TT.

Пример 4. Иммуногенность поливалентной пневмококковой конъюгатной вакцины.

Поливалентные пневмококковые вакцины со смешанным носителем PCV16-CRM197, PCV16-13TT, PCV16-15TT и PCV16-35TT, полученные в примере 3, были протестированы на способность вызывать иммуногенный ответ у кроликов. Указанные иммуногенные эффекты были охарактеризованы с помощью антигенспецифического ИФА в отношении сывороточных концентраций IgG и опсонофагоцитарного анализа (ОПА) в отношении функции антител. Новозеландских белых кроликов иммунизировали внутримышечно на 0-й и 3-й неделях дозой, на 5% превышающей запланированную клиническую дозу для человека, каждого полисахарида (2,31 мкг каждого полисахарида, за исключением 6В в дозе 4,62 мкг) в составе, или дозой для человека (2,2 мкг каждого полисахарида, за исключением 6В в дозе 4,4 мкг). Образцы сыворотки отбирали каждые 3 недели после иммунизации. Обе концентрации показали одинаковые результаты.

Серотип-специфическую иммунную реакцию в отношении композиций PCV16-CRM197, PCV16-

13TT, PCV16-15TT и PCV16-35TT оценивали с помощью IgG ИФА и опосредованного комплементом анализа МОРА, который измеряет количество функционального антитела. 4-1. PCV16-CRM197.

Измерение концентрации серотип-специфического IgG.

Капсульные полисахариды (PnP) для каждого серотипа наносили на 96-луночный планшет в концентрации от 0,5 мкг/лунку до 1 мкг/лунку. У каждого субъекта отбирали эквивалентное количество сыворотки и объединяли в пул по группам. Пул сыворотки серийно разбавляли в 2,5 раза буфером для разведения антител, содержащим Твин 20 и CWPS 5 мкг/мл, и затем проводили реакцию при комнатной температуре в течение 30 мин. Планшет промывали 5 раз промывочным буфером, а затем предварительно адсорбированную и разбавленную сыворотку в количестве 50 мкл добавляли в планшет с покрытыми лунками с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение от 2 до 18 ч. Планшет промывали таким же образом, а затем к каждой лунке добавляли конъюгаты козьего антикроличьего IgG с щелочной фосфатазой с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 2 ч. Планшеты промывали, как описано выше, и в каждую лунку добавляли 1 мг/мл п-нитрофениламинового буфера в качестве субстрата, и затем проводили реакцию при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакцию гасили путем добавления 50 мкл 3 М NaOH и измеряли оптическую плотность на 405 и 690 нм. В качестве примера для сравнения той же процедуре была подвергнута коммерчески доступная 13-валентная вакцина (PREVNAR13). Результаты показаны в табл. 4.

Таблица 4. Концентрация IgG (Ед/мл) для 16 серотипов через 3 недели после вторичной иммунизации

Серотип	PREVNAR13	PCV16-CRM197	Серотип	PREVNAR13	PCV16-CRM197
1	320,99	379,99	12F	-	120,44
3	436,85	653,84	14	482,05	502,6
4	1820,49	1948,29	18C	1731,07	2915,55
5	466,09	380,18	19A	993,68	672,2
6A	1064,69	1643,6	19F	863,32	1054,3
6B	326,94	552,58	22F	1,33	678,45
7F	1010,79	833,11	23F	329,11	185,97
9V	715,40	433,33	33F	4,58	499,3

Было обнаружено, что PCV16-CRM197 приводит к хорошим уровням серотип-специфических IgG для всех 16 серотипов. Для PCV16-CRM₁₉₇ серотипы, общие для PCV16-CRM197 и PREVNAR13, показали концентрации серотип-специфических IgG, эквивалентные или более высокие, чем для PREVNAR13, и каждый из вновь добавленных серотипов 12F, 22F и 33F также показал хороший уровень серотип-специфических IgG.

Тест функциональной иммуногенности (МОРА).

