

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040838**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.03

(21) Номер заявки
201792470

(22) Дата подачи заявки
2016.06.03

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/085 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 39/116 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)

(54) **УСТОЙЧИВАЯ ПОЛИВАЛЕНТНАЯ ВАКЦИННАЯ КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ**

(31) **2185/MUM/2015**

(32) **2015.06.08**

(33) **IN**

(43) **2018.10.31**

(86) **PCT/IB2016/053265**

(87) **WO 2016/199003 2016.12.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**СЕРУМ ИНСТИТЬЮТ ОФ ИНДИЯ
ПРАЙВАТ ЛТД. (IN)**

(72) Изобретатель:
**Шере Раджив Мхаласакант, Малвийя
Хитеш Кумар, Джана Суопан Кумар,
Писал Самбхаджи Шанкар, Маллия
Аша Дайнеш, Махор Сунил, Гаутам
Маниш Махешкумар, Джоши Читан
Вилас, Малепати Венката Вамси
Кришна, Джашав Прашант Шиваджи
(IN)**

(74) Представитель:
Нюховский В.А. (RU)

(56) US-A1-20100209450
US-A1-20140377302
US-A1-20110195086
US-A1-20070110762
US-A-5623057
EP-A1-2865392

(57) Изобретение относится к устойчивой поливалентной вакцинной композиции и способу её получения. Предложенные композиции показывают пониженную агрегацию между частицами полисахарид-полисахарид и полисахарид-белковый конъюгат вместе с усовершенствованной устойчивостью и иммуногенностью. Также предложен способ получения поливалентной вакцинной композиции, показывающей оптимальную адсорбцию от 75 до 99% для каждого конъюгата.

B1

040838

040838

B1

Предпосылки создания изобретения

Пневмококк является основной причиной бактериальной пневмонии, менингита и сепсиса у детей. Согласно недавним оценкам детские смерти, вызванные пневмококком, составляют от 0,7-1,0 млн ежегодно по всему миру. В 2000 г. согласно оценкам произошло около 14,5 млн эпизодов пневмококковой инфекции (диапазон неопределенности 11,1-18,0 млн).

Пневмококковая инфекция привела приблизительно к 0,826 млн детских смертей (0,58-0,926 млн) в возрасте 1-59 месяцев, из которых 0,091 млн (0,063-0,1 млн) были ВИЧ-положительными и 0,735 млн (0,51-0,82 млн) были ВИЧ-отрицательными.

Поливалентные противопневмококковые полисахаридные вакцины, которые были разрешены к применению в течение многих лет, подтвердили свою ценность для предотвращения пневмококковой инфекции у взрослых, в частности у пожилых людей и людей в группе риска. Однако грудные дети и дети младшего возраста плохо реагируют на неконъюгированные пневмококковые полисахариды. Противопневмококковая конъюгированная вакцина, Prevnar®, содержащая семь наиболее часто изолируемых серотипов (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F), вызывающих инвазивную пневмококковую инфекцию у детей младшего возраста и грудных детей в настоящее время, была впервые разрешена к применению в Соединенных Штатах в феврале 2000 г.

Кроме того, Prevnar™ 13 (Wyeth) является одобренной вакциной, содержащей конъюгаты полисахаридов из серотипов 6A, 6B, 19A, 19F в дополнение к 1, 3, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C и 23F.

Synflorix™ (GSK) - это другая утвержденная вакцина, обеспечивающая защиту от 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 20 и 23F, а также перекрестный иммунитет от 19A и 6A.

Вакцинные препараты обычно должны быть стабильными и иметь однородную консистенцию для обеспечения длительного срока хранения и использования упаковки для многократного приема. Вакцины на основе белков, включая полисахарид-белковые конъюгаты, подлежат агрегации и осаждению белков, что может привести к более низкой эффективной общей концентрации вакцины в связи с недоступностью осажденного белкового продукта. Полисахарид-белковые конъюгированные вакцины, в частности, имеют большую склонность к агрегации, чем один белок-носитель (см. Берти и соавт., 2004, Biophys J 86:3-9). Выбор препарата для полисахарид-белковой конъюгированной вакцины может значительно повлиять на агрегацию белка. См. Хо и соавт., 2001, Вакцина 19:716-725.

Несмотря на существование нескольких поливалентных противопневмококковых полисахарид-белковых конъюгированных вакцинных композиций, разрабатываемых по всему миру, в данной области техники существует постоянная необходимость в вакцинных препаратах, обеспечивающих высокую адсорбцию отдельных конъюгатов без агрегации/осаждения иммуногенных композиций, содержащих полисахарид-белковые конъюгаты.

Адьюванты, обычно используемые в таких поливалентных противопневмококковых вакцинах, были солями алюминия, такими как гидроксид алюминия и фосфат алюминия. Известно множество других экспериментальных адьювантов, однако адсорбция в соли алюминия остается наиболее распространенной адьювантной композицией вакцины. Несмотря на то, что их использование широко распространено, соли алюминия не всегда сравнимы с определенными антигенами, что, таким образом, приводит к значительным отклонениям в отношении процентной адсорбции полисахарид-белкового конъюгата на алюмокалиевых квасцах или антигенности.

Иммунологические свойства и устойчивость кандидата в конъюгированные вакцины, адсорбированного на алюмокалиевом адьюванте, зависят от различных параметров, таких как

- i) антигенность каждого антигена,
- ii) тип белка-носителя, используемого для конъюгации, и
- iii) тип используемого адьюванта.

Что особенно важно, протяженность адсорбции антигена на адьюванте ранее заявлялась как один из ключевых параметров для демонстрации однородности характеристик от партии к партии в процессе разработки композиции и возможного влияния на эффективность вакцинного препарата.

Кроме того, процентная адсорбция полисахарид-белковых конъюгатов может далее снижаться при хранении композиции или в неблагоприятных условиях, таких как колебания температуры. См. 54-е заседание экспертной комиссии ВОЗ по стандартизации биологических препаратов, Рекомендации по производству и контролю противопневмококковых конъюгированных вакцин, 17-21 ноября 2003 г., Карл Э. Фраш, Сессия IV: Конъюгированные вакцины; Вакцинные технологии II; Португалия, 2008 г. Согласно предписаниям европейского регулирующего органа (ЕМЕА) для пневмококковых полисахарид-белковых конъюгатов, завершенность адсорбции (% свободного конъюгата) следует рассматривать как ключевой параметр контроля качества совместно с содержанием алюмокалиевых квасцов, стерильностью, идентичностью и содержанием свободного полисахарида. См. отчет об оценке для Synflorix 2009, процедура № ЕМЕА/Н/С/000973. ВОЗ рекомендует максимизировать адсорбцию для антигенов, осажденных алюмокалиевыми квасцами (например, дифтерийный и столбнячный анатоксин), где адсорбируется как минимум 80% антигенов в данных вакцинах.

Во время производства полисахарид-белкового конъюгата композиция может содержать скопления

частиц типа полисахарид-полисахарид, белок-белок или полисахарид-белок. Такие скопления частиц также наблюдаются в готовой продукции, что приводит к отбраковке от 4 до 10% заполненных флаконов полисахарид-белковой конъюгированной вакцины, что влияет на устойчивость и эффективность конъюгированной вакцины.

С учетом вышеуказанных ограничений в отношении агрегации и устойчивости полисахарида и его конъюгата остается явная необходимость в снижении агрегации и стабилизации полисахарида при последующей переработке до этапа конечной композиции при производстве противопневмококковой конъюгированной вакцины.

Сущность изобретения

Данное изобретение предлагает усовершенствование устойчивости вакцин, содержащих соль алюминия, и, в частности, способы минимизации агрегации и улучшения процентной адсорбции отдельных конъюгатов в поливалентных противопневмококковых полисахарид-белковых конъюгированных вакцинах. Авторы настоящего изобретения наблюдали, что совместная адсорбция полисахарид-белковых конъюгатов и применение соотношения полисахарида и белка более чем 1:1 приводит к

i) процентной адсорбции менее 55% для пневмококковых конъюгатов для серотипов 6А, 9V и 23F и
ii) процентной адсорбции от 80 до 90% для оставшихся конъюгатов серотипов, что не позволяет достигнуть полной адсорбции для отдельного конъюгата серотипа для заданной поливалентной противопневмококковой конъюгированной композиции.

Также наблюдалось, что композиция вакцины, подготовленной с использованием pH от 6,8 до 7,0, привела к агрегации приблизительно от 4 до 10% и меньшей адсорбции.

Настоящее изобретение относится к способу для подготовки композиции устойчивой поливалентной противопневмококковой полисахарид-белковой конъюгированной вакцины, показывающей оптимальную адсорбцию от 75 до 99% для каждого конъюгата, где в указанном способе агрегацию предотвращают за счет использования одного из нижеуказанного:

- a) индивидуальная или отдельная адсорбция для конъюгатов, которые в ином случае показывают относительно низкую адсорбцию при комбинированной адсорбции;
- b) буферная система гистидин-янтарная кислота вместе со смещением pH от нейтрального pH к кислотному pH;
- c) соотношение полисахарида и белка от 0,6 до 1,4; и/или
- d) использование шестилопачной турбинной мешалки Раштона в сосуде композиции.

Настоящее изобретение также раскрывает способ для подготовки полисахарид-белковых конъюгатов с улучшенной иммуногенностью и меньшим содержанием свободного полисахарида для пневмококковых полисахаридов, содержащих фосфодизфирную связь, в частности 19А, 19F, 6А и 6В. Указанный процесс конъюгации минимизирует распадаемость рассортированного по размеру полисахарида, опосредованную промежуточным продуктом цианилирующего агента, и предотвращает последующую агрегацию частиц полисахарид-полисахарид, стабилизируя таким образом неустойчивые полисахариды. Главное условие пониженной агрегации может быть приписано использованию рассортированного по размеру полисахарида в диапазоне 100-200 кДа и отношению полисахарида к CDAP (цианилирующий агент) в диапазоне (1):(0,8-1).

