

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040960**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.24

(21) Номер заявки
201990625

(22) Дата подачи заявки
2017.09.01

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

(54) ВАКЦИНА ПРОТИВ NEISSERIA MENINGITIDIS

(31) 62/383,279; 62/468,695; 62/505,525

(32) 2016.09.02; 2017.03.08; 2017.05.12

(33) US

(43) 2019.07.31

(86) PCT/US2017/049856

(87) WO 2018/045286 2018.03.08

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САНОФИ ПАСТЕР ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Кенсинджер Ричард Дэвид, Хаусер
Стивен Л. (US)**

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

(56) VASSILIKI PAPAEOANGELOU ET AL.: "MenACWY-TT vaccine for active immunization against invasive meningococcal disease", EXPERT REVIEW OF VACCINES, vol. 11, no. 5, 9 May 2012 (2012-05-09), pages 523-537, XP055430443, GB ISSN: 1476-0584, DOI: 10.1586/erv.12.32 abstract page 528, column 1, paragraph 2

SOHITA DHILLON ET AL.: "Meningococcal Quadrivalent Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine (MenACWY-TT; Nimenrix): A Review", DRUGS, vol. 77, no. 17, 1 November 2017 (2017-11-01), pages 1881-1896, XP055430453, NZ ISSN: 0012-6667, DOI: 10.1007/s40265-017-0828-8 the whole document table 2

WO-A1-2016055957

WO-A1-2013114268

AIA ASSAF-CASALS ET AL.: "Meningococcal quadrivalent tetanus toxoid conjugate vaccine (MenACWY-TT, Nimenrix(TM)): A review of its immunogenicity, safety, co-administration, and antibody persistence", HUMAN VACCINES AND IMMUNOTHERAPEUTICS, 22 February 2016 (2016-02-22), pages 1-13, XP055430937, US ISSN: 2164-5515, DOI: 10.1080/21645515.2016.1143157 abstract page 1827, column 2, paragraph 1; page 1827, column 1 - page 1831

WO-A2-02058737

S. LUPISAN ET AL.: "Meningococcal Polysaccharide A O-Acetylation Levels Do Not Impact the Immunogenicity of the Quadrivalent Meningococcal Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine: Results from a Randomized, Controlled Phase III Study of Healthy Adults Aged 18 to 25 Years", CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, vol. 20, no. 10, 24 July 2013 (2013-07-24), pages 1499-1507, XP055430941, US ISSN: 1556-6811, DOI: 10.1128/CI.00162-13 abstract page 1501 - page 1505

WO-A1-2007000322

(57) В настоящем изобретении предложены соединения, композиции, составы, наборы, виды применения и методы вакцинации субъекта против Neisseria meningitidis.

B1

040960

040960

B1

I. Введение и сущность изобретения

Neisseria meningitidis (*N. meningitidis*) является основной причиной бактериального менингита и сепсиса во всем мире. Серогруппы A, C, Y и W-135 *Neisseria meningitidis* (MenA, MenC, MenY и MenW, соответственно; совместно называемые MenACYW) ответственны за значительную часть менингококковых заболеваний во всем мире. В настоящее время существует шесть типов вакцин для защиты от *N. meningitidis*: четырехвалентные конъюгированные менингококковые вакцины, такие как Menactra® Nimenrix® и Menveo®; менингококковые полисахаридные вакцины, такие как Menomune®, менингококковые вакцины серогруппы C, такие как Neisvac-C®, Menjugate® и Menitorix®, менингококковые вакцины серогруппы A, такие как MenAfriVac®, менингококковые вакцины серогрупп C и Y, такие как MenHibrix®, и менингококковые вакцины серогруппы B, такие как Bexsero® и Trumenba®.

Эпидемиология *N. meningitidis* может быть описана как сложная, непредсказуемая, географически изменчивая и изменяющаяся во времени. Таким образом, существует потребность в разработке улучшенных вакцин против *N. meningitidis*. В частности, существующие полисахаридные конъюгированные вакцины могут оказаться не подходящими для введения одному или более младенцам, детям младшего возраста, подросткам и/или пожилым людям или могут приводить к слабой или необнаруживаемой сывороточной реакции у некоторых реципиентов.

В некоторых вариантах осуществления композиции, способы и/или применения, раскрытые в настоящем изобретении, обеспечивают одно или более преимуществ или, по меньшей мере, предоставляют общественности полезный выбор. Такие преимущества могут включать одно или более из: улучшенной иммуногенности к одному, двум, трем или всем четырем MenA, MenC, MenY и MenW; иммуногенности у двух, трех или четырех из следующего: младенцев, детей младшего возраста, подростков и пожилых людей; и достаточной стабильности, позволяющей длительное хранение в виде жидкой композиции, например, в течение нескольких лет при комнатной температуре (например, 2,5, 3, 3,5, 4 или 4,5 лет) или в течение нескольких месяцев при комнатной температуре (например, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев).

Соответственно предоставлены следующие варианты осуществления. Вариант осуществления 1 представляет собой вакцинную композицию против *Neisseria meningitidis*, содержащую

- a) первый конъюгат капсульного полисахарида MenA с белком-носителем;
- b) второй конъюгат капсульного полисахарида MenC с белком-носителем;
- c) третий конъюгат капсульного полисахарида MenW-135 с белком-носителем;
- d) четвертый конъюгат капсульного полисахарида MenY с белком-носителем;

где второй конъюгат представляет собой популяцию, содержащую связанные двумя концами конъюгированные полисахариды и связанные одним концом конъюгированные полисахариды, которые присоединены к белку-носителю через вторичный амин, при этом полисахариды второго конъюгата имеют уровень О-ацетилирования от 0,3 мкмоль/мг полисахарида до 1,6 мкмоль/мг полисахарида.

Уровень О-ацетилирования может быть больше или равен 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1 или 1,2 мкмоль/мг полисахарида. Уровень О-ацетилирования может быть меньше или равен 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 или 1,5 мкмоль/мг полисахарида. Например, уровень может находиться в пределах от 0,6 до 1,5 мкмоль/мг полисахарида или от 0,8 до 1,4 мкмоль/мг полисахарида. Содержание О-ацетила может быть измерено методом Хестрина (Hestrin et al., J. Biol. Chem. 1949, 180, p. 249).

Вариант осуществления 2 представляет собой вакцинную композицию против *Neisseria meningitidis*, содержащую

- a) первый конъюгат капсульного полисахарида MenA с белком-носителем;
- b) второй конъюгат капсульного полисахарида MenC с белком-носителем;
- c) третий конъюгат капсульного полисахарида MenW-135 с белком-носителем;
- d) четвертый конъюгат капсульного полисахарида MenY с белком-носителем;

где второй конъюгат представляет собой популяцию, включающую связанные одним концом конъюгированные полисахариды, которые присоединены к белку-носителю через вторичный амин, где связанные одним концом конъюгированные полисахариды имеют концевой несвязанный сахарид, причем концевой сахарид имеет первичный гидроксил или мостик из вторичного амина в положении 7, или где восстанавливающий конец модифицирован (2-гидрокси)этоксигруппой или вторичным аминным мостиком. Вторая популяция конъюгата может дополнительно содержать связанные двумя концами конъюгаты, в которых белки-носители связаны с обоими концами полисахарида, например, через вторичный амин.

Вариант осуществления 3 представляет собой вакцинную композицию против *Neisseria meningitidis*, содержащую

- a) первый конъюгат капсульного полисахарида MenA с белком-носителем;
- b) второй конъюгат капсульного полисахарида MenC с белком-носителем;
- c) третий конъюгат капсульного полисахарида MenW-135 с белком-носителем;
- d) четвертый конъюгат капсульного полисахарида MenY с белком-носителем;

где капсульный полисахарид MenA присоединен к белку-носителю через линкер, содержащий карбамат, спейсер и амид, при этом спейсер находится между карбаматом и амидом и содержит 2-10 линей-

ных атомов углерода, и первый конъюгат имеет массовое отношение полисахарида к белку-носителю в пределах от 0,3 до 1,5. Первый конъюгат может иметь массовое отношение полисахарида к белку-носителю, например, в пределах от 0,3 до 0,4, от 0,4 до 0,5, от 0,5 до 0,6, от 0,6 до 0,7, от 0,7 до 0,8, от 0,8 до 0,9, от 0,9 до 1,0, от 1,0 до 1,1, от 1,1 до 1,2, от 1,2 до 1,3, от 1,3 до 1,4 или от 1,4 до 1,5.

Вариант осуществления 4 представляет собой вакцинную композицию против *Neisseria meningitidis*, содержащую

- а) первый конъюгат капсульного полисахарида MenA с белком-носителем;
- б) второй конъюгат капсульного полисахарида MenC с белком-носителем;
- в) третий конъюгат капсульного полисахарида MenW-135 с белком-носителем;
- г) четвертый конъюгат капсульного полисахарида MenY с белком-носителем;

где капсульный полисахарид MenA присоединен к белку-носителю через линкер, содержащий карбамат, спейсер и амид, при этом спейсер находится между карбаматом и амидом и содержит 2-10 линейных атомов углерода; и при этом капсульные полисахариды MenC, MenW-135 и MenY присоединены к белку-носителю через вторичный амин; и, по меньшей мере, один из конъюгатов имеет средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от 300 до 1500 кДа.

Вариант осуществления 5 представляет собой вакцинную композицию против *Neisseria meningitidis*, содержащую

- а) первый конъюгат капсульного полисахарида MenA с белком-носителем;
- б) второй конъюгат капсульного полисахарида MenC с белком-носителем;
- в) третий конъюгат капсульного полисахарида MenW-135 с белком-носителем;
- г) четвертый конъюгат капсульного полисахарида MenY с белком-носителем;

где белок-носитель представляет собой столбнячный анатоксин; один или более из первого, второго, третьего и четвертого конъюгатов имеют средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от 300 до 1500 кДа; и композиция содержит менее 20% по массе свободного полисахарида относительно общего количества полисахаридов.

По меньшей мере один, два, три или четыре из конъюгатов в композиции могут иметь средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от 300 до 1500 кДа. Средневзвешенная молекулярная масса по меньшей мере одного, двух, трех или четырех из конъюгатов в композиции может быть больше или равна 400 кДа, 500 кДа, 600 кДа, 700 кДа, 800 кДа, 900 кДа, 1000 кДа или 1100 кДа. Средневзвешенная молекулярная масса по меньшей мере одного, двух, трех или четырех из конъюгатов в композиции может быть меньше или равна 600 кДа, 700 кДа, 800 кДа, 900 кДа, 1000 кДа, 1100 кДа, 1200 кДа, 1300 кДа или 1400 кДа. По меньшей мере один конъюгат может иметь молекулярную массу в диапазоне от 700 до 800, от 800 до 900, от 900 до 1000, от 1000 до 1100, от 1100 до 1200, от 1200 до 1300, от 1300 до 1400 или от 1400 до 1500 кДа. Конъюгат MenA может иметь молекулярную массу в диапазоне от 700 до 800, от 800 до 900, от 900 до 1000, от 1000 до 1100, от 1100 до 1200, от 1200 до 1300, от 1300 до 1400 или от 1400 до 1500 кДа. Конъюгат MenC может иметь молекулярную массу в диапазоне от 700 до 800, от 800 до 900, от 900 до 1000, от 1000 до 1100, от 1100 до 1200, от 1200 до 1300, от 1300 до 1400 или от 1400 до 1500 кДа. Конъюгат MenY может иметь молекулярную массу в диапазоне от 700 до 800, от 800 до 900, от 900 до 1000, от 1000 до 1100, от 1100 до 1200, от 1200 до 1300, от 1300 до 1400 или от 1400 до 1500 кДа. Конъюгат MenW-135 может иметь молекулярную массу в диапазоне от 700 до 800, от 800 до 900, от 900 до 1000, от 1000 до 1100, от 1100 до 1200, от 1200 до 1300, от 1300 до 1400 или от 1400 до 1500 кДа.

Вариант осуществления 6 представляет собой вакцинную композицию против *Neisseria meningitidis*, содержащую

- а) первый конъюгат капсульного полисахарида MenA с белком-носителем;
- б) второй конъюгат капсульного полисахарида MenC с белком-носителем;
- в) третий конъюгат капсульного полисахарида MenW-135 с белком-носителем;
- г) четвертый конъюгат капсульного полисахарида MenY с белком-носителем;

где белок-носитель представляет собой столбнячный анатоксин; один или более из первого, второго, третьего и четвертого конъюгатов имеют массовое отношение полисахарида к белку-носителю от 0,3 до 1,5; и композиция содержит менее 20% по массе свободного полисахарида относительно общего количества полисахаридов.

Первый конъюгат может иметь массовое отношение полисахарида к белку-носителю, например, от 0,3 до 0,4, от 0,4 до 0,5, от 0,5 до 0,6, от 0,6 до 0,7, от 0,7 до 0,8, от 0,8 до 0,9, от 0,9 до 1,0, от 1,0 до 1,1, от 1,1 до 1,2, от 1,2 до 1,3, от 1,3 до 1,4 или от 1,4 до 1,5. Второй конъюгат может иметь массовое отношение полисахарида к белку-носителю, например, от 0,3 до 0,4, от 0,4 до 0,5, от 0,5 до 0,6, от 0,6 до 0,7, от 0,7 до 0,8, от 0,8 до 0,9, от 0,9 до 1,0, от 1,0 до 1,1, от 1,1 до 1,2, от 1,2 до 1,3, от 1,3 до 1,4 или от 1,4 до 1,5. Третий конъюгат может иметь массовое отношение полисахарида к белку-носителю, например, от 0,3 до 0,4, от 0,4 до 0,5, от 0,5 до 0,6, от 0,6 до 0,7, от 0,7 до 0,8, от 0,8 до 0,9, от 0,9 до 1,0, от 1,0 до 1,1, от 1,1 до 1,2, от 1,2 до 1,3, от 1,3 до 1,4 или от 1,4 до 1,5. Четвертый конъюгат может иметь массовое отношение полисахарида к белку-носителю, например, от 0,3 до 0,4, от 0,4 до 0,5, от 0,5 до 0,6, от 0,6 до 0,7, от 0,7 до 0,8, от 0,8 до 0,9, от 0,9 до 1,0, от 1,0 до 1,1, от 1,1 до 1,2, от 1,2 до 1,3, от 1,3 до 1,4 или от 1,4 до 1,5.

Вариант осуществления 7 представляет собой вакцинную композицию по любому из предшеств-

вующих вариантов осуществления, где первый, второй, третий и/или четвертый конъюгаты представляют собой популяцию, включающую молекулы с молекулярной массой в диапазоне от 700 кДа до 1400 кДа или от 800 до 1300 кД. Первый и второй конъюгаты могут представлять собой популяцию, включающую молекулы с молекулярной массой в диапазоне от 700 до 1400 кДа или от 800 до 1300 кДа. Первый и третий конъюгаты могут представлять собой популяцию, включающую молекулы с молекулярной массой в диапазоне от 700 до 1400 кДа или от 800 до 1300 кДа. Первый и четвертый конъюгаты могут представлять собой популяцию, включающую молекулы с молекулярной массой в диапазоне от 700 до 1400 кДа или от 800 до 1300 кДа. Второй и третий конъюгаты могут представлять собой популяцию, включающую молекулы с молекулярной массой в диапазоне от 700 до 1400 кДа или от 800 до 1300 кДа. Второй и четвертый конъюгаты могут представлять собой популяцию, включающую молекулы с молекулярной массой в диапазоне от 700 до 1400 кДа или от 800 до 1300 кДа. Третий и четвертый конъюгаты могут представлять собой популяцию, включающую молекулы с молекулярной массой в диапазоне от 700 до 1400 кДа или от 800 до 1300 кДа.

Вариант осуществления 8 представляет собой вакцинную композицию против *Neisseria meningitidis*, содержащую конъюгат капсульного полисахарида MenC с белком-носителем, где конъюгат представляет собой популяцию, содержащую связанные двумя концами конъюгированные полисахариды и связанные одним концом конъюгированные полисахариды, которые присоединены к белку-носителю через вторичный амин, при этом полисахариды конъюгата капсульного полисахарида MenC с белком-носителем имеют уровень О-ацетилирования в диапазоне от 0,3 мкмоль/мг полисахарида до 1,6 мкмоль/мг полисахарида. Уровень О-ацетилирования может быть больше или равен 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1 или 1,2 мкмоль/мг полисахарида. Уровень О-ацетилирования может быть меньше или равен 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 или 1,5 мкмоль/мг полисахарида. Например, уровень может находиться в пределах от 0,6 до 1,5 мкмоль/мг полисахарида или от 0,8 до 1,4 мкмоль/мг полисахарида. Содержание О-ацетила может быть измерено методом Хестрина (Hestrin et al., J. Biol. Chem. 1949, 180, p. 249).

Вариант осуществления 9 представляет собой вакцинную композицию согласно варианту осуществления 8, где конъюгат (а) имеет средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от 300 до 1500 кДа; или (б) представляет собой популяцию, включающую молекулы, имеющие молекулярную массу в диапазоне от 700 до 1400 кДа или от 800 до 1300 кДа.

Вариант осуществления 10 представляет собой вакцинную композицию по любому из вариантов осуществления 4, 5, 7 или 9, в которой молекулярную массу определяют методом многоуглового рассеяния света (MALS).

Вариант осуществления 11 представляет собой вакцинную композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, где полисахарид MenC имеет уровень О-ацетилирования в диапазоне от 0,6 до 1,5 мкмоль/мг полисахарида или от 0,8 до 1,4 мкмоль/мг полисахарида.

Вариант осуществления 12 представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 11, в которой уровень О-ацетилирования больше или равен 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1 или 1,2 мкмоль/мг полисахарида.

Вариант осуществления 13 представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 11, в которой уровень О-ацетилирования меньше или равен 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3 или 1,4 мкмоль/мг полисахарида.

Вариант осуществления 14 представляет собой вакцинную композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, где конъюгат, содержащий полисахарид MenC, представляет собой популяцию, содержащую связанные двумя концами конъюгированные полисахариды и связанные одним концом конъюгированные полисахариды.

Вариант осуществления 15 представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 14, в которой связанные одним концом полисахариды второго конъюгата содержат концевой несвязанный сахарид, при этом связанные одним концом конъюгированные полисахариды имеют концевой несвязанный сахарид, где концевой сахарид имеет первичный гидроксил в положении 7 или где восстанавливающий конец модифицирован (2-гидрокси)этокси группой.

Вариант осуществления 16 представляет собой вакцинную композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, где конъюгат, содержащий полисахарид MenC, содержит одну или более модификаций, выбранных из (i) первичного гидроксила в положении 7, (ii) (2-гидрокси)этокси группы на восстанавливающем конце и (iii) конъюгации с белком-носителем, причем модификации присутствуют в количестве не менее 25 нмоль/мг полисахарида.

Вариант осуществления 17 представляет собой вакцинную композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, содержащую конъюгат полисахарида MenW-135 и/или MenY, который содержит одну или более модификаций, выбранных из (i) первичного гидроксила в положении винциального диола в нативном полисахариде MenW-135 или MenY и (ii) конъюгации с белком-носителем, причем модификации присутствуют в количестве не менее 60 нмоль/мг полисахарида.

Вариант осуществления 18 представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 16 или 17, где модификации присутствуют в количестве менее 200 нмоль/мг полисахарида, менее 150 нмоль/мг полисахарида, менее 100 нмоль/мг полисахарида или

менее 80 нмоль/мг полисахарида.

Вариант осуществления 19 представляет собой вакцинную композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, в которой размер полисахарида MenC уменьшен в 3-8 раз по сравнению с нативным полисахаридом MenC.

Вариант осуществления 20 представляет собой вакцинную композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, содержащую конъюгат капсульного полисахарида MenA с белком-носителем, имеющий массовое отношение полисахарида к белку-носителю от 0,5 до 1,5. Вариант осуществления 20А представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 20, содержащую конъюгат капсульного полисахарида MenA с белком-носителем, имеющий массовое отношение полисахарида к белку-носителю от 0,7 до 1,4.

Вариант осуществления 21 представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 20, в которой конъюгат MenA имеет массовое отношение полисахарида к белку-носителю от 0,8 до 1,3.

Вариант осуществления 22 представляет собой вакцинную композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, содержащую конъюгат капсульного полисахарида MenC и/или MenY с белком-носителем, имеющим массовое отношение полисахарида к белку-носителю от 0,3 до 1,1.

Вариант осуществления 23 представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 22, в которой конъюгат MenC имеет массовое отношение полисахарида к белку-носителю от 0,4 до 0,8.

Вариант осуществления 24 представляет собой вакцинную композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, содержащую конъюгат капсульного полисахарида MenW-135 с белком-носителем, имеющий массовое отношение полисахарида к белку-носителю от 0,3 до 1,3.

Вариант осуществления 25 представляет собой вакцинную композицию воплощения 24, в которой конъюгат MenW-135 имеет массовое отношение полисахарида к белку-носителю от 0,6 до 1,3.

Вариант осуществления 26 представляет собой вакцинную композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, содержащую конъюгат капсульного полисахарида MenY с белком-носителем, имеющий массовое отношение полисахарида к белку-носителю от 0,5 до 1,3.

Вариант осуществления 27 представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 26, в которой конъюгат MenY имеет массовое отношение полисахарида к белку-носителю от 0,5 до 0,9.

Вариант осуществления 28 представляет собой вакцинную композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, где композиция содержит менее 20% по массе свободного полисахарида.

Вариант осуществления 29 представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 28, где композиция содержит менее 10% по массе свободного полисахарида, менее 5% по массе свободного полисахарида или по существу не содержит свободного полисахарида.

Вариант осуществления 30 представляет собой вакцинную композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, где полисахарид конъюгата MenA, MenC, MenW-135 или MenY присоединен к белку-носителю через линкер.

Вариант осуществления 31 представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 30, где линкер содержит 2-10 линейных атомов углерода.

Вариант осуществления 32 представляет собой вакцинную композицию по вариантам осуществления 30 и 31, в которой линкер присутствует в конъюгате MenA, MenC, MenW-135 или MenY в соотношении один линкер на 10-100 повторяющихся сахаридных звеньев.

