

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039487**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.01

(21) Номер заявки
201800067

(22) Дата подачи заявки
2016.07.04

(51) Int. Cl. *A61K 39/02* (2006.01)
A61K 39/095 (2006.01)
A61K 39/112 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННЫЕ ПОЛИСАХАРИДНЫЕ ВАКЦИННЫЕ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КАПСУЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

(31) 3426/CHE/2015

(32) 2015.07.04

(33) IN

(43) 2018.11.30

(86) PCT/IN2016/050218

(87) WO 2017/006349 2017.01.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БХАРАТ БАЙОТЕК ИНТЕРНЭШНЛ
ЛИМИТЕД (IN)**

(72) Изобретатель:
**Элла Кришна Муртхи, Кумар
Ашавани, Рамасвами Венкатесан,
Муртхи Воleti Сабрахманя
Рамачандра (IN)**

(74) Представитель:
Вахнин А.М. (RU)

(56) WO-A2-2014009971
US-A1-20140377302
WO-A2-2014080423
US-B2-8129147

Jones et. al.: 'Endotoxin, Capsule, and Bacterial Attachment Contribute to *Neisseria meningitidis* Resistance to the Human Antimicrobial Peptide LL-37', JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2009 Jun, vol. 191, № 12, p. 3861-3868, p. 3864, table 1

(57) Представленное изобретение относится к области комбинированных вакцинных композиций, которые являются эффективными против всех форм менингококковых заболеваний, а также брюшного тифа. Вакцинные препараты содержат антигены из капсульных полисахаридов *Neisseria meningitidis* A, *Neisseria meningitidis* C, *Neisseria meningitidis* Y, *Neisseria meningitidis* W135, *Neisseria meningitidis* X, Vi капсульного полисахарида *Salmonella typhi* (ViPs) или капсульных ViPs, конъюгированных с белком-носителем столбнячного анатоксина (ViPs-TT). Данное изобретение также относится к усовершенствованным способам, особенно к использованию улучшенной питательной среды и улучшенного способа последующей обработки и промышленной очистки капсульных полисахаридов. Вакцина не содержит какого-либо животного компонента или спирта и полностью соответствует религиозным чувствам различных этнических групп. Композиция является высокоэффективной и стабильной, а также экономически эффективной и доступной, особенно для стран с низким и средним уровнем дохода и стран с низким доходом.

B1**039487****039487****B1**

Область изобретения

Данное изобретение относится к области полисахаридных вакцин. Более конкретно данное изобретение относится к области процесса получения и изготовления комбинированных полисахаридных вакцин. Изобретение также касается промышленного производства и культивирования бактериальных полисахаридов, связанных с производством вакцин и препаратов. Кроме того, данное изобретение также относится к области комбинированных вакцинных препаратов, где указанная комбинированная вакцина является эффективной против некоторых эндемических инфекций и включает соответствующий бактериальный полисахарид в качестве вакцинных антигенов в комбинации с различными серотипами *Neisseria meningitidis* и *Salmonella typhi* Vi антигенами полисахаридных конъюгатов. Данное изобретение связано с предоставлением улучшенных методологий в области производства вакцин, особенно в области капсульных полисахаридных вакцинных препаратов.

Предпосылки создания изобретения

Менингококковый менингит представляет собой заболевание, идентифицированное как воспаление менингита головного и спинного мозга. Агентом, вызывающим бактериальный менингит, является *Neisseria meningitidis*. Клиническое проявление менингококковой инфекции включает лихорадку, головную боль, светобоязнь, жесткость шеи, эпизодические судороги, измененный психический статус, тошноту, рвоту, миалгию и петехиальную или пурпуровую сыпь (28-77%). Несмотря на антибактериальную терапию уровень смертности выше, а иногда последствия остаются постоянными. В результате последствия могут включать потерю слуха, уменьшение зрения или потерю конечности из-за возникновения гангрены. *Neisseria meningitidis* представляет грамотрицательные диплококки, которые были идентифицированы на основе их капсульных полисахаридов. До сих пор было идентифицировано 12 антигенных различных капсулярных групп в соответствии с характеристиками полисахаридной капсулы для данного микроорганизма, которые включают *Neisseria meningitidis* A, *Neisseria meningitidis* B, *Neisseria meningitidis* C, *Neisseria meningitidis* E, *Neisseria meningitidis* H, *Neisseria meningitidis* I, *Neisseria meningitidis* K, *Neisseria meningitidis* L, *Neisseria meningitidis* W135, *Neisseria meningitidis* X, *Neisseria meningitidis* Y и *Neisseria meningitidis* Z. Дополнительно они могут различаться по различным типам и подтипам на основе белков наружной мембраны. Они также идентифицируются как различный тип последовательности (ST), основанный на секвенировании определенных областей их хромосомной ДНК. Из двенадцати шесть типов капсул (*Neisseria meningitidis* A, *Neisseria meningitidis* B, *Neisseria meningitidis* C, *Neisseria meningitidis* Y, *Neisseria meningitidis* W135 и *Neisseria meningitidis* X) были признаны ответственными за инвазивный менингит и септицемию во всем мире. Относительная значимость каждой серогруппы зависит от географического региона. Поэтому определение серогруппы, ответственной за спорадический случай, является важным для сдерживания заболевания в определенном географическом положении. Причина развития болезни у некоторых носителей не полностью понята. Тем не менее немногие идентифицированные факторы риска включают возраст, сезон, курение, предшествующее заражение гриппом A и проживание в "закрытых" или "полузакрытых" сообществах (Cartwright, 1995). Менингококковая инфекция устанавливает безвредные комменсальные отношения, колонизирующие носоглотку среди 25% подростков и от 5 до 11% взрослых людей без каких-либо симптомов болезни. Но в случае инфекции среди младенцев и детей младшего возраста скорость передачи низкая по сравнению со взрослыми (Christensen et al., 2010). Способ менингококковой передачи реализуется посредством аэрозоля, капель или прямого контакта с респираторными выделениями человека, несущего организм. Передача обычно требует либо частых, либо длительных тесных контактов, таких как воздействие бактерий. Существует выраженная сезонная вариабельность менингококковой инфекции, причем пиковые уровни в зимние месяцы снижаются до низких уровней к концу лета.

Менингококковый менингит является важной проблемой общественного здравоохранения во многих странах. Согласно оценкам ВОЗ ежегодное бремя менингококковой болезни во всем мире составляет приблизительно от 300000 до 350000 случаев. Заболеваемость намного выше во многих развивающихся странах (около 25/100000) по сравнению с США или Западной Европой (1-4/100000). Серогруппа A была причиной большинства менингококковых заболеваний в начале 20-го века и теперь отвечает за повторяющиеся эпидемии в развивающихся странах, особенно в странах Африки к югу от Сахары. С 2000 по 2002 г. произошли эпидемии серогруппы W-135, связанные с распространением во время паломничества хаджа, что сказалось на здоровье данных путешественников и их контактах в странах по всему миру. Серогруппа B является наиболее важной причиной эндемического заболевания в развитых странах (30-40%) и 80% заболеваний в Соединенных Штатах и европейских странах соответственно), а серогруппа C имеет переменные показатели эндемического заболевания (в настоящее время около 30%) в промышленно развитых странах (Jackson et al., 1995). Серогруппа Y появилась в последнее десятилетие в Соединенных Штатах и вызвала одну треть заболеваний, связанных с менингококковой инфекцией в стране (Rosenstein et al., 1999), обычно затрагивающей старшие возрастные группы. Интересно, что менингококковая пневмония обычно возникает из-за серогрупп Y и W-135. Недавно была обнаружена серогруппа X, связанная с увеличением вспышки менингококковой болезни в поясе африканского менингококка. Сообщалось о вспышках от Нигера, Буркина-Фасо, Тонго и Ганы. В 2010 г. более 6500 случаев менингококковой инфекции были зарегистрированы только в Буркина-Фасо, из которых было обнаружено 1000 случаев, свя-

занных с серогруппой X. В 2011 г. из 3155 случаев менингококковой инфекции 60% снова были связаны с серотипом Meningitidis X.

Следовательно, на основе разнообразной эпидемиологии заболевания ряд коммерческих вакцин был предоставлен до настоящего времени в зависимости от региона возникновения специфических серотипов *Neisseria meningitidis*.

Таблица 1
Коммерческие менингококковые вакцины, доступные на рынке

Сер. №	Торговое название	Название производителя	Тип вакцины	Покрываемые серогруппы	Страны, в которых лицензированы
1	Bexsero®	GSK	Рекомбинантная	B	США, Европа, Австралия
2	Menactra®	Sanofi Pasteur	Конъюгат	A, C, Y, W135	США, Канада, Индия, Австралия, Арабские страны и страны Персидского залива
3	MenHibrix®	GSK	Конъюгат	C, Y и <i>Haemophilus influenzae</i> тип b PRP	США
4	Menitorix®	GSK	Конъюгат	C	Европа, Австралия
5	Menomune®	Sanofi Pasteur	Полисахарид	A, C, W135, Y	США
6	Menveo® (MCV4 type)	Novartis	Конъюгат	A, C, W135, Y	США, Канада, Европа, Австралия
7	Trumenba®	Pfizer	Рекомбинантная	B	США, Европа, Австралия, Канада
8	MenAfriVac®	Институт сыворотки Индии	Конъюгат (Лиюфилизированный)	A	Индия и Африка
9	Mencevax®	Pfizer	Полисахарид (Лиюфилизированный)	A	Утверждено в 79 странах Африки, Азии, Австралии, Европы, Латинской Америки, Ближнего Востока и Новой Зеландии.
10	NmVac4-A/C/Y/W-135®	J.N International Medical Corporation	Конъюгат	A, C, W135, Y	Страны Персидского залива
11	Nimenrix®	Pfizer Канада	Конъюгат	A,C,W135,Y	Утверждено для продажи в более чем 61 стране, включая Европейское экономическое пространство, Канаду и Австралию
12	VA-MENGOC-BC®	Finlay Institute	Белок везикулы внешней мембраны	B	Куба, Бразилия, Сальвадор, Никарагуа, Доминиканская Республика, Колумбия, Аргентина и Сирия
13	MeNZB™	Chiron	Белок везикулы внешней мембраны	Специфический штамм серогруппы B	Только в Новой Зеландии (Программа иммунизации закончилась в 2011 году, и вакцина больше не доступна в Новой Зеландии)

Таким образом, мы видим, что большая часть вакцины, доступной против менингококкового менингита, доступна только в развитых странах в Западном мире, и очень немногие имеются в развивающихся странах или странах с низкой или средней экономикой. Тем не менее эпидемиологические исследования показывают, что в Африке насчитывается по меньшей мере 25 стран, имеющих самую высокую годовую заболеваемость менингококковой болезнью в мире. Большинство заболеваний вызвано менингококковой инфекцией серогруппы A, хотя сообщалось, что также преобладают серогруппы C, W-135 и X. Сообщалось, что частота менингококковых заболеваний может достигать 224 случая/100000 населения в этом поясе. Южноамериканские страны также показали высокий уровень распространенности серогрупп B и C (Jafri R., Ali A., Messonnier N., Tevi-Benissan C., Durrheim D., Eskola J., Fermon F., Klugman K., Ramsay M., Sow S., Zhujun S., Bhutta Z. и Abramson J. (2013). Global epidemiology of invasive meningococcal disease. Popul Health Metrics, 11(1), p. 17.). В регионе Восточного Средиземноморья преобладающими серогруппами являются A и W-135. Основными страдающими странами являются страны, такие как Су-

дан и Саудовская Аравия в Восточном Средиземноморье. В большинстве азиатских стран малочисленные исследования показали, что бремя болезней в этих развивающихся странах может быть значительным. Помимо распространенной серогруппы А, были зарегистрированы заболевания, вызванные серогруппами С, Y и W-135. Были случаи менингококковой эпидемии во многих странах, таких как Камбоджа, Китай, Гонконг, Индонезия, Малайзия и т.д. Индия также пережила повторные эпидемии менингококковой серогруппы А в течение последних 2-3 десятилетий (Vyse A., Wolter J., Chen J., NG, T. и SORIANO-GABARRO, M. (2011). Meningococcal disease in Asia: an under-recognized public health burden. *Epidemiol. Infect.*, 139(07), p. 967-985).