Иммуногенная композиция, подготовленная в соответствии с настоящим изобретением, предлагает пониженную агрегацию между частицами полисахарид-полисахарид и полисахарид-белковый конъюгат вместе с усовершенствованной устойчивостью и иммуногенностью.

Перечень фигур

Фиг. 1 - профиль ВЭЖХ-ИУ рассортированного по размеру 19А PnPs (178 кДа) до обработки диметиламинопиридином (DMAP);

фиг. 2 - профиль ВЭЖХ-ИУ рассортированного по размеру 19А PnPs (70 кДа) через 24 ч (А) и профили распада при обработке диметиламинопиридином 14,5 кДа через 72 ч (В);

фиг. 3 - профили ВЭЖХ-ИУ рассортированного по размеру 19А PnPs (178 кДа; А) и агрегация в зависимости от времени активированных посредством CDAP полисахаридов (3В, 3С и 3D), метод конъюгации без этапа диафильтрации 10 кДа 3Е (конъюгат без диафильтрации 10 кДа), 3F (конъюгат с диафильтрацией 10 кДа), 3G рассортированный по размеру 19А/3F1 активированный 19А (модифицированное соотношение Ps:CDAP 1:1 для 19А);

фиг. 4 - профили ВЭЖХ-ИУ рассортированного по размеру 19F PnPs (157 кДа; А) и агрегация в зависимости от времени активированных посредством CDAP полисахаридов (В), метод конъюгации без этапа диафильтрации 10 кДа 4С/4D (модифицированное соотношение Ps:CDAP 1:1 для 19F);

фиг. 5 - турбинная мешалка Раштона с шестью плоскими лопатками;

фиг. 6 - протокол адсорбции.

Раскрытие изобретения

Целью данного изобретения является обеспечение усовершенствования устойчивости вакцин, содержащих соль алюминия, и, в частности, способы минимизации агрегации и улучшения процентной адсорбции отдельных конъюгатов в поливалентных противопневмококковых полисахарид-белковых конъюгированных вакцинах.

Авторы настоящего изобретения наблюдали, что совместная адсорбция полисахарид-белковых конъюгатов и применение соотношения полисахарида и белка более чем 1:1 приводит к

i) процентной адсорбции менее 55% для пневмококковых конъюгатов для серотипов 6A, 9V и 23F и
ii) процентной адсорбции от 80 до 90% для оставшихся конъюгатов серотипов, что не позволяет достигнуть полной адсорбции для отдельного конъюгата серотипа для заданной поливалентной противопневмококковой конъюгированной композиции. Также наблюдалось, что композиция вакцины, подготовленной с использованием рН от 6,8 до 7,0, привела к агрегации приблизительно от 4 до 10% и меньшей адсорбции.

Полисахарид был культивирован способом, раскрытым в патенте WO 2013088448 A1, где указанный способ содержит

(a) обеспечение посевного материала штамма бактерий, экспрессирующих С-полисахарид;
(b) культивацию штамма посредством ферментации при рН 7,2, где скорость добавления исходной среды эквивалентна скорости добавления щелочной среды для поддержания заранее установленного рН;
с) ферментация питательной среды при 35-38°C с перемешиванием с частотой 50-150 об/мин и скоростью потока воздуха 0,1-0,5 об/об/мин.

Полисахарид был очищен при помощи процесса, раскрытого в патенте WO 2012127485. Pn-Ps, подготовленный при помощи такого процесса, показывает восстановление приблизительно от 60 до 70%, где загрязненность С-полисахарида снижается в 1-5 раз по сравнению с содержанием С-Ps после хроматографии с гидрофобным взаимодействием или до ионообменной хроматографии, загрязнение белка составляет менее 1%, и загрязнение нуклеиновой кислоты составляет менее 1%. Указанный процесс выполнялся на исследовательском, полупромышленном и промышленном уровне.

При помощи данного процесса очистка полисахарида может проводиться за меньшее на 80-90% время и с меньшими на 90% расходами, если сравнивать с методами, основанными на ЦТАБ/спирте.

Согласно одному важному варианту осуществления настоящего изобретения улучшенная процентная адсорбция от 75 до 95% может быть получена для конъюгатов пневмококка за счет

i) применения соотношения полисахарида и белка приблизительно от 0,8 до 1,4;
ii) применения индивидуальной или отдельной адсорбции для плохо адсорбирующихся конъюгатов пневмококка;
iii) поддержания низкого рН во время формирования композиции.

Согласно одному аспекту первого варианта осуществления изобретения предпочтительным соотношением полисахарида и белка является 1:1.

Согласно второму аспекту первого варианта осуществления изобретения указанная композиция содержит как минимум 2 полисахарид-белковых конъюгата с полисахаридом, отобранным из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9F, 9N, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F и 45.

Согласно третьему аспекту первого варианта осуществления индивидуальный режим адсорбции может быть применен к любому серотипу пневмококка, выбранному из 2, 3, 4, 6A, 8, 9V, 9F, 9N, 12F, 15B, 17F, 18C, 20, 22F, 23F, 33F и 45, предпочтительно для серотипов пневмококка 6A, 9V и 23F.

Согласно предпочтительному аспекту первого варианта осуществления изобретения поливалентная противопневмококковая конъюгированная вакцина является 10-валентной, когда серотипы пневмококка 6A, 9V и 23F индивидуально адсорбируют как отдельную смесь, а затем добавляют к другой смеси, состоящей из серотипов пневмококка 1, 5, 6B, 7F, 14, 19A и 19F, которые были адсорбированы в совместном режиме.

Согласно другому предпочтительному аспекту первого варианта осуществления изобретения поливалентная противопневмококковая конъюгированная вакцина является 11-, 13-, 15-, 16- и более валентной, тогда как минимум один серотип пневмококка, выбранный из группы 2, 3, 4, 6A, 8, 9V, 9F, 9N, 12F, 15B, 17F, 18C, 20, 22F, 23F, 33F и 45, индивидуально адсорбируют или адсорбируют в меньшей группе как отдельную смесь, а затем добавляют к другой смеси, состоящей из серотипов пневмококка 1, 5, 6B, 7F, 14, 19A и 19F, которые были адсорбированы в совместном режиме.

Согласно еще одному предпочтительному аспекту первого варианта осуществления изобретения поливалентная противопневмококковая конъюгированная вакцина является 16-валентной, когда как минимум один серотип пневмококка, выбранный из группы 2, 3, 4, 6A, 9V, 12F, 15B, 18C и 23F, индивидуально адсорбируют в меньшей группе как отдельную смесь, а затем добавляют к другой смеси, состоящей из серотипов пневмококка 1, 5, 6B, 7F, 14, 19A и 19F, которые были адсорбированы в совместном режиме.

Второй вариант осуществления настоящего изобретения состоит в том, что агрегацию композиции поливалентного противопневмококкового полисахарид-белкового конъюгата можно полностью предотвратить за счет

i) смещения рН от нейтрального рН к кислотному рН и
ii) использования буферной комбинации гистидин-янтарная кислота.

Согласно одному аспекту второго варианта осуществления указанное смещение может происходить с 6,8 к рН, выбранному из значений 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8 и 5,9, но не ограничивающемуся ими. Более предпочтительно с 6,8 к рН, выбранному из значений 5,4, 5,5, 5,6, 5,7 и 5,8.

Согласно другому аспекту второго варианта осуществления указанная буферная система гистидин-янтарная кислота может иметь концентрацию от 1 мМ до 200 М. Предпочтительная концентрация составляет как минимум 1 мМ (например, максимум 200 мМ, 150 мМ, 100 мМ, 90 мМ, 80 мМ, 70 мМ, 60 мМ, 50 мМ, 40 мМ, 30 мМ, 20 мМ, 10 мМ и т.д.). Более предпочтительно, чтобы концентрация буферной системы гистидин-янтарная кислота в композиции составляла от 10 до 40 мМ.

Третий вариант осуществления настоящего изобретения состоит в том, что флоккулы или агрегатное образование в общем объеме пневмококковых конъюгатов могут быть предотвращены за счет использования турбинных мешалок Раштона с плоскими лопатками вместо мешалок магнитного, осевого и радиального типа в сосудах композиции. Устойчивость иммуногенной композиции настоящего изобретения легко определяется при помощи стандартных техник, которые хорошо известны и являются стандартными для специалистов в данной области техники. Например, иммуногенная композиция подвергается анализу на процентную адсорбцию конъюгатов, устойчивость, агрегацию, иммуногенность, образование твердых частиц, потерю белка (концентрации) и т.п. посредством методов, содержащих, но не ограничивающихся, ИФА, рассеивание света, оптическую плотность, скоростное осаждение в центрифуге, равновесное осаждение в центрифуге, круговой дихроизм КД (CD), метод Лоури, анализ с бицинониновой кислотой БХК (BCA) и т.п. В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает новый метод иммуноферментного анализа ИФА (ELISA), который непосредственно определяет количество конъюгированного/связанного полисахарида, не влияя на антигенность конъюгатов в поливалентных противопневмококковых конъюгированных вакцинах. Тот же метод можно применять для определения количественного содержания неадсорбированного конъюгата в матрице композиции как идентифицирующего параметра для процентной адсорбции, где конъюгаты показывают адсорбцию более 70%.