Функции антител оценивали путем тестирования сыворотки в анализе МОРА. Штамм *S. pneumoniae* МОРА, хранившийся при -70°C или ниже, разбавляли до соответствующей конечной степени разведения так, чтобы концентрация каждого штамма составляла приблизительно 50000 КОЕ/мл. У каждого субъекта отбирали эквивалентное количество сыворотки, объединяли в пул по группам и серийно разводили в 2 раза, так что в планшете с U-образным дном оставалось 20 мкл сыворотки. После разбавления образца, 10 мкл штамма, приготовленного для каждого серотипа, смешивали с разбавленным образцом, и смеси давали прореагировать при комнатной температуре в течение 30 мин, так что *S. pneumoniae* и антитело были хорошо перемешаны. Добавляли смесь предварительно дифференцированных клеток HL-60 и комплемента и проводили реакцию в инкубаторе с CO₂ (37°C) в течение 45 минут. Снижали температуру, чтобы остановить фагоцитоз, и наносили 10 мкл реакционного раствора на планшет с агаром, предварительно высушенным в течение 30-60 мин, и затем оставляли абсорбироваться на планшете в течение 20 минут до высушивания. Исходный раствор ТТС 25 мг/мл добавляли в верхний слой приготовленного агара, и к нему добавляли антитело, подходящее для соответствующего штамма. Смесь тщательно перемешивали, и затем на планшет добавляли приблизительно 25 мл смеси и давали затвердеть в течение приблизительно 30 мин. Полностью отвержденный планшет инкубировали в инкубаторе с CO₂ (37°C) в течение 12-18 ч, а затем подсчитывали колонии. Титр МОРА выражали в виде степени разведения, при которой наблюдалась 50%-ная гибель клеток. В качестве примера для сравнения той же процедуре была подвергнута коммерчески доступная 13-валентная вакцина (PREVNAR13). Результаты показаны в табл. 5.

Таблица 5. Титры МОРА для 16 серотипов через 3 недели после вторичной иммунизации

Серотип	PREVNAR13	PCV16-CRM197	Серотип	PREVNAR13	PCV16-CRM197
1	128	128	12F	4	1024
3	512	1024	14	2048	1024
4	2048	2048	18C	1024	2048
5	512	256	19A	4096	2048
6A	4096	4096	19F	2048	2048
6B	4096	4096	22F	16	4096
7F	2048	1024	23F	2048	1024
9V	1024	512	33F	32	1024

Все серотипы показали превосходный уровень функциональной иммуногенности в PCV16-CRM197. Для PCV16-CRM197 серотипы, общие для PCV16-CRM197 и PREVNAR13, показали функциональную иммуногенность, эквивалентную или лучше, чем в PREVNAR13, и каждый из вновь добавленных серотипов 12F, 22F и 33F также показал высокий уровень функциональной иммуногенности.

4-2. PCV16-13TT.

Концентрацию серотип-специфического IgG и титр функциональной иммуногенности измеряли таким же образом, как в 4-1, за исключением того, что вместо PCV16-CRM197 использовали PCV16-13TT, и полученные результаты показаны далее.

Измерение концентрации серотип-специфического IgG.

Таблица 6. Концентрация IgG (Ед/мл) для 16 серотипов через 3 недели после вторичной иммунизации

Серотип	PREVNAR13	PCV16-13TT	Серотип	PREVNAR13	PCV16-13TT
1	276,92	844,48	12F	0,37	354,00
3	539,40	2980,73	14	254,59	582,61
4	1000,76	1698,00	18C	3266,87	5553,58
5	303,20	184,49	19A	681,62	1702,05
6A	533,35	532,02	19F	528,77	1998,83
6B	172,75	451,18	22F	0,74	1583,58
7F	726,27	3449,73	23F	576,63	367,71
9V	647,71	725,14	33F	0,25	977,02

Когда капсульные полисахариды серотипов 1 и 3 были конъюгированы с ТТ, они показали значительно повышенные уровни серотип-специфического IgG по сравнению с уровнем, полученным, когда серотипы были конъюгированы с CRM₁₉₇. Кроме того, каждый из капсульных полисахаридов серотипов 12F, 22F и 33F, конъюгированных с CRM₁₉₇, показал удовлетворительный уровень серотип-специфического IgG, а серотипы 4, 6B, 7F, 14, 18C, 19A и 19F показали более высокие уровни серотип-специфического IgG, чем в PREVNAR13.