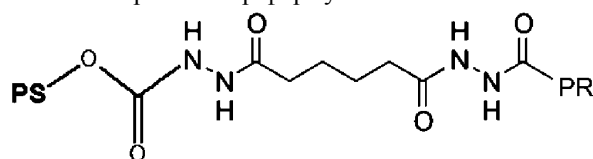
Вариант осуществления 33 представляет собой вакцинную композицию по вариантам осуществления 30 и 31, где линкер присутствует в конъюгате MenA, MenC, MenW-135 или MenY в соотношении один линкер на 20-60 повторяющихся сахаридных звеньев.

Вариант осуществления 34 представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 30 и 31, в которой линкер содержит спейсер между первым карбонилем и вторым карбонилем, и этот спейсер содержит 4-8 атомов углерода.

Вариант осуществления 35 представляет собой вакцинную композицию по любому из вариантов осуществления 30-34, где линкер конъюгата MenA содержит остаток дигидразида.

Вариант осуществления 36 представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 35, где линкер конъюгата MenA содержит остаток дигидразида адипиновой кислоты.

Вариант осуществления 37 представляет собой вакцинную композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, где полисахарид конъюгата MenA, MenC, MenW-135 и/или MenY присоединен к белку-носителю через линкер формулы I



(I),

где PS означает присоединение к полисахариду, а PR означает присоединение к белку-носителю.

Вариант осуществления 38 представляет собой вакцинную композицию по любому из вариантов осуществления 30-37, где линкер находится в конъюгате MenA.

Вариант осуществления 39 представляет собой вакцинную композицию по любому из вариантов осуществления 30-37, где линкер находится в конъюгате MenC.

Вариант осуществления 40 представляет собой вакцинную композицию по любому из вариантов осуществления 30-37, где линкер находится в конъюгате MenW-135.

Вариант осуществления 41 представляет собой вакцинную композицию по любому из вариантов осуществления 30-37, где линкер находится в конъюгате MenY.

Вариант осуществления 42 представляет собой вакцинную композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, где полисахарид конъюгата MenA, MenC, MenW-135 и/или MenY присоединен к белку-носителю, как показано в формуле II: PR-NH-CH₂-PS (II), где PS означает присоединение к полисахариду, а PR означает присоединение к белку-носителю.

Вариант осуществления 43 представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 42, в которой полисахарид конъюгата MenA присоединен к белку-носителю, как показано в формуле II.

Вариант осуществления 44 представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 42, в которой полисахарид конъюгата MenC присоединен к белку-носителю, как показано в формуле II.

Вариант осуществления 45 представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 42, в которой полисахарид конъюгата MenW-135 присоединен к белку-носителю, как показано в формуле II.

Вариант осуществления 46 представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 42, в которой полисахарид конъюгата MenY присоединен к белку-носителю, как показано в формуле II.

Вариант осуществления 47 представляет собой вакцинную композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, где белок-носитель содержит или состоит из рекомбинантного экзопротеина A (гЕРА), дифтерийного анатоксина или В-фрагмента дифтерийного токсина, CRM197, столбнячного анатоксина или С-фрагмента столбнячного токсина.

Вариант осуществления 48 представляет собой вакцинную композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, где белок-носитель представляет собой столбнячный анатоксин.

Вариант осуществления 49 представляет собой способ получения конъюгата капсульного полисахарида *Neisseria meningitidis* с белком-носителем, включающий

а) активацию полисахарида активирующим агентом, который может образовывать карбаматный мостик, причем активирующий агент присутствует в 20-50-кратном молярном избытке относительно полисахарида;

б) частичное блокирование активированного полисахарида и дериватизацию активированного полисахарида дигидразидным линкером, добавленным в молярном отношении от 0,3 до 1,0 относительно повторяющихся полисахаридных звеньев, где полисахарид дериватизирован в соотношении один дигидразидный линкер на 10-100 сахаридных повторяющихся звеньев;

с) конъюгацию дериватизированного полисахарида с белком-носителем карбодимидным методом, где полисахарид присутствует в начале реакции конъюгации в массовом отношении к белку-носителю в диапазоне от 3:1 до 5:1, образуя таким образом конъюгат.

Вариант осуществления 50 представляет собой способ по варианту осуществления 49, в котором дигидразидный линкер добавляют в молярном отношении к повторяющимся полисахаридным звеньям от 0,4 до 0,6.

Вариант осуществления 51 представляет собой способ по варианту осуществления 49, включающий дополнительный этап остановки реакции глицерином.

Вариант осуществления 52 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 49-51, где дигидразидным линкером является дигидразид адипиновой кислоты.

Вариант осуществления 53 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 49-51, в котором дериватизированный полисахарид в реакции конъюгации имеет начальную концентрацию от 10 до 20 г/л.

Вариант осуществления 54 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 49-51, в котором активирующий агент содержит карбонил, связанный с двумя N-связанными гетероарилами, такими как CDI (1,1'-карбонилдимидазол) и CDT (1,1'-карбонил-ди-(1,2,4-триазол)) или другими подходящими уходящими группами.

Вариант осуществления 55 представляет собой способ по варианту осуществления 54, где активирующий агент представляет собой карбонилдимидазол.

Вариант осуществления 56 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 49-51, в котором активирующий агент присутствует на этапе активации в 35-45-кратном молярном избытке относительно полисахарида.

Вариант осуществления 57 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 49-51, где этап конъюгации включает взаимодействие белка-носителя с N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодимидом.

Вариант осуществления 58 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 49-51, где полисахаридом является капсульный полисахарид MenA.

Вариант осуществления 59 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 49-

51, где полисахаридом является капсульный полисахарид MenC.

Вариант осуществления 60 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 49-51, где полисахаридом является капсульный полисахарид MenW-135 или MenY.

Вариант осуществления 61 представляет собой способ получения конъюгата капсульного полисахарида *Neisseria meningitidis* с белком-носителем, включающий а) частичное де-О-ацетилирование полисахарида методом щелочного гидролиза; б) активацию полисахарида обработкой периодатом, превращая, таким образом, диолы в альдегиды до уровня превращения, равного по меньшей мере 20 нмоль альдегида на мг полисахарида; с) конъюгацию активированного полисахарида с белком-носителем методом восстановительного аминирования, где полисахарид присутствует в реакции конъюгации в массовом отношении к белку-носителю от 1:1 до 5:1, образуя таким образом конъюгат.

Вариант осуществления 62 представляет собой способ по варианту осуществления 61, в котором полисахарид присутствует в реакции конъюгации в массовом отношении к белку-носителю от 1,5 до 3:1.

Вариант осуществления 63 представляет собой способ по варианту осуществления 61, в котором де-О-ацетилирование снижает начальное количество О-ацетилирования в полисахариде на 40-70% или 50-60%.

Вариант осуществления 64 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 61-63, в котором после де-О-ацетилирования полисахарид имеет уровень О-ацетилирования в пределах от 0,6 мкмоль/мг полисахарида до 1,5 мкмоль/мг полисахарида или от 0,8 до 1,4 мкмоль/мг полисахарида.

Вариант осуществления 65 представляет собой способ по варианту осуществления 64, в котором уровень О-ацетилирования больше или равен 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1 или 1,2 мкмоль/мг полисахарида.

Вариант осуществления 66 представляет собой способ по варианту осуществления 64, в котором уровень О-ацетилирования меньше или равен 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3 или 1,4 мкмоль/мг полисахарида.

Вариант осуществления 67 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 61-66, в котором активированный полисахарид в реакции конъюгации имеет начальную концентрацию от 20 до 50 г/л.

Вариант осуществления 68 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 61-66, где полисахарид представляет собой капсульный полисахарид MenC.

Вариант осуществления 69 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 61-66, где полисахарид представляет собой капсульный полисахарид MenA.

Вариант осуществления 70 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 61-66, где полисахарид представляет собой капсульный полисахарид MenW-135 или MenY.

Вариант осуществления 71 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 61-66, в котором до реакции конъюгации размер полисахарида уменьшен до 30-150 кДа или 50-100 кДа.

Вариант осуществления 72 представляет собой способ получения конъюгата капсульного полисахарида *Neisseria meningitidis* с белком-носителем, включающий: а) активацию полисахарида обработкой периодатом, таким образом преобразуя диолы в альдегиды до уровня, по меньшей мере, 50 нмоль альдегида на мг полисахарида; б) конъюгацию активированного полисахарида с белком-носителем путем восстановительного аминирования, где полисахарид присутствует в реакции конъюгации в массовом отношении к белку-носителю от 1:1 до 5:1, образуя таким образом конъюгат.

Вариант осуществления 73 представляет собой способ по варианту осуществления 72, в котором полисахарид присутствует в реакции конъюгации в массовом отношении к белку-носителю от 1,5 до 3:1.

Вариант осуществления 74 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 72 и 73, в котором полисахарид представляет собой капсульный полисахарид MenW-135 или MenY.

Вариант осуществления 75 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 72 и 73, где полисахарид представляет собой капсульный полисахарид MenC.

Вариант осуществления 76 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 72 и 73, где полисахарид представляет собой капсульный полисахарид MenA.

Вариант осуществления 77 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 72-76, в котором до реакции конъюгации размер полисахарида уменьшен до 100-200 кДа или 125-175 кДа.

Вариант осуществления 78 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 49, 61 и 72, в котором размер полисахарида уменьшен в результате кислотного гидролиза и/или нагревания.

Вариант осуществления 79 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 49, 61 и 72, в котором размер полисахарида уменьшен в результате окислительного расщепления.

Вариант осуществления 80 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 72-79, в котором восстановительное аминирование включает восстановление иминов до аминов с использованием цианоборогидрида или других восстанавливающих реагентов, таких как пиридиноборан (C_5H_8BN) и пиколиноборановый комплекс ($C_6H_7N \cdot BH_3$).

Вариант осуществления 81 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 72-79, дополнительно включающий превращение непрореагировавших альдегидов в конъюгате в спирты при помощи восстанавливающего реагента.

Вариант осуществления 82 представляет собой способ по варианту осуществления 81, в котором восстанавливающий реагент представляет собой борогидрид.

Вариант осуществления 83 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 72-79, в котором для активации полисахарида добавляют периодат до концентрации от 1 до 4 мМ или от 1,5 до 3 мМ.

Вариант 84 осуществления представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 49-83, дополнительно включающий очистку конъюгата хроматографией гидрофобного взаимодействия.

Вариант осуществления 85 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 49-83, дополнительно включающий очистку конъюгата хроматографией на смоле в смешанном режиме.

Вариант 86 осуществления представляет собой способ очистки конъюгата капсульного полисахарида *Neisseria meningitidis* с белком-носителем из смеси, содержащей конъюгат, соль и свободный полисахарид, включающий а) приведение в контакт смолы для хроматографии гидрофобного взаимодействия со смесью, при котором конъюгат связывается со смолой; б) элюирование свободного полисахарида из смолы; и с) элюирование конъюгата из смолы водной жидкостью, где водная жидкость не содержит соли или содержит меньше соли, чем смесь, получая таким образом композицию, содержащую очищенный конъюгат.

Вариант осуществления 87 представляет собой способ по варианту осуществления 86, в котором соль включает сульфат аммония.

Вариант осуществления 88 представляет собой способ по варианту осуществления 86 или варианту осуществления 87, где смесь включает соль в количестве от 0,5 до 1,5 М или от 0,8 до 1,2 М.

Вариант осуществления 89 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 86-88, в котором водная жидкость содержит соль в количестве менее чем 0,2, 0,1 или 0,05 М.

Вариант осуществления 90 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 86-89, в котором водная жидкость представляет собой воду.

Вариант осуществления 91 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 86-90, в котором композиция содержит менее 20% по массе свободного полисахарида, менее 10% по массе свободного полисахарида, менее 5% по массе свободного полисахарида или по существу не содержит свободного полисахарида.

Вариант осуществления 92 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 86-91, где смола для хроматографии гидрофобного взаимодействия представляет собой смолу с фенильными, пропильными или бутильными группами.

Вариант осуществления 93 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 49-92, где белок-носитель представляет собой столбнячный анатоксин.

Вариант 94 осуществления представляет собой конъюгат, полученный способом по любому из вариантов осуществления 49-85.

Вариант осуществления 95 представляет собой вакцинную композицию, содержащую а) первый конъюгат капсульного полисахарида MenA с белком-носителем; б) второй конъюгат капсульного полисахарида MenC с белком-носителем; в) третий конъюгат капсульного полисахарида MenW-135 с белком-носителем; и д) четвертый конъюгат капсульного полисахарида MenY с белком-носителем; где первый, второй, третий или все первый, второй, третий и четвертый конъюгаты получены способом по любому из вариантов осуществления 49-85.

Вариант осуществления 96 представляет собой вакцинную композицию по любому из вариантов осуществления 1-48 или 95, которая не содержит адъюванта.

Вариант осуществления 97 представляет собой вакцинную композицию по любому из вариантов осуществления 1-48 или 95-96, дополнительно включающую фармацевтически приемлемый буфер.

Вариант осуществления 98 представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 97, содержащую ацетатный буфер с pH от 5,5 до 6,5.

Вариант осуществления 99 представляет собой вакцинную композицию по любому из вариантов осуществления 1-48 или 95-98, дополнительно включающую фармацевтически приемлемую соль.

Вариант осуществления 100 представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 99, где фармацевтически приемлемой солью является хлорид натрия.

Вариант осуществления 101 представляет собой вакцинную композицию по варианту осуществления 99 или 100, где фармацевтически приемлемая соль присутствует в количестве от 0,45 до 0,9% мас./об. или от 0,5 до 0,85% мас./об.

Вариант осуществления 102 представляет собой вакцинную композицию по любому из вариантов осуществления 1-48 или 95-101, в которой по меньшей мере первый, второй, третий или все четыре из первого, второго, третьего и четвертого конъюгатов содержат множество точек присоединения между полисахаридами и белками-носителями.

Вариант осуществления 103 представляет собой вакцинную композицию по любому из вариантов осуществления 1-48 или 95-102, составленную для внутримышечного введения.

Вариант осуществления 104 представляет собой единичную стандартную дозу вакцинной композиции по любому из вариантов осуществления 1-48 или 95-103, включающую от 6 до 15 мкг каждого из полисахаридов MenA, MenC, MenW-135 и MenY.

Вариант осуществления 105 представляет собой единичную стандартную дозу по варианту осуществ-

ствления 104, где белок-носитель присутствует в количестве от 50 мкг до 80 мкг.

Вариант осуществления 106 представляет собой единичную стандартную дозу по варианту осуществления 104 или 105, которая содержится в шприце.

Вариант осуществления 107 представляет собой единичную стандартную дозу по варианту осуществления 106, где шприц не содержит силикона.

Вариант осуществления 108 представляет собой единичную стандартную дозу по варианту осуществления 106 или 107, в которой шприц упакован для коммерческой продажи или распространения.

Вариант осуществления 109 представляет собой способ вакцинации субъекта против *Neisseria meningitidis*, включающий введение субъекту дозы вакцинной композиции по любому из вариантов осуществления 1-48 или 95-103. Вариант осуществления 109A представляет собой вакцинную композицию по любому из вариантов осуществления 1-48 или 95-103 для применения в способе вакцинации субъекта против *Neisseria meningitidis*, включающем введение субъекту дозы вакцинной композиции.

Вариант осуществления 110 представляет собой применение вакцинной композиции по любому из вариантов осуществления 1-48 или 95-103 или единичной стандартной дозы по любому из вариантов осуществления 104-108 для иммунизации субъекта против *Neisseria meningitidis*. Вариант осуществления 110A представляет собой вакцинную композицию по любому из вариантов осуществления 1-48 или 95-103 или единичную стандартную дозу по любому из вариантов осуществления 104-108 для применения для иммунизации субъекта против *Neisseria meningitidis*.

Вариант осуществления 111 представляет собой применение вакцинной композиции по любому из вариантов осуществления 1-48 или 95-103 или единичной стандартной дозы по любому из вариантов осуществления 104-108 для изготовления лекарственного средства для иммунизации субъекта против *Neisseria meningitidis*. Вариант осуществления 111A представляет собой вакцинную композицию по любому из вариантов осуществления 1-48 или 95-103 или единичную стандартную дозу по любому из вариантов осуществления 104-108 для применения в качестве лекарственного средства для иммунизации субъекта против *Neisseria meningitidis*.

Вариант осуществления 112 представляет собой способ, применение или композицию по любому из вариантов осуществления 109-111A, где вакцину вводят внутримышечно.

Вариант осуществления 113 представляет собой способ, применение или композицию по любому из вариантов осуществления 109-112, где субъекту от 6 недель до 3 лет.

Вариант осуществления 114 представляет собой способ, применение или композицию по варианту осуществления 113, где возраст субъекта составляет 2 месяца, 6 месяцев, 12 месяцев или 15 месяцев.

Вариант осуществления 115 представляет собой способ, применение или композицию по любому из вариантов осуществления 109-112, где возраст субъекта составляет 50 лет или более, 55 лет или более, 60 лет или более или 65 лет или более.

Вариант осуществления 116 представляет собой способ, применение или композицию по любому из вариантов осуществления 109-115, где вакцину вводят в дозе 0,5 мл.

Вариант осуществления 117 представляет собой способ, применение или композицию по варианту осуществления 116, где вакцина содержит 4-10 мкг каждой из серогрупп A, C, Y и W-135.

Вариант осуществления 118 представляет собой способ, применение или композицию по варианту осуществления 116, где вакцина содержит 50-80 мкг белка столбнячного анатоксина.

Вариант осуществления 119 представляет собой способ, применение или композицию по варианту осуществления 116, где вакцина содержит 4-10 мкг каждой из серогрупп A, C, Y и W-135 и 50-80 мкг белка столбнячного анатоксина.

Вариант осуществления 120 представляет собой способ, применение или композицию по любому из вариантов осуществления 109-119, дополнительно включающий введение вакцины, которая не направлена на *Neisseria meningitidis*, и в то же время не находится в той же инъекции, что и вакцина MenA-CYW-TT.

Вариант осуществления 121 представляет собой способ, применение или композицию по варианту осуществления 120, где вакцина, отличная от *Neisseria meningitidis*, направлена на профилактику инфекций ветряной оспы, дифтерии, Hib, гепатита B, кори, эпидемического паротита, коклюша, полиомиелита, пневмококка, ротавируса, краснухи или столбняка.

Вариант осуществления 122 представляет собой способ, применение или композицию по варианту осуществления 120, где вакциной, отличной от вакцины против *Neisseria meningitidis*, является DTaP5, Hib, HepB, DTaP5-IPV/Hib, DTaP5-IPV/Hib, HepB, MMR, IPV, PCV7, PCV13, RV1 или RV5.

Вариант осуществления 123 представляет собой способ, применение или композицию по любому из вариантов осуществления 109-122, где субъект ранее получал конъюгатную вакцину капсульного сахара *Neisseria meningitidis*.

Вариант осуществления 124 представляет собой способ, применение или композицию по варианту осуществления 123, где субъект получал конъюгатную вакцину капсульного сахара *Neisseria meningitidis* от четырех месяцев назад до десяти лет назад. Вариант осуществления 124A представляет собой способ, применение или композицию по варианту осуществления 123, где субъект получал конъюгатную вакцину капсульного сахара *Neisseria meningitidis* два месяца - десять лет назад.

Вариант осуществления 125 представляет собой способ, применение или композицию по любому из вариантов осуществления 109-122, где субъект ранее не получал конъюгатную вакцину капсульного са-харида *Neisseria meningitidis*.

II. Краткое описание фигур

На фиг. 1A показана схема конъюгата АДН-полисахарида серогруппы А, связанного с белком. Полисахариды 10 серогруппы А с остатками 11 реакционноспособного сайта образованы путем активации карбонилдиимидазолом (CDI) и, необязательно, дериватизации дигидразидом адипиновой кислоты (АДН) по гидроксильным группам полисахарида и взаимодействия с белком (например, столбнячным анатоксином (ТТ)). Активированный/дериватизированный полисахарид сшиваются с белком 13 посредством мостика 12 прямо или опосредованно по группам 14. Например, в прямых связях могут быть задействованы первичные амины белка, например, через образование карбаматного мостика (например, полученной из CDI). Опосредованные связи могут быть получены из АДН и N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDAC), который активирует карбоксильные группы белка.

На фиг. 1B показано получение активного О-ацилизомочевинного интермедиата белка-носителя (например, ТТ) с использованием N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDAC), который реагирует с карбоксильными группами (например, на аспарагиновой кислоте или боковых цепях глутаминовой кислоты или С-конце) белка. Этот интермедиат подходит для связывания с аминоклупами активированного дериватизированного полисахарида (не показано).

На фиг. 1C показана общая схема получения активированного дериватизированного полисахарида серогруппы А, который можно использовать для получения конъюгата полисахарид-АДН серогруппы А, связанного с белком-носителем (например, ТТ). В этом варианте осуществления полисахариды активируют по гидроксильным группам при помощи CDI с образованием активного имидазолкарбаматного интермедиата, который далее дериватизируют, используя АДН. АДН-дериватизированный полисахарид серогруппы А пригоден для ковалентного связывания с белком-носителем методом аминного сочетания первичных аминоклуп на АДН линкере с активным О-ацилизомочевинным интермедиатом белка-носителя (не показано).

На фиг. 1D показана общая схема получения конъюгата полисахарида серогруппы А, связанного со столбнячным анатоксином через карбамат. Полисахариды (PS) активируют по гидроксильным группам, используя CDI, с образованием активного имидазолкарбаматного интермедиата. Затем активный интермедиат реагирует с белком-носителем (PR). Карбаматный мостик образуется в результате реакции нуклеофильного замещения, в которой первичный амин белка атакует углерод карбамата, что приводит к потере имидазола и образованию карбаматного мостика между полисахаридом и белком.

На фиг. 1E, F показана структура полисахарида (E) серогруппы А после CDI-активации и (F) после CDI-активации и дериватизации с помощью АДН.

На фиг. 1G показано получение конъюгата АДН-полисахарида серогруппы А, связанного с белком-носителем (например, ТТ), из активированного дериватизированного полисахарида и активного О-ацилизомочевинного интермедиата, образованного из белка-носителя столбнячного анатоксина и N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDAC). Первичный амин активированного дериватизированного полисахарида замещает изомочевину, которая служит уходящей группой, давая продукт, в котором белок связан с полисахаридом через амидную связь, остаток АДН и карбаматный мостик, в которой карбонил получают от CDI. Отщепленный побочный продукт мочевины не показан.