Предпочтительно, чтобы в указанном методе ИФА мог применяться предварительный этап перед анализом, содержащий десорбцию конъюгата из адьюванта алюмокалиевых квасцов без влияния на антигенность белка-носителя, а также конъюгированного полисахарида. В частности, растворение образцов конъюгата, адсорбированных на алюмокалиевых квасцах, достигается с использованием гидроксида натрия и лимонной кислоты. Белок-носитель может быть выбран из группы, но не ограничивается ею, содержащей CRM₁₉₇, P4, дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин, фрагмент С столбнячного анатоксина, коклюшный анатоксин, белок D гемофильной палочки, термолabile энтеротоксины кишечной палочки, термостабильные энтеротоксины кишечной палочки и экзотоксин А синегнойной палочки, комплекс наружной мембраны С, порины, трансферринсвязывающие белки, пневмолизин, пневмококковый поверхностный белок А (PspA), пневмококковый поверхностный адгезин А (PsaA), белок PhtD, пневмококковые поверхностные белки BVH-3 и BVH-11, защищающий антиген 3А (РА) штамма сибирской язвы, детоксицированный фактор, вызывающий отек, летальный фактор сибирской язвы, яичный белок, гемоцианин лимфы улитки ГЛУ (KFH), человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин БСА (BSA) и сухой туберкулин, очищенный от белков среды (PPD), в частности, CRM₁₉₇ или P4.

В предпочтительном варианте осуществления указанная поливалентная композиция может содержать

- i) как минимум один полисахарид-белковый конъюгат, имеющий CRM₁₉₇ в качестве белка-носителя, как минимум один белок полисахарида с ТТ в качестве белка-носителя; или
- ii) как минимум один полисахарид-белковый конъюгат, имеющий CRM₁₉₇ в качестве белка-носителя, как минимум один белок полисахарида с DT в качестве белка-носителя; или
- iii) как минимум один полисахарид-белковый конъюгат, имеющий CRM₁₉₇ в качестве белка-носителя, как минимум один белок полисахарида с пневмококковым поверхностным белком А (PsaA) в качестве белка-носителя; или
- iv) как минимум один полисахарид-белковый конъюгат, имеющий CRM₁₉₇ в качестве белка-носителя, как минимум один белок полисахарида с ТТ в качестве белка-носителя, как минимум один белок полисахарида с DT в качестве белка-носителя; или
- v) как минимум один полисахарид-белковый конъюгат, имеющий CRM₁₉₇ в качестве белка-носителя, как минимум один белок полисахарида с ТТ в качестве белка-носителя, как минимум один белок полисахарида с пневмококковым поверхностным адгезином А (PsaA) в качестве белка-носителя; или
- vi) как минимум один полисахарид-белковый конъюгат, имеющий CRM₁₉₇ в качестве белка-носителя, как минимум один белок полисахарида с DT в качестве белка-носителя, как минимум один белок полисахарида с пневмококковым поверхностным адгезином А (PsaA) в качестве белка-носителя.

В другом варианте осуществления изобретения предпочтительный белок-носитель, конъюгированный в серотип 3, это CRM-197, серотип 4 - ТТ или DT и серотип 18С - CRM₁₉₇.

Другой вариант осуществления изобретения содержит использование PsaA в качестве белка-носителя в финальной композиции. PsaA также может быть использован в финальной композиции как адьювант.

В некоторых вариантах осуществления поливалентная композиция настоящего изобретения может содержать поверхностно-активное вещество, предпочтительно полисорбат 20. В некоторых вариантах

осуществления финальная концентрация полисорбата 20 в композиции составляет от 0,01 до 10% мас./об. композиции. В еще одних вариантах осуществления финальная концентрация полисорбата 20 в композиции составляет 0,01% мас./об. композиции. В других вариантах осуществления финальная концентрация полисорбата 20 в композиции составляет 0,05% мас./об. композиции. В еще одних вариантах осуществления финальная концентрация полисорбата 20 в композиции составляет 0,1% мас./об. композиции. В другом варианте осуществления финальная концентрация полисорбата 20 в композиции составляет 1,0% мас./об. композиции. В еще одном варианте осуществления финальная концентрация полисорбата 20 в композиции составляет 10,0% мас./об. композиции.

Композиции настоящей поливалентной вакцины могут содержать консерванты, выбранные из группы ртутьсодержащих консервантов (например, тимеросал), 2-феноксизанола, метилпарабенов, пропилпарабенов и бензилового спирта (или их смесей), но не ограничиваются ими.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанная композиция поливалентной противопневмококковой полисахарид-белок конъюгированной вакцины, предпочтительно 10- или 16-валентной, может содержать конъюгаты, адсорбированные на фосфате алюминия, гистидин, янтарную кислоту, хлорид натрия, полисорбат 20 и тиомерсал. Композиция вакцины настоящего изобретения может содержать этап добавления адьюванта соли алюминия в количестве 20-375 мкг, 20-300 мкг, 20-200 мкг, 25-150 мкг Al^{+++} на дозу 0,5 мл.

Обычно иммуногенные композиции подготавливаются для инъекций в виде жидких растворов или суспензий; также могут быть приготовлены в твердых формах для растворения или суспендирования в жидких связующих перед введением. Препарат также может быть эмульгирован или помещен в липосомы для усиленного адьювантного эффекта. Непосредственное введение композиции обычно осуществляется парентерально (например, посредством инъекции, подкожно, интраперитонеально, внутривенно или внутримышечно, или вводится в интерстициальное пространство ткани). Композиции также можно наносить на пораженный участок. Прочие способы ввода содержат пероральный и ингаляционный прием, суппозитории, трансдермальное или транскутанное введение иглой, а также безыгольными шприцами. Дозировка может осуществляться по схеме введения однократной дозы или схеме введения многократных доз (например, включая бустерные дозы). Предпочтительно, чтобы вакцины настоящего изобретения могли храниться в растворе или лиофилизированными, где лиофилизованная композиция вакцины настоящего изобретения может быть представлена как препарат на 1, 5 или 10 доз с разбавителем, содержащим гель фосфата алюминия и NaCl.

Другой вариант осуществления изобретения содержит использование турбинной мешалки Раштона с плоскими лопатками в сосуде композиции (см. фиг. 5).

Примеры

Пример 1. Ферментация.

Способ содержит:

- (a) обеспечение посевного материала штамма бактерий, экспрессирующих С-полисахарид;
- (b) культивацию штамма посредством ферментации при pH 7,2, где скорость добавления исходной среды эквивалентна скорости добавления щелочной среды для поддержания заранее установленного pH;
- (c) ферментация питательной среды при 35-38°C с перемешиванием с частотой 50-150 об/мин и скоростью потока воздуха 0-0,5 об/об/мин.

Пример 2. Очистка капсульного полисахарида.

Очистка капсульного полисахарида пневмококка серотип 19F (ионообменная хроматография после хроматографии с гидрофобным взаимодействием).

Очищенный бульон 5L из ферментированных культур пневмококка серотипа 19F был концентрирован и подвергнут диафильтрации до 500 мл с использованием мембраны с НОММ 100 кДа.

Диафильтрация осуществлялась с использованием 25 мМ натрий-фосфатного буфера с нейтральным pH, а затем проводилась диафильтрация с водой для инъекций ВДИ (WFI). Нуклеаза была добавлена к раствору полисахарида для достижения финальной концентрации раствора 8 ед/мл. Ферментативная обработка проводилась при 370°C, в течение 10 ± 2 ч с перемешиванием.

Сульфат аммония был добавлен к раствору полисахарида с нуклеазой до насыщенности 50% и выдерживался при 2-8°C в течение 12 ± 2 ч (за исключением серотипов 5 и 4). Смесь подвергалась центрифугированию. Осадок в пробирке (выделившаяся фаза) был удален. Раствор (~500 мл) подвергается диафильтрации 100 кДа с использованием NaCl, а затем охлажденной ВДИ. Данный раствор, подвергнутый диафильтрации, содержащий полисахарид с буфером и высокой концентрацией соли, был загружен в колонку для хроматографии с гидрофобным взаимодействием.

Колонка для хроматографии с гидрофобным взаимодействием (300 мл) была кондиционирована с сульфатно-аммониевым буфером 50% насыщенности, и затем раствор полисахарида (500 мл) был помещен в колонку с pH от 6 до 8, предпочтительно от 6 до 7. Затем колонка была промыта буфером, содержащим сульфат аммония 50% насыщенности. При этих условиях полисахарид был восстановлен при проточной и кондиционирующей промывке из колонки.

Затем раствор полисахарида был концентрирован с использованием фильтра с НОММ 100 кДа, а

затем подвергнут диафильтрации с использованием NaCl и воды для инъекций (ВДИ). Колонка для ионообменной хроматографии (300 мл) (сильноосновный анионит) была кондиционирована с 20 mM натрий-фосфатного буфера, и затем раствор полисахарида (500 мл) был помещен в колонку с pH от 6 до 8, предпочтительно от 6,5 до 7,5. Затем колонка была промыта буфером. Адсорбированные полисахариды были извлечены из адсорбента посредством поэтапного градиентного элюирования с использованием 1,0M NaCl (различные полисахариды были извлечены из адсорбента при различной ионной силе NaCl).

Затем раствор полисахарида был концентрирован с использованием фильтра с НОММ 100 кДа, а затем подвергнут диафильтрации с использованием воды для инъекций (ВДИ). Раствор полисахарида, подвергнутый диафильтрации, был пропущен через мембранный фильтр 0,22 мкм в полипропиленовые бутылки. Очищенный полисахарид хранился в замороженном состоянии при температуре (-20)+50°C.

Описанный выше процесс также применялся для серотипов 4, 6А, 6В, 7F, 9V, 10А, 14, 18С, 19А, 19F и 23F.

Результаты.

Оценка результатов С-полисахарида после хроматографии с гидрофобным взаимодействием и после ионообменной хроматографии проводилась по методу ЯМР-спектра H1/P31. Результатом процесса стало снижение содержания загрязнений в 2-3 раза.

Пример 3. Рассортированные по размеру полисахариды.