Следовательно, установлено, что менингококковые инфекции не только ограничиваются появлением в развитых странах, например, в США, Канаде и Европе или Австралии. Тем не менее существует пробел в разработке экономически эффективных менингококковых вакцин в оставленных без внимания районах мира, таких как африканские и азиатские страны, несмотря на появление разнообразных менингококковых инфекций. Кроме того, отдельные вакцины, доступные до настоящего времени, не обеспечивают полной защиты от всех серотипов в конкретном регионе. Существуют все еще возможности различных менингококковых инфекций в данном регионе, в котором вакцины против конкретного серотипа вообще отсутствуют. Конкретный субъект, вакцинированный одним, или двумя, или тремя серотипами вакцины, остается по-прежнему не полностью защищенным от какой-либо потенциальной инфекции из-за серотипа менингококка, которым он или она не был вакцинирован(а). Таким образом, существует необходимость в разработке более рентабельных вакцин против менингита, которые будут предлагать профилактику против различных серотипов в одной комбинированной вакцине против всех серотипов менингита независимо от характера менингококковой инфекции. Паломники хаджа, включающие мусульманское население со всего мира, сходятся в Мекке каждый год. Это увеличивает возможности заражения различными менингитными инфекциями паломниками хаджа, поскольку вероятность заражения увеличивается из-за нехватки гигиенических продуктов питания и воды, включая санитарно-гигиенические факторы. Сообщалось, что по меньшей мере 225 случаев менингококковых заболеваний регистрируются каждый год после сезона хаджа в Саудовской Аравии из-за конгломерата большого числа людей со всего мира. Отсутствие пригодной питьевой воды также способствует риску заражения брюшным тифом из-за инфекции *Salmonella typhi* у паломников хаджа. Поэтому, помимо простого предупреждения менингита, важно также предупредить у паломников хаджа возникновение потенциального брюшного тифа, вызванного *Salmonella typhi*. Центр по контролю и профилактике заболеваний, федеральное агентство при Департаменте здравоохранения и социальных служб в Соединенных Штатах, рекомендовало вакцинацию как от тифа, так и от менингита перед поездкой на африканский пояс менингита. Кроме того, паломники, отправляющиеся в хадж или умру в обязательном порядке должны получить менингококковую вакцину, без которой виза для хаджа не выдается. Кроме того, перед тем как отправиться в путешествие, рекомендуются вакцины против тифа. Поэтому комбинированная вакцина, которая одновременно удовлетворяет этому требованию, в котором путешественники одновременно иммунизируются против менингита и брюшного тифа, уменьшит необходимость использования двух отдельных вакцин. Скорее, путешественнику или паломнику необходимо пройти вакцинацию комбинированной вакциной, чтобы удовлетворить требования и повысить соответствие вакцин.

Менингококковые вакцины требуют бактериальной ферментации полисахаридов с использованием среды для животных и спирта для последующей обработки. Использование животных источников свиного происхождения и спирта ограничивает применимость вакцины против менингита несколькими паломниками хаджа, поскольку существует возможность удержания животных компонентов и спирта в готовом вакцинном продукте. Потребление какого-либо продукта свиного происхождения и употребление алкоголя запрещено по законам исламского шариата, которое рассматривается как 'HARAM' в разговорной речи. Следовательно, в качестве личного выбора большинство мусульманского населения предпочитает не прививаться существующими вакцинами менингита из-за использования свиного материала в ферментационных средах и дальнейшего последующего потока через вещества, полученные из спирта. Более того разработка продуктов вакцинных препаратов против индивидуальных менингококковых инфекций является дорогостоящей из-за использования спиртов и животных ресурсов, используемых в качестве сырья в процессе бактериальной ферментации и последующего процесса. Для того чтобы преодолеть данную ситуацию, синтетическая и полусинтетическая среда, не содержащая источника животного происхождения, была использована для культивирования *Neisseria meningitidis* в целом.

Наряду с использованием таких синтетических и полусинтетических сред оптимальным также было увеличение выхода бактериальной ферментации с использованием различных источников сред с предшествующего уровня техники. Различные составы сред описаны в непатентной литературе, как указано в Frantz J. *Bact.*, 43: 757-761, 1942; и Catlin J. *Inf. Dis.*, 128(2): 178-194, 1973; Watson Scherp *Medium: J. Immunol.*, 1958; 81: 337-44. Модифицированную среду использовали в Frantz и Catlin 6 *Braz. J. Microbiol.* 34: 2003. New Chemically Defined Medium (NCDM) is described by David bundal et al. *JBC*, 1974, которая в результате давала выход полисахарида Men X 20 мг/л. Существует несколько других известных из предшествующего уровня техники описаний составов сред и стратегий культивирования для увеличения выхода капсульного полисахарида. Ферментацию проводят в периодических и загруженных периодических режи-

мах с различной стратегией(ями) подпитки на основе pH параметра, добавок и постоянной скорости в соответствии с требованиями культивирования штаммов Meningitidis A, C, Y, W135 и X (с настоящего момента представлены как Men A, Men C, Men Y, Men W135 и Men X соответственно). Некоторые из данных релевантных известных уровней техники обсуждаются в данном документе. В предшествующем уровне техники US 7399615 раскрывает исключение NH_4Cl из ферментационных сред и замену его на соевый пептон (HSP-A; Nutricepts, inc; Minneapolis, Minn). Подпитываемая 2 л периодическая ферментация с питательным раствором, содержащим белок теплового шока HSP-A, в результате привела к выходу полисахарида Men A 1300-1400 мг/л при максимальной оптической плотности (OD) от 14 до 20. В предшествующем уровне техники US 7491517 раскрыта прихотливая культуральная среда *Neisseria meningitidis* (NMFM) с CaCO_3 для поддержания pH от 6,5 до 7,0, что в результате приводит к среднему выходу 30-40 мг/л со средним значением OD 10. В предшествующем уровне техники WO 2014/080423 A2 раскрыто использование казеиновой кислоты вместо соевого пептона или дрожжевого экстракта с новой стратегией подпитки с использованием питательного раствора 1 (FS-1); и питательного раствора 2 (FS-2). Для того чтобы получить выход полисахаридов Men X 650 мг/л на стадии 100 кДа, культуру собирали на стадии, когда OD культуры составляет меньше чем 60% наивысшего значения OD культуры. Наивысшее полученное значение OD культуры составило 16 при 580 нм.

Доступная ферментационная среда и питательные растворы, описанные в предшествующих уровнях техники, используемые для культивирования и улучшения выхода полисахарида из серогруппы A, C, Y, W135 и X, способствовали только в некоторой степени увеличению выхода полисахарида. Но все же существует дополнительное(ые) требование(я) увеличения выхода и снижения стоимости производства бактериальных полисахаридов *Neisseria meningitidis* всех штаммов, а именно Men A, Men C, Men Y, Men W135 и Men X, с целью сделать менингококковые вакцины еще более доступными и экономически эффективными. Представленное изобретение ориентировано на разработку нового(ых) способа(ов) увеличения выхода(ов) бактериального полисахарида Men A, Men C, Men Y, Men W135 и Men X с использованием улучшенных составов ферментационной среды, содержащих пептоны не животного происхождения и использование новых компонентов подпитки, и новых способов последующей переработки и промышленной очистки бактериальных полисахаридов *Neisseria meningitidis*.

Вакцинные препараты, разработанные в данной патентной заявке, исключительно нашли свое применение для паломников хаджа, которые несут очень высокий уровень риска заражения инфекциями бактериями менингококка и брюшного тифа, обе из которых могут быть предупреждены с помощью соответствующей эффективной стратегии вакцинации, включающей соответствующие бактериальные капсульные полисахариды в качестве вакцинных антигенов в одной комбинированной вакцине, включающей тифоидный конъюгированный вакцинный антиген. Как уже отмечалось ранее, ни одна из доступных вакцин менингита не охватывает все существующие серотипы заболевания. Таким образом, защита остается неполной почти у каждого человека, включая даже тех, кто прошел вакцинацию против менингита. Кроме того, полная комбинация всех основных существующих серотипов менингита будет соответствовать полной защите от менингита для какого-либо человека, родом из какого-либо региона мира. Кроме того, поскольку не существует никакой(их) возможности(ей) включения каких-либо компонентов сред, полученных из животного происхождения и спирта, предпочтительным является использовать такую новую комбинированную вакцину для паломников хаджа, так как вакцина "HALAL" предпочтительно маркируется как HALVAC™ заявителем патента. Конъюгатные полисахаридные вакцины уже разработаны специально для конкретных серотипов менингококковых инфекций, для долгосрочного иммунитета против данных серотипов. Но, как было сказано ранее, конъюгированные вакцины не обеспечивают полную защиту от всех серотипов вакцины. Поэтому предлагается, чтобы вакцина на основе полисахарида была адекватно иммуногенной, чтобы обеспечить защиту против какой-либо возможной инфекции какой-либо одной или несколькими менингококковыми инфекциями или *Salmonella typhi*. Иммунитет, обеспечиваемый полисахаридной вакциной, длится в течение 2 лет, и поэтому достаточно обосновать применимость комбинированных вакцин на основе полисахаридов, перечисленных в этом изобретении, вместе с Vi полисахаридным конъюгатом тифоидного вакцинного антигена, которые являются достаточными для обеспечения полной защиты субъектов в районах с высокой степенью скопления путешественников в определенном географическом месте.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1: кинетика роста *N. meningitidis* серотипа A при 200 л периодической ферментации в сочетании со стратегией подпитки с двумя впрыскиваниями.

Фиг. 2: кинетика роста *N. meningitidis* серотипа C при 200 л периодической ферментации в сочетании со стратегией подпитки с двумя впрыскиваниями.

Фиг. 3: кинетика роста *N. meningitidis* серотипа Y при 200 л периодической ферментации в сочетании со стратегией подпитки с двумя впрыскиваниями.

Фиг. 4: кинетика роста *N. meningitidis* серотипа W135 при 200 л периодической ферментации в сочетании со стратегией подпитки с двумя впрыскиваниями.