Тест функциональной иммуногенности (МОРА).

Таблица 7. Титры МОРА для 16 серотипов через 3 недели после вторичной иммунизации

Серотип	PREVNAR13	PCV16-13TT	Серотип	PREVNAR13	PCV16-13TT
1	102	645	12F	4	1625
3	813	3251	14	2048	4096
4	2580	3251	18C	4096	4096
5	813	406	19A	2580	5161
6A	4096	4096	19F	2048	5161
6B	4096	6502	22F	8	5161
7F	2580	6502	23F	4096	3251
9V	2048	3251	33F	4	3251

Когда капсульные полисахариды серотипов 1 и 3 были конъюгированы с ТТ, функциональная иммуногенность улучшилась по сравнению с полученной, когда они были конъюгированы с CRM₁₉₇. Кроме того, каждый из капсульных полисахаридов серотипов 12F, 22F и 33F, конъюгированных с CRM₁₉₇, показал превосходную функциональную иммуногенность, и каждый из капсульных полисахаридов серотипов 4, 6B, 7F, 9V, 14, 19A и 19F показал лучшую функциональную иммуногенность по сравнению с PREVNAR13. 4-3. PCV16-15TT

Концентрацию серотип-специфического IgG и титр функциональной иммуногенности измеряли таким же образом, как в 4-1, за исключением того, что вместо PCV16-CRM197 использовали PCV16-15TT, и результаты показаны далее.

Измерение концентрации серотип-специфического IgG.

Таблица 8. Концентрация IgG (Ед/мл) для 16 серотипов через 3 недели после вторичной иммунизации

Серотип	PREVNAR13	PCV16-15TT	Серотип	PREVNAR13	PCV16-15TT
1	276,92	1083,23	12F	0,37	303,99
3	539,40	901,37	14	254,59	493,06
4	1000,76	2655,28	18C	3266,87	4075,62
5	303,20	2645,56	19A	681,62	937,41
6A	533,35	1460,65	19F	528,77	1355,08
6B	172,75	603,87	22F	0,74	1874,55
7F	726,27	2285,92	23F	576,63	607,40
9V	647,71	663,37	33F	0,25	880,54

Когда капсульные полисахариды серотипов 1 и 5 были конъюгированы с ТТ, концентрация серотип-специфического IgG значительно увеличивалась по сравнению с концентрацией, полученной при их конъюгировании с CRM₁₉₇. Кроме того, каждый из капсульных полисахаридов серотипов 12F, 22F и 33F, конъюгированных с CRM₁₉₇, показал высокий уровень серотип-специфического IgG, и каждый из капсульных полисахаридов серотипов 3, 4, 6A, 6B, 7F, 14, 18C, 19A и 19F показал более высокий уровень серотип-специфического IgG, чем в PREVNAR13.

Тест функциональной иммуногенности (MOPA).

Таблица 9. Титры MOPA для 16 серотипов через 3 недели после вторичной иммунизации

Серотип	PREVNAR13	PCV16-15TT	Серотип	PREVNAR13	PCV16-15TT
1	102	645	12F	4	1290
3	813	1290	14	2048	2580
4	2580	4096	18C	4096	3251
5	813	4096	19A	2580	2580
6A	4096	6502	19F	2048	4096
6B	4096	6502	22F	8	6502
7F	2580	4096	23F	4096	3251
9V	2048	1290	33F	4	2580

Когда капсульные полисахариды серотипов 1 и 5 были конъюгированы с ТТ, функциональная иммуногенность улучшилась по сравнению с таковой, полученной, когда они были конъюгированы с CRM₁₉₇.

Кроме того, каждый из капсульных полисахаридов серотипов 12F, 22F и 33F, конъюгированных с CRM₁₉₇, показал превосходную функциональную иммуногенность, и каждый из капсульных полисахаридов серотипов 3, 4, 6A, 6B, 7F и 19F показал более высокий уровень функциональной иммуногенности, чем в PREVNAR13.

4-4. PCV16-35TT.