Гомогенизирующее (микроструйное) устройство было использовано для снижения молекулярной массы полисахарида перед этапом активации. Для 19А уменьшение размера было выполнено при 24-28 кфунтах/кв.дюйм, при этом уменьшение размера для 19F осуществлялось при 26-30 кфунтах/кв.дюйм, где количество проходов составляло от 1 до 3. Рассортированный по размеру полисахарид подвергался диафильтрации и концентрации, а затем фильтрации через фильтр 0,22 мкм. Затем рассортированный по размеру полисахарид подвергался ВЭЖХ-ИУ для оценки средней молекулярной массы.

Пример 4. Обычный процесс конъюгации.

Конъюгация полисахарида с белком-носителем осуществлялась с применением способа конъюгации CDAP Лиса и соавт. (Вакцина 26: 190-198, 1996). Полисахариды с механически уменьшенным размером (за исключением 6А, который был использован в нативной форме или рассортирован в зависимости от размера 6А) были растворены в 2M NaCl. CDAP (в ацетонитриле) из маточного раствора 100 мг/мл был добавлен в раствор полисахарида в соответствии с соотношением полисахарид:CDAP.

Приблизительно через 1 мин было добавлено 2M NaOH для получения определенного активационного pH. Активация полисахарида осуществлялась с этим pH в течение 4-10 мин при температуре 22°C. CRM-197 (количество зависит от исходного соотношения Ps/белок) был добавлен к активированному полисахариду, и реакция сочетания выполнялась при определенном pH в течение 3-8 ч в зависимости от серотипа. Затем осуществлялась остановка реакции при помощи глицина в течение 1 ч при 220°C и на протяжении ночи при 120°C. Конъюгаты затем были очищены посредством диафильтрации от 300 кДа до 500 кДа, а затем диафильтрацией 100 кДа. Затем было определено содержание полисахарида и белка в очищенных конъюгатах, прошедших через фильтр 0,22 мкм.

Таблица 1

Варианты параметров реакции конъюгации в зависимости от серотипа для 10 серотипов

Параметры конъюгации для 10 серотипов										
Характеристики	Условия процесса для различных серотипов									
	1	5	6А	6В	7F	9V	14	19А	19F	23F
Конц. Ps (мг/мл)	4,5	5	5	11	10	8	10	9,5	9,5	9
Растворение Ps	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl
Время активации (мин.)	4	4	4	4	4	4	4	4	10	4
Соотношение Ps/CDAP	1:1,2 5	1:1	1:1	1:1,15	1:1,2 5	1:1,2	1:1,1	1:1	1:0,8	1:1,1
Конц. CRM 197 (мг/мл)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Соотношение Ps/CRM	0,82	0,75	1,05	0,77	0,85	0,87	0,82	0,86	0,96	0,71
pH ^a :pH ^b :pH ^c	9,5:9,5:9,5	9,5:9,5:9,5	9,5:9,5:9,5	9,5:9,5:9,5	9,5:9,5:9,5	9,5:9,5:9,5	9,5:9,5:9,5	09:09:09	9,5:9,5:9,5	9,5:9,5:9,5
Свободный Ps (%)	< 1	6,3	2,63	1,57	< 1	НЕ ОБНАРУЖЕНО	2,53	1,5	1,07	2,59
Свободный белок (%)	НЕ ОБНАРУЖЕНО	1,54	2,2	НЕ ОБНАРУЖЕНО	2,2	НЕ ОБНАРУЖЕНО				
Распределение размера молекул (%)	70,56	74,93	67,67	76,52	75,68	72,75	76,59	78,1	74,35	72,91

Таблица 2

Сравнение процентной адсорбции отдельных серотипов композиций ПКВ-10 при подходе к процессу разработки композиции с одной и двумя смесями

№	Серотипы композиций ПКВ-10	Подход с одной смесью (все антигены вместе) % адсорбции			Подход с двумя смесями (смеси А и В)		
		Эксп. - 1	Эксп. - 2	Эксп. - 3	Эксп. - 4	Эксп. - 5	Эксп. - 6
1	Серотип 1	90	85	92	>99	>99	97
2	Серотип 5	84	82	85	90	88	97
3	Серотип 6А	67	51	61	77	71	93
4	Серотип 6В	82	72	83	84	80	86
5	Серотип 7F	83	77	81	87	86	84
6	Серотип 9V	67	43	74	89	85	85
7	Серотип 14	86	83	88	92	91	90
8	Серотип	95	92	97	95	93	85
9	Серотип 19F	91	87	93	91	88	75
10	Серотип 23F	56	52	58	84	81	81

При подходе с одной смесью серотипы 6А, 9V и 23F плохо адсорбировались в композиции, при этом при подходе с двумя смесями процентная адсорбция составляла >70% для всех серотипов.

Таблица 3

Влияние смещения pH на агрегацию композиций ПКВ-10

№	Композиция Описание	% отбраковки флаконов, связанной с агрегацией (белые частицы/флоккулы)		
		Эксперимент - 7	Эксперимент - 8	Эксперимент 9
1	ПКВ-10 Лекарственные формы без «смещения pH»	10%	4%	6%
2	ПКВ-10 Композиции со «смещением pH» от pH 6,8 к pH 5,6-5,8	Эксперимент-10	Эксперимент-11	Эксперимент-12
		Без агрегации (без отбраковки при проверке)	Без агрегации (без отбраковки при проверке)	Без агрегации (без отбраковки при проверке)

Агрегация не была обнаружена при pH 5,6-5,8 для композиции ПКВ-10 по сравнению с pH 6,8.

Было обнаружено, что соотношение полисахарида и белка (1:1) имеет благоприятное влияние на продолжительность адсорбции пневмококкового конъюгата в композиции.

Таблица 4

Влияние соотношения Ps и CRM₁₉₇ на адсорбцию пневмококкового конъюгата (серотип 6А) в композиции

№	Пневмококковый конъюгат серотип 6А общий объем	Соотношение Ps и белка	Адсорбция (%)
1	ZPN6ACP1201	1,95	34
2	ZPN6ACP1203	1,51	42
3	ZPN6ACP1204-A	1,32	87
4	ZPN6ACP1204-B	1,15	95
5	ZPN6ACP1205	1,09	86

Влияние соотношения полисахарида и белка наблюдалось при адсорбции конъюгатов. Конъюгаты 6А с соотношением Ps и белка >1,5 показывали плохую адсорбцию. Большинство серотипов, использованных в композиции ПКВ-10, имели соотношение Ps:Pr в диапазоне 0,6-1,3, что привело к оптимальной адсорбции различных серотипов, включая серотип 6А. На основе данных адсорбции, полученных для серотипа 6А, и опыта получения композиции ПКВ-10 при разработке композиции 16-валентной вакцины можно экстраполировать, что соотношение Ps:Pr оставшихся 6 конъюгатов в аналогичном диапазоне может обеспечить соответствующую адсорбцию конъюгатов всех 16 серотипов.

Технические условия турбинной мешалки Раштона с плоскими лопатками для различных сосудов

Геометрический объем (л)	14
Рабочий объем (л)	10,0
Диаметр лопатки (мм)	74,7
Высота лопатки (мм)	17,3
Количество лопаток	6
Управление перемешиванием (об/мин)	50-500
Окружная скорость (м/с)	0,19-1,95

Пример 6. Протокол ИФА.

Содержание антигена и процентная адсорбция были определены при помощи модифицированного сэндвич-ИФА.

Обычный сэндвич-ИФА был изменен в отношении следующих условий испытаний/анализа и поэтому имеет следующие преимущества:

- i) определение количества конъюгированного полисахарида в присутствии 9 других конъюгированных антигенов в 10-валентной вакцине,
- ii) извлечение всех десяти конъюгатов из геля фосфата алюминия, где адсорбция составляет более 80%,
- iii) получение конъюгата происходит даже при pH 9 без ущерба для антигенности конъюгата.

Содержание антигена и процентная адсорбция были определены при помощи ИФА в соответствии с протоколом ниже.

День 1.

1. Планшеты были покрыты иммобилизованным антителом (антитело против белка-носителя), а затем выдерживались в течение 0,5-2 ч при $35\pm 5^\circ\text{C}$.

2. Планшеты были вымыты 3-6 раз в устройстве для мойки планшетов.

3. Планшеты были заблокированы при помощи блокирующего буфера (3% БСА в 1X ФСБР и трис-буфер для серотипов 14 и 9V), а затем выдерживались в течение 1,5-2,5 ч при $30\pm 5^\circ\text{C}$.

4. Планшеты были вымыты 3 раза в устройстве для мойки планшетов.

5. Образцы были добавлены в планшеты.

6. Планшеты выдерживались в течение ночи при $5\pm 3^\circ\text{C}$.

День 2.

1. Планшеты поместили в условия комнатной температуры.

2. Сначала антитело добавили после трехкратного мытья планшетов, последующего выдерживания при комнатной температуре $25\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 30 мин и последующего мытья.

3. Затем добавили антитело и выдерживали при температуре $25\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 30 мин.

4. Добавили ТМБ субстрат и выдерживали при комнатной температуре в течение 15-20 мин в темноте.

5. Был добавлен стоп-реагент.

6. Считывание планшетов осуществлялось при 450 нм.

Процедура растворения образца без ущерба для антигенной детерминанты белка-носителя.

Надлежащее количество 0,5-2M NaOH было добавлено к 2 мл образца вакцины. Указанный образец был подвергнут аккуратному перемешиванию вихревым способом до тех пор, пока раствор не стал прозрачным. pH раствора регулировали с 9-12 до тех пор, пока раствор не стал прозрачным. pH раствора вернули обратно к 6-7,4 при помощи 0,5-2M лимонной кислоты. Указанный раствор подвергли центрифугированию (растворенные образцы) при 3000-6000g в течение 5 мин, и надосадочная жидкость была собрана для испытаний.