Фиг. 5: кинетика роста *N. meningitidis* серотипа X при 200 л периодической ферментации в сочетании со стратегией подпитки с двумя впрыскиваниями.

Фиг. 6: кинетика роста *N. meningitidis* серотипа А при 200 л периодической ферментации в сочетании с режимом непрерывной подачи.

Фиг. 7: кинетика роста *N. meningitidis* серотипа С при 200 л периодической ферментации в сочетании с режимом непрерывной подачи.

Фиг. 8: кинетика роста *N. meningitidis* серотипа Y при 200 л периодической ферментации в сочетании с режимом непрерывной подачи.

Фиг. 9: кинетика роста *N. meningitidis* серотипа W135 при 200 л периодической ферментации в сочетании с режимом непрерывной подачи.

Фиг. 10: кинетика роста *N. meningitidis* серотипа X при 200 л периодической ферментации в сочетании с режимом непрерывной подачи.

Фиг. 11: общая концентрация CPS *N. Meningitidis* серогруппы А на стадии 100 кДа с использованием диапазона концентрации сахарозы от 0 до 25% с 0,06 мМ LL37 в питательной композиции.

Фиг. 12: общая концентрация CPS *N. Meningitidis* серогруппы С на стадии 100 кДа с использованием диапазона концентрации сахарозы от 0 до 25% с 0,06 мМ LL37 в питательной композиции.

Фиг. 13: общая концентрация CPS *N. Meningitidis* серогруппы Y на стадии 100 кДа с использованием диапазона концентрации сахарозы от 0 до 25% с 0,06 мМ LL37 в питательной композиции.

Фиг. 14: общая концентрация CPS *N. Meningitidis* серогруппы W135 на стадии 100 кДа с использованием диапазона концентрации сахарозы от 0 до 25% с 0,06 мМ LL37 в питательной композиции.

Фиг. 15: общая концентрация CPS *N. Meningitidis* серогруппы X на стадии 100 кДа с использованием диапазона концентрации сахарозы от 0 до 25% с 0,06 мМ LL37 в питательной композиции.

Цели изобретения

Основной целью изобретения является предоставление иммунологической композиции для полной профилактики менингококковых заболеваний, вызванных патогенной *Neisseria meningitidis*.

Другой целью изобретения является предоставление иммунологической композиции для профилактики брюшного тифа, вызванного патогенной *Salmonella typhi*.

Еще одной целью представленного изобретения является предоставление комбинированной вакцины, включающей несколько полисахаридных вакцинных антигенов для защиты субъекта от менингококковых заболеваний, вызванных всеми патогенными серотипическими формами *Neisseria meningitidis* и брюшного тифа, вызванных патогенной *Salmonella typhi*.

Другой целью представленного изобретения является предоставление иммунологической композиции для профилактики менингококковых заболеваний, вызванных всеми пятью типами отдельных антигенных капсулярных групп *Neisseria meningitidis*, которые отвечают за инвазивный менингит и септицемию.

Еще одной целью представленного изобретения является предоставление способа получения увеличенного выхода капсульного полисахарида с использованием улучшенной ферментационной среды неживотного происхождения, усовершенствованного способа последующей обработки и промышленной очистки бактериального полисахарида, что, следовательно, представляет собой технический прогресс по сравнению с существующим уровнем техники.

Другой целью представленного изобретения является предоставление высокоэффективной, но экономически эффективной вакцины против всех серотипов менингококковых заболеваний, а также брюшного тифа, который является доступным для стран с низким и средним уровнем дохода и с низким уровнем дохода.

Конкретной целью представленного изобретения является предоставление вакцины для международных путешественников для профилактики всех форм неэндемичных менингококковых заболеваний, а также брюшного тифа.

Другой конкретной целью представленного изобретения является предоставление вакцины, которую могут использовать паломники хаджа для профилактики всех форм менингококковых заболеваний наряду с брюшным тифом, которые могут передаваться из-за разнообразного скопления во время паломничества.

Сущность изобретения

Представленное изобретение касается композиции и способа изготовления комбинированных вакцинных препаратов, причем указанная комбинированная вакцина эффективна против различных серотипов *Neisseria meningitidis* и полисахаридных конъюгатных антигенов *Salmonella typhi* Vi.

В одном аспекте изобретение предусматривает стабильный и эффективный вакцинный препарат, содержащий бактериальные капсульные полисахариды *Neisseria meningitidis* стереотипа А, Y, C, W-135 и X, которые могут содержать дополнительный Vi полисахарид *Salmonella typhi* (либо простой полисахарид, либо Vi полисахарид, конъюгированный со столбнячным анатоксиновым вакцинным антигеном).

В следующем аспекте изобретение предусматривает способ получения бактериальных капсульных полисахаридов посредством периодического процесса, который включает

использование улучшенных композиций для составов сред на основе дрожжевого экстракта (BBIL-YE), составов сред на основе соевого пептона (BBIL-SP) и составов сред на основе растительного инфузионного пептона (BBIL-VI);

использование новой питательной композиции, которая включает сахарозу, катионный пептид LL37, глутамат натрия, аргинин, серин, L-цистеин, хлорид магния и цитрат железа, в новой стратегии подпитки с двумя впрыскиваниями или путем непрерывной подачи;

последующую обработку капсульного полисахарида посредством методики осаждения белка с использованием либо отдельно, либо в комбинации с ацетатом цинка, динатрия гидрофосфата, натрия дигидрофосфата и/или цитрата натрия.

В соответствии с вариантами осуществления, представленными в данном изобретении, преимущества улучшенной среды и режима с периодической загрузкой либо в непрерывном режиме, либо в стратегии подпитки с двумя впрыскиваниями, которые четко проиллюстрированы в данном документе, показывают вплоть до 14-кратного увеличения концентрации неочищенного полисахарида по сравнению с другими традиционно используемыми средами для промышленного производства бактериальных полисахаридов. Кроме того, при увеличении объема процесса при 200 л потери выхода бактериального полисахарида оказываются незначительными, что также подчеркивает конкретные преимущества представленного изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения способ последующей обработки и очистки капсульных полисахаридов осуществляют с использованием методик осаждения белков каким-либо из ацетата цинка или в комбинации ацетата цинка с динатрия гидрофосфатом и натрия дигидрофосфатом и или только цитратом натрия.

В одном варианте осуществления изобретения предусматривается иммуногенность вакцинных препаратов. Установлено, что иммуногенность всех индивидуальных вакцинных антигенов *Neisseria meningitidis* стереотипа A, Y, C, W135 и X и Vi полисахаридного конъюгата не воспрепятствуется присутствием других антигенов.

Следующий вариант осуществления изобретения предусматривает стабильность менингококковых полисахаридов и полисахаридных конъюгатных вакцинных композиций.

Подробное описание изобретения

Как обсуждалось выше, представленное изобретение описывает новые составы сред для промышленной ферментации бактериальных полисахаридов *Neisseria meningitidis*, которые имеют неживотное происхождение. Разработаны составы сред согласно представленному изобретению, состоящие либо из композиции среды на основе экстракта дрожжей (называемой в данном документе далее как BBIL-YE), или композиции среды на основе соевого пептона (называемой в данном документе далее как BBIL-SP), или композиции среды на основе растительного инфузионного белка (называемой в данном документе далее как BBIL-VI) для производства промышленных полисахаридов. Кроме того, представленное изобретение описывает новые питательные композиции в периодическом режиме с подпиткой бактериальной ферментации промышленных полисахаридов *Neisseria meningitidis*. Подача в представленном изобретении предусматривается либо после стратегии с двумя впрыскиваниями путем включения содержимого подпитки с фиксированной пропорцией в определенные фиксированные временные интервалы во время, когда ферментация уже проходит, и/или обеспечения непрерывной подачи с использованием периодического режима ферментации с подпиткой. Представленное изобретение основано на том факте, что включение сахарозы в среду способствует образованию биопленок грамположительными и грамотрицательными патогенными бактериями. Основными компонентами биопленки являются внеклеточный матрикс, состоящий из полисахаридов. Другим компонентом, который включается в среду во время культивирования бактерий, является катионный пептид LL37, который, как сообщается, активирует гены *siaC* и *siaD*, ответственные за производство капсул в *Neisseria meningitidis* (Jones, A. et al. 2009. JBC. 191: 3861-3868). Таким образом, изучая перспективы использования сахарозы в качестве источника углерода для поддержки образования капсульного полисахарида наряду с антибиотиками, такими как выбранные из полимексина-B или LL37, который специфически активирует экспрессию генов, продуцирующих капсульные полисахариды, для увеличения образования выхода полисахарида, было подтверждено с помощью соответствующих экспериментов в колбах для встряхивания и в промышленных масштабах оценивание использования сахарозы наряду с LL37 в качестве подпитки. Проводилась бактериальная ферментация менингококковых штаммов, причем штаммы получают из депозитария коллекции культуры департамента клинической бактериологии университета Гетеборга, Швеция, названные как CCUG-55614 для *Neisseria meningitidis* X, CCUG-42379 для *Neisseria meningitidis* A, CCUG32912 для *Neisseria meningitidis* C, CCUG-38303 для *Neisseria meningitidis* Y и CCUG-41485 для *Neisseria meningitidis* W135.

Впоследствии представленное изобретение также раскрывает дополнительные усовершенствованные способы последующей обработки для получения безопасных бактериальных капсульных полисахаридов для производства вакцин, главным образом *Neisseria meningitidis* A, *Neisseria meningitidis* Y, *Neisseria meningitidis* C, *Neisseria meningitidis* W135 и *Neisseria meningitidis* X, при этом капсульный(ые) полисахарид(ы) для вакцинного препарата, указанная бактериальная ферментация, культивирование и последующие методики очистки полностью исключают использование каких-либо компонентов животного происхождения и спирта, обеспечивая тем самым абсолютное соблюдение религиозных чувств различных этнических групп, в частности исламских стран, где такие бактериальные инфекции являются весьма эндемическими по своей природе.

Пример 1. Процесс ферментации.

Среды, оптимизированные в экспериментах во встряхивающей колбе для конкретных серотипов *Neisseria meningitidis*, использовали для ферментации в среде объемом 200 л в биотехнологическом ферментере на 300 л. Первичный посев был приготовлен путем повторного суспендирования культуры, выращенной на пластине из шоколадного агара или пластине агара Мюллера Хинтона, инкубированной при $36,0 \pm 1^\circ\text{C}$ с $\sim 5\%$ CO_2 в свечной банке в течение 18-24 ч в 100 мл ферментационной среды, и инкубирования при $36,0 \pm 1^\circ\text{C}$ на 150 об/мин. Первичный посев 8-10-часовой стадии переносили в 900 мл ферментационной среды и дополнительно инкубировали при $36,0 \pm 1^\circ\text{C}$ на 150 об/мин в течение 12-18 ч или до тех пор, пока оптическая плотность (OD) не достигала 5 на 600 нм. 1-Литровый вторичный посев инокулировали к 9 л ферментационной среде в 18 л биотехнологическом ферментере. Конечный 10-литровый посев с оптической плотностью 10 на 600 нм использовали для инокуляции 200 л конечной ферментационной среды в 300 л биотехнологическом ферментере.