На фиг. 1H показан продукт реакции, приведенный на фиг. 1F, со структурой связанного повторяющегося полисахаридного звена (включая остаток АДН).

На фиг. 2A показана схема конъюгата белок-полисахарид серогруппы С. Концы полисахариды 20 серогруппы С связаны с белком (например, столбнячным анатоксином) 21.

На фиг. 2B показана активация полисахарида серогруппы С (показана с обычной нумерацией атомов углерода в повторяющемся полисахаридном звене) метaperиодом натрия. Обработка метaperиодом натрия приводит к расщеплению между 7 и 8 атомами углерода, окислительно деполимеризуя полисахарид в соответствующие концевые альдегиды.

На фиг. 2C показано образование конъюгата полисахарида серогруппы С с белком (например, ТТ) методом восстановительного аминирования. Первичный амин белка (PR) (например, боковая цепь лизина или N-конец) реагирует с концевым альдегидом деполимеризованного активированного полисахарида серогруппы С (PS) с образованием интермедиата, Шиффового основания (не показано), который восстанавливается (например, пиридинобораном, пиколинобораном или цианоборогидридом) с получением мостика из вторичного амина. Конец полисахаридной части связан с белком. Отдельные молекулы белка могут реагировать с более чем одним полисахаридом, и некоторые концы полисахарида могут не вступать в реакцию (не показано; см. фиг. 2A). Непореагировавшие альдегиды могут быть заблокированы, т.е. восстановлены до спиртов, подходящим восстанавливающим агентом, таким как борогидрид натрия, после восстановления основания Шиффа (не показано).

На фиг. 2D показан продукт реакции, приведенный на фиг. 2C, со структурой связанного повторяющегося полисахаридного звена. Возможна связь белка с дополнительными полисахаридами (не показано).

На фиг. 3 показана схема конъюгата полисахарида серогруппы W-135 или серогруппы Y с белком.

Полисахариды серогруппы W-135 или серогруппы Y31 связаны с одним или более белками (например, столбнячным анатоксином) 30 в одном или более положениях.

На фиг. 4А показана деполимеризация и активация полисахарида серогруппы W-135. Полисахарид деполимеризуют, используя, например, повышенную температуру, а затем активируют путем обработки метапериодатом натрия, который расщепляет вицинальные диолы, такие как, например между углеродом 7 и 8, из фрагмента сиаловой кислоты, и окисляют их до альдегидов.

На фиг. 4В показано образование конъюгата полисахарида серогруппы W-135 с белком (например, ТТ) методом восстановительного аминирования. Первичный амин белка (PR) (например, боковая цепь лизина или N-конец) реагирует с альдегидом деполимеризованного активированного полисахарида серогруппы W-135 (PS) с образованием интермедиата, основания Шиффа (не показано). Интермедиат восстанавливают цианоборогидридом натрия с образованием мостика из вторичного амина. Отдельные молекулы белка могут реагировать с более чем одним полисахаридом и наоборот (не показано; см. фиг. 3). Непрореагировавшие альдегиды могут быть заблокированы, т.е. восстановлены до спиртов подходящим восстанавливающим агентом, таким как борогидрид натрия, после восстановления основания Шиффа (не показано).

На фиг. 4С показан продукт реакции, приведенный на фиг. 4В, с одной возможной структурой связанного повторяющегося полисахаридного звена. Возможна связь белка с дополнительными полисахаридами или наоборот (не показано; см. фиг. 3).

На фиг. 5А показана деполимеризация и активация полисахарида серогруппы Y. Полисахарид деполимеризуют, например, повышенной температурой, а затем активируют путем обработки метапериодатом натрия, который расщепляет вицинальные диолы, такие как, например между углеродом 7 и 8, из фрагмента сиаловой кислоты, и окисляют их до альдегидов.

На фиг. 5В показано образование конъюгата полисахарида серогруппы Y с белком (например, ТТ) методом восстановительного аминирования. Первичный амин белка (PR) (например, боковая цепь лизина или N-конец) реагирует с альдегидом деполимеризованного активированного полисахарида серогруппы Y (PS) с образованием интермедиата, основания Шиффа (не показано). Интермедиат восстанавливают (например, пиридином, пиколином или цианоборогидридом) с получением мостика из вторичного амина. Отдельные молекулы белка могут реагировать с более чем одним полисахаридом и наоборот (не показано; см. фиг. 3). Непрореагировавшие альдегиды могут быть заблокированы, т.е. восстановлены до спиртов подходящим восстанавливающим агентом, таким как борогидрид натрия, после восстановления основания Шиффа (не показано).

На фиг. 5С показан продукт реакции, приведенный на фиг. 5В, с одной возможной структурой связанного повторяющегося полисахаридного звена. Возможна связь белка с дополнительными полисахаридами или наоборот (не показано; см. фиг. 3).

На фиг. 6 показан процент субъектов в группах 1-4, у которых через 30 дней (D30) после последнего введения вакцины титры hSBA были выше или равны 1:8 для серогрупп A, C, Y и W.

На фиг. 7 показан процент субъектов в группах 1-4, у которых в день 30 после последнего введения вакцины титры rSBA были больше или равны 1:8 для серогрупп A, C, Y и W.

На фиг. 8 показан совокупный процент участников, которые в пределах 7 дней после введения вакцины MenACYW-TT сообщили об одной или более запрошенных реакциях в месте инъекции.

На фиг. 9 показан процент субъектов, которые в пределах 7 дней после введения либо вакцины MenACYW-TT плюс обычные вакцины, либо только обычных вакцин сообщили о запрошенных системных реакциях.

На фиг. 10 показан процент субъектов, у которых в день 30 после введения вакцины MenACYW-TT или Menomune®-A/C/Y/W-135 (MPSV4) титры hSBA были $\geq 1:8$ для различных серогрупп.

На фиг. 11 показаны обобщенные данные по среднегеометрическим титрам hSBA (GMT) в день 30 после введения вакцины MenACYW-TT или MPSV4.

На фиг. 12 показана доля субъектов, у которых в день 30 после введения вакцины MenACYW-TT или MPSV4 титры rSBA были $\geq 1:8$ для разных серогрупп.

На фиг. 13 показана доля субъектов с запрошенными реакциями в месте инъекции с указанием типу и степени их проявления после введения вакцины MenACYW-TT или MPSV4.

На фиг. 14 показана доля субъектов с запрошенными системными реакциями с указанием типу и степени их проявления после введения вакцины MenACYW-TT или MPSV4.

На фиг. 15 показана доля субъектов с сывороточной реакцией hSBA на вакцину в день 30 после введения вакцины MenACYW-TT или MCV4-TT.

На фиг. 16 показаны среднегеометрические титры hSBA после введения вакцины MenACYW-TT или MCV4-TT.

На фиг. 17 показаны запрошенные реакции в месте инъекции в дни 0-7 после введения вакцины MenACYW-TT или MCV4-TT.

На фиг. 18 показаны запрошенные системные реакции в дни 0-7 после введения вакцины MenACYW-TT или MCV4-TT.

III. Подробное описание вариантов осуществления изобретения

Ниже приведено подробное описание некоторых вариантов осуществления изобретения, примеры которых проиллюстрированы в прилагаемых чертежах. Хотя изобретение описано со ссылкой на иллюстративные варианты осуществления, следует понимать, что эти варианты осуществления не предназначены для ограничения изобретения. Напротив, изобретение охватывает все альтернативы, модификации и эквиваленты, которые могут быть включены в изобретение согласно тому, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

Перед подробным описанием настоящего изобретения следует отметить, что раскрытие не ограничено конкретными композициями или этапами процесса, поскольку они могут меняться. Следует также отметить, что используемые в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число, если из контекста в явном виде не следует иное. Таким образом, например, ссылка на "конъюгат" включает множество конъюгатов, а ссылка на "клетку" включает множество клеток и т.п.

Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Измеренные и измеряемые значения являются приблизительными с учетом значащих цифр и погрешности измерения. Кроме того, термины "содержать", "содержит", "содержащий", "состоять", "состоит", "состоящий", "включать", "включает" и "включающий" не предназначены для ограничения. Следует понимать, что как предшествующее общее описание, так и подробное описание приведены только в качестве примера и пояснения и не являются ограничивающими.

Если в приведенном выше описании специально не указано, варианты осуществления в описании, в которых указано "содержащий" различные компоненты, также следует понимать как "состоящий из" или "состоящий по существу из" перечисленных компонентов; варианты осуществления в описании, в которых указано "состоящий из" различных компонентов, также следует понимать как "содержащий" или "состоящий по существу из" перечисленных компонентов; и варианты осуществления в описании, в которых указано "состоящий по существу из" различных компонентов, также следует понимать как "состоящий из" или "включающий" перечисленные компоненты (эта взаимозаменяемость не применяется к использованию этих терминов в формуле изобретения).

Заголовки разделов, используемые в настоящем изобретении, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие требуемый объект изобретения каким-либо образом. В случае, если любая литература, включенная в качестве ссылки, противоречит какому-либо термину, определенному в данном описании, этот термин следует понимать так, как определено в настоящем описании. Хотя настоящее изобретение описано в различных вариантах его осуществления, не следует понимать, что настоящее изобретение ограничено такими вариантами осуществления. Напротив, настоящее изобретение охватывает различные альтернативы, модификации и эквиваленты, которые будут понятны специалистам в данной области техники.

А. Определения

Если не указано иное, приведенные ниже термины и фразы, используемые в настоящем изобретении, имеют следующие значения:

Используемый в настоящем изобретении термин "или их комбинации" относится ко всем перестановкам и комбинациям перечисленных терминов, предшествующих указанному термину. Например, "А, В, С или их комбинации" включает, по меньшей мере, одно из: А, В, С, АВ, АС, ВС или АВС, и, если в конкретном контексте важен порядок следования, также ВА, СА, СВ, АСВ, СВА, ВСА, ВАС или САВ. Продолжая этот пример, включенными в явном виде являются комбинации, которые содержат повторы одного или более элементов или терминов, такие как ВВ, ААА, ААВ, ВВС, ААВСССС, СВВААА, САВАВВ и т.д. Специалисту в данной области будет ясно, что на количество предметов или терминов в любой комбинации, как правило, не существует ограничений, если иное не следует очевидным образом из контекста.

Используемый в настоящем изобретении термин "набор" относится к упакованному комплекту связанных компонентов, таких как одно или более соединений или композиций, и одному или более связанным материалам, таким как растворители, растворы, буферы, инструкции или десиканты.

"Или" используется в смысле включения, т.е. эквивалентно "и/или", если из контекста не следует иное.

Термины "линкер" и "мостик" используются взаимозаменяемо и означают химический фрагмент, содержащий цепь атомов, которая ковалентно присоединена или присоединена к таким элементам, как белок-носитель или полисахарид.

"Связывающий фрагмент" означает химически реактивную группу, заместитель или фрагмент, например, нуклеофил или электрофил, способный реагировать с другой молекулой с образованием мостика посредством ковалентной связи.

"Алкил" означает насыщенный или ненасыщенный, разветвленный, линейный, разветвленный или циклический углеводородный радикал, полученный путем удаления одного атома водорода от одного атома углерода исходного алкана, алкена или алкина. Типичные алкильные группы состоят из 1-12 насыщенных и/или ненасыщенных атомов углерода, включая, без ограничения, метил, этил, пропил, бутил

и т.п.

"Повторяющиеся звено" представляет собой моно- или олигосахаридный остаток, который полимеризуется в полисахарид. Повторяющиеся звенья MenA и MenC являются моносахаридами (N-ацетилманнозамин и сиаловая кислота, соответственно), а повторяющиеся звенья MenW-135 и MenY являются дисахаридами (в случае MenY, сиаловой кислоты и глюкозы или, в случае MenW-135, сиаловой кислоты и галактозы). Повторяющиеся звенья могут отличаться друг от друга боковыми цепями (например, О-ацетилирование) и/или модификациями, раскрытыми в настоящем изобретении.

MenA, MenC, MenW-135 и MenY используются в виде условных обозначений серогрупп A, C, W-135 или Y *Neisseria meningitidis*, соответственно, или их капсульного полисахарида (как, например, в случае "конъюгата MenC", который означает конъюгат капсульного полисахарида *Neisseria meningitidis* серогруппы C с белком-носителем).

В. Иллюстративные вакцинные композиции

В некоторых вариантах осуществления предлагается вакцинная композиция. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция содержит конъюгат капсульного полисахарида MenC с белком-носителем. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция содержит конъюгат капсульного полисахарида MenA с белком-носителем. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция содержит конъюгат капсульного полисахарида MenW-135 с белком-носителем. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция содержит конъюгат капсульного полисахарида MenY с белком-носителем. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция содержит по меньшей мере два, по меньшей мере три или по меньшей мере четыре конъюгата капсульного полисахарида с белком-носителем. По меньшей мере два, по меньшей мере три или по меньшей мере четыре конъюгата капсульного полисахарида с белком-носителем могут быть конъюгатами капсульных полисахаридов из различных серогрупп *Neisseria meningitidis*, например, конъюгатов капсульных полисахаридов MenA, MenC, MenY и MenW с белком-носителем, например столбнячным анатоксином.

Капсульные полисахариды могут быть получены способом, описанным в примере 1 US 2003/0068336. Капсульные полисахариды также могут быть получены с использованием среды и способов, описанных, например в US 6933137.

Раскрытые в настоящем изобретении конъюгаты содержат белки-носители. Примеры белков-носителей приведены, например, в работе Pichichero ME. Protein carriers of conjugate vaccines: Characteristics, development, and clinical trials. Human Vaccines & Immunotherapeutics. 2013;9 (12):2505-2523. doi:10.4161/hv.26109, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления белок-носитель включает или состоит из рекомбинантного альфа-экзопротеина (REPA), дифтерийного анатоксина, CRM197, столбнячного анатоксина или С-фрагмента столбнячного токсина. В некоторых вариантах осуществления белок-носитель представляет собой столбнячный анатоксин.

В некоторых вариантах осуществления столбнячный анатоксин (ТТ) получают экстракцией, очисткой сульфатом аммония и инактивацией формалином токсина из культур *Clostridium tetani* (штамм Гарварда), выращенных в среде Мюллера (Миллера) или модифицированной среде Мюллера (Миллера). В некоторых вариантах осуществления ТТ обрабатывают для уменьшения уровня остаточного формальдегида, концентрируют в хлориде натрия и стерилизуют фильтрованием. В некоторых вариантах осуществления ТТ очищают хроматографией, а не очисткой сульфатом аммония. В некоторых вариантах осуществления модифицированная среда Мюллера (Миллера) не содержит инфузии говяжьего сердца. В некоторых вариантах осуществления *Clostridium tetani* выращивают в среде, описанной в WO 2006/042542 в табл. 3, стр. 16.

Некоторые обсуждаемые ниже варианты осуществления включают признак, такой как химический фрагмент (например, гидроксил или О-ацетилирование) или конъюгацию с белком-носителем, который присутствует в заданном количестве на единицу массы полисахарида. Например, определенный признак или комбинация признаков могут присутствовать в количестве, таком как не менее 25 нмоль/мг полисахарида. Это означает, что на 1 мг полисахарида признак или комбинация признаков встречаются по меньшей мере 15×10^{15} раз (где $25 \text{ нмоль} = 25 \times 10^{-9} \text{ моль} \times (6,02 \times 10^{23} \text{ единиц/моль}) = 15 \times 10^{15} \text{ единиц}$).

В некоторых вариантах осуществления полисахариды конъюгата капсульного полисахарида MenC с белком-носителем имеют уровень О-ацетилирования в диапазоне от 0,3 мкмоль/мг полисахарида до 1,6 мкмоль/мг полисахарида. В некоторых вариантах осуществления уровень О-ацетилирования больше или равен 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1 или 1,2 мкмоль/мг полисахарида. В некоторых вариантах осуществления уровень О-ацетилирования меньше или равен 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 или 1,5 мкмоль/мг полисахарида. Например, уровень может составлять от 0,6 до 1,5 мкмоль/мг полисахарида или от 0,8 до 1,4 мкмоль/мг полисахарида. Содержание О-ацетила может быть измерено методом Хестрина (Hestrin et al., J. Biol. Chem. 1949, 180, p. 249).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из конъюгатов в композиции имеет средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от 300 до 1500 кДа. В некоторых таких вариантах осуществления средневзвешенная молекулярная масса больше или равна 400 кДа, 500 кДа, 600 кДа, 700 кДа, 800 кДа, 900 кДа, 1000 кДа или 1100 кДа. В некоторых таких вариантах осуществления средневзвешенная молекулярная масса меньше или равна 600 кДа, 700 кДа, 800 кДа, 900 кДа, 1000 кДа,

1100 кДа, 1200 кДа, 1300 кДа или 1400 кДа. Средневзвешенную молекулярную массу можно определить способами, известными в данной области, например многоугловым рассеянием света (MALS). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один конъюгат в композиции содержит (т.е. представляет собой популяцию молекул, включающую) молекулы, имеющие молекулярную массу в диапазоне от 700 до 1400 кДа. Следует отметить, что некоторые молекулы популяции могут иметь массу в этом диапазоне независимо от того, находится ли средневзвешенная или среднечисловая молекулярная масса в этом диапазоне или нет. Например, популяция молекул со средневзвешенной молекулярной массой 600 или 1500 кДа, вероятно, будет содержать молекулы с молекулярной массой в диапазоне от 700 до 1400 кДа. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один конъюгат в композиции содержит молекулы, имеющие молекулярную массу в диапазоне от 800 до 1300 кДа. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один конъюгат в композиции содержит молекулы, имеющие молекулярную массу в диапазоне 700-800, 800-900, 900-1000, 1000-1100, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400 или 1400-1500 кДа. В некоторых вариантах осуществления конъюгат MenA имеет молекулярную массу, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления конъюгат MenC имеет молекулярную массу, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления конъюгат MenW-135 имеет молекулярную массу, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления конъюгат MenY имеет молекулярную массу, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления молекулярную массу определяют методом многоугольного рассеяния света (MALS). В некоторых вариантах осуществления молекулярную массу определяют методом высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (HPSEC).

В некоторых вариантах осуществления конъюгат, такой как конъюгат MenC, представляет собой популяцию, содержащую связанные одним концом конъюгированные полисахариды, связанные двумя концами полисахариды или их комбинацию. Связанный одним концом конъюгированный полисахарид присоединен одним концом к белку-носителю. Связанный двумя концами конъюгированный полисахарид присоединен обоими концами к белку-носителю. Связанные на конце конъюгированные полисахариды могут быть получены, например, путем расщепления и активации вицинальных диолов в основной цепи полисахарида с обнажением активированных концов, например обработкой периодатом. Например, полисахарид MenC имеет в своем повторяющемся звене вицинальный диол в положении 7, 8 в виде сиаловой кислоты, при этом в одном и том же повторяющемся звене положения 7 и 8 не являются О-ацетилированными. Этот вицинальный диол находится в основной цепи полисахарида, поскольку его расщепление отделяет один сахарид от последующего, т.е. вицинальный диол не является частью боковой цепи. После активации активированные концы могут затем вступать в реакцию с белком-носителем (или с линкером, который будет или уже присоединен к белку-носителю) с образованием конъюгата полисахарида, связанного через концевую группу. Конъюгат является связанным одним концом, если только один из концов (концевых сахаридных остатков) полисахарида связан с белком-носителем (в том числе через линкер, если это применимо). Связанный двумя концами конъюгат содержит белки-носители, связанные с обоими концами полисахарида. Как правило, использование более высокой стехиометрии полисахарида относительно белка-носителя или более низкой общей концентрации реагента будет приводить к смещению реакции конъюгации в сторону образования связанных одним концом продуктов. Напротив, более низкая стехиометрия полисахарида относительно белка-носителя или более высокая общая концентрация реагента будут смещать реакцию конъюгации в сторону образования связанных обоими концами продуктов.

В некоторых вариантах осуществления связанные одним концом конъюгированные полисахариды (например, конъюгаты MenC) имеют концевой несвязанный сахарид, в котором имеется первичный гидроксил в положении 7, или в котором восстанавливающий конец модифицирован (2-гидрокси)этоксигруппой. Это может быть результатом активации полисахарида, содержащего вицинальные диолы в положении 7, 8, периодатом (который дает концевые альдегиды), конъюгации по одному концу и восстановления непрореагировавшего альдегида на другом конце, например, борогидридным реагентом. Первичный гидроксил в положении 7 можно считать концом усеченного остатка сиаловой кислоты. Восстанавливающий конец, который модифицирован (2-гидрокси)этоксигруппой, можно считать остатком сиаловой кислоты, прикрепленным через восстанавливающий конец к фрагменту из 9 и 8 атомов углерода другого остатка и связанных с ними атомов кислорода.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой полисахарид MenW-135 и/или MenY, который содержит одну или более модификаций, выбранных из (i) первичного гидроксила в положении вицинального диола в нативном полисахариде MenW-135 или MenY и (ii) конъюгации с белком-носителем, где модификации присутствуют в количестве не менее 60 нмоль/мг полисахарида. Модификации могут быть получены путем окисления периодатом с последующей конъюгацией с белком-носителем и восстановлением непрореагировавших альдегидов. Стимулированное периодатом расщепление сахаридных остатков может происходить в положениях вицинальных диолов, таких как положения 7,8 или 8,9 сиаловой кислоты, а также потенциально в гексозном кольце повторяющегося звена, особенно если диолы находятся в цис-положении. В некоторых вариантах осуществления модификации присутствуют в количестве менее 200 нмоль/мг полисахарида, менее 150 нмоль/мг полисахарида, менее 100 нмоль/мг полисахарида или менее 80 нмоль/мг полисахарида.

В некоторых вариантах осуществления полисахарид связан с белком-носителем через мостик из вторичного амина. В некоторых вариантах осуществления полисахарид присоединен к белку-носителю, как показано в формуле II



где PS означает присоединение к полисахариду, а PR означает присоединение к белку-носителю. Такой мостик из вторичного амина связь сформировать, например, посредством восстановительного аминирования, при котором первичный амин в белке (например, N-конец или аминоклупа боковой цепи лизина) атакует активированную группу (например, альдегид) в полисахариде, образуя основание Шиффа, которое затем восстанавливают с образованием вторичного амина. Восстановление может быть осуществлено с использованием подходящего восстанавливающего реагента, такого как цианоборогидрид (например, цианоборогидрид натрия) или борана (например, пиридиноборана или пикколиноборана).