Таблица 6

Серотип	Серия 1		Серия 2	
	Содержание в мкг/мл	% адсорбции	Содержание в мкг/мл	% адсорбции
Серотип 1	3,87	89	4,66	99,4
Серотип 5	3,57	83	4,03	90,8
Серотип 6А	3,39	83	4,6	68,3
Серотип 6В	8,01	80	6,8	85
Серотип 7F	4,72	97	4,18	84,4
Серотип 9V	4,61	80	3,95	70,4
Серотип 14	5,11	94	5,06	92,5
Серотип 19А	4,42	94	3,65	91,8
Серотип 19F	4,35	82	4,14	81,4
Серотип 23F	3,66	72	4,03	75

Пример 7. Пневмококковая конъюгированная вакцина - 10-валентная (ПКВ-10).

Таблица 7

Состав ПКВ-10

№	Наименование ингредиента	Количество/доза (0,5 мл)
1	Серотип полисахарида 1, 5, 6А, 7F, 9V, 14, 19А, 19F и 23F*	2 мкг каждый
2	Серотип полисахарида 6В*	4 мкг
3	Фосфат алюминия Adju-Phos®	0,125 мг как Al ⁺⁺⁺
4	Хлорид натрия	4,5 мг
5	Янтарная кислота	1,18 мг
6	Полисорбат-20	50 мкг
7	Тиомерсал (только для многодозового представления)	25 мкг
8	L-гистидин	1,55 мг

Действующие вещества конъюгируются с белком-носителем CRM₁₉₇.

Пример 8. Композиция 1 (ПКВ-16).

Пневмококковая конъюгированная вакцина - 16-валентная (ПКВ-16).

Состав "I" ПКВ-16

№	Композиции	Количество/доза
Действующие вещества*		
1	Серотип 1	2,0 мкг
2	Серотип 2	2,0 мкг
3	Серотип 3	2,0 мкг
4	Серотип 4	2,0 мкг
5	Серотип 5	2,0 мкг
6	Серотип 6А	2,0 мкг
7	Серотип 6В	4,0 мкг
8	Серотип 7F	2,0 мкг
9	Серотип 9V	2,0 мкг
10	Серотип 12F	2,0 мкг
11	Серотип 14	2,0 мкг
12	Серотип 15В	2,0 мкг
13	Серотип 18С	2,0 мкг
14	Серотип 19А	2,0 мкг
15	Серотип 19F	2,0 мкг
16	Серотип 23F	2,0 мкг
Вспомогательные вещества*		
17	Фосфат алюминия	не более 1,25 мг Al ³⁺
18	Гистидин	1,55 мг
19	Белки-носители	11,3-113,3 мкг
20	Янтарная кислота	1,18 мг
21	Хлорид натрия	4,5 мг
22	Полисорбат 20	50 мкг
23	Тиомерсал**	25 мкг
24	ВДИ	по необходимости

*Действующие вещества вакцины конъюгированы с как минимум одним белком-носителем, выбранным из CRM₁₉₇, TT и DT.

** Добавляется только при многодозовом представлении.

Пример 9. Композиция 1 (ПКВ-16).

Таблица 9

Состав "II" ПКВ-16

№	Композиции	Количество/доза
Действующие вещества*		
1	Серотип 1	2,0 мкг
2	Серотип 2	2,0 мкг
3	Серотип 3	2,0 мкг
4	Серотип 4	2,0 мкг
5	Серотип 5	2,0 мкг
6	Серотип 6А	2,0 мкг
7	Серотип 6В	4,0 мкг
8	Серотип 7F	2,0 мкг
9	Серотип 9V	2,0 мкг

10	Серотип 12F	2,0 мкг
11	Серотип 14	2,0 мкг
12	Серотип 15B	2,0 мкг
13	Серотип 18C	2,0 мкг
14	Серотип 19A	2,0 мкг
15	Серотип 19F	2,0 мкг
16	Серотип 23F	2,0 мкг
Вспомогательные вещества*		
17	Фосфат алюминия	не более 1,25 мг Al ³⁺
18	Гистидин	1,55 мг
19	Белки-носители	11,3-113,3 мкг
20	Янтарная кислота	1,18 мг
21	Хлорид натрия	4,5 мг
22	Полисорбат 20	50 мкг
23	2-феноксизтанол**	10 мг
24	ВДИ	

*Действующие вещества вакцины конъюгированы с как минимум одним белком-носителем, выбранным из CRM₁₉₇, TT и DT.

**Добавляется только при многодозовом представлении.

Пример 10.

I) Распад рассортированного по размеру PnPs (19A, 19F, 6A и 6B) в присутствии диметиламинопиридина.

Рассортированный по размеру PnPs в реакционном растворе был обработан при помощи диметиламинопиридина в соотношении 1:1,5, и его профиль распада был подвергнут проверке посредством ВЭЖХ-ИУ.

Результаты.

Наблюдалось, что только 19A PnPs распадается в присутствии диметиламинопиридина, в то время как другие PnPs, содержащие фосфодиэфир (19F, 6A и 6B), остаются неизменными. См. фиг. 1 (без диметиламинопиридина) и 2, где показан распад PnPs, опосредованный диметиламинопиридином.

Для минимизации такого распада 19A активированный PnPs был подвергнут диафильтрации 10 кДа с использованием 2M NaCl для удаления диметиламинопиридина, образовавшегося из реакционного раствора, перед конъюгацией с CRM₁₉₇.

II) Распад и агрегация рассортированного по размеру PnPs (19A, 19F, 6A и 6B) в присутствии CDAP.

Рассортированный по размеру PnPs в реакционном растворе был обработан при помощи CDAP в соотношении 1:1,5 во время активации. Наблюдалось, что 50% диметиламинопиридин создается как промежуточный продукт (измеренный ОФ-ВЭЖХ), что приводит к распаду PnPs, а также агрегации между активированным PnPs после определенного времени активации (см. табл. 2). Распад и агрегация были проверены посредством профиля ВЭЖХ-ИУ. См. фиг. 3A (без CDAP), 3B, 3C и 3D (для 19A) и 4A (без CDAP) 4B (для 19F), где показана агрегация посредством CDAP и распад PnPs.

Факторы, ответственные за перекрестное связывание и агрегацию частиц полисахарид-полисахарид.
Влияние "продолжительности активации CDAP" на формирование "агрегаций полисахарид-полисахарид"

Серотипы	Молекулярная масса рассортированного по размеру / модифицированного PnPs (кДа) [ВЭЖХ- ИУ]	Активированный модифицированный PnPs (кДа) [ВЭЖХ- ИУ]	Эффекты
6A	432	435	Без агрегации между активированными полисахаридами
6B	131	131	Без агрегации между активированными полисахаридами
19A	178	254 (через 20 мин)	Агрегация между активированными полисахаридами
		487 (через 60 мин)	Агрегация между активированными полисахаридами
		1173 (через 120 мин)	Агрегация между активированными полисахаридами
19F	157	205 (через 30 мин)	Агрегация между активированными полисахаридами

III) Предотвращение распада и агрегации рассортированного по размеру PnPs (19A и 19F) с соотношением PnPs:CDAP, равным 1:1,5, посредством применения этапа диафильтрации.

Для минимизации такого распада и агрегации 19A активированный PnPs был подвергнут диафильтрации 10 кДа с использованием 2M NaCl для удаления диметиламинопиридина, образовавшегося из реакционного раствора, перед конъюгацией с CRM₁₉₇. См. фиг. 3E (конъюгат без диафильтрации 10 кДа) и 3F (конъюгат с диафильтрацией 10 кДа), где показан профиль ВЭЖХ-ИУ конъюгата с использованием 10 кДа прошедших диафильтрацию и активацию PnPs и CRM₁₉₇. Однако этап диафильтрации негативно влиял на выход конъюгата, что приводило к снижению общего выхода на 30-40%.

IV) Предотвращение распада и агрегации рассортированного по размеру PnPs (19A и 19F) за счет снижения соотношения PnPs:CDAP до 1:1 (19A) и 1:0,8 (19F) без применения этапа диафильтрации.

Рассортированный по размеру PnPs в реакционном растворе был обработан при помощи CDAP в соотношении 1:1 и 1:0,8 для 19A и 19A соответственно, и его профиль распада и агрегации был подвергнут проверке посредством ВЭЖХ-ИУ.

Результаты.

Наблюдалось, что измененные соотношения Ps:CDAP (1:1 для 19A и 1:0,8 для 19F) предотвращают распад и агрегацию и для PnPs 19A, и для PnPs 19F. См. фиг. 3 (G и H для 19A) и 4 (C и D для 19F). Дополнительным преимуществом применения измененных соотношений было то, что исключался этап диафильтрации 10 кДа, что обеспечивало минимальные потери общего выхода.

Наблюдалось, что в случае серотипа 19A, когда "продолжительность активации CDAP" составляла более 10 мин, это приводило к перекрестному связыванию активированного полисахарида с активированным полисахаридом, неизбежно приводя к образованию "агрегаций полисахарид-полисахарид".

Кроме того, в случае серотипа 19F, когда "продолжительность активации CDAP" составляла более 20 мин, это приводило к перекрестному связыванию активированного полисахарида с активированным полисахаридом, неизбежно приводя к образованию "агрегаций полисахарид-полисахарид". Кроме того, было обнаружено, что продолжительность реакции конъюгации больше продолжительности, требуемой для перекрестного связывания активированного полисахарида, что, таким образом, приводит к образованию агрегаций. См. фиг. 3 и 4.

Однако для других серотипов, таких как 6APnPs и 6BPnPs, такое перекрестное связывание не наблюдалось.

Пример 11. Подготовка конъюгатов PnPs19A и PnPs19F.