Параметры ферментации приведены в табл. 2.

Таблица 2

Параметры ферментации

Параметр	единицы
Температура	$36,0 \pm 1^\circ\text{C}$
Перемешивание	150-600 об /мин
pH	$7,0 \pm 0,5$
Растворенный кислород	От 25 до 90%
Насыщение воздухом	0,5-2 об /об /мин
Давление	$\sim 0,2$ бар

Пример 2. Состав и получение среды.

Культивирование *Neisseria meningitidis* серотипов A, Y, C, W135 и X основывается на системе партий посева и выращивается в улучшенных составах сред, раскрытых в табл. 3, 4 и 5 ниже.

Таблица 3

Состав среды на основе экстракта дрожжей (BBIL-YE)

Состав	Концентрация (г/л)
Хлорид аммония	0,1-2,0
Глутаминовая кислота	5-20
Серин	от 0,25 до 0,4
Аргинин	от 0,25 до 0,4
L-Цистин	от 0,2 до 0,3
Дикалия гидрофосфат	4
Хлорид натрия	5
Сульфат магния	0,73
Хлорид кальция	0,03
Цитрат железа	0,04
Экстракт дрожжей	5-20
Глюкоза	10-20

Таблица 4

Состав среды на основе соевого пептона (BBIL-SP)

Состав	Концентрация (г/л)
Хлорид аммония	0,1-2,0
Глутаминовая кислота	5-20

Серин	от 0,25 до 0,4
Аргинин	от 0,25 до 0,4
L-Цистин	от 0,2 до 0,3
Дикалия гидрофосфат	4
Хлорид натрия	5
Сульфат магния	0,73
Хлорид кальция	0,03
Цитрат железа	0,04
Соевый пептон	10
Глюкоза	10

Таблица 5

Состав среды на основе растительного инфузионного пептона (BBIL-VI)

Состав	Концентрация (г/л)
Хлорид аммония	0,1-2,0
Глютаминовая кислота	5-20
Серин	от 0,25 до 0,4
Аргинин	от 0,25 до 0,4
L-Цистин	от 0,2 до 0,3
Дикалия гидрофосфат	4
Хлорид натрия	5
Сульфат магния	0,73
Хлорид кальция	0,03
Цитрат железа	0,04
Растительный инфузионный пептон (30к диафильтрованный)	10
Глюкоза	10

Данные конкретные составы сред, раскрытые в этом изобретении, применимы для коммерческого культивирования и ферментации для всех типов бактериальных капсульных полисахаридов. В качестве примеров авторы изобретения показали, что данные составы сред отвечают за более высокие выходы для конкретных серотипов бактериальных капсульных полисахаридов *Neisseria meningitidis*. Тем не менее не следует понимать, что данные составы сред ограничиваются только указанными полисахаридами. Квалифицированные специалисты в данной области подтвердят, что примеры, представленные в этой заявке, предназначены только для подтверждения изобретения и не ограничивают объем изобретения. Составы сред и методологии последующей обработки также будут эффективны для обеспечения более высоких выходов других серотипов тех же микроорганизмов, представленных в данном документе, а также для ферментации и культивирования каких-либо капсульных полисахаридов из каких-либо бактерий, в частности штамма CS 68 H. influenzae, *Neisseria meningitidis* серотипов A, C, Y, W135 и X, *Streptococcus pneumoniae* серотипа 9V, *Salmonella typhi* и *Salmonella paratyphi*.

Получение сред.

(а) Какой-либо из трех составов сред согласно представленному изобретению не животного происхождения (BBIL-YE, BBIL-SP и BBIL-VI) был полностью растворен в одной десятой объема воды для инъекций (общее количество партии 10 л) и диафильтрован с использованием кассеты 30 кДа для удаления нежелательных высокомолекулярных примесей. Это устраняет нежелательные примеси с высокой молекулярной массой, тем самым увеличивая рост и уменьшая возможности интерференции примесей на последующих стадиях очистки.

(b) Среду готовили путем растворения следующих компонентов в таком же порядке: хлорид аммония, хлорид натрия, дикалия гидрофосфат, сульфат магния, хлорид кальция, цитрат железа, серин, аргинин, L-цистин, глютаминовая кислота и наконец добавление фильтрованного пептона не животного происхождения.

(с) Среду стерилизовали путем автоклавирования при 121°C в течение 15 мин в ферментере.

(d) Глюкозу и сульфат магния растворяют и стерилизуют отдельно путем автоклавирования при 121°C в течение 15 мин и добавляют к основной композиции среды асептически в ферментере, и pH регулируют до 7,0±0,2 с использованием 1 М раствора гидроксида натрия (NaOH).

Пример 3. Новая питательная композиция, получение и стратегия подпитки и кинетика роста.

Новая питательная композиция.

Новая питательная композиция состоит из сахарозы от 0,5 до 50%, глутамата натрия (вплоть до 10 г/л) и катионного пептида LL37 от 0,5 до 20 мкг/мл общей ферментационной среды в зависимости от культивирования штамма *N. meningitidis*. Другие компоненты питательной композиции являются постоянными и представлены в табл. 6 и 7.

Таблица 6

Питательная композиция-1

Компонент	Концентрация (г/л)
Сахароза	0,5- 50%
Глутамат натрия	10-50
LL37	0,0005-0,02
Аргинин	0-10
Серин	0-10
L-цистеин	0-5
Хлорид магния	2
Цитрат железа	0,04

Таблица 7

Питательная композиция-2

Компонент	Концентрация (г/л)
Сахароза	0,5- 50%
Глутамат натрия	0-60
LL37	0,0005-0,02
Хлорид магния	2-4

Приготовление подпитки.

(а) Сахарозу, глутамат натрия и другие компоненты подпитки за исключением катионного пептида LL37 растворяли в 10 л WFI и автоклавировали при 121°C в течение 15 мин в 10 л.

(б) Присоединяли сосуд с сифоном.

(с) Катионный пептид фильтровали через фильтр 0,22 мкм и асептически добавляли к указанной выше композиции.

Стратегия подпитывания.

Новую стратегию подпитки с двумя впрыскиваниями и режим непрерывной подачи оценивали для достижения более высокого выхода полисахарида. 50% Питательного раствора подавали в партию на 4-й ч, и другие 50% питательного раствора подавали на 6-й ч процесса ферментации, при этом поддерживая pH 7,1±0,2 и растворенный кислород (DO) выше 30%. Ферментацию проводили в течение более 4 ч, в завершение собирали на 10-й ч, добавляя 0,6% формалина, и продолжали еще 3 ч с последующим быстрым охлаждением при 15°C, и собирали инактивированный культуральный бульон. На фиг. 1-5 представлены результаты ферментации *N. meningitidis*, проведенной в 200 л ферментере, с использованием оптимизированной стратегии с двумя впрыскиваниями. Фиг. 6-10 представляют результаты непрерывной подачи.

На фиг. 1-5 концентрация сахара во время бактериальной ферментации представлена в виде столбчатого графика в единицах г/л. Существует медленное снижение концентрации сахара с 1-го по 4-й ч. На 4-й ч первое впрыскивание подпитки подается в ферментационную среду. Это увеличивает концентрацию сахара на 5-й ч, и затем снова происходит снижение концентрации сахара в ферментационной среде на 6-й ч. На 6-й ч обеспечивается второе впрыскивание подпитки. Как упоминалось выше, поскольку подпитка содержит сахарозу, глутамат натрия и LL37, концентрация сахара сразу увеличивается непосредственно после впрыскивания подпитки. Затем концентрация сахара снова увеличивается и сопровождается медленным снижением концентрации сахара с 6-го ч до сбора. Оптическая плотность наносится на график каждый час во время бактериальной ферментации, представленной на фиг. 1-5 в виде непрерывной линии, до сбора культуры. Оптическая плотность, измеренная на 600 нм, является показателем кинетики роста бактериальной ферментации на фигурах.

На фиг. 6-10 концентрация сахара во время бактериальной ферментации представлена в виде столбчатого графика в единицах г/л. Существует медленное снижение концентрации сахара с 1-го по 4-й ч. Подпитка обеспечивается с 4-го по 7-й ч путем постепенного увеличения концентрации сахара в ферментационной среде в зависимости от оптической плотности и скорости потока процесса ферментации. Как упоминалось выше, поскольку подпитка содержит сахарозу, глутамат натрия и LL37, концентрация сахара демонстрирует постепенное увеличение во время впрыскивания подпитки с 4-го по 7-й ч. За этим следует медленное снижение концентрации сахара с 8-го ч до сбора культуры. Оптическая плотность наносится на график каждый час во время бактериальной ферментации, представленной на фиг. 6-10 в виде непре-

рывной линии, до сбора культуры. Оптическая плотность, измеренная на 600 нм, является показателем кинетики роста бактериальной ферментации на фиг. 6-10. Для непрерывной подачи питательная композиция, как подробно указано в табл. 6, подавалась во время бактериальной ферментации.

Пример 4. Результаты и масштабирование от колбы встряхивания до партии в 200 л.

Прежде всего оптимизированную концентрацию сахарозы в диапазоне 0,5-50% и LL37 0,5-20 мкг/мл определяли в экспериментах во встряхиваемой колбе для *N. meningitidis* серотипа A, Y, C, W135 и X. Эксперименты во встряхиваемой колбе проводили в общем объеме среды 200 мл, содержащейся в 1 л колбе, с постоянной скоростью 150 об/мин при 37°C. Исходя из результатов экспериментов во встряхиваемой колбе оптимизированные концентрации сахарозы и LL37 использовались в 10 л ферментации, проведенной в 18 л биотехнологическом ферментере и далее масштабировались вплоть до 200 л в 300-литровом биотехнологическом ферментере. Результаты, представленные в табл. 9, представлены для 10 и 200 л периодической ферментации, взятой для *N. meningitidis* штамм A, C, Y, W135 и X. Табл. 8 представляет собой рост клеток и выход полисахарида, полученный в экспериментах во встряхиваемой колбе модифицированных сахарозных питательных сред по сравнению с эталонными средами Frantz (Ref) и Catlin 6 (Ref) по-отдельности. Кроме того, влияние различных концентраций питательной композиции, включающей сахарозу со стандартизованной концентрацией LL37, было объяснено на фиг. 11-15. Максимальный сбор культуры, полученный с наибольшими оптимальными концентрациями сахарозы в питательной среде, которая продуцирует неочищенный полисахарид с максимальным выходом (представлена в виде черных столбцов), показан на фиг. 11-15. Соответствующие результаты выхода неочищенного бактериального полисахарида после первоначального удаления нежелательных компонентов, солей и других остаточных веществ среды посредством стадии фильтрации тангенциального потока 100 кДа приведены в табл. 9.