Концентрацию серотип-специфического IgG и титр функциональной иммуногенности измеряли таким же образом, как в 4-1, за исключением того, что вместо PCV16-CRM197 использовали PCV16-35TT, и результаты показаны далее.

Измерение концентрации серотип-специфического IgG.

Таблица 10. Концентрация IgG (Ед/мл) для 16 серотипов через 3 недели после вторичной иммунизации

Серотип	PREVNAR13	PCV16-35TT		PREVNAR13	PCV16-35TT
1	242,33	367,13	12F	0,25	334,45
3	656,91	1837,36	14	320,12	1055,422
4	1305,61	1786,84	18C	2920,75	3665,59
5	408,78	1316,12	19A	652,67	409,17
6A	737,55	957,85	19F	411,07	534,19
6B	167,41	322,61	22F	1,15	1176,6
7F	808,75	1357,46	23F	742,55	408,88
9V	775,28	966,22	33F	0,25	855,55

Когда капсульные полисахариды серотипов 3 и 5 были конъюгированы с ТТ, концентрация серотип-специфического IgG значительно увеличивалась по сравнению с концентрацией, полученной при их конъюгировании с CRM₁₉₇. Кроме того, каждый из капсульных полисахаридов серотипов 12F, 22F и 33F, конъюгированных с CRM₁₉₇, имел хорошую концентрацию серотип-специфического IgG, и каждый из капсульных полисахаридов серотипов 1, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C и 19F показал более высокий уровень серотип-специфического IgG, чем в PREVNAR13.

Тест функциональной иммуногенности (МОР).

Таблица 11. Титры МОР для 16 серотипов через 3 недели после вторичной иммунизации

Серотип	PREVNAR13	PCV16-35TT	Серотип	PREVNAR13	PCV16-35TT
1	128	256	12F	4	512
3	512	2048	14	2048	4096
4	2048	4096	18C	1024	4096
5	512	2048	19A	4096	4096
6A	4096	4096	19F	2048	4096
6B	4096	4096	22F	16	4096
7F	2048	2048	23F	2048	2048
9V	1024	2048	33F	32	2048

Когда серотипы 3 и 5 были конъюгированы с ТТ, функциональная иммуногенность улучшилась по сравнению с таковой, полученной, когда они были конъюгированы с CRM₁₉₇. Кроме того, каждый из капсульных полисахаридов серотипов 12F, 22F и 33F, конъюгированных с CRM₁₉₇, показал превосходную функциональную иммуногенность, а каждый из капсульных полисахаридов серотипов 1, 4, 9V, 12F, 14, 18C и 19F показал более высокий уровень функциональной иммуногенности, чем в PREVNAR13. Указанные результаты показывают, что 16-валентные пневмококковые капсульные полисахаридные конъюгатные композиции со смешанным носителем индуцируют иммуногенность, эквивалентную или лучше, чем вакцина из пневмококкового капсульного полисахаридного конъюгата с одним носителем, PREVNAR13. Они также неожиданно показывают, что ответ антител на серотипы 1, 3 и/или 5, конъюгированные с столбнячным анатоксином в композициях со смешанным носителем, был значительно усилен по сравнению с ответами антител против тех же серотипов, конъюгированных с CRM₁₉₇, в вакцине PREVNAR 13 с одним носителем. Кроме того, они показывают, что 16-валентные пневмококковые капсульные полисахаридные конъюгатные композиции со смешанным носителем успешно индуцируют ответы антител против добавленных серотипов, 12F, 22F и 33F, обеспечивая защиту от более широкого спектра серотипов, чем пневмококковые капсульные полисахаридные конъюгатные вакцины, которые в настоящее время имеются на рынке.

Хотя в описании были приведены один или несколько иллюстративных вариантов реализации, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в них могут быть сделаны различные изменения в форме и деталях без отклонения от сущности и объема идеи изобретения, определенных следующей формулой изобретения.

Ссылки

Следующие источники процитированы в заявке и содержат общую информацию, касающуюся технической области, а также содержат анализы и другие подробности, обсуждаемые в заявке. Следующие источники включены в заявку посредством ссылки во всей их полноте.