Конъюгация полисахарида с белком-носителем осуществлялась с применением способа конъюгации CDAP Лиса и соавт. (Вакцина 26: 190-198, 1996) со следующими изменениями:

i) для подготовки конъюгата 19A с применением соотношения полисахарида и CDAP, равного 1:1, при температуре 22°C с периодом активации 4 мин и применением соотношения полисахарида и белка, равного 1:1,

ii) для подготовки конъюгата 19F с применением соотношения полисахарида и CDAP, равного 1:0,8, при температуре 22°C с периодом активации 9-10 мин и применением соотношения полисахарида и белка, равного 1:1, для 19F.

Сравнение результатов конъюгатов для 19А и 19F с "традиционным способом конъюгации CDAP" (лот 1) "усовершенствованный способ конъюгации" (лот 2)

I) Параметры реакции конъюгации				
Конъюгаты	Конъюгат 19А		Конъюгат 19F	
Номер серии	Лот 1	<i>Лот 2</i>	Лот 1	<i>Лот 2</i>
Конц. PnPs (мг/мл)	9,5	9,5	9,5	9,5
Растворение PnPs	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl
Время активации (мин)	4	4	4	от 9 до 10
Соотношение PnPs/CDAP	1,0:1,5	1,0:1,0	1,0:1,5	1,0:0,8
Конц. CRM (мг/мл)	20	20	20	20
Начальное соотношение Ps/CRM₁₉₇	1,0:1,5	1,0:1,0	1,0:1,5	1,0:1,0
pH^а:pH^с:pH^д	9,0:9,0:9,0	9,0:9,0:9,0	9,5:9,5:9,5	9,5:9,5:9,5
II) Финальные характеристики конъюгата				
Конъюгаты	Конъюгат 19А		Конъюгат 19F	
Номер серии	Лот 1	<i>Лот 2</i>	Лот 1	<i>Лот 2</i>
Финальное соотношение PnPs/CRM₁₉₇	0,53	0,86	0,52	0,96
CRM₁₉₇/PnPs	1,88	1,16	1,92	1,04
Свободный PnPs (%)	1,9	1,5	1,7	1,07
Свободный CRM₁₉₇ (%)	НЕ ОБНАРУЖЕНО	НЕ ОБНАРУЖЕНО	НЕ ОБНАРУЖЕНО	2,2
Ср. размер молекул ВЭЖХ-I(кДа)	1081	853	994	847
Ср. размер молекул (УФ/ИУ/MALS) (кДа)	8212	6012	6393	4773

Результаты.

Наблюдалось, что измененные соотношение полисахарид:CDAP, время активации CDAP и начальное соотношение полисахарид:белок минимизируют распад рассортированного по размеру полисахарида, опосредованный 4-диметиламинопиридином, во время активации, а также предотвращают последующую агрегацию полисахарид-полисахарид, улучшая таким образом финальные характеристики конъюгата в отношении содержания свободного полисахарида.

Усовершенствованный способ конъюгации, использованный для подготовки конъюгатов 19А и 19F, привел к получению конъюгатов, не показывавших сигнал фосфомоноэфира в соответствующих профилях конъюгата (протонный ЯМР на ядрах ³¹P), что показывало, что измененный способ конъюгации является эффективным для предотвращения гидролиза полисахаридов в реакциях конъюгации.

Принимая во внимание множество возможных вариантов осуществления изобретения, к которым могут быть применены принципы раскрытого изобретения, следует признать, что показанные варианты осуществления являются только предпочтительными примерами изобретения и не несут ограничительного характера для изобретения. Скорее объем притязаний изобретения определяется следующими пунктами формулы изобретения. Таким образом, мы заявляем как наше изобретение все, что входит в объем и сущность данной формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения устойчивой поливалентной вакцинной композиции с полисахарид-белковым конъюгатом *Streptococcus pneumoniae*, которая включает по меньшей мере 10 различных конъюгатов полисахарид-белков *Streptococcus pneumoniae*, включающий следующие этапы:

i) конъюгирование противопневмококкового полисахарида, полученного из *Streptococcus pneumoniae*, с белком носителем в соотношении от 0,5 до 1,4 и при pH от 5,2 до 5,9 с получением цианат-активированного полисахарида;

ii) индивидуальная адсорбция полисахарид-белковых конъюгатов, полученных на этапе (i), включающих серотипы 6A, 9V и 23F на первом адьюванте - соли алюминия в буфере гистидин-янтарная кислота с концентрацией от 1 до 200 мМ и при pH от 5,6 до 5,8, в котором количество указанного адьюванта соли алюминия находится в диапазоне 20-375 мкг Al^{+++} на дозу 0,5 мл финальной композиции вакцины;

iii) смешивание и адсорбция полисахарид-белковых конъюгатов, полученных на этапе (i), включая серотипы, выбранные из 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F и 22F на втором адьюванте - соли алюминия в буфере гистидин-янтарная кислота с концентрацией от 1 до 200 мМ и при pH от 5,6 до 5,8, в котором количество указанного адьюванта соли - алюминия находится в диапазоне 20-375 мкг Al^{+++} на дозу 0,5 мл финальной композиции вакцины; и

iv) смешивание указанного первого адсорбированного набора, полученного на этапе (ii), с указанным вторым адсорбированным набором в присутствии поверхностно-активного вещества, при помощи турбинной мешалки Раштона с плоскими лопатками для получения устойчивой поливалентной вакцинной композиции с полисахарид-белковым конъюгатом *Streptococcus pneumoniae*,

причем белок-носитель выбран из группы, включающей CRM₁₉₇, анатоксин столбняка (TT) и анатоксин дифтерии (DT), полисахарид-белковые конъюгаты *Streptococcus pneumoniae* получают с использованием химии конъюгации цианилирования, при этом диапазон адсорбции составляет 75-99%, что измеряется методом иммуоферментного анализа ИФА (ELISA), и композиция показывает оптимальную адсорбцию для каждого конъюгата и минимальную агрегацию конъюгатов.

2. Способ по п.1, в котором этап (i) включает следующие подэтапы:

i) взаимодействие пневмококкового полисахарида, содержащего фосфодиэфирную связь между повторяющимися звеньями, имеющими средний размер от 130 до 190 кДа, ковалентно связанных с белком-носителем, с цианилирующим агентом в соотношении от 1:0,8 до 1:1 при температуре от 22 до 25°C в течение от 4 до 10 мин с получением цианат-активированного полисахарида;

ii) реакция цианат-активированного полисахарида с белком в соотношении 1:1 при pH от 9 до 9,5 в течение от 3 до 5 ч с последующей остановкой реакции при помощи глицина.

3. Способ по п.2, в котором полисахарид, содержащий фосфодиэфирную связь между повторяющимися звеньями, получают из одного из *Streptococcus pneumoniae* серотипа 19A, 19F, 6A или 6B.

4. Способ по п.3, в котором полисахаридом является полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 19A, а цианилирующим агентом является 1-циано-4-диметиламинопиридин-тетрафторборат, смешанные в соотношении 1:1 при температуре 22°C в течение 4 мин, с получением цианат-активированного полисахарида.

5. Способ по п.3, в котором полисахаридом является полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 19F, а цианилирующим агентом является 1-циано-4-диметиламинопиридин-тетрафторборат, смешанные в соотношении 1:0,8 при температуре 22°C в течение 8-10 мин, с получением цианат-активированного полисахарида.

6. Способ по п.1, в котором указанный буфер гистидин-янтарная кислота имеет концентрацию от 10 до 40 мМ.

7. Устойчивая поливалентная вакцинная композиция с полисахарид-белковым конъюгатом *Streptococcus pneumoniae*, полученная способом по пп.1-6, включающая по меньшей мере 10 различных конъюгатов полисахарид-белков *Streptococcus pneumoniae*, имеющих полисахарид, выбранный из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F и 23F, причем по меньшей мере один полисахарид-белковый конъюгат имеет CRM₁₉₇ в качестве белка-носителя, по меньшей мере один полисахарид-белковый конъюгат имеет анатоксин столбняка (TT) в качестве белка-носителя, и по меньшей мере один полисахарид-белковый конъюгат имеет анатоксин дифтерии (DT) в качестве белка-носителя, причем серотипы 6A, 9V и 23F индивидуально адсорбированы на алюминиевом адьюванте, серотипы, выбранные из 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F и 22F, смешаны и адсорбированы на алюминиевом адьюванте, и адсорбция находится в диапазоне 75-99%, при этом композиция имеет буфер гистидин-янтарная кислота в концентрации от 10 до 40 мМ.

8. Композиция по п.7, в которой серотип 3 конъюгирован с CRM₁₉₇, серотип 18C конъюгирован с CRM₁₉₇, серотип 4 конъюгирован с DT, серотип 15B конъюгирован с TT, и серотип 22F конъюгирован с TT.

9. Композиция по п.7, содержащая 10 различных полисахарид-белковых конъюгатов *Streptococcus pneumoniae*, имеющих полисахарид из серотипов 1, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 19A, 19F и 23F, которые конъю-

гированы с CRM₁₉₇ в качестве белка-носителя, причем серотипы 6A, 9V и 23F индивидуально адсорбированы на алюминиевом адьюванте, серотипы, выбранные из 1, 5, 6B, 7F, 14, 19A и 19F, смешаны и адсорбированы на алюминиевом адьюванте, и адсорбция находится в диапазоне 75-99%, при этом указанная композиция имеет буфер гистидин-янтарная кислота в концентрации от 10 до 40 мМ.