В некоторых вариантах осуществления размер конъюгата полисахарида MenC уменьшен в 3-8 раз по сравнению с нативным полисахаридом MenC, например, в 3-4, 4-5, 5-6, 6-7 или 7-8 раз. Расщепление периодатом приводит к отделению соседних повторяющихся звеньев и, таким образом, уменьшению размера полисахарида. Размер может быть дополнительно уменьшен обработкой, такой как нагревание и/или обработка кислотой, например, перед обработкой периодатом. Также можно использовать другие известные способы уменьшения размера, такие как обработка ультразвуком или микрофлюидизация.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат полисахарида MenA имеет массовое отношение полисахарида к белку-носителю в пределах от 0,3 до 1,5, например от 0,3 до 0,4, от 0,4 до 0,5, от 0,5 до 0,6, от 0,6 до 0,7, от 0,7 до 0,8, от 0,8 до 0,9, 0,9 до 1,0, от 1,0 до 1,1, от 1,1 до 1,2, от 1,2 до 1,3, от 1,3 до 1,4 или от 1,4 до 1,5. В некоторых вариантах осуществления конъюгат полисахарида MenA имеет массовое отношение полисахарида к белку-носителю в пределах от 0,5 до 1,5.

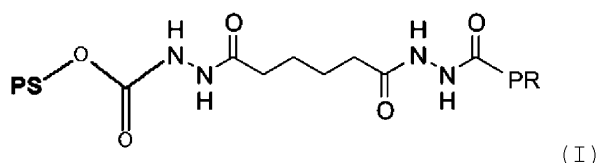
В некоторых вариантах осуществления конъюгат полисахарида MenC имеет массовое отношение полисахарида к белку-носителю в пределах от 0,3 до 1,1, например от 0,3 до 0,4, от 0,4 до 0,5, от 0,5 до 0,6, от 0,6 до 0,7, от 0,7 до 0,8, от 0,8 до 0,9, 0,9 до 1,0 или от 1,0 до 1,1.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат полисахарида MenW-135 имеет массовое отношение полисахарида к белку-носителю в пределах от 0,3 до 1,3, например от 0,3 до 0,4, от 0,4 до 0,5, от 0,5 до 0,6, от 0,6 до 0,7, от 0,7 до 0,8, от 0,8 до 0,9, 0,9 до 1,0, от 1,0 до 1,1, от 1,1 до 1,2 или от 1,2 до 1,3.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат полисахарида MenY имеет массовое отношение полисахарида к белку-носителю в пределах от 0,5 до 1,3, например, от 0,3 до 0,4, от 0,4 до 0,5, от 0,5 до 0,6, от 0,6 до 0,7, от 0,7 до 0,8, от 0,8 до 0,9, 0,9 до 1,0, от 1,0 до 1,1, от 1,1 до 1,2 или от 1,2 до 1,3.

В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция, представленная в настоящем изобретении, содержит менее 20% по массе свободного полисахарида, например, содержит менее 10% по массе свободного полисахарида, менее 5% по массе свободного полисахарида или по существу не содержит свободного полисахарида. "По существу не содержит свободный полисахарид" означает, что уровень свободного полисахарида ниже предела обнаружения анализа осаждения дезоксихолатом, в котором конъюгированный с белком полисахарид осаждает дезоксихолатом и анализируют оставшийся в растворе полисахарид, например, как описано у Lei et al., "Quantification of free polysaccharide in meningococcal polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccines", Dev Biol (Basel). 2000; 103: 259-64 (PMID: 11214246).

В некоторых вариантах осуществления полисахарид присоединен к белку-носителю через линкер, содержащий 2-10 линейных атомов углерода, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 атомов углерода. "Линейные атомы углерода" представляют собой атомы углерода, расположенные вдоль цепи в направлении от полисахарида к белку-носителю, и не включают атомы углерода, содержащиеся в ответвлении этой цепи. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит спейсер между первым карбонилем и вторым карбонилем, и спейсер содержит 4-8 атомов углерода (например, 4, 5, 6, 7 или 8 атомов углерода), которые могут быть линейными атомами углерода. Первый карбонил может быть частью карбамата. Второй карбонил может быть частью амида. Первый карбонил может быть проксимальным к полисахариду и дистальным к белку-носителю. Второй карбонил может быть проксимальным к белку-носителю и дистальным к полисахариду. Линкер может содержать остаток дигидразида, такого как дигидразид адипиновой кислоты (ADH). В некоторых вариантах осуществления полисахарид присоединен к белку-носителю через линкер формулы I



(I)

где PS означает присоединение к полисахариду, а PR означает присоединение к белку-носителю. Отдельный полисахарид может быть присоединен к одному или более белкам-носителям (в разных положениях) и наоборот.

В некоторых вариантах осуществления линкер присутствует в конъюгате в соотношении один лин-

кер на 10-100 сахаридных повторяющихся звеньев, например 20-60. Включены линкеры, к которым присоединены как белок-носитель, так и полисахарид, а также линкеры, присоединенные только к полисахариду, т.е. которые не образуют соединений с белком-носителем.

В некоторых вариантах осуществления предлагается конъюгат капсульного полисахарида *Neisseria meningitidis*, соединенного с белком-носителем через линкер, в котором линкер присутствует в количестве 1 линкер на 10-100 повторяющихся полисахаридных звеньев, например 1 линкер на 10-20 повторяющихся звеньев, 1 линкер на 20-30 повторяющихся звеньев, 1 линкер на 30-40 повторяющихся звеньев, 1 линкер на 40-50 повторяющихся звеньев, 1 линкер на 50-60 повторяющихся звеньев или 1 линкер на 60-70 повторяющихся звеньев. В некоторых вариантах осуществления полисахарид MenA присоединен к белку-носителю через линкер, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления полисахарид MenC присоединен к белку-носителю через линкер, как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления композиция полисахаридного конъюгата по настоящему изобретению обладает улучшенной стабильностью по сравнению с существующими композициями. В некоторых вариантах осуществления стабильность тестируют на наличие свободного полисахарида, соответствующего каждому конъюгированному полисахариду, в количестве менее 40% после хранения при 2-8°C, например, в течение 2,5, 3, 3,5, 4 или 4,5 лет. В некоторых вариантах осуществления стабильность тестируют на наличие свободного полисахарида, соответствующего каждому конъюгированному полисахариду, в количестве менее 40% после хранения при 23°C-27°C, например, в течение 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев. Некоторые четырехвалентные полисахаридные конъюгатные вакцины MenACYW, приготовленные в виде жидких составов, требуют лиофилизации или других мер консервирования, по меньшей мере отчасти из-за низкой стабильности одного или более содержащихся в ней конъюгатов. Лиофилизация усложняет как изготовление, так и введение по сравнению с одним жидким составом. В некоторых вариантах осуществления полисахарид присоединен к белку-носителю в нескольких точках. Многоточечное присоединение, как правило, является следствием химии конъюгации, например активации периодата с последующим восстановительным аминированием или связывания с участием карбонилдимидазола (необязательно через линкер), которое может создавать каркас из белка-носителя и полисахарида, в сочетании с подходящим размером полисахарида и коэффициентом загрузки. Подробное обсуждения такой приведенной в качестве примера химии, см. ниже в примерах. Приведенные в качестве примера размеры полисахаридов и коэффициенты загрузки, совместимые с образованием белок-полисахаридного каркаса со множеством точек присоединения, составляют по меньшей мере 30 кДа (и приведенные выше в качестве примера диапазоны размеров) и отношения полисахарид/белок, составляющие от 0,3 до 1,5 (и приведенные выше в качестве примера диапазоны коэффициентов загрузки). Не ограничиваясь конкретной теорией, обеспечение конъюгатов несколькими точками присоединения между полисахаридом и белком-носителем может обеспечить длительную стабильность конъюгата, в котором для высвобождения полисахаридных фрагментов из белка-носителя должно произойти несколько событий расщепления (например, гидролитического). Такого рода улучшение длительной стабильности может оказаться особенно актуальным для полисахарида MenA, который имеет фосфодиэфирные мостики, которые при хранении в жидкости могут быть более нестабильными, чем гликозидные связи. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит полисахарид MenA с несколькими точками прикрепления к белку-носителю. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит полисахарид MenC с несколькими точками прикрепления к белку-носителю. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит полисахарид MenY с несколькими точками прикрепления к белку-носителю. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит полисахарид MenW-135 с несколькими точками прикрепления к белку-носителю. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит полисахариды MenA, MenC, MenY и MenW-135, каждый из которых имеет несколько точек прикрепления к белку-носителю.

В некоторых вариантах осуществления описанная в настоящем изобретении вакцинная композиция предоставлена в виде жидкой композиции в шприце, например в предварительно заполненном и/или не содержащем силикона шприце. В некоторых вариантах осуществления такой шприц коммерчески упакован для продажи и/или распространения.

С. Приведенные в качестве примера способы получения конъюгатов и вакцин

В настоящем изобретении представлены способы получения и/или очистки конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем.

Реагент (такой как активирующий агент) считается присутствующим в заданном количестве в одном из этапов (например, этапе активации), если он присутствует в таком количестве в любой момент времени во время соответствующего этапа или реакции (например, когда реакция запущена).

В некоторых вариантах осуществления предложен способ получения конъюгата полисахарида с белком-носителем. В некоторых вариантах осуществления полисахарид подвергают де-О-ацетилированию, например, щелочным гидролизом. Например, можно использовать гидроксид, такой как NaOH или КОН, например, в концентрации 50-150, 60-140, 70-130, 80-120, 90-110 или 95-100 mM. В некоторых вариантах осуществления гидроксид находится в концентрации 50, 60, 70, 80, 90 или 100 mM. В некоторых вариантах осуществления гидроксид находится в концентрации 100 mM. Де-О-

ацетилирование можно проводить в течение времени и при температуре, достаточных для де-О-ацетилирования полисахарида на 40-70% или на 50-60% по отношению к исходному количеству. В некоторых вариантах осуществления де-О-ацетилирование можно проводить в течение времени и при температуре, достаточных для де-О-ацетилирования полисахарида на 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по отношению к исходному количеству. В некоторых вариантах осуществления после де-О-ацетилирования полисахарид имеет уровень О-ацетилирования в диапазоне от 0,6 мкмоль/мг полисахарида до 1,5 мкмоль/мг полисахарида или от 0,8 до 1,4 мкмоль/мг полисахарида. В некоторых вариантах осуществления уровень О-ацетилирования больше или равен 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2,0 мкмоль/мг полисахарида.

В некоторых вариантах осуществления уровень О-ацетилирования меньше или равен 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3 или 1,4 мкмоль/мг полисахарида.

В некоторых вариантах осуществления полисахарид деполимеризуют, например, нагреванием, обработкой кислотой, обработкой ультразвуком, микрофлюидизацией или их комбинацией, такой как нагревание и кислота. Например, полисахарид может быть нагрет до 40-80°C (например, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75°C) и/или подвергнут воздействию умеренно кислого pH, например 5, 5,5, 6 или 6,5 или выше. Полисахарид может быть деполимеризован до средневзвешенной молекулярной массы, например от 50 до 200 кДа, такой как 50, 75, 100, 125, 150, 175 или 200.

В некоторых способах используется активирующий агент, способный образовывать карбаматный мостик, примеры которого известны в данной области. Активирующий агент, способный образовывать карбаматный мостик, может представлять собой соединение, имеющее карбонил, присоединенный к двум уходящим группам, таким как N-связанные гетероарилы, такие как имидазол, пиридин, пиримидин, пурин, триазин, пиразин, тиазин, тиазол и т.д. В некоторых вариантах осуществления активирующим агентом является карбонилдиимидазол. Активирующий агент может присутствовать в 20-50-кратном молярном избытке относительно полисахарида, например, в 20-25-кратном, 25-30-кратном, 30-35-кратном, 35-40-кратном, 40-45-кратном или 45-50-кратном избытке.

В некоторых вариантах осуществления линкер, такой как дигидразидный линкер, реагирует с активированным полисахаридом, например, в молярном отношении от 0,3 до 1,0 по отношению к повторяющимся полисахаридным звеньям, например от 0,3 до 0,4, от 0,4 до 0,5, от 0,5 до 0,6, от 0,6 до 0,7, от 0,7 до 0,8, от 0,8 до 0,9 или от 0,9 до 1,0. В некоторых вариантах осуществления дигидразидный линкер представляет собой дигидразид адипиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления полисахарид дериватизируют с помощью линкера таким образом, чтобы он содержал один линкер на 10-100 повторяющихся звеньев, например, один линкер на 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90 или 90-100 повторяющихся звеньев. В некоторых вариантах осуществления полисахарид дериватизируют с помощью линкера таким образом, чтобы он содержал один линкер на 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 повторяющихся звеньев.

В некоторых вариантах осуществления полисахарид активируют обработкой окислителем, таким как периодат, например метапериодат натрия (также известный как периодат натрия). В некоторых вариантах окислитель реагирует с полисахаридом с образованием альдегидов. В некоторых вариантах осуществления альдегиды образуются в боковых цепях полисахарида, например, в полисахаридах MenW-135 и MenY. В некоторых вариантах осуществления альдегиды образуются путем расщепления основной цепи полисахарида и образуются на концах, например, в полисахариде MenC. Окислительная обработка может быть выполнена с использованием окислителя в количестве, равном примерно 2 mM, например, от 1,5 до 3 mM. Окислительная обработка может быть выполнена при 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 или 3,0 mM. Окислительную обработку можно выполнять при температуре и в течение времени, достаточных для получения по меньшей мере 20 нмоль/мг полисахарида, например, 20-30, 20-40, 20-50, 20-60, 20-70, 20-80, 20-90, 20-100, 20-150, 20-160, 20-170, 20-180, 20-190 или 20-200 нмоль/мг. Окислительную обработку можно выполнять при температуре и в течение времени, достаточных для получения по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 нмоль/мг полисахарида. В некоторых вариантах осуществления окислительную обработку выполняют при pH в диапазоне от 6,5 до 9,5 или имеет pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 или 9,5. В некоторых вариантах осуществления окислительную обработку выполняют в жидком растворе при температуре ниже комнатной, например, ниже 20, 15, 10 или 5°C.

Когда конъюгация происходит через восстановительное аминирование, основания Шиффа могут быть восстановлены подходящим восстановителем, таким как цианоборогидрид (например, NaCN·BH₃), или боран, такой как пиридиноборан или пиколиноборан.

После конъюгации, при которой присутствуют непрореагировавшие альдегиды, конъюгат можно стабилизировать путем восстановления или аминирования альдегидов. Борогидрид, такой как NABH₄, является подходящим восстанавливающим реагентом. Аммиак, метиламин, глицин, аланин и т.п. подходят для аминирования непрореагировавших альдегидов.

В некоторых вариантах осуществления после конъюгации следует очистка. Один из способов очистки, включающий ультрафильтрацию в присутствии сульфата аммония, описан в патенте США No. 6,146,902. Альтернативно конъюгаты могут быть очищены от непрореагировавшего белка и полисахарида любым количеством стандартных методов, включая, среди прочего, гель-фильтрационную хроматографию, центрифугирование в градиенте плотности, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию смешанного типа на комбинированных смолах или фракционирование сульфатом аммония. См., например, P.W. Anderson, et. al. (1986). J. Immunol. 137: 1181-1186. См. также H. J. Jennings and C. Lugowski (1981) J. Immunol. 127: 1011-1018.

В некоторых вариантах осуществления выполняют хроматографию гидрофобного взаимодействия (HIC). Можно использовать смолу, такую как смола с фенильными, гексильными, гептильными, октильными, нонильными или децильными группами. Смесь может быть загружена на смолу для очистки конъюгата от свободного полисахарида. В некоторых вариантах осуществления смесь содержит соль, такую как сульфат аммония. В некоторых вариантах осуществления pH загружаемой смеси регулируют таким образом, чтобы pH был приближен к нейтральному. В некоторых вариантах осуществления pH загружаемой смеси равен, или его регулируют до 5,5-8,5, 6-8, 6,5-7,5 или 7. Соль может присутствовать в концентрации, например, от 0,5 М до 1,5 М, например от 0,5 М до 0,7 М, от 0,7 М до 0,9 М, от 0,9 М до 1,1 М, от 1,1 М до 1,3 М или от 1,3 М до 1,5 М. После загрузки смолу можно промыть солевым раствором, например, содержащим сульфат аммония, в котором концентрация соли может быть, например, такой, как указано в предыдущем предложении. В некоторых вариантах осуществления смола находится в колонке, и объем промывки составляет, по меньшей мере, два, три, четыре, пять или шесть объемов колонки, например, до 7, 8, 9 или 10 объемов колонки. В некоторых вариантах осуществления смолу промывают порциями солевого раствора, например, двумя или более порциями, при этом совокупный объем порций, по меньшей мере, в 2, 3, 4, 5, 6 или 7 раз превышает объем смеси до загрузки.

Конъюгат может более сильно взаимодействовать со смолой, например, при высокой ионной силе, и свободный полисахарид может вымываться. Конъюгат может быть элюирован из смолы путем промывки элюентом с низкой ионной силой, таким как вода, например, WFI. Альтернативно можно использовать раствор с низким содержанием соли, например, имеющим концентрацию соли (например, ацетатной соли, такой как ацетат натрия), меньшую или равную 0,2, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01 или 0,005 М. В некоторых вариантах осуществления элюат содержит менее 20% по массе свободного полисахарида, например менее 10% по массе свободного полисахарида, менее 5% по массе свободного полисахарида или по существу не содержит свободного полисахарида.

В некоторых вариантах осуществления способ получения конъюгата капсульного полисахарида *Neisseria meningitidis* с белком-носителем включает

а) активацию полисахарида активирующим агентом, который может образовывать карбаматный мостик (например, карбонилдиимидазольный), где активирующий агент присутствует в 20-50-кратном молярном избытке относительно полисахарида;

б) блокирование активирующего агента (например, водой) и дериватизацию активированного полисахарида дигидразидным линкером, добавленным в молярном отношении от 0,3 до 1,0 по отношению к повторяющимся полисахаридным звеньям, где полисахарид дериватизирован в соотношении один дигидразидный линкер на 10-100 сахаридных повторяющихся звеньев;

с) конъюгацию дериватизированного полисахарида с белком-носителем через карбодиимидную группу, где полисахарид присутствует в начале реакции конъюгации в массовом отношении к белку-носителю от 3:1 до 5:1, образуя, таким образом, конъюгат.

В некоторых вариантах осуществления способ получения конъюгата капсульного полисахарида *Neisseria meningitidis* с белком-носителем включает

а) частичное де-О-ацетилирование полисахарида методом щелочного гидролиза;

б) активацию полисахарида обработкой периодатом, превращая таким образом диолы в альдегиды до уровня, по меньшей мере, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 50 нмоль альдегида на мг полисахарида;

с) конъюгацию активированного полисахарида с белком-носителем путем восстановительного аминирования, где полисахарид присутствует в реакции конъюгации в массовом отношении от 0,5-1 до 5:1 относительно белка-носителя, образуя, таким образом, конъюгат.

В некоторых вариантах осуществления способ получения конъюгата капсульного полисахарида *Neisseria meningitidis* с белком-носителем включает

а) активацию полисахарида путем обработки периодатом, превращая таким образом диолы в альдегиды до уровня, по меньшей мере, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 нмоль альдегида на мг полисахарида; а также

б) конъюгацию активированного полисахарида с белком-носителем путем восстановительного аминирования, где полисахарид присутствует в реакции конъюгации в массовом отношении к белку-носителю от 1:1 до 5:1, образуя, таким образом, конъюгат.

В некоторых вариантах осуществления способ очистки дополнительно включает очистку конъюгата методом хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC).

А. Приведенные в качестве примера вакцинные составы

Вакцинные композиции по настоящему изобретению могут быть приготовлены известными в данной области способами. Вакцинные композиции/составы по настоящему изобретению также могут содержать один или более адъювантов. Адъюванты включают в качестве примера, без ограничения, адъюванты алюминия, адъювант Фрейнда, BAY, DC-chol, pcpp, монофосфорилилипид А, CpG, QS-21, холерный токсин и формилметионилпептид. См., например, Vaccine Design, the Subunit and Adjuvant Approach, 1995 (M. F. Powell and M. J. Newman, eds., Plenum Press, N.Y.). Адъювант, если он присутствует, может представлять собой адъювант алюминия, такой как гидроксид алюминия или фосфат алюминия. В некоторых вариантах осуществления вакцинные композиции и составы, например вакцина MenACWY-TT, не содержат адъюванта. В некоторых вариантах осуществления вакцинные композиции и составы, например вакцина MenACWY-TT, содержат адъювант.

Вакцинные композиции и составы (например, конъюгатные вакцины/вакцина MenACWY-TT) по настоящему изобретению можно вводить в виде одной или нескольких доз (т.е. с "бустером" или "бустерами") или в качестве бустера после более раннего введения другой вакцины против *Neisseria meningitidis*, такой как конъюгатная вакцина капсульного сахара Neisseria meningitidis. Например, ребенок может получить единичную дозу в раннем возрасте, а затем через десять лет может быть введена бустерная доза, как рекомендуется в настоящее время для других вакцин для предотвращения детских заболеваний. В некоторых вариантах осуществления дозу вакцины, описанную в настоящем изобретении, вводят через промежуток времени, составляющий от двух месяцев до десяти лет, после ранее введенной конъюгатной вакцины капсульного сахара *Neisseria meningitidis*, например от двух до четырех месяцев, от четырех до шести месяцев, от шести до двенадцати месяцев, от года до двух лет, от 2 до 3 лет, от 3 до 4 лет, от 4 до 5 лет, от 5 до 6 лет, от 6 до 7 лет, от 7 до 8 лет, от 8 до 9 лет или от 9 до 10 лет после ранее введенной конъюгатной вакцины капсульного сахара *Neisseria meningitidis*.