- [1] Prymula et al., *Lancet*, 367:740-48 (2006).
- [2] Vesikari et al., *PIDJ*, 28(4):S66-76 (2009).
- [3] Dagan et al. *Infection & Immunity*, 5383-91 (2004).
- [4] Juergens et al., *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(9):1277-1281 (2014).
- [5] Andrews et al., *Lancet*, 14:839-846 (2014).
- [6] Nurkka et al., *Vaccine*, 20:194-201 (2001).
- [7] Levin and Stone, *J. Immunology*, 67:235-242 (1951).
- [8] W.H.O. Manual for the Production and Control of Vaccines: Tetanus Toxoid, 1977 (BLG/UNDP/77.2 Rev.I.)
- [9] Didierlaurent et al., *J. Immunol.*, 183: 6186-6197 (2009).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Поливалентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем для профилактики инфекции *Streptococcus pneumoniae* или вызванного ей заболевания у субъекта, содержащая 16 различных пневмококковых капсульных полисахарид-белковых конъюгатов, в которой каждый пневмококковый капсульный полисахарид-белковый конъюгат содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из разных серотипов *Streptococcus pneumoniae*, причем серотипы *Streptococcus pneumoniae* представляют собой 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, причем белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇ или столбнячный анатоксин, причем два из указанных капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM₁₉₇, и при этом указанные два капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5.

2. Поливалентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем по п.1, отличающаяся тем, что капсульные полисахариды из серотипов 1 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды из серотипов 3, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇.

3. Поливалентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем по п.1, отличающаяся тем, что капсульные полисахариды из серотипов 1 и 3 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды из серотипов 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇.

4. Поливалентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем по п.1, отличающаяся тем, что капсульные полисахариды из серотипов 3 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а капсульные полисахариды из серотипов 1, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F конъюгированы с CRM₁₉₇.

5. Поливалентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащая адъювант.

6. Поливалентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем по п.5, отличающаяся тем, что адъювантом является адъювант на основе алюминия.

7. Поливалентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем по п.6, отличающаяся тем, что адъювант выбран из группы, состоящей из фосфата алюминия, сульфата алюминия и гидроксида алюминия.

8. Поливалентная пневмококковая конъюгатная композиция со смешанным носителем по п.7, отличающаяся тем, что адъювантом является фосфат алюминия.

9. Применение поливалентной пневмококковой конъюгатной композиции со смешанным носителем по любому из предыдущих пунктов для профилактики против инфекции *Streptococcus pneumoniae* или вызванного ей заболевания у субъекта.

10. Вакцина для профилактики инфекции *Streptococcus pneumoniae* или вызванного ей заболевания у субъекта, содержащая поливалентную пневмококковую конъюгатную композицию со смешанным носителем по любому из пп.1-8 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

11. Способ профилактики инфекции *Streptococcus pneumoniae* или вызванного ей заболевания у субъекта, включающий введение профилактически эффективного количества поливалентной пневмокок-

ковой конъюгатной композиции со смешанным носителем по любому из пп.1-8 или вакцины по п.10 указанному субъекту.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что субъектом является человек, которому по меньшей мере 50 лет, и заболевание представляет собой пневмонию или инвазивное пневмококковое заболевание (IPD).

13. Способ по п.11, отличающийся тем, что субъектом является человек, которому по меньшей мере 6 недель, и заболевание представляет собой пневмонию, инвазивное пневмококковое заболевание (IPD) или острый средний отит (ОСО).

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что возраст субъекта составляет от 6 недель до 5 лет, от 2 до 15 месяцев или от 6 до 17 лет.

15. Способ по п.11, отличающийся тем, что субъектом является человек.

16. Способ по любому из пп.11-15, отличающийся тем, что поливалентную пневмококковую конъюгатную композицию со смешанным носителем или вакцину вводят путем внутримышечной инъекции.

17. Способ по любому из пп.11-16, отличающийся тем, что поливалентную пневмококковую конъюгатную композицию со смешанным носителем или вакцину вводят в рамках серии иммунизации.

18. Применение по п.9, отличающееся тем, что субъектом является человек.