Таблица 8

Общее производство капсульных полисахаридов *N. meningitidis* серотипами, собранными из 200 мл экспериментов во встряхиваемой колбе, использующих 30 кДа фильтрованный дрожжевой экстракт (BBIL-YE) в качестве источника пептона

№ серии	Название серотипа	Frantz		Catlin 6		Питательная среда согласно представленному изобретению	
		OD при 600 нм	PS мкг/мл	OD 600 нм	PS мкг/мл	OD 600 нм	PS мкг/мл
1	<i>N. meningitidis</i> A	4,0±1	21±1	4,2±1	45±1	11,8±2	136±1
2	<i>N. meningitidis</i> C	4,1±2	21±1	4,8±2	42±1	12,8±1	180±1
3	<i>N. meningitidis</i> Y	4,2±1	23±2	5,2±1	34±2	14,2±1	290±1
4	<i>N. meningitidis</i> W135	5,8±1	33±2	6,5±1	51±2	15,8±1	489±1
5	<i>N. meningitidis</i> X	4,2±1	23±1	4,3±1	47±1	12,7±2	340±2

Таким образом, из представленной выше табл. 8, можно сравнить количество полисахарида, полученное с использованием новых составов сред BBIL и новых подпиток, по отношению к традиционно используемым сред Frantz и Catlin 6.

В экспериментах в 200 мл встряхиваемой колбе *N. meningitidis* A показал содержание полисахарида 136±1 мкг/мл при OD₆₀₀ 11,8±2 для новых сред и подпитки в соответствии со способами, раскрытыми в данном изобретении, по сравнению с 45±1 мкг/мл при OD₆₀₀ 4,2±1 для среды Catlin 6, и всего 21±1 мкг/мл при OD₆₀₀ 4,0±1 для среды Frantz. Таким образом, можно увидеть, что кратное увеличение по меньшей мере в 6 раз увеличивает или по меньшей мере в 3 раза увеличивает выход неочищенного полисахарида для способов, описанных в данном представленном изобретении, при использовании новой питательной среды согласно представленному изобретению по сравнению с обычной средой Frantz и средой Catlin 6 соответственно.

В экспериментах в 200 мл встряхиваемой колбе, *N. meningitidis* C показал содержание полисахарида 180±1 мкг/мл при OD₆₀₀ 12,8±1 для новых сред и подпитки в соответствии со способами, раскрытыми в данном изобретении, по сравнению с 42±1 мкг/мл при OD₆₀₀ 4,8±2 для среды Catlin 6, и всего 21±1 мкг/мл при OD₆₀₀ 4,1±2 для среды Frantz. Таким образом, можно увидеть, что кратное увеличение по меньшей мере в 8 раз увеличивает или по меньшей мере в 5 раз увеличивает выход неочищенного полисахарида для способов, описанных в данном представленном изобретении, при использовании новой питательной среды согласно представленному изобретению по сравнению с обычной средой Frantz и средой Catlin 6 соответственно.

В экспериментах в 200 мл встряхиваемой колбе *N. meningitidis* Y показал содержание полисахарида 290 ± 1 мкг/мл при OD_{600} $14,2 \pm 1$ для новых сред и подпитки в соответствии со способами, раскрытыми в данном изобретении, по сравнению с 34 ± 2 мкг/мл при OD_{600} $5,2 \pm 1$ для среды Catlin 6 и всего 23 ± 2 мкг/мл при OD_{600} $4,2 \pm 1$ для среды Frantz. Таким образом, можно увидеть, что кратное увеличение по меньшей мере в 12 раз увеличивает или по меньшей мере в 8 раз увеличивает выход неочищенного полисахарида для способов, описанных в данном представленном изобретении, при использовании новой питательной среды согласно представленному изобретению по сравнению с обычной средой Frantz и средой Catlin 6 соответственно.

В экспериментах в 200 мл встряхиваемой колбе *N. meningitidis* W135 показал содержание полисахарида 489 ± 1 мкг/мл при OD_{600} $15,8 \pm 1$ для новых сред и подпитки в соответствии со способами, раскрытыми в данном изобретении, по сравнению с 51 ± 2 мкг/мл при OD_{600} $6,5 \pm 1$ для среды Catlin 6 и всего 33 ± 2 мкг/мл при OD_{600} $5,8 \pm 1$ для среды Frantz. Таким образом, можно увидеть, что кратное увеличение по меньшей мере в 14 раз увеличивает или по меньшей мере в 9 раз увеличивает выход неочищенного полисахарида для способов, описанных в данном представленном изобретении, при использовании новой питательной среды согласно представленному изобретению по сравнению с обычной средой Frantz и средой Catlin 6 соответственно.

В экспериментах в 200 мл встряхиваемой колбе *N. meningitidis* X показал содержание полисахарида 340 ± 2 мкг/мл при OD_{600} $12,7 \pm 2$ для новых сред и подпитки в соответствии со способами, раскрытыми в данном изобретении, по сравнению с 47 ± 1 мкг/мл при OD_{600} $4,3 \pm 1$ для среды Catlin 6 и всего 23 ± 1 мкг/мл при OD_{600} $4,2 \pm 1$ для среды Frantz. Таким образом, можно увидеть, что кратное увеличение по меньшей мере в 14 раз увеличивает или по меньшей мере в 7 раз увеличивает выход неочищенного полисахарида для способов, описанных в данном представленном изобретении, при использовании новой питательной среды согласно представленному изобретению по сравнению с обычной средой Frantz и средой Catlin 6 соответственно.

Таблица 9

Общее производство капсульных полисахаридов *N. meningitidis* серотипа-ми, собранными из 10 и 200 л ферментера, использующих 30 кДа фильтрованный дрожжевой экстракт (BBIL-YE) в качестве источника пептона

№ серии	Название серотипа	Сахароза	Концент. LL37	Время сбора культуры	Выход из 10 л со стадии 100 кДа TFF в мг/л	Выход из 200 л со стадии 100 кДа TFF в мг/л
1	<i>N. meningitidis</i> A	7,50%	0,06 мМ	10 часов	2227	1960
2	<i>N. meningitidis</i> C	7,50%	0,12 мМ	10 часов	1820	1680
3	<i>N. meningitidis</i> Y	7,50%	0,12 мМ	10 часов	1670	1520
4	<i>N. meningitidis</i> W135	7,50%	0,12 мМ	10 часов	1650	1510
5	<i>N. meningitidis</i> X	7,50%	0,06 мМ	10 часов	1510	1430

Сравнительный сбор культуры полисахаридов с тремя различными составами сред (BBIL-YE, BBIL-SP и BBIL-VI) концентрацией стадии 100 кДа

Содержание полисахаридов *N. meningitidis* штамма W135, культивированного в трех разных источниках пептона не животного происхождения приведено в табл. 10 ниже.

Таблица 10

Концентрации полисахарида Men W135 из 10-литровой партии

Используемый источник азота	Сахароза %	LL37 мкг/мл	Полисахарид концентрация мг/мл
Соевый пептон (BBIL-SP)	0,5- 50%	0,5-20	1420
Экстракт дрожжей (BBIL-YE)	0,5- 50%	0,5-20	1650
Растительный инфузионный пептон (BBIL-VI)	0,5- 50%	0,5-20	1570

Пример 5. Инактивация и сбор культуры.

Партию ферментации собирали, когда три последовательных считывания, взятых в интервале 30 мин, были одинаковыми в течение периода с 7-го по 12-й ч. Для инактивации культуры использовали от 0,5 до 0,8% формалина в зависимости от *N. meningitidis* штамма. Культуру инкубировали при $36,0 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 3 ч после добавления формалина. Культуральный бульон охлаждали до $10-15^\circ\text{C}$ в ферментере. Охлажденный культуральный бульон собирали в стерильные сосуды, и бульон собирали центрифугированием с последующей фильтрацией 0,22 мкм.

Пример 6. Последующая обработка и очистка бактериальных полисахаридов.

Инактивированный и собранный бульон центрифугируют при 4000 об/мин в течение 30 мин. Кле-

точные пеллеты отбрасывали. Супернатант, свободный от клеток, подвергали 100 кДа фильтрации тангенциального потока (TFF) для удаления нежелательных компонентов среды и остаточных веществ.

Затем ретентат подвергали осаждению белка для удаления белков с использованием ацетата цинка (в диапазоне от 0,5 до 5% мас./об.). Предпочтительно осаждение ацетатом цинка осуществляли в диапазоне от 1 до 3% мас./об. Более предпочтительно осаждение ацетатом цинка осуществляли при от 1,8 до 2,5% мас./об. Результаты осаждения белка 2% мас./об. ацетатом цинка приведены в табл. 11 ниже.

Альтернативно ретентат подвергали осаждению белка для удаления белков с использованием комбинации ацетата цинка (от 0,5 до 5% мас./об.) и смеси 25 мМ динатрия гидрофосфата и 25 мМ натрия дигидрофосфата. Предпочтительно используемый ацетат цинка находился в диапазоне от 1 до 3% мас./об. Более предпочтительно ацетат цинка использовали в концентрации от 2 до 2,5% мас./об. Результаты осаждения белка с использованием комбинации ацетата цинка в концентрации 2 мас./об., 25 мМ динатрия гидрофосфата и 25 мМ натрия дигидрофосфата представлены в табл. 12 ниже.

Альтернативно ретентат подвергали осаждению белка для удаления белков с использованием цитрата натрия (от 0,5 до 1,0 М). Результаты осаждения белка приведены в табл. 13 ниже.

Альтернативно ретентат подвергали осаждению белка для удаления белков с использованием комбинации ацетата цинка (от 0,5 до 5% мас./об.) и цитрата натрия (от 0,5 до 1,0 М). Предпочтительно осаждение ацетатом цинка проводили в диапазоне от 1 до 3% мас./об. Более предпочтительно осаждение ацетатом цинка осуществляли при от 1,8 до 2,5% мас./об.

Альтернативно белок осаждали с использованием сульфата аммония или цитрата натрия с конечной концентрацией 30-70% об./об. с или без ацетата цинка. Альтернативно также может использоваться какая-либо комбинация солей, указанная в серии Hofmeister или лиотропной серии.

Затем следовало центрифугирование, и пеллету отбрасывали. Супернатант пропускали через 100 кДа TFF для удаления остаточных солей. Затем ретентат подвергали ферментной обработке для дальнейшего разложения остаточных белков и/или материалов нуклеиновой кислоты. Подходящие ферменты, используемые для обработки ферментами, включают, но не ограничиваются этим, бензоназу, протеазу, РНКазу, ДНКазу и др. Обработка ферментами приведет к разложению таких белков или других материалов нуклеиновой кислоты, которые превышают размер 100 кДа. Другие ферментные, такие как ДНК, РНК, протеиназа К или наргаса могут альтернативно использоваться вместо бензоназы. Обработку бензоназой проводили при 37°C в течение 8-12 ч. Супернатант, обработанный бензоназой, дополнительно подвергали диафильтрации и концентрировали с использованием 50 мМ буфера Tris HCl при pH 7,0 через кассеты TFF 100 кДа для удаления компонентов ниже 100 кДа, так как размер представляющего интерес полисахарида составлял больше 100 кДа. Весь концентрированный раствор подвергали диафильтрации в течение 24 ч в 10 KDa TFF против WFI. Конечный раствор лиофилизировали. Весь процесс проводили совершенно без использования этанола. Затем ретентат лиофилизировали и восстанавливали, чтобы пройти дальнейшие стадии хроматографической очистки. Дальнейшая очистка лиофилизированного полисахарида была достигнута с использованием СНТ керамической гидроксипатитной смолы (одновременная анионная и катионообменная хроматография). Бактериальные полисахариды могут быть очищены по меньшей мере одним из следующих способов, например ионообменной хроматографией, гель-фильтрацией, аффинной хроматографией, хроматографией на гидрофобной колонке, фракционированием с солью, органическим растворителем (растворителями), центрифугированием и т.д., а также могут быть реализованы для очистки и последующей обработки без использования какого-либо спирта вообще.