Бустерная доза будет генерировать антитела из примированных В-клеток, т.е. анамнестическую реакцию. Таким образом, вакцинные композиции и составы, например вакцина MenACWY-TT, вызывает высокий первичный (т.е. после однократного введения вакцины) функциональный антителный ответ в более молодых и более старых популяциях и способен вызывать анамнестическую реакцию (т.е. после бустерного введения), демонстрируя, что защитный иммунный ответ, вызванный вакцинными композициями и составами, например вакциной MenACWY-TT по настоящему изобретению, является длительным.

В некоторых вариантах осуществления введение представляет собой внутримышечную инъекцию. В некоторых вариантах осуществления введение является подкожным, внутрикожным, внутрибрюшинным, парентеральным или внутривенным. Композиции и составы могут находиться в смеси с подходящим носителем, разбавителем или наполнителем, таким как забуференный солевой раствор ацетата натрия, стерильная вода, физиологический солевой раствор или т.п. Композиции/составы также могут быть лиофилизированы. Композиции/составы могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты, pH-буферные агенты, гелеобразующие или повышающие вязкость добавки, консерванты и т.п., в зависимости от пути введения и требуемого препарата. Для приготовления подходящих препаратов без излишнего экспериментирования могут быть использованы стандартные тексты, такие как "Фармацевтические науки ремингтона", 17-е издание, 1985 г., включенное в настоящий документ в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция/состав представляет собой жидкий препарат. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция/состав, например вакцина MenACWY-TT, представляет собой жидкую композицию, которую вводят путем инъекции животным, детям, особенно маленьким детям, пожилым людям, например, старше 55, 60, 65, 70, 75, 80 или 90.

Выбор подходящих носителей и других добавок будет зависеть от точного пути введения и природы конкретной лекарственной формы.

В одном из вариантов осуществления вакцинные композиции и составы, например вакцина MenACWY-TT, содержат фармацевтически приемлемый консервант, носитель, буферный наполнитель и т.п. В одном из вариантов осуществления фармацевтически приемлемый консервант, носитель или наполнитель увеличивает или продлевает срок годности композиций. В некоторых вариантах осуществления вакцина содержит буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой ацетат натрия. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой фосфат натрия. В некоторых вариантах осуществления буфер присутствует в концентрации в диапазоне от 10 до 100 мМ, например от 10 до 70 мМ, от 15 до 45 мМ, от 20 до 40 мМ, от 40 до 60 мМ или от 60 до 100 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер имеет pH от 4,5 до 7,5, от 4,5 до 7,0, от 4,5 до 6,5, от 4,5 до 6,0, от 4,5 до 5,5 или от 4,5 до 5,0. В некоторых вариантах осуществления буфер имеет pH от 5,5 до 7,0, например, от 5,75 до 6,25 или от 6,25 до 6,75. В некоторых вариантах осуществления буфер имеет pH от 5,5 до 6,5. В некоторых вариантах осуществления буфер имеет pH 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция содержит фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция/состав содержит физиологический раствор. В некоторых вариантах осуществления солевой раствор содержит или представляет собой NaCl. NaCl может присутствовать в концентрации от 0,45 до 0,9% мас./об., например от 0,5 до 0,85% мас./об., или от 0,6 до 0,8% мас./об., или 0,6%, 0,67%,

0,75%, 0,8%, 0,85%, или 0,9%.

В одном из вариантов осуществления каждый компонент композиции является химически инертным по отношению к конъюгатам полисахарида *N. meningitidis* с белком-носителем.

В некоторых вариантах осуществления вакцинные композиции и составы, например вакцина MenACWY-TT, приготовлены в виде единичной стандартной дозы. В некоторых вариантах осуществления единичная стандартная доза включает от 6 мкг до 15 мкг каждого из полисахаридов MenA, MenC, MenW-135 и MenY. В некоторых вариантах осуществления единичная стандартная доза содержит 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 мкг каждого из полисахаридов MenA, MenC, MenW-135 и MenY. В некоторых вариантах осуществления в единичной стандартной дозе белок-носитель присутствует в количестве от 50 мкг до 80 мкг. В некоторых вариантах осуществления в единичной стандартной дозе белок-носитель присутствует в количестве от 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80 мкг.

В некоторых вариантах осуществления вакцинные композиции и составы, например вакцину MenACWY-TT, готовят в виде 0,5 мл дозы в ацетате натрия, забуференном ацетатом натрия физиологическом растворе или аналогичном буфере. В некоторых вариантах осуществления 0,5 мл доза включает 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 мкг каждой из серогрупп A, C, Y и W-135, конъюгированной с 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85 или 90 мкг белка столбнячного анатоксина. В некоторых вариантах осуществления эту 0,5 мл дозу вводят внутримышечно.

В. Приведенные в качестве примера методы и типы применения

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ вакцинации субъекта против *Neisseria meningitidis* включает введение вакцинных композиций или составов, например вакцины MenACWY-TT, описанных в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления изобретение включает применение описанной в настоящем изобретении вакцинной композиции или препарата для иммунизации субъекта против *Neisseria meningitidis*. В некоторых вариантах осуществления предоставляется применение вакцинной композиции или состава, описанных в настоящем описании, для изготовления лекарственного средства для иммунизации субъекта против *Neisseria meningitidis*.

В некоторых вариантах осуществления вакцинируемому субъекту 12 месяцев или более. В некоторых вариантах осуществления при вакцинации субъект находится в пожилом возрасте. В некоторых вариантах осуществления возраст взрослого пожилого человека при вакцинации составляет 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 100 лет.

В некоторых вариантах осуществления на момент вакцинации субъекту от 6 недель до 3 лет. В некоторых вариантах осуществления на момент вакцинации возраст субъекта составляет 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 недель. В некоторых вариантах осуществления субъекта вакцинируют в 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 12 месяцев и/или 15 месяцев. В некоторых вариантах осуществления субъекта вакцинируют в зависимости от возраста. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят три дозы вакцинных композиций или составов, например, описанной в настоящем изобретении вакцины MenACWY-TT, в 6-8, 10-12 и 14-16 недель.

В некоторых вариантах осуществления субъекта вакцинируют более одного раза в течение жизни. В некоторых вариантах осуществления субъект получает бустерную дозу через 3 года или более после первой дозы. В некоторых вариантах осуществления субъект получает бустерную дозу через 4 года или более после первой дозы. В некоторых вариантах осуществления субъекта вакцинируют до трех раз до его первого дня рождения и один раз незадолго до или после первого дня рождения. В некоторых вариантах осуществления первая вакцинация проводится в возрасте 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 недель. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая вакцинация проводится в возрасте 3, 4 или 5 месяцев. В некоторых вариантах осуществления первая, вторая или третья вакцинация проводится в возрасте 5, 6 или 7 месяцев. В некоторых вариантах осуществления первая, вторая, третья или четвертая вакцинация проводится в возрасте 11, 12, 13, 14 или 15 месяцев. В некоторых вариантах осуществления первая, вторая, третья или четвертая вакцинация проводится в возрасте 14, 15, 16, 17 или 18 месяцев. В некоторых вариантах осуществления первая вакцинация проводится через 6, 7, 8 или 9 месяцев, а вторая вакцинация проводится до 24 месяцев. В некоторых вариантах осуществления субъекта вакцинируют в пожилом возрасте независимо от того, получал ли он ранее MenACWY-TT или другую вакцину против *Neisseria meningitidis*. В некоторых вариантах осуществления при вакцинации вакцинными композициями или составами, например вакциной MenACWY-TT, описанной в настоящем изобретении, субъекту исполнилось 50 лет или более, 55 лет или более, 60 лет или более или 65 лет или более.

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении вакцинные композиции или составы, например вакцину MenACWY-TT, вводят одновременно с другими стандартными вакцинами. В некоторых вариантах осуществления стандартные вакцины включают, например, Pentacel® (DTaP5-IPV/Hib), Prevnar® (PCV7), Prevnar 13® (PCV13), RotaTeq® (RV5), ROTARIX® (RV1), ENGERIX-B® (HepB), вакцины RECOMBIVAX HB® (HepB), MMR® (MMR), MMR®_{II} (MMR) и VARI-VAX® (V). В некоторых вариантах осуществления стандартные вакцины включают, например, Adacel® (Tdap5) и Gardasil® (HPV4). В некоторых вариантах осуществления стандартные вакцины включают DTaP5-IPV/HibHepB. Другие стандартные вакцины известны в данной области и могут быть предостав-

лены субъекту в то же самое время, до или после введения описанных в настоящем изобретении вакцинных композиций или составов, например вакцины MenACWY-TT.

IV Примеры

Ниже приведены примеры способов, применения и композиций, раскрытых в настоящем изобретении. Очевидно, что учитывая представленное выше общее и подробное описание, могут быть применены различные другие варианты осуществления. Приведенные ниже примеры даны с целью иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем раскрытия или формулы изобретения.

1. Приготовление конъюгатов группы А.

Пример 1А.

Очищенный капсульный полисахарид группы А растворяют в 10 мас.% тетрабутиламмония хлорида (TBAC) в диметилсульфоксиде (DMSO) до целевой концентрации 8 мг/мл. Раствор перемешивают до полного растворения полисахарида при 19-25°C. Растворенный полисахарид активируют путем добавления целевой концентрации карбонилдимидазола (CDI) в 35-45-ти кратном молярном избытке относительно N-ацетилманнозамин фосфатных повторяющихся звеньев (PS RU) и перемешивают в течение 50-70 мин при 19-25°C (фиг. 1C, первая реакция; продукт, показанный на фиг. 1E). Раствор полисахарида разбавляют WFI в отношении 1:2 (50% об./об.), доводя концентрацию активированного полисахарида до 4 мг/мл в 50% ДМСО. Раствор дериватизируют путем добавления дигидрида адипиновой кислоты (ADH) (1,0 моль ADH на 1-3 моль PS RU) (фиг. 1C, вторая реакция; продукт, показанный на фиг. 1F) и перемешивают в течение ночи при комнатной температуре. Реакция дает такое количество дериватизации, что один связанный ADH приходится на 10-100 повторяющихся полисахаридных звеньев, например один связанный ADH на 20, 30, 40, 50 или 60 повторяющихся полисахаридных звеньев. Активированный полисахарид концентрируют ультрафильтрацией на мембране MESCO PES 10 кДа, а затем подвергают диафильтрации против 12-18 объемных обменов физиологического раствора. Целевая концентрация составляет примерно 30 мг/мл. Активированный полисахарид отфильтровывают и хранят при 1-5°C.

Очищенный белок столбнячного анатоксина (TT) фильтруют через 0,2 микронную мембрану и хранят при 1-5°C. Дериватизированный полисахарид и концентрированный столбнячный белок смешивают вместе в отношении 0,5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1. Аликвоту 100 мг/мл сшивающего агента, 1-этил-3-(диметиламинопропил) карбодиимида (EDAC), в 1,0 М буфере MES, pH 5,7 добавляют к смеси полисахарид-белок в количестве, необходимом для получения конечной концентрации EDAC 10 мг/мл, а MES - 100 mM.

Солевой раствор добавляют для получения целевых концентраций 16 мг/мл полисахарида и 4 мг/мл TT. Конечный pH доводят до 5,5-5,9, и реакционную смесь перемешивают при 15,6-23,9°C в течение 16-24 ч. В течение этого времени EDAC и TT вступают в реакцию с образованием интермедиата, О-ацелизомочевина (фиг. 1B). Затем интермедиат, О-ацелизомочевина, и дериватизированный полисахарид образуют конъюгат (фиг. 1G; продукты, показанные на фиг. 1H и фиг. 1A).

К реакционной смеси конъюгата добавляют сульфат аммония с получением 1M концентрации сульфата аммония. Значение pH доводят до 7 и перемешивают до растворения при комнатной температуре. Реакционную смесь конъюгата наносят на колонку HIC, заполненную смолой с фенильными группами. Неконъюгированный полисахарид элюируют 2-7 объемами колонки 1M раствора сульфата аммония. Конъюгат элюируют WFI. В этом и последующих примерах HIC-очистка конъюгата может обеспечить продукт, в котором менее 20% по массе полисахарида является свободным (неконъюгированным) полисахаридом. Элюат конъюгата подвергают диафильтрации против 10 объемных обменов 50 mM ацетата натрия, pH 6,0, используя мембрану PW MWCO 100 кДа. Окончательную фильтрацию очищенного конъюгата выполняют, используя 0,2 микронные мембраны, и конъюгат хранят при 1-5°C.

Пример 1В.

Очищенный капсульный полисахарид группы А растворяют в смеси тетрабутиламмония хлорид (TBAC)/диметилсульфоксид (DMSO) по массе до целевой концентрации 6 мг/мл. Раствор перемешивают в течение 16-24 ч при 19-25°C. Растворенный полисахарид активируют путем добавления целевой концентрации карбонилдимидазола (CDI) в 35-45-кратном молярном избытке относительно N-ацетилманнозамин фосфатных повторяющихся звеньев (PS RU) и перемешивают в течение 50-70 мин при 19-25°C (фиг. 1C, первая реакция; продукт, показанный на фиг. 1E). Раствор полисахарида разбавляют WFI в отношении 1:2 (45-55% об./об.) так, чтобы активированный полисахарид находился в целевой концентрации 3 мг/мл в 50% DMSO.

Очищенный белок столбнячного анатоксина (TT) фильтруют через 0,2 микронную мембрану и хранят при 1-5°C. Столбнячный белок добавляют до конечной концентрации 1 мг/мл. В течение этого времени активированный полисахарид и TT реагируют с образованием конъюгата через карбаматный мостик (фиг. 1D). Реакция протекает в течение ночи при комнатной температуре.

К реакционной смеси конъюгата добавляют сульфат аммония с получением 1M концентрации сульфата аммония. Значение pH доводят до 7 и перемешивают до растворения при комнатной температуре. Реакционную смесь конъюгата наносят на колонку HIC, заполненную смолой с фенильными группами. Неконъюгированный полисахарид элюируют 2-7 объемами колонки 1M раствора сульфата аммо-

ния. Конъюгат элюируют WFI. В этом и последующих примерах НИС-очистка конъюгата может обеспечить продукт, в котором менее 20% по массе полисахарида является свободным (неконъюгированным) полисахаридом. Элюат конъюгата подвергали диафильтрации против 10 объемных обменов 50 мМ ацетата натрия, pH 6,0, используя мембрану PW MWCO 100 кДа. Окончательную фильтрацию очищенного конъюгата выполняют, используя 0,2 микронные мембраны, и конъюгат хранят при 1-5°C.

2. Приготовление конъюгатов группы С.

Пример 2А.

Очищенный капсульный полисахарид группы С растворяют в физиологическом растворе до целевой концентрации 10 мг/мл. Раствор перемешивают до полного растворения. Температуру раствора полисахарида доводят до 37°C, и добавляют гидроксид натрия (NaOH) до целевой конечной концентрации 100 мМ NaOH. Раствор перемешивают и инкубируют в течение 20 мин, обеспечивая частичное де-О-ацетилирование такое, чтобы полисахарид в конечном конъюгате имел уровень О-ацетилирования от 0,8 до 1,4 мкмоль ОАс/мг полисахарида, и/или его уровень был снижен на 50% до 60% относительно уровня О-ацетилирования исходного материала. Нативный полисахарид MenC имеет два потенциальных положения О-ацетилирования в моносахаридном повторяющемся звене и, как правило, имеет 40-45% общий уровень О-ацетилирования всех возможных сайтов О-ацетилирования. Уменьшение О-ацетильных групп на 50% по сравнению с исходным материалом дает общий уровень О-ацетилирования (всех возможных сайтов О-ацетилирования) менее 25%.

Значение pH доводят до 6, а температуру снижают до 15°C. Растворенный полисахарид активируют добавлением метапериодата натрия (фиг. 2В) в количестве, необходимом для получения целевой концентрации 2 мМ. Значение pH доводят до 6, и раствор перемешивают при 15°C. Периодат окисляется и расщепляется в соседних положениях диола, образуя цепи с альдегидными группами на конце. Реакцию перемешивают до тех пор, пока средний размер молекулы не уменьшится до 50000-10000 Дальтон согласно результатам HPSEC. Восстанавливающая активность (отражающая количество альдегидов) составляет от 40 до 100 нмоль/мг полисахарида. Реакцию останавливают добавлением глицерина в количестве 0,5 мл глицерина на грамм полисахарида и перемешивают в течение минимум 5 мин. Полисахарид сначала концентрируют ультрафильтрацией через фильтр из регенерированной целлюлозы с молекулярной массой 5 кДа, а затем подвергают диафильтрации против 8-12 объемных обменов 50 мМ натрий-ацетатного буфера, pH 6,0. Материал дополнительно концентрируют до целевой концентрации 50 мг/мл.

Деполимеризованный/активированный полисахарид фильтруют и хранят.

Очищенный белок столбнячного анатоксина концентрируют на мембране MWCO PES 10 кДа до целевой конечной концентрации до 100 мг/мл и затем пропускают через 0,2 мкм фильтр. Отфильтрованный белковый раствор хранят при 1-5°C.

Деполимеризованный/активированный полисахарид и концентрированный столбнячный белок смешивают вместе в массовом отношении 0,5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1 (полисахарид: белок). К смеси полисахарид-белок добавляют аликвоту 100 мг/мл цианоборогидрида натрия в 2,0 М фосфатном буфере таким образом, чтобы цианоборогидрид натрия составил 10 мг/мл, а концентрация фосфатного буфера была равна 200 мМ, pH 8,0. Для подгонки концентрации полисахарида, например, до целевого значения 15-50 мг/мл добавляют солевой раствор. Реакционную смесь (фиг. 2С) перемешивают при 37°C в течение 16-30 ч. Реакционную смесь разбавляют 6 мМ фосфатно-солевым буфером (PBS) до отношения 1:2. К реакционной смеси добавляют аликвоту 100 мг/мл борогидрида натрия в 6 мМ PBS с получением целевой концентрации 0,5 мг борогидрида натрия на мл реакционного объема. Реакционную смесь перемешивают в течение минимум 15 мин при комнатной температуре. Непрореагировавшие альдегиды блокируют борогидридом натрия, восстанавливая их до спиртов с образованием концевых несвязанного сахара с первичным гидроксильной группой в положении 7, либо восстанавливающий конец модифицируют (2-гидрокси)этокси группой. Продукты (концевые сахара не показаны) показаны на фиг. 2D и фиг. 2А. Раствор для конъюгации подвергают диафильтрации против 10 объемных обменов 6 мМ PBS на мембране PES 50 кДа MWCO. Раствор хранят при 1-5°C.

К реакционной смеси конъюгата добавляют сульфат аммония с получением концентрации 1М сульфата аммония. Значение pH доводят до 7, и смесь перемешивают до растворения при комнатной температуре. Реакционную смесь конъюгата наносят на колонку НИС, заполненную фенильной смолой. Неконъюгированный полисахарид элюируют 2-7 объемами колонки 1М раствора сульфата аммония. Конъюгат элюируют WFI. В этом и последующих примерах НИС-очистка конъюгата может обеспечить продукт, в котором менее 20% по массе полисахарида является свободным (неконъюгированным) полисахаридом. Элюат конъюгата подвергают диафильтрации против 10 объемных обменов 50 мМ ацетата натрия, pH 6,0, используя мембрану PW MWCO 100 кДа. Окончательную фильтрацию очищенного конъюгата выполняют на 0,2 микронной мембране, и конъюгат хранят при 1-5°C.

Пример 2В.

Очищенный капсульный полисахарид группы С растворяют в физиологическом растворе до целевой концентрации 10 мг/мл. Раствор перемешивают до полного растворения. Значение pH доводят до 6,0, а температуру изменяют до 15°C. Растворенный полисахарид активируют добавлением метапериодата натрия (фиг. 2В) в количестве, необходимом для получения целевой концентрации 2 мМ. Реакционную

смесь перемешивают до тех пор, пока средний размер молекулы не будет находиться в диапазоне от 50000 до 100000 Дальтон согласно результатам HPSEC. Реакцию останавливают, добавляя глицерин в количестве 0,5 мл глицерина на грамм полисахарида, и перемешивают в течение минимум 5 мин. Полисахарид сначала концентрируют ультрафильтрацией через фильтр из регенерированной целлюлозы с молекулярной массой 5 кДа, а затем подвергают диафильтрации против 8-12 объемных обменов 50 мМ натрий-ацетатного буфера, pH 6,0. Материал дополнительно концентрируют до целевой концентрации 50 мг/мл. Деполимеризованный/активированный полисахарид отфильтровывают и хранят при 1-5°C.

Очищенный белок столбнячного анатоксина концентрируют на мембране MWCO PES 10 кДа до целевой конечной концентрации 100 мг/мл и затем пропускают через 0,2 мкм фильтр. Отфильтрованный белковый раствор хранят при 1-5°C.

Деполимеризованный/активированный полисахарид и концентрированный столбнячный белок смешивают вместе в молярном отношении 0,5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1 (полисахарид: белок). К смеси полисахарид-белок добавляют аликвоту 100 мг/мл цианоборогидрида натрия в 2,0 М фосфатном буфере таким образом, чтобы концентрация цианоборогидрида натрия составила 10 мг/мл, а фосфатного буфера - 200 мМ, pH 8,0. Для подгонки концентрации полисахарида, например, до целевого значения 15-50 мг/мл добавляют солевой раствор. Реакционную смесь (фиг. 2С) перемешивают при 37°C в течение 16-30 ч. Реакционную смесь разбавляют 6 мМ фосфатно-солевым буфером (PBS) до отношения 1:2. К реакционной смеси добавляют аликвоту 100 мг/мл борогидрида натрия в 6 мМ PBS с получением целевой концентрации 0,5 мг борогидрида натрия на мл реакционного объема. Реакционную смесь перемешивают в течение минимум 15 мин при комнатной температуре. Непрореагировавшие альдегиды блокируют борогидридом натрия, восстанавливая их до спиртов с образованием концевых несвязанного сахара с первичным гидроксильной группой в положении 7, либо восстанавливающий конец модифицируют (2-гидрокси)этоксигруппой. Продукты (концевые сахара не показаны) показаны на фиг. 2D и фиг. 2A. Раствор для конъюгации подвергают диафильтрации против 10 объемных обменов 6 мМ PBS на мембране PES 50 кДа MWCO. Раствор хранят при 1-5°C.