10. Композиция по п.7, содержащая 16 различных полисахарид-белковых конъюгатов Streptococcus pneumoniae, имеющих полисахарид из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F и 23F, причем серотип 3 конъюгирован с CRM₁₉₇, серотип 18C конъюгирован с CRM₁₉₇, серотип 4 конъюгирован с DT, а серотип 15B конъюгирован с TT, причем серотипы 6A, 9V и 23F индивидуально адсорбированы на алюминиевом адьюванте, серотипы, выбранные из 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 12F, 14, 15B, 18C, 19A и 19F, смешаны и адсорбированы на алюминиевом адьюванте, и адсорбция находится в диапазоне 75-99%, при этом указанная композиция имеет буфер гистидин-янтарная кислота в концентрации от 10 до 40 мМ.

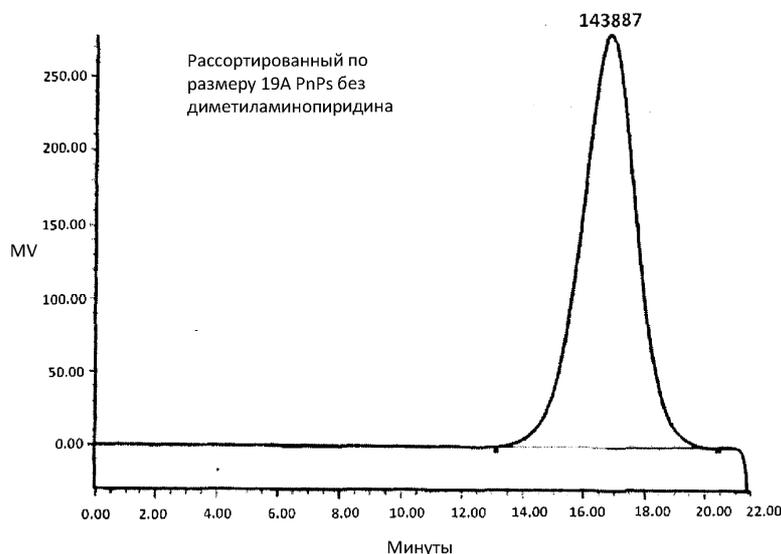
11. Композиция по п.7, содержащая 17 различных полисахарид-белковых конъюгатов Streptococcus pneumoniae, имеющих полисахарид из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F и 23F, причем серотип 3 конъюгирован с CRM₁₉₇, серотип 18C конъюгирован с CRM₁₉₇, серотип 4 конъюгирован с DT, серотип 15B конъюгирован с TT, и серотип 22F конъюгирован с TT, причем серотипы 6A, 9V и 23F индивидуально адсорбированы на алюминиевом адьюванте, и серотипы, выбранные из 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F и 22F, смешаны и адсорбированы на алюминиевом адьюванте, и адсорбция находится в диапазоне 75-99%, при этом указанная композиция имеет буфер гистидин-янтарная кислота в концентрации от 10 до 40 мМ.

12. Композиция по любому из пп.7-11, существующая в лиофилизированном состоянии, дополнительно содержащая растворитель, содержащий гель фосфата алюминия и NaCl.

13. Композиция по любому из пп.7-12, в которой конъюгат Streptococcus pneumoniae серотипа 6A-CRM₁₉₇ проявляет повышенную иммуногенность, когда присутствует в 16-валентной или 17-валентной композиции.

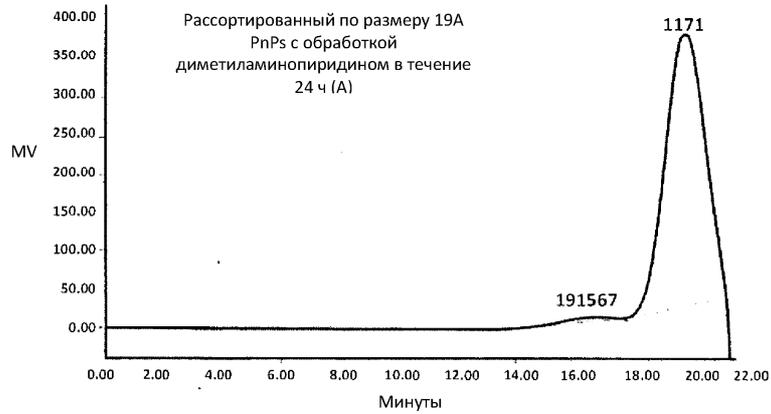
14. Композиция по любому из пп.7-12, содержащая полисорбат-20 с концентрацией от 0,01 до 10% мас./об. в качестве поверхностно-активного вещества.

	Название максимума	Реальное время	Площадь	Mw (Да)	Mn (Да)	MP (Да)	% площади	Полидисперсность
1	Максимум 4	16,881	36050010	178357	124375	143887	100,00	1,434025



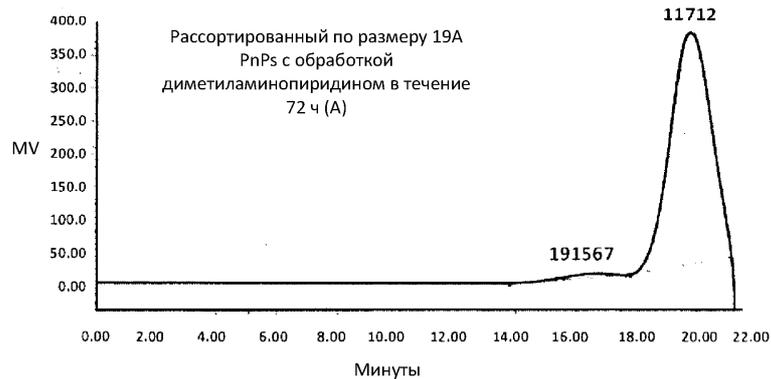
Фиг. 1

	Название максимума	Реальное время	Площадь	Mw (Да)	Mn (Да)	MP (Да)	% площади	Полидисперсность
1	Максимум 8	18,120	16821344	69941	37105	61650	100,00	1,884959



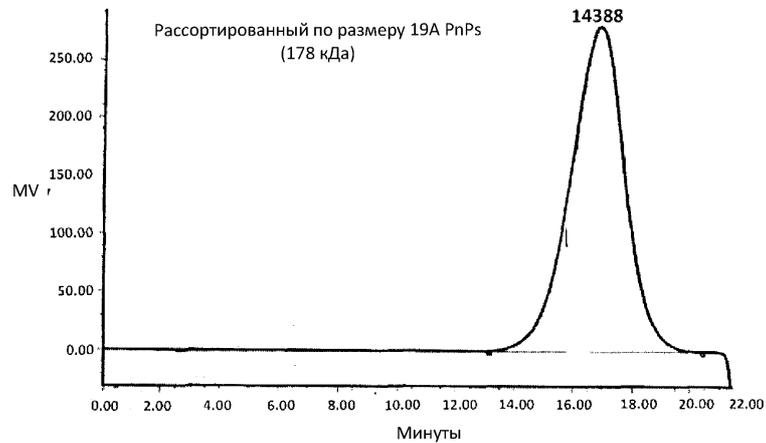
Фиг. 2А

	Название максимума	Реальное время	Площадь	Mw (Да)	Mn (Да)	MP (Да)	% площади	Полидисперсность
1	Размытый	16,417	561317	224030	194108	191587	1,62	1,154181
2	Максимум 9	19,875	34140780	14487	9007	11712	98,38	1,606378

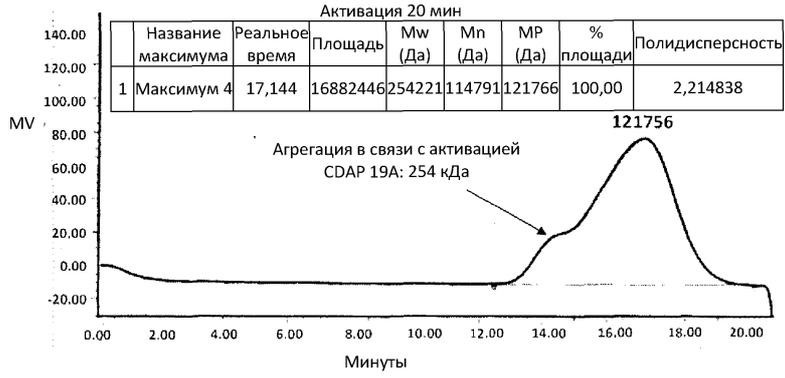


Фиг. 2В

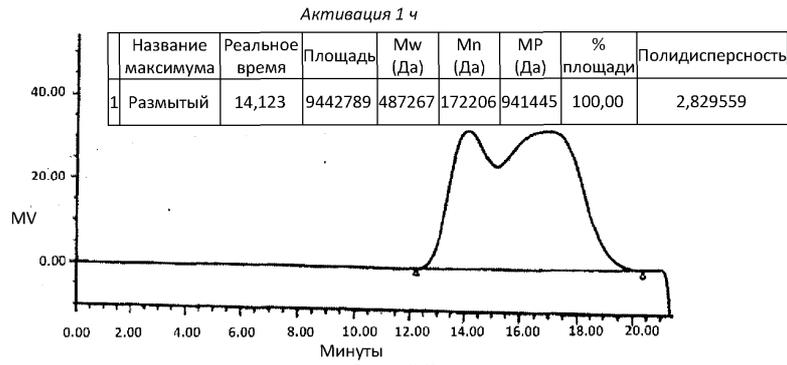
	Название максимума	Реальное время	Площадь	Mw (Да)	Mn (Да)	MP (Да)	% площади	Полидисперсность
1	Максимум 4	16,881	36050010	178357	124375	143887	100,00	1,434025