Таблица 11

Удаление белковых примесей путем осаждения
ацетатом цинка (0,5-5%) в партии 10 л

Менингококковый серотип	Стадия 100 кДа TFF перед обработкой ацетатом цинка		Стадия 100 кДа TFF после обработки ацетатом цинка (0,5-5%) (2%)		Конечный объем	
	Общий капсульный полисахарид (мг/мл)	Общий белок %	Общий капсульный полисахарид (мг/мл)	Общий белок %	Общий капсульный полисахарид (мг/мл)	Общий белок %
<i>N. Meningitidis</i> A	2227	40-65	2117	< 5	1932	0,15
<i>N. Meningitidis</i> C	1850	35-58	1810	<5	1520	0,12
<i>N. Meningitidis</i> Y	1640	50-62	1620	<5	1360	0,09
<i>N. Meningitidis</i> W135	1630	40-58	1590	<10	1342	0,13
<i>N. Meningitidis</i> X	1580	38-65	1510	<5	1210	0,14

Таблица 12

Удаление белковых примесей путем осаждения ацетатом цинка (0,5-5%) вместе с 25 мМ каждого из динатрия гидрофосфата и натрия дигидрофосфата в партии 10 л

Менингококковый серотип	Стадия 100 кДа TFF перед обработкой ацетатом цинка		Стадия 100 кДа TFF после обработки ацетатом цинка (0,5-5%) с 25 мМ каждого Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 .		Конечный объем	
	Общий капсульный полисахарид (мг/мл)	Общий белок %	Общий капсульный полисахарид (мг/мл)	Общий белок %	Общий капсульный полисахарид (мг/мл)	Общий белок %
<i>N. Meningitidis</i> A	2327	45-68	2127	< 5	1932	0,12
<i>N. Meningitidis</i> C	1810	30-55	1800	<5	1520	0,16
<i>N. Meningitidis</i> Y	1680	55-70	1650	<5	1360	0,17
<i>N. Meningitidis</i> W135	1660	45-58	1610	<5	1342	0,14
<i>N. Meningitidis</i> X	1540	30-65	1500	<5	1210	0,06

Таблица 13

Удаление белковых примесей цитратом натрия концентрацией 0,5-1 М

Менингококковый серотип	Стадия 100 кДа TFF перед обработкой ацетатом цинка		Стадия 100 кДа TFF после обработки цитратом натрия (0,5-1 М)		Конечный объем	
	Общий капсульный полисахарид (мг/мл)	Общий белок %	Общий капсульный полисахарид (мг/мл)	Общий белок %	Общий капсульный полисахарид (мг/мл)	Общий белок мг/мл
<i>N. Meningitidis</i> A	2327	40-65	2137	15	1932	0,13
<i>N. Meningitidis</i> C	1850	35-55	1830	20	1520	0,15
<i>N. Meningitidis</i> Y	1610	50-70	1570	14	1360	0,14
<i>N. Meningitidis</i> W135	1670	40-58	1600	10	1342	0,15
<i>N. Meningitidis</i> X	1540	35-60	1490	12	1210	0,08

Пример 7. Вакцинные препараты.

Бактериальные полисахариды, полученные в результате процессов, разработанных в соответствии с настоящим изобретением, описанные выше, были сформулированы вместе с комбинацией бактериальных полисахаридов *Salmonella typhi*, конъюгированных с белком-носителем, и бактериальных полисахаридов *Neisseria meningitidis* A, *Neisseria meningitidis* C, *Neisseria meningitidis* Y, *Neisseria meningitidis* W135 и *Neisseria meningitidis* X.

Стабильная вакцинная композиция для профилактики инфекций, вызванных *Neisseria meningitidis* и *Salmonella typhi* включает

(a) вакцинные антигены, где указанные вакцинные антигены содержат капсульные полисахариды *Neisseria meningitidis* A, *Neisseria meningitidis* C, *Neisseria meningitidis* Y, *Neisseria meningitidis* W135 *Neisseria meningitidis* X и Vi капсульный полисахарид *Salmonella typhi*, конъюгированный с белком-носителем столбнячного анатоксина (ViPs-TT);

(b) комбинацию сахаров, выбранных из сахарозы, глюкозы, лактозы, мальтозы и трегалозы;

(c) буфер, выбранный из физиологического раствора и фосфатно-солевого буферного раствора;

(d) консервант; и

(e) необязательно адъювант,

при этом указанные препараты не содержат какого-либо животного компонента или спирта.

Препарат-A1.

Вакцинные препараты, представленные в соответствии с настоящим изобретением, включают капсульные полисахариды *N. meningitis* A, *N. meningitis* C, *N. meningitis* Y, *N. meningitis* W135 и *N. meningitis* X, сформулированные и представленные в виде лиофилизированной формы с или без буферных разбавителей. Бактериальные капсульные полисахариды менингококков A, C, Y, W135 и X представлены в

виде лиофилизированных пеллет. Буферные разбавители вакцинных препаратов в соответствии с представленным изобретением выбирают из физиологического раствора или фосфатно-солевого буферного раствора. Буферный разбавитель формулируется с хлоридом натрия или натрий-фосфатным буферным раствором. При этом лиофилизированный препарат менингококка A, C, Y, W135 и X содержит какую-либо комбинацию сахаров, выбранных из трегалозы, сахарозы и лактозы, в качестве стабилизаторов.

Препарат-A2.

Препараты, представленные в соответствии с настоящим изобретением, включают капсульные полисахариды N. meningitis A, N. meningitis C, N. meningitis Y, N. meningitis W135 и N. meningitis X, сформулированные и представленные в виде лиофилизированной формы с Vi полисахаридом Salmonella typhi, конъюгированным с белком-носителем столбнячного анатоксина (ViPs-TT). Бактериальные капсульные полисахариды менингококков A, C, Y, W135 и X представлены в виде лиофилизированных пеллет. ViPs-TT вакцинный антиген вакцинных препаратов в соответствии с представленным изобретением растворяют в физиологическом растворе или фосфатно-солевом буферном растворе. Буферные разбавители формулируются с хлоридом натрия или натрий-фосфатными буферными растворами. Лиофилизированный препарат менингококка A, C, Y, W135 и X содержит какую-либо комбинацию сахаров, выбранных из трегалозы, сахарозы и лактозы, в качестве стабилизаторов. Вакцинные препараты могут дополнительно содержать консерванты, такие как тиомерсал.

Препарат-A3.

Препараты, представленные в соответствии с настоящим изобретением, включают капсульные полисахариды N. meningitis A, N. meningitis C, N. meningitis Y, N. meningitis W135 и N. meningitis X, сформулированные Vi полисахаридом Salmonella typhi (ViPs), представленные в виде лиофилизированной формы. Бактериальные капсульные полисахариды менингококков A, C, Y, W135 и X, включая ViPs, представлены в виде лиофилизированных пеллет. ViPs-TT вакцинный антиген вакцинных препаратов в соответствии с представленным изобретением растворяют в физиологическом растворе или фосфатно-солевом буферном растворе. Буферный разбавитель формулируется с хлоридом натрия или натрий-фосфатными буферными растворами. Лиофилизированный препарат менингококка A, C, Y, W135 X и ViPs содержит какую-либо комбинацию сахаров, выбранных из трегалозы, сахарозы и лактозы, в качестве стабилизаторов.

Стабильная вакцинная композиция для профилактики инфекций, вызванных Neisseria meningitidis и Salmonella typhi включает вакцинные антигены, где указанные вакцинные антигены содержат капсульные полисахариды Neisseria meningitidis A, Neisseria meningitidis C, Neisseria meningitidis Y, Neisseria meningitidis W135, Neisseria meningitidis X и Vi капсульный полисахарид Salmonella typhi, причем указанная композиция не содержит какого-либо животного компонента или спирта.

В табл. 14 ниже приведены различные концентрации вакцинных антигенов вакцинных композиций, раскрытых в представленном изобретении.

Таблица 14

Вакцинные препараты согласно представленному изобретению

Препарат	Состав в мкг/0,5 мл (объем дозы)						Наполнители
	C	Y	W135	X	A	ViPs-TT (ViPs:TT в соотношении от 0,5 до 1,5)	
A1	50	50	50	50	50	Непригодный	Натрий-фосфатным буферный раствор и тиомерсал, комбинация сахаров - сахароза (вплоть до 70% мас./об.), трегалоза (0,5-1% мас./об.) и лактоза
							(0,5 -1% мас./об.).
A2	50	50	50	50	50	25 мкг конъюгата Vi-Ps-TT	Буферный раствор хлорида натрия (физиологический раствор) и тиомерсал, комбинация сахаров - сахароза (вплоть до 70% мас./об.), трегалоза (0,5 -1% мас./об.) и лактоза (0,5 -1% мас./об.).

Пример 8. Биологическая активность вакцинных препаратов A1 и A2.

Оценивали иммуногенность препаратов. Результаты представлены в табл. 15.

Таблица 15

Данные об иммуногенности вакцинных препаратов A1 и A2

Код препарата	День	Men A		Men C		Men Y		Men W135		Men X		ViPs-TT	
		IgG	SBA	IgG	SBA	IgG	SBA	IgG	SBA	IgG	SBA	IgG	SBA
A1	28	243	12	214	15	354	17	425	10	345	23	NA	NA
	35	1169	32	7562	68	5231	76	1235	22	2314	79	NA	NA
A2	28	215	11	254	12	156	16	254	12	165	24	2365	52
	35	1126	30	6865	59	4356	74	1254	25	2145	75	18567	183

Результаты. Исследование, проведенное на мышах, касательно иммуногенности показало, что все препараты были удовлетворительно иммуногенными. Добавление конъюгата ViPs-ТТ к препарату имело независимый иммуногенный ответ в препарате и поддерживало концепцию разработки вакцины для одновременной целевой защиты от менингита и брюшного тифа. Таким образом, какой-либо из каждого компонента индивидуальных менингококковых антигенов не ослабляется присутствием других компонентов менингококковых антигенов или антигена конъюгата Vi капсульный-ТТ, тем самым предоставляя эквивалент титра антитела, который продуцирует достаточный иммунный ответ против всех основных типов менингококковых серотипов и инфекций *Salmonella typhi*.

Пример 9. Стабильность менингококковых полисахаридов и полисахаридных конъюгатных препаратов.

Конечные вакцинные препараты восстанавливали для исследований стабильности. Восстановленные вакцинные антигены объединяли и инкубировали при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$, $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ и $56\pm 2^{\circ}\text{C}$. Общие полисахариды и свободные полисахариды оценивали в день 0, а также на 15-й и 30-й день. Результаты стабильности представлены в табл. 16 и 17.