К реакционной смеси конъюгата добавляют сульфат аммония с получением 1М сульфата аммония. Значение pH доводят до 7, и смесь перемешивают до растворения при комнатной температуре. Реакционную смесь конъюгата наносят на колонку НИС, заполненную смолой с фенильными группами. Неконъюгированный полисахарид элюируют 2-7 объемами колонки 1М раствора сульфата аммония. Конъюгат элюируют WFI. В этом и последующих примерах НИС-очистка конъюгата может обеспечить продукт, в котором менее 20% по массе полисахарида является свободным (неконъюгированным) полисахаридом. Элюат конъюгата подвергают диафильтрации против 10 объемных обменов 50 мМ ацетата натрия, pH 6,0, используя мембрану PW MWCO 100 кДа. Окончательную фильтрацию очищенного конъюгата выполняют на 0,2 микронной мембране, и конъюгат хранят при 1-5°C.

3. Приготовление конъюгатов группы W-135 и Y.

Очищенный капсульный полисахарид группы W-135 растворяют в натрий-ацетатном буфере до целевой концентрации 10 мг/мл. Раствор перемешивают до полного растворения. Раствор полисахарида нагревают до 50-70°C посредством оснащенного рубашкой теплообменника. Значение pH доводят до 4,5. Реакционную смесь (фиг. 4А, этап 1) оставляют перемешиваться до тех пор, пока средний размер молекулы не достигнет величины 150000 Дальтон согласно результатам HPSEC. Реакционную смесь охлаждают до 1-5°C. К раствору полисахарида добавляют метапериодат натрия в количестве, необходимом для получения целевой концентрации метапериодата 2 мМ (фиг. 4А, этап 2). Величину pH доводят до 6,0, и раствор перемешивают в течение 60 мин при температуре от 0 до 5°C. Периодат окисляется и расщепляется в соседних положениях диола, образуя альдегиды, например в положении 7 остатка сиаловой кислоты, как показано на фиг. 4А. Восстанавливающая активность (отражающая количество альдегидов) составляет от 60 до 150 нмоль/мг полисахарида. Реакцию останавливают, добавляя 0,5 мл глицерина на грамм полисахарида и перемешивая в течение не менее 5 мин. Полисахарид концентрируют ультрафильтрацией через фильтр регенерированной целлюлозы с молекулярной массой 10 кДа и затем подвергают диафильтрации против 10 объемных обменов 50 мМ натрий-ацетатного буфера, pH 6,0.

Материал дополнительно концентрируют до целевой концентрации 50 мг/мл. Деполимеризованный/активированный полисахарид отфильтровывают и хранят при 1-5°C.

Очищенный белок столбнячного анатоксина концентрируют на мембране MWCO PES 10 кДа до целевой конечной концентрации 100 мг/мл, а затем пропускают через 0,2 мкм фильтр и хранят при 1-5°C. Деполимеризованный/активированный полисахарид и концентрированный столбнячный белок смешивают вместе в массовом отношении 0,5:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1 (полисахарид: белок). К смеси полисахарид-белок добавляют аликвоту 100 мг/мл цианоборогидрида натрия в 2,0 М фосфатном буфере таким образом, чтобы концентрация цианоборогидрида натрия составила 10 мг/мл, а фосфатного буфера - 200 мМ, pH 9,0. Для подгонки целевой концентрации полисахарида, например, до целевого значения 15-50 мг/мл добавляют солевой раствор. Реакционную смесь (фиг. 4В) перемешивают при комнатной температуре в течение ночи.

Реакционную смесь разбавляют 6 мМ фосфатно-солевым буфером (PBS) до отношения 1:2. К реакционной смеси добавляют аликвоту 100 мг/мл борогидрида натрия в 6 мМ PBS с получением целевой

концентрации 0,5 мг борогидрида натрия на мл реакционного объема. Реакционную смесь перемешивают в течение минимум 15 мин при комнатной температуре. Борогидрид натрия блокирует непрореагировавшие альдегиды, восстанавливая их до спиртов. Продукты показаны на фиг. 4С и фиг. 3.

К реакционной смеси конъюгата добавляют сульфат аммония с получением 1М сульфата аммония. Значение pH доводят до 7, и смесь перемешивают до растворения при комнатной температуре. Реакционную смесь конъюгата наносят на колонку НИС, заполненную смолой с фенильными группами. Неконъюгированный полисахарид элюируют 2-7 объемами колонки 1М раствора сульфата аммония. Конъюгат элюируют WFI. Элюат конъюгата подвергают диафильтрации против 10 объемных обменов 50 мМ ацетата натрия, pH 6,0, используя мембрану PW MWCO 100 кДа. Окончательную фильтрацию очищенного конъюгата выполняют на 0,2 микронной мембране, и конъюгат хранят при 1-5°C. Такой же процесс можно использовать для очищенного капсульного полисахарида группы Y.

4. Составление четырехвалентных вакцин.

Пример 4А.

Четырехвалентную конъюгатную вакцину MenACYW-TT готовят из четырех одновалентных конъюгатов PS-белка, полученных, как описано в примерах 1А, 2А и 3-4, и разбавляют забуференным соевым раствором ацетата натрия до конечной концентрации 10 мкг PS/серогруппа/0,5 мл. Таким образом, 0,5 мл доза конъюгатной вакцины MenACYW содержит 10 мкг каждой из менингококковых PS серогрупп А, С, Y и W-135, конъюгированных с общим количеством белка столбнячного анатоксина, равным 45-80 мкг, (фактическое количество белка столбнячного анатоксина зависит от конкретных отношений PS к белку в партиях нефасованных одновалентных концентратов, используемых в составах).

Каждую 0,5 мл дозу конъюгатной вакцины MenACYW готовят в 30 мМ буферном растворе ацетата натрия с pH 6,0.

Пример 4В.

Четырехвалентную конъюгатную вакцину MenACYW-TT готовят из четырех одновалентных конъюгатов PS-белка, полученных, как описано в примерах 1А, 2В и 3-4, и разбавляют забуференным соевым раствором ацетата натрия до конечной концентрации 10 мкг PS/серогруппа/0,5 мл. Таким образом, 0,5 мл доза конъюгатной вакцины MenACYW содержит 10 мкг каждой из менингококковых PS серогрупп А, С, Y и W-135, конъюгированных с общим количеством белка столбнячного анатоксина, равным 45-80 мкг, (фактическое количество белка столбнячного анатоксина зависит от конкретных отношений PS к белку в партиях нефасованных одновалентных концентратов, используемых в составах).

Каждую 0,5 мл дозу конъюгатной вакцины MenACYW готовят в 30 мМ буферном растворе ацетата натрия с pH 6,0.

Пример 4С.

Четырехвалентную конъюгатную вакцину MenACYW-TT готовят из четырех одновалентных конъюгатов PS-белка, полученных, как описано в примерах 1В, 2В и 3-4, и разбавляют забуференным соевым раствором ацетата натрия до конечной концентрации 10 мкг PS/серогруппа/0,5 мл. Таким образом, 0,5 мл доза конъюгатной вакцины MenACYW содержит 10 мкг каждой из менингококковых PS серогрупп А, С, Y и W-135, конъюгированных с общим количеством белка столбнячного анатоксина, равным 45-80 мкг, (фактическое количество белка столбнячного анатоксина зависит от конкретных отношений PS к белку в партиях нефасованных одновалентных концентратов, используемых в составах).

Каждую 0,5 мл дозу конъюгатной вакцины MenACYW готовят в 30 мМ буферном растворе ацетата натрия с pH 6,0.

Свойства и иммуногенность приведенных в качестве примера конъюгатов.

Конъюгат MenA готовили, как описано выше, без линкера ADH, за исключением того, что концентрация полисахарида, используемого в реакции конъюгации со столбнячным анатоксином, составила 12 мг/мл. Конъюгат имел массовое отношение полисахарид/белок (PS/PR), равное 0,3. Определенный уровень О-ацетилирования составил 3,0 мкмоль/мг полисахарида.

Конъюгат MenA готовили, как описано выше, с ADH-линкером, за исключением того, что концентрация полисахарида, используемого в реакции конъюгации со столбнячным анатоксином, составила 12 мг/мл. Конъюгат имел массовое отношение PS/PR, равное 1,0. Определенный уровень О-ацетилирования составлял 2,8 мкмоль/мг полисахарида. Готовили несколько дополнительных партий конъюгата MenA с ADH-линкером, в которых концентрация полисахарида, используемого в реакции конъюгации со столбнячным анатоксином, составляла либо 12 мг/мл, либо 16 мг/мл. Измеренные значения массовых отношений PS/PR в этих партиях составляли 1,0, 1,1, 1,2 и 1,3, а измеренные значения уровней О-ацетилирования в мкмоль/мг полисахарида составляли 2,5, 2,8, 2,9 и 3,0. Некоторые значения наблюдали более одного раза.

Иммуногенность каждой партии конъюгата MenA (т.е. индуцирование анти-MenA антител, согласно результатам сывороточного бактерицидного теста и/или ELISA у по меньшей мере значительной и статистически значимой части реципиентов относительно образцов до обработки и/или неиммунизированных контролей) подтверждали путем введения четырехвалентного состава людям, мышам и/или морским свинкам, ранее не вакцинированным MenA.

Конъюгат MenC готовили, как правило, как описано выше. Конъюгат имел массовое отношение по-

лисахарид/белок (PS/PR), равное 0,6. Определенный уровень О-ацетилирования составлял 2,4 мкмоль/мг полисахарида. Готовили несколько дополнительных партий конъюгата MenC. Измеренные значения массовых отношений PS/PR в этих партиях составляли 0,4, 0,6 и 0,7, а измеренные значения уровней О-ацетилирования в мкмоль/мг полисахарида составляли 0,8, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2,2 и 2,3. Некоторые значения наблюдали более одного раза.

Иммуногенность каждой партии конъюгата MenC (т.е. индуцирование анти-MenC антител, согласно результатам сывороточного бактерицидного теста и/или ELISA у по меньшей мере значительной и статистически значимой части реципиентов относительно образцов до обработки и/или неиммунизированных контролей) подтверждали путем введения четырехвалентного состава людям, мышам и/или морским свинкам, ранее не вакцинированным MenC.

Конъюгат MenW-135 готовили, как правило, как описано выше. Конъюгат имел массовое отношение полисахарид/белок (PS/PR), равное 0,9. Определенный уровень О-ацетилирования составлял 1,6 мкмоль/мг полисахарида. Готовили несколько дополнительных партий конъюгата MenW-135. Измеренные значения массовых отношений PS/PR в этих партиях составляли 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 и 1,2, а измеренные значения уровней О-ацетилирования в мкмоль/мг полисахарида составляли 0,7, 0,8 и 1,3. Некоторые значения наблюдали более одного раза.

Иммуногенность каждой партии конъюгата MenW-135 (т.е. индуцирование анти-MenW-135 антител, согласно результатам сывороточного бактерицидного теста и/или ELISA у по меньшей мере значительной и статистически значимой части реципиентов относительно образцов до обработки и/или неиммунизированных контролей) подтверждали путем введения четырехвалентного состава людям, мышам и/или морским свинкам, ранее не вакцинированным MenW-135.

Конъюгат MenY готовили, как правило, как описано выше. Конъюгат имел массовое отношение полисахарид/белок (PS/PR), равное 1,0. Определенный уровень О-ацетилирования составлял 1,3 мкмоль/мг полисахарида. Готовили несколько дополнительных партий конъюгата MenY. Измеренные значения массовых отношений PS/PR в этих партиях составляли 0,6, 0,7, 0,8 и 0,9, а измеренные значения уровней О-ацетилирования в мкмоль/мг полисахарида составляли 0,8, 0,9, 1,0, 1,1 и 1,3. Некоторые значения наблюдали более одного раза.

Иммуногенность каждой партии конъюгата MenY (т.е. индуцирование анти-MenY антител, согласно результатам сывороточного бактерицидного теста и/или ELISA у по меньшей мере значительной и статистически значимой части реципиентов относительно образцов до обработки и/или неиммунизированных контролей) подтверждали путем введения четырехвалентного состава людям, мышам и/или морским свинкам, ранее не вакцинированным MenY.

Все описанные выше партии конъюгатов представляли собой популяции молекул конъюгатов со средневзвешенной молекулярной массой в диапазоне от 300 до 1500 кДа.

Клинические испытания.

Описанный в настоящем изобретении четырехвалентный конъюгат MenACYW-TT использовали в клинических исследованиях для оценки безопасности и иммуногенности различных схем вакцинации у младенцев и детей младшего возраста (от 6 недель и старше) и взрослых в возрасте от 56 лет и старше.

а) Фаза I/II клинических исследований 1. Безопасность и иммуногенность различных составов, подобных MenACYW-TT, вводимых детям младшего возраста (12 месяцев $\pm$ 21 день), ранее не получавших менингококковую вакцину.

В этом исследовании фазы I/II оценивали безопасность и иммуногенность единичной дозы различных четырехвалентных относящихся к MenACYW-TT составов конъюгатов менингококкового полисахарида со столбнячным анатоксином, вводимых внутримышечно детям младшего возраста в возрасте 12 месяцев $\pm$ 21 день (группы 1-5). Контрольной группе (группа 6) вводили NeisVac-C® (конъюгат полностью де-О-ацетилированного менингококкового полисахарида группы C со столбнячным анатоксином), упоминаемой в настоящем изобретении "MenC-TT", которая является лицензированной моновалентной менингококковой конъюгатной вакциной.

Состав 1А содержал 4 мкг полисахарида каждого из четырех полисахаридов (т.е. MenACYW) и 22,1 мкг TT на 0,5 мл дозы. Все они имели нативные уровни О-ацетилирования и были конъюгированы путем активации периодатом и восстановительного аминирования (MenCYW) или с использованием карбонил-дигидразола и дигидразида адипиновой кислоты (MenA), по существу, как описано выше.

Состав 1В содержал 10 мкг каждого из полисахаридов MenA и MenW и 4 мкг каждого из полисахаридов MenC и MenY и 36,6 мкг TT на 0,5 мл дозы. В остальном он был идентичен составу 1А.

Состав 1С содержал 10 мкг каждого из четырех полисахаридов и 54,8 мкг TT на 0,5 мл дозы. В остальном он был идентичен составу 1А.

Состав 2А содержал 4 мкг полисахарида каждого из четырех полисахаридов и 33,9 мкг TT на 0,5 мл дозы. Полисахариды MenC, Y и W были частично де-О-ацетилированы щелочной обработкой и конъюгированы путем активации периодатом и восстановительного аминирования, по существу, как описано выше. Полисахарид MenA имел нативный уровень О-ацетилирования и был получен в виде неоглико-конъюгата в результате реакции конъюгации, по существу, как описано в патенте США 2005/0002957 в

примере 5.

Состав 2В содержал 10 мкг каждого из четырех полисахаридов и 84,8 мкг ТТ на 0,5 мл дозы. В остальном он был идентичен составу 2А.

Все вышеуказанные составы содержали 0,67% NaCl и были забуферены фосфатом натрия при pH 6. Шесть исследовательских групп обобщены и охарактеризованы в табл. 1.

Таблица 1. Исследовательские группы фаз I/II клинических испытаний 1

Группа	№	Лечение	Анализ популяции по протоколу
1	63	Состав 1А	54
2	61	Состав 1В	51
3	61	Состав 1С	51
4	60	Состав 2А	48
5	61	Состав 2В	51
6	62	MenC-ТТ	51

В группах лечения отношение мальчиков к девочкам варьировало, причем крайние значения составляли от 39,3 до 60,7% во 2-й группе и от 62,3 до 37,7% в 5-й группе. Возрастной диапазон во всех группах составлял от 11,0 до 12,0 месяцев; средний возраст в группах находился в пределах от 11,5 до 11,7 месяцев.

Данные по безопасности в виде нежелательных явлений (НЯ) собирали в течение 30-37 дней после введения дозы вакцины. Период регистрации запрошенных НЯ составлял от D0 до D7 (т.е. от 0 до 7 дней после введения). Сбор данных по запрошенной реактогенности включал болезненность в месте инъекции, покраснение и отек, а также лихорадку, рвоту, потерю аппетита, аномальный плач, сонливость и раздражительность.

Все вакцинированные субъекты завершили исследование, но 56 вакцинированных субъектов (все группы) были исключены из анализа из-за отклонений от протокола, причем наиболее частой причиной была неспособность предоставить образец крови на 30-37 день в пределах разрешенного временного интервала.

У двух субъектов сразу появились незапрашиваемые НЯ, одно из которых было отнесено к явлению, связанному с вакцинацией (появление сыпи у субъекта группы 1).

Запрошенные реакции в месте инъекции в период между днем 0 и днем 7.

У большинства субъектов во всех группах наблюдали запрошенные реакции. В целом, уровни запрошенных реакций были сопоставимы между группами. Процент реципиентов в группах 1-5, сообщивших о реакции в месте инъекции, был таким же, как у субъектов, получавших контрольную вакцину (группа 6).

Между частотой реакций в месте инъекции и количеством столбнячного анатоксина, содержащегося в каждом вакцинном составе очевидная корреляция не наблюдалась.

Наиболее распространенной реакцией в месте инъекции была болезненность с частотой в диапазоне от 25,4% в группе 1 до 39,3% в группе 5; следующей была эритема, частота которой варьировала от 29,5% в группе 2 до 39,3% в группе 5; и наименее распространенной реакцией был отек, частота которого варьировала от 13,6% в группе 4 до 23,0% в группе 3. Интенсивность большинства запрошенных реакций в месте инъекции имела степень 1; реакции возникали и проходили через 3 дня после вакцинации без каких-либо вмешательств. В группах не было отмечено никаких тенденций с точки зрения интенсивности, времени начала, продолжительности или предпринятых действий.

Запрошенные системные реакции между днем 0 и днем 7.

Как и в случае реакций в месте инъекции, общая частота системных реакций, таких как лихорадка, рвота, аномальный плач, сонливость, потеря аппетита и раздражительность, была сопоставимой в группах 1-5 и аналогична частоте, наблюдаемой для контрольной вакцины. Наиболее распространенной системной реакцией во всех группах была раздражительность, которая варьировала от 54,2% в группе 4 до 70,5% как в группе 2, так и в группе 5. Следующей наиболее распространенной реакцией (для всех групп, кроме группы 2) был аномальный плач, частота которого варьировала от 34,4% в группе 2 до 48,4% в группе 6 с последующей потерей аппетита (второй по частоте реакцией в группе 2), которая варьировала от 27,9% в группе 2 до 46,8% в группе 6. Частота рвоты варьировала от 18,6% в группе 4 до 32,3% в группе 6; и лихорадка была наиболее редкой из зарегистрированных реакций, частота которой варьировала от 11,1% в группе 1 до 25,8% в группе 6. Интенсивность большинства запрошенных системных реакций имела степень 1; реакции появлялись и проходили через 3 дня после вакцинации без каких-либо вмешательств. В группах не было отмечено никаких тенденций с точки зрения интенсивности, вре-

мени начала, продолжительности или предпринятых действий.

Незапрашиваемые нежелательные явления в период между днем 0 и днем 30.

Количество незапрашиваемых нежелательных явлений, зарегистрированных у 327 субъектов, в общей сложности составило 931. Всего было выявлено 107 незапрашиваемых НЯ, связанных с вакцинацией, которые были определены как побочные реакции (ПР).

Наиболее распространенные ПР были в SOC: 1) общие расстройства и состояние места введения (25); 2) инфекции и инвазии и заболевания кожи и подкожной клетчатки (по 20); и 3) расстройства со стороны желудочно-кишечного тракта и респираторной системы, расстройства в области груди и средостения (по 16). Между частотой возникновения ПР и полученной вакциной не было выявлено явных связей. В общей сложности четыре зарегистрированных системных ПР имели интенсивность степени 3: по одной в группах 1 и 4, и две в группе 5.

Серьезные НЯ.

Смертельные случаи отсутствовали. В общей сложности, во время исследования наблюдали семь СНЯ у 7 субъектов: 2 в группе 1, 1 в группе 2, 2 в группе 3 и 2 в группе 4. В группах 5 и 6 СНЯ не были зарегистрированы. Одно из этих СНЯ, реактивный артрит, наблюдаемый у одного субъекта в группе 3, отнесли к реакции, связанной с вакцинацией. Субъект полностью восстановился через 23 дня.

Согласно выводам, сделанным относительно безопасности, единичная доза была хорошо переносимой во всех группах, и в профиле безопасности не было выявлено значимых различий.

Функциональные антитела к менингококковым серогруппам A, C, Y и W-135 измеряли, используя сывороточный бактерицидный тесте с комплементом человека (SBA-HC) и комплементом крольчонка (SBA-BR), для определения 1) доли субъектов с титром SBA-HC $\geq 1:8$ и $\geq 1:4$ или титром SBA-BR $\geq 1:8$; 2) среднегеометрических титров (GMT); 3) обратных кумулятивных кривых распределения (RCDC); и 4) распределения титров. Кроме того, титры антител к столбнячному анатоксину, присутствующему в вакцинах, оценивали методом ELISA. Анализы проводили на образцах крови, взятых до вакцинации ("До" в табл. 2 и 3) и через 30-37 дней после вакцинации ("После" в табл. 2 и 3).

В табл. 2 и 3 показаны результаты SBA-HC. В табл. 2 и 3 95% доверительные интервалы выражены в процентах.