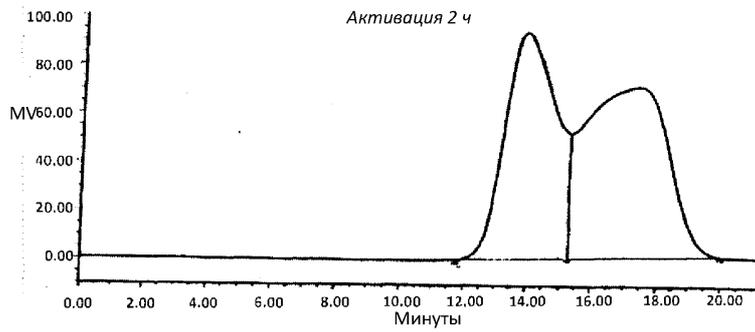
Фиг. 3А



Фиг. 3В



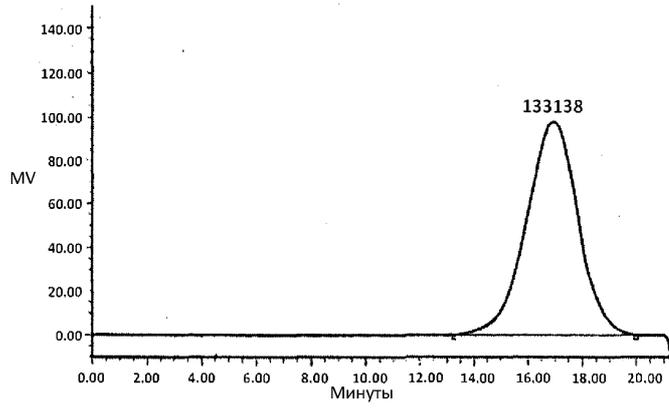
Фиг. 3С



Название максимума	Реальное время	Площадь	Mw (Да)	Mn (Да)	MP (Да)	% площади	Полидисперсность
1 Размытый	13,860	10289208	1173521	911209	1150119	44,70	1,287873
2 Максимум 4	17,373	12731305	173846	114964	117250	55,30	1,612173

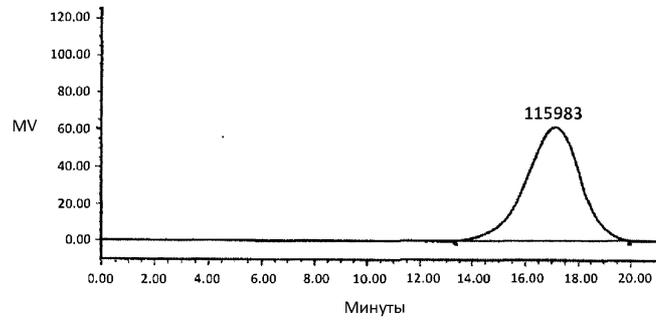
Фиг. 3Д

040838



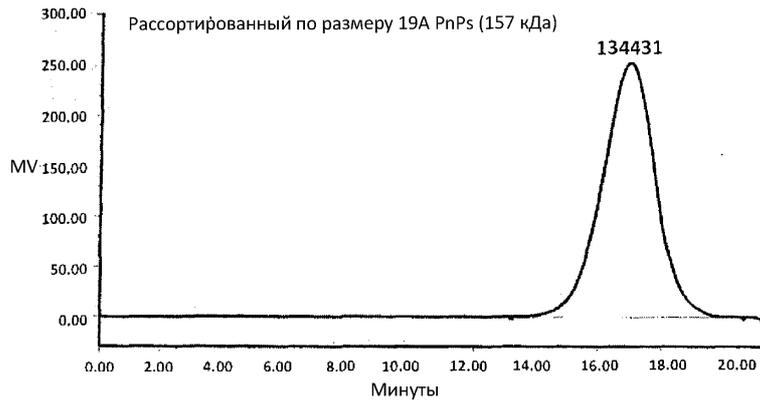
	Максимум Имя	Реальное время	Площадь	Mw (Да)	Mn (Да)	MP (Да)	% площади	Полидисперсность
1	Максимум 4	16,980	12939746	166907	113770	133136	100,00	1,467050

Фиг. 3Г



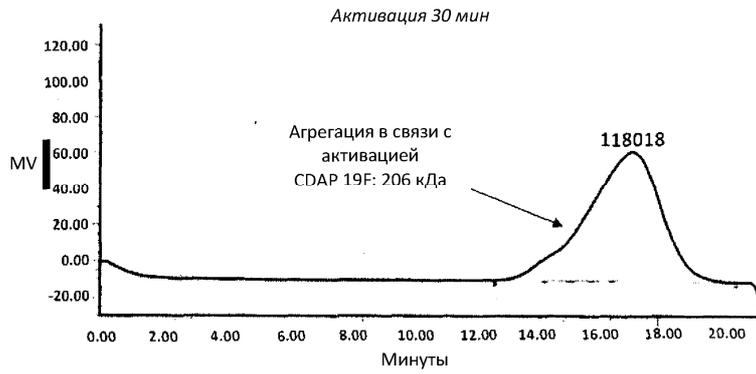
	Название максимума	Реальное время	Площадь	Mw (Да)	Mn (Да)	MP (Да)	% площади	Полидисперсность
1	Максимум 4	17,192	8884468	156239	99497	115983	100,00	1,570293

Фиг. 3Ф

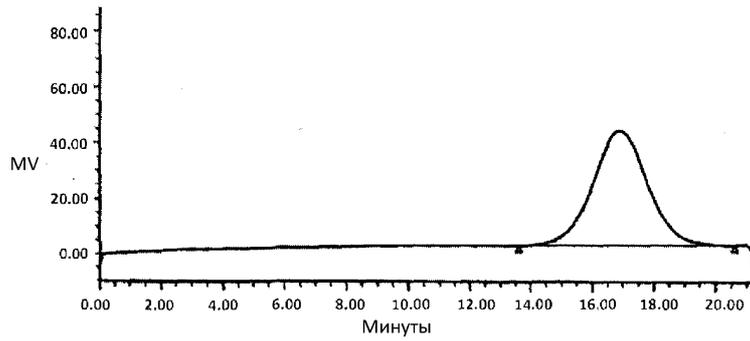


	Максимум Имя	Реальное время	Площадь	Mw (Да)	Mn (Да)	MP (Да)	% площади	Полидисперсность
1	Максимум 4	16,989	30256211	157553	114413	134431	100,00	1,377054

Фиг. 4А

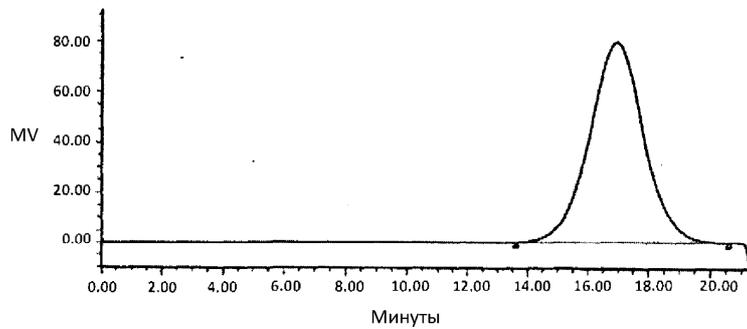


Фиг. 4В



	Максимум Имя	Реальное время	Площадь	Mw (Да)	Mn (Да)	MP (Да)	% площади	Полидисперсность
1	Максимум 4	16,940	5091525	161255	116007	141922	100,00	1,390010

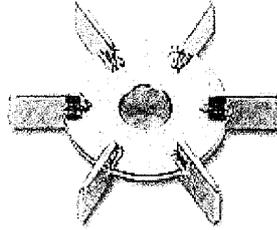
Фиг. 4С



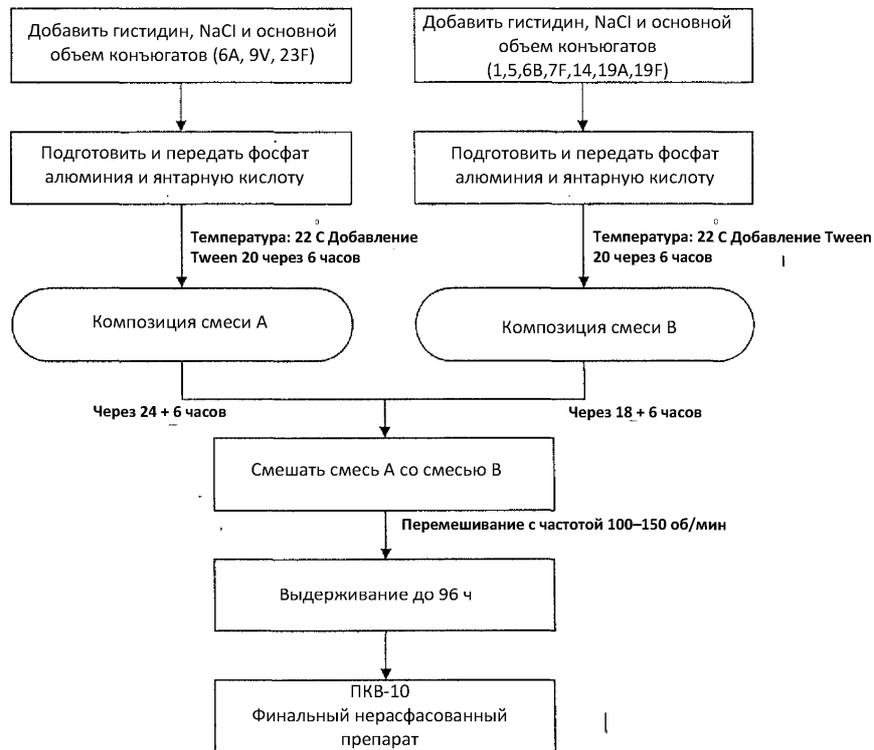
	Максимум Имя	Реальное время	Площадь	Mw (Да)	Mn (Да)	MP (Да)	% площади	Полидисперсность
1	Максимум 4	16,952	9921138	161360	114430	140847	100,00	1,410112

Фиг. 4D

Турбинная мешалка Раштона с шестью плоскими лопатками



Фиг. 5



Фиг. 6