Таблица 16

Исследование стабильности препарата A1

День	Хранение при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$		Хранение при $37\pm 2^{\circ}\text{C}$		Хранение при $56\pm 2^{\circ}\text{C}$	
	Общие полисахариды мкг/мл	Потери полисахарида %	Общие полисахариды мкг/мл	Потери полисахарида %	Общие полисахариды мкг/мл	Потери полисахарида %
Men A						
0	50	< 5	50	< 5	50	< 5
15	50	< 5	50	< 5	45	10
30	49	< 5	48	< 5	40	20
180	50	< 5	-	-	-	-
360	48	< 5	-	-	-	-
Men C						
0	49	< 5	49	< 5	49	< 5
15	49	< 5	45	8,1	35	28,5
30	48	< 5	38	22,4	30	38,7
180	49	< 5	-	-	-	-
360	48	< 5	-	-	-	-
Men Y						
0	49	< 5	49	< 5	49	< 5
15	48	< 5	44	10,2	34	30,6
30	48	< 5	36	26,5	29	40,8
180	49	< 5	-	-	-	-
360	49	< 5	-	-	-	-
Men W135						
0	49	< 5	49	< 5	49	< 5
15	49	< 5	46	6,1	36	26,5
30	48	< 5	37	24,4	30	38,7
180	48	< 5	-	-	-	-
360	48	< 5	-	-	-	-
Men X						
0	50	< 5	50	< 5	50	< 5
15	48	< 5	43	14	31	38
30	48	< 5	32	36	27	46
180	48	< 5	-	-	-	-
360	48	< 5	-	-	-	-

Таблица 17

Исследование стабильности препарата A2

День	Хранение при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$		Хранение при $37\pm 2^{\circ}\text{C}$		Хранение при $56\pm 2^{\circ}\text{C}$	
	Общие полисахариды мкг/мл	Потери полисахарида %	Общие полисахариды мкг/мл	Потери полисахарида %	Общие полисахариды мкг/мл	Потери полисахарида %

Men A Лиофилизированный восстановленный препарат						
0	49	< 5	50	< 5	50	< 5
15	50	< 5	48	< 5	46	10
30	48	< 5	48	< 5	40	20
180	50	< 5	-	-	-	-
360	48	< 5	-	-	-	-
Men C						
0	49	< 5	49	< 5	49	< 5
15	49	< 5	45	8,1	35	28,5
30	48	< 5	38	22,4	30	38,7
180	49	< 5	-	-	-	-
360	48	< 5	-	-	-	-
Men Y						
0	49	< 5	49	< 5	49	< 5
15	48	< 5	44	10,2	34	30,6
30	48	< 5	36	26,5	29	40,8
180	49	< 5	-	-	-	-
360	49	< 5	-	-	-	-
Men W135						
0	49	< 5	49	< 5	49	< 5
15	49	< 5	46	6,1	36	26,5
30	48	< 5	37	24,4	30	38,7
180	48	< 5	-	-	-	-
360	48	< 5	-	-	-	-
Men X						
0	50	< 5	50	< 5	50	< 5
15	48	< 5	43	14	31	38
30	48	< 5	32	36	27	46
180	48	< 5	-	-	-	-
360	48	< 5	-	-	-	-
ViPs-TT						
0	25	< 5	25	< 5	-	-
15	25	< 5	25	< 5	-	-
30	25	< 5	25	< 5	-	-
180	24	< 5	-	-	-	-
360	24	< 5	-	-	-	-
720	24	< 5	-	-	-	-

Таблица 18

Исследование стабильности препарата А3

День	Хранение при 5 ± 3 °С		Хранение при 37 ± 2 °С		Хранение при 56 ± 2 °С	
	Общие полисахариды мкг/мл	Потери полисахарида %	Общие полисахариды мкг/мл	Потери полисахарида %	Общие полисахариды мкг/мл	Потери полисахарида %
Men A Лيوфилизированный восстановленный препарат						
0	50	< 5	50	< 5	50	< 5
15	50	< 5	48	< 5	46	10
30	48	< 5	48	< 5	40	20
180	50	< 5	-	-	-	-
360	48	< 5	-	-	-	-
Men C						
0	49	< 5	49	< 5	49	< 5
15	49	< 5	45	8,1	35	28,5
30	47	< 5	38	22,4	30	38,7
180	49	< 5	-	-	-	-
360	48	< 5	-	-	-	-
Men Y						
0	49	< 5	49	< 5	49	< 5
15	48	< 5	44	10,2	34	30,6
30	48	< 5	36	26,5	29	40,8
180	49	< 5	-	-	-	-
360	47	< 5	-	-	-	-
Men W135						
0	49	< 5	49	< 5	49	< 5
15	49	< 5	46	6,1	36	26,5
30	49	< 5	37	24,4	30	38,7
180	48	< 5	-	-	-	-
360	48	< 5	-	-	-	-
Men X						
0	50	< 5	50	< 5	50	< 5
15	48	< 5	43	14	31	38
30	48	< 5	32	36	27	46
180	48	< 5	-	-	-	-
360	47	< 5	-	-	-	-
Vi-Ps						
0	25	< 5	25	< 5	-	-
15	24	< 5	25	< 5	-	-
30	25	< 5	25	< 5	-	-
180	25	< 5	-	-	-	-
360	24	< 5	-	-	-	-

Результаты. Препарат А1, как обнаружено, был стабильным в течение периода в 360 дней при хранении при 5°С. Однако наблюдалась 20%-ная потеря в лиофилизированном менингококковом А полисахариде. Весь полностью восстановленный препарат, как обнаружено, был стабильным при 5°С вплоть до 360 дней периода исследования. Препараты А2 и А3, как также было установлено, были стабильными при 5°С вплоть до 360 дней периода исследования.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Стабильная вакцинная композиция для профилактики инфекций, вызванных *Neisseria meningitidis* и *Salmonella typhi*, включающая

(а) вакцинные антигены, содержащие капсульные полисахариды *Neisseria meningitidis* А, *Neisseria meningitidis* С, *Neisseria meningitidis* Y, *Neisseria meningitidis* W135, *Neisseria meningitidis* X, присутствующие в концентрации 50 мкг/0,5 мл, и капсульный полисахарид Vi *Salmonella typhi*, который содержит простой капсульный полисахарид Vi (простой ViPs) и ViPs, конъюгированный со столбнячным анатоксином (конъюгат ViPs-ТТ), присутствующий в концентрации 25 мкг/0,5 мл,

в которой Vi капсульный полисахарид *Salmonella typhi* (ViPs) и белок-носитель столбнячного анатоксина (ТТ) в конъюгате ViPs-ТТ присутствуют в соотношении 0,5:1,5;

(b) комбинацию сахаров, выбранных из сахарозы, глюкозы, лактозы, мальтозы и трегалозы;

(c) буфер, выбранный из физиологического раствора и фосфатно-солевого буферного раствора;

(d) консервант - тиомерсал,

при этом вакцинная композиция не содержит животного компонента или спирта.

2. Вакцинная композиция по п.1, которая дополнительно содержит адъювант.

3. Вакцинная композиция по п.1, в которой указанные комбинации сахаров представляют собой сахарозу вплоть до 70% мас./об., трегалозу 0,5-1% мас./об. и лактозу 0,5-1% мас./об.

4. Вакцинная композиция по п.1, в которой указанные капсульные полисахариды *Neisseria meningitidis* являются стабильными в течение по меньшей мере 720 дней при $5\pm 3^\circ\text{C}$ и в течение по меньшей мере 30 дней при $37\pm 3^\circ\text{C}$ и в которой указанный ViPs-ТТ является стабильным в течение по меньшей мере 720 дней при $5\pm 3^\circ\text{C}$ и в течение по меньшей мере 21 дня при $37\pm 3^\circ\text{C}$.

5. Способ получения капсульных полисахаридов *Neisseria meningitidis* A, *Neisseria meningitidis* C, *Neisseria meningitidis* Y, *Neisseria meningitidis* W135 и *Neisseria meningitidis* X, которые применяются в качестве антигенов в вакцинной композиции, где способ использует конкретные композиции сред, выбранные из композиции среды на основе экстракта дрожжей (BBIL-YE), композиции среды на основе соевого пептона (BBIL-SP) или композиции среды на основе растительного инфузионного белка (BBIL-VI) для промышленного производства капсульных полисахаридов посредством бактериальной ферментации с режимом периодического культивирования с подпиткой, где ферментация с режимом периодического культивирования с подпиткой осуществляется согласно стратегии подпитки с двумя впрыскиваниями или непрерывной подачи с использованием питательной среды, в которой неочищенный полисахарид получают с повышенным выходом по сравнению с обычными композициями сред.

6. Способ по п.5, в котором конкретная среда представляет собой композицию среды на основе экстракта дрожжей, содержащую 0,1-2,0 г/мл хлорида аммония, 5-20 г/мл глютаминовой кислоты, от 0,25 до 0,4 г/мл серина, от 0,25 до 0,4 г/мл аргинина, от 0,2 до 0,3 г/мл L-цистеина, 4 г/мл дикалия гидрофосфата, 5 г/мл хлорида натрия, 0,73 г/мл сульфата магния, 0,030 г/мл хлорида кальция, 0,04 г/мл цитрата железа, 5-20 г/мл экстракта дрожжей и 10-20 г/мл глюкозы.

7. Способ по п.5, в котором конкретная среда представляет собой композицию среды на основе соевого пептона, содержащую 0,1-2,0 г/мл хлорида аммония, 5-20 г/мл глютаминовой кислоты, от 0,25 до 0,4 г/мл серина, от 0,25 до 0,4 г/мл аргинина, от 0,2 до 0,3 г/мл L-цистеина, 4 г/мл дикалия гидрофосфата, 5 г/мл хлорида натрия, 0,73 г/мл сульфата магния, 0,030 г/мл хлорида кальция, 0,04 г/мл цитрата железа, 10 г/мл соевого пептона и 10 г/мл глюкозы.

8. Способ по п.5, в которой конкретная среда представляет собой композицию среды на основе растительного инфузионного пептона, содержащую 0,1-2,0 г/мл хлорида аммония, 5-20 г/мл глютаминовой кислоты, от 0,25 до 0,4 г/мл серина, от 0,25 до 0,4 г/мл аргинина, от 0,2 до 0,3 г/мл L-цистеина, 4 г/мл дикалия гидрофосфата, 5 г/мл хлорида натрия, 0,73 г/мл сульфата магния, 0,030 г/мл хлорида кальция, 0,04 г/мл цитрата железа, 10 г/мл растительного инфузионного пептона (30k диафильтрованного) и 10 г/мл глюкозы.

9. Способ по п.5, в котором композиция питательной среды содержит 0,5-50% г/л сахарозы, 0,0005-0,02 г/л катионного пептида LL37, 10-50 г/л глутамата натрия, до 10 г/л аргинина, до 10 г/л серина, до 5 г/л L-цистеина, 2 г/л хлорида магния и 0,04 г/л цитрата железа.

10. Способ по п.5, в котором стратегию подпитки с двойным впрыскиванием осуществляют путем введения питательной среды в фиксированные интервалы времени на 4-м и 6-м ч во время ферментации с режимом периодического культивирования с подпиткой.