Таблица 2. Количество и процент субъектов с титром $\geq 1:8$ в исходном состоянии и после вакцинации, анализ SBA-НС (популяция в соответствии с протоколом)

Серогруппа	Временная точка	Группа 1 (N=54)	Группа 2 (N=51)	Группа 3 (N=51)	Группа 4 (N=48)	Группа 5 (N=51)	Группа 6 (N=51)
		n/M; % 95% CI	n/M; % 95% CI	n/M; % 95% CI	n/M; % 95% CI	n/M; % 95% CI	n/M; % 95% CI
А	До	19/54; 35,2 (22,7; 49,4)	11/51; 21,6 (11,3; 35,3)	15/50; 30,0 (17,9; 44,6)	9/48; 18,8 (8,9; 32,6)	16/51; 31,4 (19,1; 45,9)	13/51; 25,5 (14,3; 39,6)
	После	47/54; 87,0 (75,1; 94,6)	50/50; 100,0 (92,9; 100,0)	45/51; 88,2 (76,1; 95,6)	36/48; 75,0 (60,4; 86,4)	47/51; 92,2 (81,1; 97,8)	23/50; 46,0 (31,8; 60,7)
С	До	0/54; 0,0 (0,0; 6,6)	0/51; 0,0 (0,0; 7,0)	0/51; 0,0 (0,0; 7,0)	1/48; 2,1 (0,1; 11,1)	0/51; 0,0 (0,0; 7,0)	0/51; 0,0 (0,0; 7,0)
	После	49/54; 90,7 (79,7; 96,9)	44/51; 86,3 (73,7; 94,3)	43/51; 84,3 (71,4; 93,0)	45/48; 93,8 (82,8; 98,7)	49/51; 96,1 (86,5; 99,5)	51/51; 100,0 (93,0; 100,0)
У	До	1/54; 1,9 (0,0; 9,9)	2/51; 3,9 (0,5; 13,5)	1/51; 2,0 (0,0; 10,4)	0/48; 0,0 (0,0; 7,4)	0/51; 0,0 (0,0; 7,0)	3/51; 5,9 (1,2; 16,2)
	После	36/54; 66,7 (52,5; 78,9)	40/51; 78,4 (64,7; 88,7)	40/51; 78,4 (64,7; 88,7)	44/48; 91,7 (80,0; 97,7)	42/51; 82,4 (69,1; 91,6)	4/51; 7,8 (2,2; 18,9)
W-135	До	0/54; 0,0 (0,0; 0,0)	0/51; 0,0 (0,0; 0,0)	0/51; 0,0 (0,0; 0,0)	0/48; 0,0 (0,0; 0,0)	0/51; 0,0 (0,0; 0,0)	0/51; 0,0 (0,0; 0,0)

		6,6)	7,0)	7,0)	7,4)	7,0)	7,0)
	После	35/54; 64,8 (50,6; 77,3)	35/50; 70,0 (55,4; 82,1)	33/51; 64,7 (50,1; 77,6)	30/48; 62,5 (47,4; 76,0)	36/51; 70,6 (56,2; 82,5)	1/50; 2,0 (0,1; 10,6)

Таблица 3. Среднегеометрические титры (GMT) в исходном состоянии и после вакцинации, анализ SBA-НС (в соответствии с протоколом)

Антиген	Временная точка	Группа 1 (N=54)	Группа 2 (N=51)	Группа 3 (N=51)	Группа 4 (N=48)	Группа 5 (N=51)	Группа 6 (N=51)
		GMT (95% CI)	GMT (95% CI)	GMT (95% CI)	GMT (95% CI)	GMT (95% CI)	GMT (95% CI)
А	До	4,79 (3,75; 6,11)	3,84 (3,12; 4,73)	4,17 (3,35; 5,19)	3,83 (3,07; 4,78)	4,77 (3,59; 6,35)	3,84 (3,11; 4,74)
	После	21,22 (14,85; 30,33)	41,64 (30,30; 57,24)	29,10 (20,18; 41,95)	14,89 (10,54; 21,03)	29,10 (21,30; 39,75)	6,87 (5,10; 9,26)
С	До	2,00 (2,00; 2,00)	2,03 (1,97; 2,08)	2,03 (1,97; 2,08)	2,06 (1,94; 2,18)	2,00 (2,00; 2,00)	2,08 (1,99; 2,18)
	После	60,80 (37,71; 98,01)	46,19 (29,29; 72,82)	73,32 (42,18; 127,43)	131,75 (80,90; 214,56)	252,54 (170,84; 373,32)	471,91 (373,90; 595,60)
У	До	2,08 (1,96; 2,20)	2,14 (1,94; 2,36)	2,20 (1,86; 2,60)	2,00 (2,00; 2,00)	2,00 (2,00; 2,00)	2,32 (1,96; 2,76)
	После	13,89 (9,19; 21,00)	17,36 (11,50; 26,21)	23,73 (14,86; 37,90)	26,52 (18,61; 37,79)	26,46 (17,29; 40,49)	2,42 (2,09; 2,80)
W-135	До	2,03 (1,97; 2,08)	2,00 (2,00; 2,00)	2,03 (1,97; 2,08)	2,03 (1,97; 2,09)	2,03 (1,97; 2,08)	2,00 (2,00; 2,00)
	После	10,21 (7,32; 14,25)	13,00 (8,59; 19,66)	16,00 (9,74; 26,28)	10,53 (7,10; 15,60)	15,57 (10,56; 22,95)	2,17 (2,01; 2,34)

Как видно из таблиц, титры до вакцинации были низкими во всех серогруппах. В случае серогруппы А, значение титров у большинства субъектов во всех группах было равно 8 или менее; а в случае остальных трех серогрупп, практически у всех субъектов в группах значения были <4. В случае серогруппы А, в группах 1-5 после вакцинации большинство значений титра находилось в диапазоне от 8 до 128; серогруппы С - в диапазоне от 16 до 1024; серогруппы У - в диапазоне от <4 до 128; и серогруппы W-135 - в диапазоне от <4 до 64. У контрольной группы значения титров для серогрупп А, У и W-135 в основном находились между <4 и 4, в то время как большинство значений титра для серогруппы С находилось между 256 и 1024. В группах с высокими дозами наблюдалась тенденция к более высоким ответам антигел по сравнению с группами с низкими дозами. В анализах SBA-BR значения GMT в группах лечения до введения дозы были сопоставимы и находились в пределах от 4,22 до 5,26 для серогруппы А; от 4,00 до 6,26 для серогруппы С; и от 6,01 до 8,45 для серогруппы W-135. В серогруппе У наблюдалась сильная изменчивость, значения для этой серогруппы варьировали от 17,36 (группа 5) до 35,92 (группа 1).

В группах 1-5 значения после вакцинации для серогруппы А варьировали в пределах от 336,91 (группа 1) до 759,35 (группа 5); значение в контрольной группе было равно 5,66. Значения для серогруппы С варьировали в пределах от 145,53 (группа 1) до 636,37 (группа 5). Значение в контрольной группе

было равно 1290,16. Значения для серогруппы Y варьировали в пределах от 586,54 (группа 3) до 713,70 (группа 4). Значение в контрольной группе было равно 23,41. Значения для серогруппы W-135 варьировали в пределах от 912,28 (группа 4) до 1518,71 (группа 5). Значение в контрольной группе было равно 8,57.

б) Фаза II клинических исследований 1. Безопасность и иммуногенность MenACYW-TT у младенцев и детей младшего возраста.

Фазу II рандомизированного открытого многоцентрового клинического исследования проводили в Соединенных Штатах с участием 580 детей. Исследование было разработано для изучения профилей безопасности и иммуногенности вакцины MenACYW-TT, вводимой по разным графикам и одновременно со стандартными педиатрическими прививками. Исследование также было направлено на описание профилей иммуногенности вакцины MenACYW-TT и отобранных лицензированных педиатрических вакцин (Pentacel® (DTaP-IPV/Hib), Prevnar® (PCV7) или Prevnar® 13 (PCV13), MMR®_{II} (MMR) Varivax® (V), ENGERIX-B® или RECOMBIVAX HB® (HepB), Rotarix® (RV1) и Rotateq® (RV5) при их одновременном введении с вакциной MenACYW-TT.

Участники получали либо вакцину MenACYW-TT одновременно со стандартными вакцинами (исследуемые группы; группы 1-5 из табл. 1), либо только обычные стандартные вакцины (контрольные группы; группы 6-7).

Двухмесячных младенцев случайным образом распределяли на 3 исследуемые группы (группы 1-3) и 2 контрольные группы (группы 6 и 7), как показано в табл. 1. Младенцы в исследуемых группах 1-3 получали 3 или 4 дозы вакцины MenACYW-TT (одновременно со стандартными вакцинами), как указано в табл. 4.

В табл. 4 приведено краткое описание плана клинического исследования.

Таблица 4. План исследования и вакцины, полученные в этом клиническом исследовании

Группа	График проведения исследования (возраст)				
	2 месяца	4 месяца	6 месяцев	12 месяцев	15 месяцев
1	MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib, PCV7 или PCV13, RV1, или RV5, HepB ¹	MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib, PCV7 или PCV13, RV1, или RV5	MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib, PCV7 или PCV13, RV5 ² , HepB	MenACYW-TT, MMR, V, PCV7 или PCV13	
2	MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib, PCV7 или PCV13, RV1, или RV5, HepB ¹	MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib, PCV7 или PCV13, RV1, или RV5	MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib, PCV7 или PCV13, RV5 ² , HepB	MMR, V, PCV7 или PCV13	MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib
3	MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib, PCV7 или PCV13, RV1, или RV5, HepB ¹	MenACYW-TT, DTaP-IPV/Hib, PCV7 или PCV13, RV1, или RV5	DTaP-IPV/Hib, PCV7 или PCV13, RV5 ² , HepB	MenACYW-TT, MMR, V, PCV7 или PCV13	

	или HepB ¹	или RV5			
4			MenACYW-TT, DTaP- IPV/Hib, PCV7 или PCV13, RV5 ² , HepB	MenACYW-TT, MMR, V, PCV7 или PCV13	
5				MenACYW-TT, MMR, V, PCV7 или PCV13	
6	DTaP- IPV/Hib, PCV7 или PCV13, RV1, или RV5, HepB ¹	DTaP- IPV/Hib, PCV7 или PCV13, RV1, или RV5	DTaP- IPV/Hib, PCV7 или PCV13, RV5 ² , HepB	MMR, V, PCV7 or PCV13	
7	DTaP- IPV/Hib, PCV7 или PCV13, RV1, или RV5, HepB ¹	DTaP- IPV/Hib, PCV7 или PCV13, RV1, или RV5	DTaP- IPV/Hib, PCV7 или PCV13, RV5 ² , HepB	MMR, V, PCV7 или PCV13	DTaP- IPV/Hib
¹ Если введена только одна предыдущая доза; ² Если в предыдущей вакцинации использовали RV5					

Шестимесячные дети получали 2 дозы вакцины MenACYW- TT (одновременно со стандартными вакцинами) в возрасте 6 и 12 месяцев (группа 4), и 12-ти месячные дети получали 1 дозу вакцины MenACYW-TT (одновременно со стандартными вакцинами) в возрасте 12 месяцев (группа 5).

Сывороточный бактерицидный тест с комплементом человека (hSBA) и крольчонка (rSBA) использовали для измерения антител к менингококковым серогруппам A, C, Y и W в начале исследования и через 30 дней после введения последней дозы младенцам и детям младшего возраста. Нижний предел количественного определения (LLOQ) в обоих анализах составил 1:4. См., например, Maslanka et al., Standardization and a Multilaboratory Comparison of Neisseria meningitidis Serogroup A and C Serum Bactericidal Assays, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Mar. 1997, p. 156-167, and Goldschneider Gotschlich, and Artenstein, Immunity to Meningococcus, The Role of Humoral Antibodies, the Journal of Experimental Medicine, 1969.

Данные по безопасности собирали в течение 6 месяцев после введения последней дозы вакцины. Нежелательные явления (НЯ) регистрировали в интервале D0-D7 (т.е. со дня 0 до дня 7 после введения). Сбор данных по запрошенной реактогенности включал ежедневное измерение температуры тела и регистрацию покраснения и отека в месте инъекции, а также регистрацию интенсивности боли в области инъекции, головной боли, миалгии и недомогания. Незапрашиваемые НЯ и серьезные нежелательные явления (СНЯ) также регистрировали на протяжении всего исследования. Все статистические анализы были описательными.

Для оценки безопасности анализировали данные по демографии для популяции, которую определяли как субъекты, получившие по меньшей мере одну дозу исследуемой или контрольной вакцины и для которых доступны данные по безопасности. Средний возраст участия в исследовании в группах 1, 2, 3, 6 и 7 составлял 2,19, 2,20, 2,24, 2,18 и 2,20 месяца, соответственно. Возрастной диапазон составлял 1,57-2,97 месяца в группе 1, 1,57-2,90 месяца в группе 2, 1,53-3,00 месяца в группе 3, 1,53-2,87 месяца в группе 6 и 1,70-2,97 месяца в группе 7 (критерии включения - 2 месяца (от 42 до 89 дней)). В группе 4 средний возраст составлял 6,23 месяца, а возрастной диапазон составлял от 5,63 до 6,50 месяцев (критерии включения - 6 месяцев (180 дней $\pm$ 14 дней)). В группе 5 средний возраст составлял 12,4 месяцев, а возрастной диапазон составлял от 12,2 до 12,7 месяцев (критерии включения - 12 месяцев (365 дней $\pm$ 14 дней)).

После завершения серии вакцинации у младенцев и получения дополнительной дозы вакцины MenACYW-TT на втором году жизни (группы 1-4) у большинства участников исследования защитные титры достигли значения 1:8 (91%-100% для комплемента человека (hSBA) и 80-100% для комплемента крольчонка (rSBA)) для всех 4 серогрупп (ACYW), включенных в вакцину MenACYW-TT, независимо от количества доз, полученных в течение первого года жизни. У участников, которые получили единичную дозу в возрасте 12 месяцев (группа 5), защитные титры ACYW 1:8 находились между 47,5-90% (hSBA) и 62-100% (rSBA). Таким образом, конъюгатная вакцина MenACYW-TT демонстрирует устойчивый иммунный ответ после дополнительной дозы на втором году жизни, независимо от первичной схемы вакцинации на первом году жизни.

На фиг. 6 представлен процент субъектов с уровнями hSBA, превышающими или равными 1:8, для каждого из серотипов A, C, Y и W для групп 1-4. На фиг. 7 представлены аналогичные результаты rSBA для этих же групп.

Иммунные ответы на hSBA после однократного введения вакцины MenACYW-TT в возрасте 12 месяцев (группа 5), были аналогичны ответам, наблюдаемым в серии из 3 доз (группа 3), для серогруппы C (90%), но ниже для серогрупп Y (47,5%), A (75%) и W-135 (54%). См. таблицу 5, в которой приведены титры hSBA и rSBA для субъектов, получавших единичную дозу вакцины MenACYW-TT в возрасте 12 месяцев (группа 5).

Таблица 5. Доля субъектов, у которых титры hSBA и rSBA достигли уровня $\geq 1:8$ в D30 после введения вакцины MenACYW-TT (субъекты, получившие только одну дозу на втором году жизни)

Серогруппы	Доля субъектов, у которых титры по результатам сывороточного бактерицидного теста достигли уровня $\geq 1:8$	
	Комплемент человека (hSBA), % (95%CI)	Комплемент крольчонка (rSBA), % (95%CI)
A	74,6 (61,6; 85,0)	62,1 (48,4; 74,5)
C	90,2 (79,8; 96,3)	91,4 (81,0; 97,1)
Y	47,5 (34,6; 60,7)	94,8 (85,6; 98,9)
W	54,2 (40,8; 67,3)	100,0 (93,8; 100,0)
D: день; CI: доверительный интервал		

Введение стандартных педиатрических вакцин одновременно с вакциной MenACYW-TT не вызвало никаких нежелательных явлений (данные не представлены).

Частота запрошенных реакций в месте инъекции не увеличивалась при повторных дозах вакцины. См. фиг. 8, на котором представлен совокупный процент участников, сообщивших об одной или более запрошенных реакциях в месте инъекции в течение 7 дней после введения вакцины MenACYW-TT. Совокупный процент участников, которые сообщили о ≥ 1 запрошенной реакции в месте инъекции в течение 7 дней после введения вакцины MenACYW-TT, был самым высоким в группах, получивших 4 дозы (группы 1 и 2, 80,0%-80,8%), затем в группах, получивших 2 дозы (группа 4, 75,3%) или 3 дозы (группа 2, 74,0%) дозы, и самой низкой - в группе, получившей 1 дозу (группа 5, 57,4%).

На фиг. 9 показаны запрошенные системные реакции, зарегистрированные в течение 7 дней после введения либо вакцины MenACYW-TT плюс стандартные вакцины, либо только стандартных вакцин.

В большинстве случаев не являющиеся серьезными нежелательные явления (ННЯ) были зарегистрированы после введения либо вакцины MenACYW-TT, либо стандартных вакцин, и каждый из сообщенных ННЯ с интенсивностью степени 3 не имел отношения к исследуемым вакцинам. Серьезные нежелательные явления, связанные с вакциной, не были зарегистрированы.

Как вакцина MenACYW-TT, так и стандартные вакцины были иммуногенными при одновременном введении (т.е. в один и тот же день в виде отдельных вакцин) по сравнению со случаями, когда стандартные вакцины вводились в контрольных группах без вакцины MenACYW-TT, что указывает на отсутствие отрицательного взаимодействия между вакциной MenACYW-TT и стандартными вакцинами.

Таким образом, вакцина MenACYW-TT была безопасной и хорошо переносимой детьми грудного и младшего возраста независимо от схемы иммунизации и количества введенных доз. Профиль безопасности вакцины MenACYW-TT в целом сходен с таковым в контрольных группах, независимо от графика иммунизации и количества вводимых доз.

Таким образом, исследуемая вакцина MenACYW-TT была хорошо переносимой и иммуногенной. Все схемы вакцинации, которые включали дозу(дозы) как на первом, так и на втором году жизни, вызывали устойчивые иммунные ответы на все 4 серогруппы A, C, Y и W вакцины N. meningitidis и имели приемлемый профиль безопасности.

с) Фаза II клинических испытаний 2. Безопасность и иммуногенность MenACYW-TT у взрослых 56 лет и старше.

Возраст и сопутствующие хронические заболевания являются важными факторами риска для менингококкового заболевания, поэтому пожилые люди подвергаются повышенному риску. Было проведено клиническое исследование по оценке безопасности и иммуногенности вакцины MenACYW-TT у взрослых в возрасте 56 лет или старше по сравнению с Menomune®-A/C/Y/W-135, являющейся лицензированной четырехвалентной менингококковой простой полисахаридной вакциной (MPSV4).

Фазу II рандомизированного, открытого, многоцентрового исследования проводили в Соединенных Штатах с участием 301 здорового взрослого человека в возрасте старше 56 лет. Участники в 12 местах исследования были распределены случайным образом по группам, получавшим одну дозу MenACYW-TT или MPSV4 (Menomune® - A/C/Y/W-135). Пациентов разделяли по возрасту на 2 подгруппы: 1) от 56 до 64 лет и 2) от 65 лет и старше.

Четыре исследуемые группы были сформированы следующим образом. Группа 1a (n=101, возраст 56-64 года) и группа 1b (n=100, ≥65 лет) получили MenACYW-TT. Группа 2a (n=50, возраст 56-64 года) и группа 2b (n=50, ≥65 лет) получили вакцину MPSV4. "Группа 1" относится к группе 1a плюс группа 1b. "Группа 2" относится к группе 2a плюс группа 2b. Демографические результаты приведены в табл. 6.

Таблица 6. План исследования и вакцины, полученные в этом клиническом исследовании

Исследуемые группы (количество исследуемых участников)	Полученные вакцины (возрастной диапазон исследуемых участников)
Группа 1a (n=101)	MenACYW-TT (56-64 года)
Группа 1b (n=100)	MenACYW-TT (≥ 65 лет)
Группа 2a (n=50)	MPSV4 (56-64 года)
Группа 2b (n=50)	MPSV4 (≥ 65 лет)

Сывороточный бактерицидный тест (SBA) с комплементом человека (hSBA) и комплементом кролика (rSBA), как описано выше, использовали для измерения антител к менингококковым серогруппам A, C, Y и W в начале исследования и через 30 дней после введения вакцины. Нижний предел количественного определения (LLOQ) для обоих анализов был равен 1:4.

Данные по безопасности регистрировали в течение 30 дней после введения вакцины. Запрошенные НЯ регистрировали в интервале D0-D7 (т.е. со дня 0 до дня 7 после введения). Сбор данных по запрошенной реактогенности включал ежедневное измерение температуры тела и регистрацию покраснения и отека в месте инъекции, а также регистрацию интенсивности боли в области инъекции, головной боли, миалгии и недомогания. Незапрашиваемые НЯ и серьезные нежелательные явления (СНЯ) также регистрировали на протяжении всего исследования. Все статистические анализы были описательными.

Для оценки безопасности анализировали данные по демографии для популяции, которую определяли как субъекты, получившие по меньшей мере одну дозу исследуемой или контрольной вакцины и для которых были доступны данные по безопасности. При регистрации средний возраст участников был одинаковым как в 1-й, так и во 2-й группах (66,1±7,13 года и 65,8±6,58 года соответственно). Кроме того, возраст был одинаковым для групп субъектов в возрасте 56-64 лет и групп субъектов в возрасте ≥65 лет (60,3±2,52 года в группе 1a, 60,8±2,59 года в группе 2a, 71,9±5,28 лет в группе 1b и 70,8±5,45 лет в группе 2b).

Как в группе 1, так и в группе 2 женщин было немного больше (60,8% (121/199) и 55,0% (55/100), соответственно), чем мужчин (39,2% (78/199) и 45,0% (45/100) соответственно). Такая же тенденция наблюдалась в подгруппах, за исключением группы 2, в которой количество субъектов женского и мужского пола было одинаковым (50,0% (25/50)).

Во всех подгруппах доля исследуемых участников с титрами hSBA ≥1:8 к серогруппам A, C, Y и W-135 была заметно выше в день 30 по сравнению с исходным уровнем. В двух возрастных группах (от 56 до 64 лет и ≥65 лет) результаты в целом были одинаковыми в каждой группе вакцинации, как показано в табл. 7.