11. Способ по п.10, в котором питательная среда для стратегии подпитки с двойным впрыскиванием, включает

(a) первое впрыскивание, содержащее 0,5-50% г/л сахарозы, 0,0005-0,02 г/л катионного пептида LL37, 10-50 г/л глутамата натрия, до 10 г/л аргинина, до 10 г/л серина, до 5 г/л L-цистеина, 2 г/л хлорида магния и 0,04 г/л цитрата железа; и

(b) второе впрыскивание, содержащее от 0,5 до 50% г/л сахарозы, от 0,0005 до 0,02 г/л катионного пептида LL37, до 60 г/л глутамата натрия и 2-4 г/л хлорида магния.

12. Способ по п.5, в котором капсульные полисахариды *Neisseria meningitidis* A, *Neisseria meningitidis* C, *Neisseria meningitidis* Y, *Neisseria meningitidis* W135 и *Neisseria meningitidis* X дополнительно очищают по способу, включающему осаждение ацетатом цинка в концентрации 0,5-5% мас./об. или от 1,8 до 2,5% мас./об.

13. Способ по п.5, в котором капсульные полисахариды *Neisseria meningitidis* A, *Neisseria meningitidis* C, *Neisseria meningitidis* Y, *Neisseria meningitidis* W135 и *Neisseria meningitidis* X дополнительно очищают по способу, включающему осаждение ацетатом цинка в концентрации 0,5-5% мас./об. или 2-2,5% мас./об. вместе с 25 мМ каждого из динатрия гидрофосфата и натрия дигидрофосфата.

14. Способ по п.5, в котором капсульные полисахариды *Neisseria meningitidis* A, *Neisseria meningitidis* C, *Neisseria meningitidis* Y, *Neisseria meningitidis* W135 и *Neisseria meningitidis* X дополнительно очи-

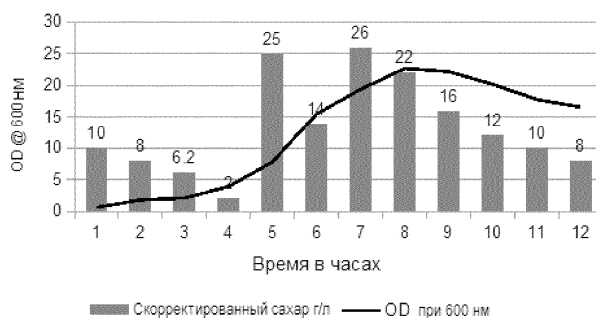
щают по способу, включающему осаждение с использованием цитрата натрия в концентрации 0,5-1 М.

15. Способ по п.5, в котором капсульные полисахариды *Neisseria meningitidis* A, *Neisseria meningitidis* C, *Neisseria meningitidis* Y, *Neisseria meningitidis* W135 и *Neisseria meningitidis* X дополнительно очищают по меньшей мере по одному из следующих способов, включающих одновременную анионо- и катионообменную хроматографию с керамической гидроксиапатитной смолой, ионообменную хроматографию, гель-фильтрационную хроматографию, гидрофобную колоночную хроматографию, фракционирование с солью, использование органического(их) растворителя(ей).

16. Способ по п.5, в котором выход неочищенного полисахарида увеличивается по меньшей мере в 3 раза по сравнению с использованием обычных композиций сред.

17. Способ по п.5, в котором выход неочищенного полисахарида увеличивается по меньшей мере в 15 раз по сравнению с использованием обычных композиций сред.

Реакция роста *N. meningitidis* серотипа А
на стратегию подпитки двумя впрыскиваниями



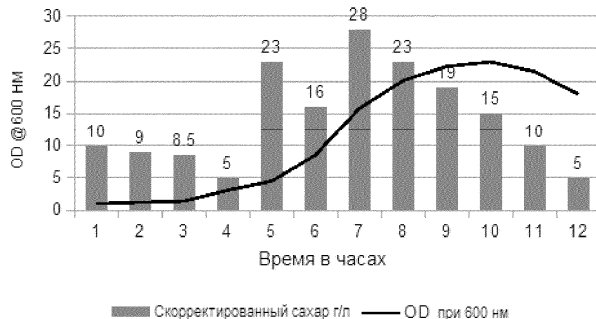
Фиг. 1

Реакция роста *N. meningitidis* серотипа С
на стратегию подпитки двумя впрыскиваниями



Фиг. 2

Реакция роста *N. meningitidis* серотипа Y
на стратегию подпитки двумя впрыскиваниями



Фиг. 3

Реакция роста *N. meningitidis* серотипа W 135
на стратегию подпитки двумя впрыскиваниями



Фиг. 4

Реакция роста *N. meningitidis* серотипа X
на стратегию подпитки двумя впрыскиваниями



Фиг. 5

Реакция роста *N. meningitidis* серотипа A
при режиме непрерывной подачи.



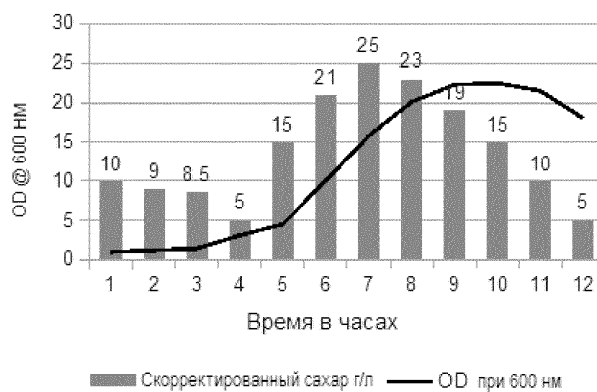
Фиг. 6

Реакция роста *N. meningitidis* серотипа C
при режиме непрерывной подачи.



Фиг. 7

Реакция роста *N. meningitidis* серотипа Y
при режиме непрерывной подачи.



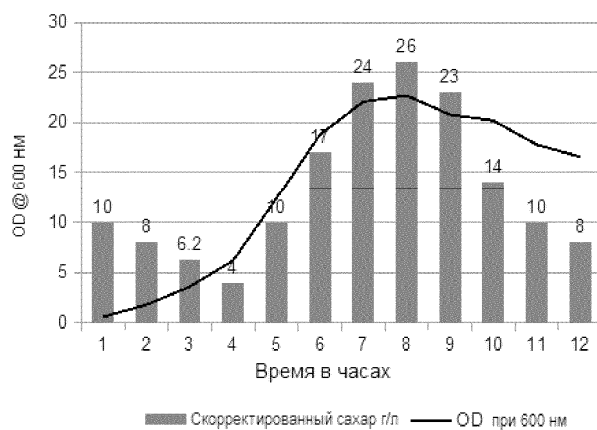
Фиг. 8

Реакция роста *N. meningitidis* серотипа W 135
при режиме непрерывной подачи.



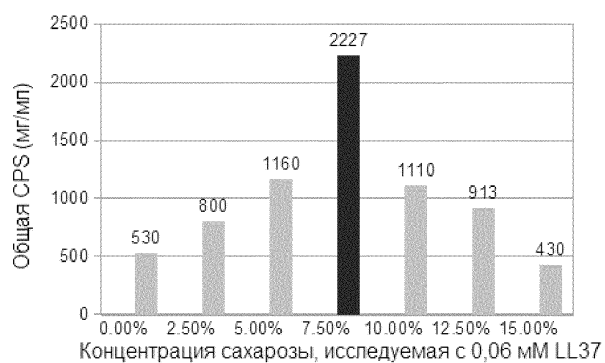
Фиг. 9

Реакция роста *N. meningitidis* серотипа X
при режиме непрерывной подачи.



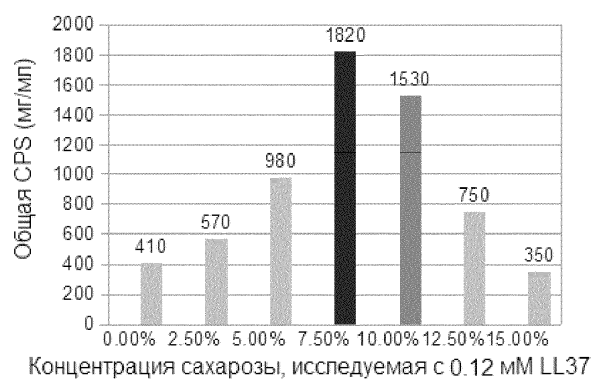
Фиг. 10

Общая концентрация CPS *N. Meningitidis* серогруппы А
на стадии ТТФ 100 кДа



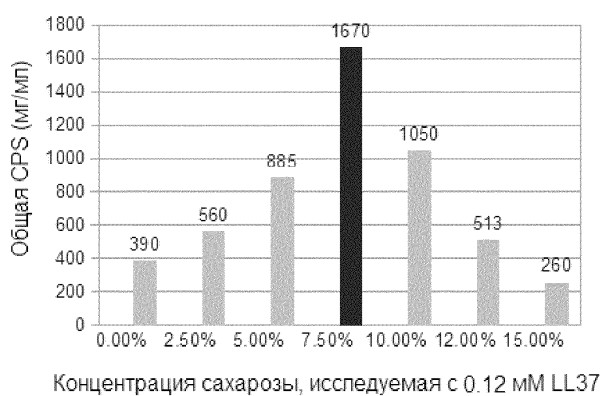
Фиг. 11

Общая концентрация CPS *N. Meningitidis* серогруппы С
на стадии ТТФ 100 кДа



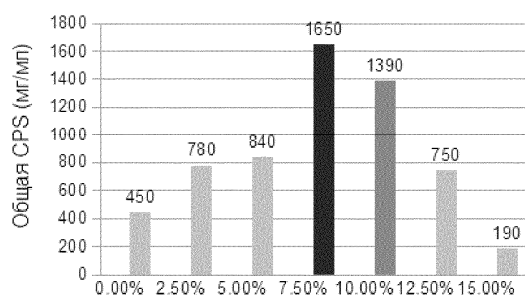
Фиг. 12

Общая концентрация CPS *N. Meningitidis* серогруппы Y
на стадии ТТФ 100 кДа



Фиг. 13

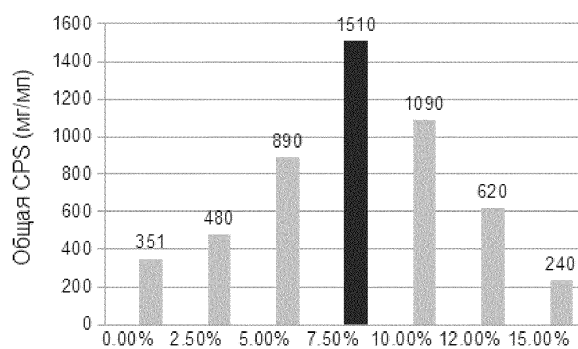
Общая концентрация CPS *N. Meningitidis* серогруппы W135
на стадии TTF 100 кДа



Концентрация сахарозы, исследуемая с 0.12 мМ LL37

Фиг. 14

Общая концентрация CPS *N. Meningitidis* серогруппы X
на стадии TTF 100 кДа



Концентрация сахарозы, исследуемая с 0.06 мМ LL37

Фиг. 15



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2