Таблица 7. Доля субъектов, у которых в D30 hSBA титр достиг уровня $\geq 1:8$

Серогруппы	Группа 1a MenACYW-TT (56y-64y) (N=98) % (95% CI)	Группа 1b MenACYW-TT ($\geq 65y$) (N=97) % (95% CI)	Группа 2a MPSV4 (56y-64y) (N=46) % (95% CI)	Группа 2b MPSV4 ($\geq 65y$) (N=48) % (95% CI)
A	95,9 (89,9; 98,9)	91,8 (84,4; 96,4)	78,3 (63,6; 89,1)	91,7 (80,0; 97,7)
C	71,4 (61,4; 80,1)	78,4 (68,8; 86,1)	58,7 (43,2; 73,0)	66,7 (51,6; 79,6)
Y	81,6 (72,5; 88,7)	79,4 (70,0; 86,9)	60,9 (45,4; 74,9)	58,3 (43,2; 72,4)
W	77,6 (68,0; 85,4)	81,4 (72,3; 88,6)	58,7 (43,2; 73,0)	62,5 (47,4; 76,0)
D: день; CI: доверительный интервал				

На фиг. 10 представлена доля субъектов, на основе данных, полученных для всех пациентов (т.е. комбинированные возрастные группы), у которых уровень hSBA для серогрупп A, C, Y и W в D30 был $\geq 1:8$. Для серогрупп A и C доля лиц с титрами hSBA $\geq 1:8$ после введения MenACYW-TT была сопоставима с титрами после введения MPSV4. Для серогрупп Y и W доля лиц с титрами hSBA $\geq 1:8$ после введения MenACYW-TT была выше, чем с титрами после введения MPSV4.

На фиг. 11 представлены среднегеометрические титры (GMT) для разных серогрупп в D30 для обеих вакцин. GMT для MenACYW-TT были больше или равны GMT для MPSV4 для всех серогрупп.

Доля участников с титрами rSBA, превышающими или равными 1:8, были сопоставимы между реципиентами MenACYW-TT и реципиентами MPSV4 для всех четырех групп вакцины. См. фиг. 12.

Запрошенные реакции в месте инъекции (фиг. 13) и системные реакции (фиг. 14), зарегистрированные в течение 7 дней после введения MenACYW-TT, были аналогичны таковым для вакцины MPSV4.

В целом профили реактогенности для вакцин MenACYW-TT и MPSV4 были сходными. Интенсивность большинства незапрашиваемых нежелательных явлений имела степень 1 или 2. Не было зарегистрировано никаких сразу возникающих реакций гиперчувствительности, и введение вакцин не было прекращено из-за НЯ или СНЯ. Никакого увеличения реактогенности у пожилых реципиентов не наблюдалось. О серьезных нежелательных явлениях не сообщалось.

MenACYW-TT был хорошо переносимым и иммуногенным при введении взрослым в возрасте 56 лет и старше. Таким образом, MenACYW-TT представляет собой альтернативную вакцину для профилактики инвазивного менингококкового заболевания, в том числе в тех районах мира, где в настоящее время для иммунизации пожилых людей доступны только простые полисахаридные вакцины, такие как MPSV4.

d) Фаза II клинических испытаний 3. Безопасность и иммуногенность MenACYW-TT, вводимой здоровым детям младшего возраста (12-23 месяца), ранее не получавшим менингококковые вакцины.

Конъюгатная вакцина MenACYW-TT предназначена для применения лицами в возрасте от 6 недель и старше. В этом исследовании оценивали безопасность и иммуногенность единичной дозы у детей младшего возраста относительно Nimenrix®, лицензированной четырехвалентной менингококковой конъюгатной вакцины (MCV4-TT), использованной в качестве контроля.

Фаза II рандомизированного открытого исследования с участием 188 детей младшего возраста (в возрасте 12-23 месяцев) с менингококковой инфекцией, не вакцинированных ранее, была проведена в Финляндии. Участников случайным образом распределяли по группам, получающим одну дозу вакцины MenACYW-TT или MCV4-TT. Сывороточный бактерицидный тест с компонентом человека (hSBA) и крольчонка (rSBA) использовали для измерения антител к менингококковым серогруппам A, C, W и Y в начале исследования и через 30 дней после введения дозы. LLOQ в обоих бактерицидных тестах составлял 1:4. Также измеряли антительные ответы против столбняка.

Данные по безопасности собирали в течение 30 дней после введения дозы. Нежелательные явления (НЯ) регистрировали в интервале D0-D7. Сбор данных по запрошенной реактогенности включал ежедневное измерение температуры тела и регистрацию покраснения и отека в месте инъекции, а также регистрацию интенсивности боли в области инъекции, головной боли, миалгии и недомогания. Незапрашиваемые НЯ и серьезные нежелательные явления (СНЯ) регистрировали на протяжении всего исследования. Все анализы были описательными.

В табл. 8 представлены данные о плане исследования и субъектах исследования.

Таблица 8. План и субъекты исследования

	Конъюгатная вакцина MenACYW-ТТ, n (%)	Контрольная вакцина MCV4-ТТ, n (%)	Все субъекты, n (%)
Запланированный размер образца	100	100	200
Включенные в исследование субъекты	94 (100%)	94 (100%)	188 (100%)
Рандомизированные субъекты	94 (100%)	94 (100%)	188 (100%)
Субъекты, закончившие исследование	94 (100%)	94 (100%)	188 (100%)
Субъекты, прервавшие исследование	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Субъекты, участвовавшие в анализе без нарушения протокола	91 (96,8%)	86 (91,5%)	177 (94,1%)

Демографический анализ выполняли для популяции для оценки безопасности. Популяцию для оценки безопасности определяли как субъекты, получившие по меньшей мере одну дозу исследуемой или контрольной вакцины и для которых были доступны данные по безопасности. Популяция для оценки безопасности включала 98 (52,1%) мужчин и 90 (47,9%) женщин; общее отношение субъектов мужского/женского пола составило 1,09. В группе MenACYW-ТТ было больше мужчин, чем женщин (отношение мужчин и женщин составило 1,54). В группе MCV4-ТТ было больше женщин, чем мужчин (отношение мужчин и женщин составило 0,77). Возраст испытуемых в двух группах был сопоставимым. Средний возраст испытуемых на момент включения в исследование составил $1,44 \pm 0,302$ года в группе MenACYW-ТТ и $1,47 \pm 0,314$ года в группе MCV4-ТТ.

Доля субъектов с сывороточной реакцией hSBA на вакцину MenACYW-ТТ была сопоставима с таковой на вакцину MCV4-ТТ для серогрупп А, W и Y (от 96,7% до 98,9% (MenACYW-ТТ) и от 91,9% до 98,8% (MCV4-ТТ)) (фиг. 15). Сывороточную реакцию hSBA на вакцину определяли следующим образом: если на исходном уровне титр был $<1:8$, а после вакцинации стал $\geq 1:8$, или если на исходном уровне титр был $\geq 1:8$, а после вакцинации увеличился в ≥ 4 раза.

Доля субъектов с сывороточной реакцией на серогруппу С была выше в группе MenACYW-ТТ (100,0%), чем в группе MCV4-ТТ (86,0%). При использовании rSBA тенденция для серогруппы С была аналогичной.

Данные о доле субъектов, у которых титры hSBA достигли уровня ≥ 8 ($\geq 1:8$) в D30 после вакцинации, представлены в табл. 9.

Таблица 9. Доля пациентов, у которых титры hSBA достигли уровня ≥ 8

Серогруппы	Доля субъектов, у которых титры по результатам сывороточного бактерицидного теста достигли уровня ≥ 8 , % (95% CI)	
	MenACYW-TT	MCV4-TT
A	97,8 (92,3; 99,7)	91,9 (83,9; 96,7)
C	100,0 (96,0; 100,0)	89,5 (81,1; 95,1)
W	98,9 (94,0; 100,0)	96,5 (90,1; 99,3)
Y	98,9 (94,0; 100,0)	100,0 (95,8; 100,0)

MenACYW-TT вызвала сопоставимые иммунные ответы на серогруппы A, W и Y и более высокие на серогруппу C, которые оценивали по среднегеометрическим титрам hSBA и доле субъектов с титрами hSBA ≥ 8 ($\geq 1:8$) после вакцинации (фиг. 16 и табл. 10). На фиг. 16 и в табл. 10 показаны одни и те же данные, за исключением того, что показанные на фиг. 16 данные в табл. 10 преобразованы в масштабе $\log_2$.

Таблица 10. Среднегеометрические титры hSBA после вакцинации

	MenACYW-TT	MCV4-TT
A	76,8	61,5
C	492,9	28,4
W	71,7	44,5
Y	96,6	76,4

В этом исследовании также оценивали безопасность. Профили реактогенности были сопоставимыми для обеих вакцин. Доля субъектов, сообщивших по меньшей мере об одной запрошенной реакции в месте инъекции, была сопоставимой для обеих вакцин (48,9% и 53,2%). Данные о покраснении кожи, чувствительности и отеке в месте инъекции показаны на фиг. 17. Большинство реакций в местах инъекции имели интенсивность степени 1 или 2, все из которых проявились между D0 и D03 и длились в основном от 1 до 3 дней.

Несколько субъектов сообщили о реакциях в месте инъекции с интенсивностью степени 3: 3,2% пациентов в группе MenACYW-TT и 4,3% пациентов в группе MCV4-TT.

Запрошенные системные реакции у двух групп также были похожими (фиг. 18).

Доля субъектов, сообщивших по меньшей мере об одном незапрашиваемом, не являющимся серьезным НЯ, была сопоставимой в исследуемых группах. Большинство незапрашиваемых нежелательных явлений имели интенсивность степени 1 или 2. Ни в одной из групп не было зарегистрировано незапрашиваемых НЯ, возникших сразу после вакцинации. СНЯ, возникших сразу после вакцинации, включая какие-либо анафилактические или опасные для жизни события, также не были зарегистрированы. Два зарегистрированных серьезных нежелательных явления были признаны не имеющими отношения к вакцинации.

Исследуемая вакцина MenACYW-TT была хорошо переносимой и иммуногенной. Единичная доза вакцины MenACYW-TT продемонстрировала превосходную эффективность в качестве альтернативного варианта вакцины для детей младшего возраста, впервые получающих менингококковую вакцину.

е) Фаза II клинического исследования 4. Безопасность и иммуногенность MenACYW-TT, вводимой здоровым подросткам (10-18 лет), не получавшим менингококковую вакцину.

В фазе II этого исследования оценивали безопасность и иммуногенность единичной дозы (10 мкг на серогруппу полисахарида, конъюгированного с ТТ в общем количестве 65 мкг в 0,67% NaCl/30 mM ацетата натрия, забуференного при pH 6,0) MenACYW-TT, вводимой внутримышечно подросткам в возрасте 10-18 лет. Контрольной группе (группа 2) вводили Menveo® (менингококковую (группы A, C, Y и W-135) олигосахаридную дифтерийную вакцину CRM197, называемую в настоящем документе "MenACYW-CRM197"), лицензированную четырехвалентную менингококковую конъюгатную вакцину. Эффект совместного введения MenACYW-TT с Tdap/Adacel® и HPV/Gardasil® (группа 3) также сравнивали с введением только Tdap/Adacel® и HPV/Gardasil® (группа 4). Контрольную вакцину и вакцины Tdap/Adacel® и HPV/Gardasil® вводили в соответствии с инструкциями на этикетке. Четыре исследуемые группы обобщили и охарактеризовали в табл. 11.

Таблица 11. Исследуемые группы в клиническом исследовании 4

Группа	n	Лечение	Мужчины	Женщины	Средний, медианный возраст (годы)
1	503	MenACYW-TT	243	260	11,4, 11,1
2	501	MenACYW-CRM ₁₉₇	272	229	11,4, 11,2
3	392	MenACYW-TT with Tdap/Adacel® and HPV*/Gardasil®	201	191	11,3, 11,1
4	155	Tdap/Adacel® and HPV*/Gardasil®	155	141	11,4, 11,1

*Первую дозу вакцины против HPV вводили в D0; дозу 2 и дозу 3 HPV вводили через 2 и 6 месяцев, соответственно, после дозы 1

В общей сложности 74 субъекта (4,3%) не завершили исследование: 10 (2,0%) в группе 1, 7 (1,4%) в группе 2, 27 (6,7%) в группе 3 и 30 (10,0%) в группе 4. Наиболее частыми причинами прекращения исследования были: добровольное прекращение лечения, не связанное с неблагоприятным явлением, не прошедшие последующее наблюдение и несоблюдение протокола. СНЯ или другое НЯ не было причиной раннего прекращения исследования.

Сывороточный бактерицидный тест с компонентом человека (hSBA) использовали для измерения антител к менингококковым серогруппам A, C, W и Y в начале исследования и через 30 дней после введения дозы. LLOQ бактерицидных тестов составлял 1:4. Данные hSBA получали для 463 членов группы 1, 464 членов группы 2 и 360 членов группы 3. Результаты hSBA приведены в табл. 12, в которой процент субъектов указывает долю субъектов с положительной сывороточной реакцией, т.е. hSBA $\geq 1:8$ у субъектов после вакцинации, у которых титры hSBA до вакцинации были $< 1:8$, или по меньшей мере увеличение титров hSBA после вакцинации в 4 раза у субъектов, у которых титры до вакцинации были $\geq 1:8$. Во всех четырех серогруппах доля субъектов, вакцинированных MenACYW-TT, с положительной сывороточной реакцией была больше, чем в случае вакцины MenACYW-CRM₁₉₇.

Таблица 12. Результаты hSBA для фазы II клинических исследований 4

	Группа 1 (MenACYW-TT) (N=463)		Группа 2 (MenACYW-CRM ₁₉₇) (N=464)		Группа 3 (MenACYW-TT + Tdap+HPV) (N=360)	
Серогруппа	% субъектов	95%CI	% субъектов	95%CI	% субъектов	95%CI
A	75,6	71,4; 79,4	66,4	61,9; 70,7	80,6	76,1; 84,5
C	97,2	95,2; 98,5	72,6	68,3; 76,6	97,2	95,0; 98,7
Y	97,0	95,0; 98,3	80,8	76,9; 84,3	95,6	92,9; 97,4
W	86,2	82,7; 89,2	66,6	62,1; 70,9	83,9	79,7; 87,5

Разница в частоте сывороточной реакции между группами 1 и 2 показана в табл. 13 вместе с 95%-ным доверительным интервалом.

Таблица 13. Дифференциальная сывороточная реакция в группах 1-2

Серогруппа	Разница (%) субъектов)	95% CI
A	9,2	3,4; 15,0
C	24,6	20,3; 29,0
Y	16,2	12,3; 20,2
W	19,6	14,2; 24,8

Разница в частоте сывороточной реакции между группами 1 и 3 не была достоверной при 95% доверительном интервале, что согласуется с выводом о том, что на эффективность MenACYW-TT не влияет совместное введение с Tdap/Adacel® и HPV/Gardasil®.

В табл. 14 показаны результаты hSBA, выраженные в виде среднегеометрических титров (GMT) в день 0 (D0) и день 30 (D30), а также 95% доверительные интервалы.

Таблица 14. Среднегеометрические титры hSBA

		Группа 1		Группа 2		Группа 3	
		(N=463)		(N=464)		(N=360)	
Серогруппа		GMT	95%CI	GMT	95%CI	GMT	95%CI
A	D0	6,19	5,62; 6,83	5,75	5,24; 6,31	5,34	4,8; 5,94
	D30	44,1	39,2; 49,6	35,2	30,3; 41,0	47,9	41,7; 55,0
C	D0	3,36	3,12; 3,62	3,08	2,88; 3,30	3,38	3,13; 3,64
	D30	387	329; 456	51,4	41,2; 64,2	335	280; 399
Y	D0	2,33	2,23; 2,43	2,41	2,28; 2,54	2,46	2,32; 2,62
	D30	75,7	66,2; 86,5	27,6	23,8; 32,1	77,3	66,5; 89,9
W	D0	5,17	4,67; 5,73	5,35	4,82; 5,94	5,87	5,22; 6,60
	D30	86,9	77,8; 97	36,0	31,5; 41,0	91	80,2; 103

Иммунные ответы на дифтерию и столбняк сравнивали для всех групп. Результаты, выраженные в виде среднегеометрической концентрации (GMC), показаны в табл. 15; % субъектов с $\geq 0,1$ ME/мл; и % субъектов с $\geq 1,0$ ME/мл концентрациями антител к столбняку и дифтерии.

Таблица 15. Среднегеометрические значения и титры после вакцинации против дифтерии и столбняка

	Дифтерия			Столбняк		
	GMC	$\geq 0,1$ МЕ/мл (%)	$\geq 1,0$ МЕ/мл (%)	GMC	$\geq 0,1$ МЕ/мл (%)	$\geq 1,0$ МЕ/мл (%)
Группа 1 (N=463)	0,152	57,4	7,4	21,4	100	97,9
Группа 2 (N=464)	35,4	100	98,9	0,346	90,1	18,7
Группа 3 (N=360)	11,9	99,4	97,8	29,0	99,7	99,7
Группа 4 (N=263)	15,7	99,6	98,9	14,7	100	99,6

Результаты соответствовали выводу о том, что совместное введение MenACYW-TT с Tdap/Adacel® (группа 3) не влияло на иммуногенность последней (см. результаты для группы 4).

Ответы на вакцины также были охарактеризованы в отношении следующих антигенов: коклюшный токсин (PT), коклюшный филаментозный гемагглютинин (FHA), коклюшный пертактин (PRN) и коклюшный фимбриальный антиген (FIM). См. табл. 16.

Таблица 16. Ответ на PT, FHA, PRN и FIM антигены

	Группа 3 (N=360)			Группа 4 (n=263)		
	GMT/ GMC	95% CI	Ответ на вакцину (%)	GMT/ GMC	95% CI	Ответ на вакцину (%)
PT	37,5	33,8; 41,7	67,3	44,4	39,5; 49,9	78,2
FHA	180	168; 194	92,1	242	218; 268	89,4
PRN	200	177; 225	94,7	265	231; 304	96,6
FIM	339	285; 403	92,2	499	414; 601	95,4

В отношении безопасности наблюдали следующее: возникновение, характер, продолжительность, интенсивность и отношение к вакцинации любых незапрашиваемых системных нежелательных явлений (НЯ), о которых сообщили через 30 мин после вакцинации; возникновение, время начала, количество дней проявления, интенсивность, предпринятые действия и то, привела ли реакция к раннему прекращению исследования, для запрошенных реакций в месте инъекции, о которых сообщалось вплоть до 7 дня после вакцинации в D0; возникновение, время начала, количество дней проявления, интенсивность, предпринятые действия и то, привела ли реакция к раннему прекращению исследования, для запрошенных системных реакций, о которых сообщалось вплоть до 7 дня после вакцинации в D0; возникновение, характер, время начала, продолжительность, интенсивность, предпринятые действия, отношение к вакцинации (только для системных НЯ) и то, привело ли событие к преждевременному прекращению исследования, для незапрашиваемых НЯ, о которых сообщалось вплоть до 23-37 дня после вакцинации(й) в D0; и возникновение, характер, время начала, продолжительность, степень тяжести, отношение к вакцинации, исход и то, привело ли серьезное нежелательное явление (СНЯ) к преждевременному прекращению исследования, для СНЯ, о которых сообщалось в течение всего исследования вплоть до 180 дня (группа 1 и группа 2) или 210 дня (группа 3 и группа 4) после вакцинации в D0. Запрошенные системные реакции включали лихорадку, миалгию и головную боль. Запрошенные реакции в месте инъекции вклю-

чали боль, эритему и отек.

Доля субъектов, сообщивших по меньшей мере об одной запрошенной реакции между D0 и D7, была сопоставимой для конъюгатной вакцины MenACYW-TT и MENVEO®: 63,5% (315/496) субъектов в группе 1 и 64,2% (316/492) в группе 2, соответственно. Доля субъектов, сообщивших по меньшей мере об одной запрошенной реакции, была сопоставимой для субъектов, которые получили конъюгатную вакцину MenACYW-TT одновременно с Tdap и HPV, и субъектов, которые получили только Tdap и HPV: 88,9% (345/388) в группе 3 и 89,0% (258/290) в группе 4, соответственно. Доля субъектов, которые сообщили по меньшей мере об одной запрошенной реакции в месте инъекции, была сопоставимой в группах 1, 2 и 3: 46,6% (231/496), 45,7% (225/492) и 49,0% (190/388), соответственно. Увеличение локальной реактогенности на конъюгатную вакцину MenACYW-TT не наблюдалось, когда конъюгатную вакцину MenACYW-TT вводили одновременно с Tdap и HPV (группа 3), относительно введения только одной конъюгатной вакцины MenACYW-TT (группа 1).

Наиболее часто сообщаемой реакцией на месте инъекции была боль, о которой сообщили 45,2% (224/496) субъектов в группе 1, 42,5% (209/492) субъектов в группе 2 и 47,2% (183/388) субъектов в группе 3, за которой следует покраснение в месте инъекции, о которой сообщили 5,0% (25/496) субъектов в группе 1, 7,5% (37/491) субъектов во 2-й группе и 3,9% (15/388) субъектов в группе 3, и отек в месте инъекции, о котором сообщили 5,4% (27/496) субъектов в группе 1, 6,5% (32/491) субъектов в группе 2 и 4,4% (17/388) субъектов в группе 3. Большинство реакций на в месте инъекции конъюгатной вакцины MenACYW-TT или MENVEO® имели интенсивность степени 1 или 2, проявлялись между D0 и D03 и длились от 1 до 3 дней. Доля субъектов с интенсивностью реакции степени 3 в месте инъекции конъюгатной вакцины MenACYW-TT или MENVEO® составила 1,8% (9/496) в группе 1, 2,2% (11/492) в группе 2 и 2,8% (11/388) в группе 3. Доля субъектов с болью степени 3 в месте инъекции конъюгатной вакцины MenACYW-TT или MENVEO® составила 1,4% (7/496) в группе 1, 1,0% (5/492) в группе 2 и 2,3% (9/388) в группе 3. Доля субъектов с покраснением степени 3 составила 0,4% (2/496) в группе 1, 1,2% (6/491) в группе 2 и 0,5% (2/388) в группе 3. Доля субъектов с отеком степени 3 составила 0,2% (1/496) в группе 1, 0,4% (2/491) в группе 2 и 0,3% (1/388) в группе 3. Степени интенсивности обычно имеют следующие значения. Степень 1: не мешает ежедневной активности. Степень 2: немного мешает ежедневной активности. Степень 3: значительная; мешает ежедневной активности. Процент субъектов, сообщивших по меньшей мере об одной запрошенной системной реакции после вакцинации, был сопоставимым в группе 1 (52,0% (258/496)) и группе 2 (51,0% (251/492)). Миалгия была наиболее часто упоминаемой системной реакцией, сопровождающейся головной болью и недомоганием, с очень небольшим количеством сообщений о лихорадке. Миалгия была отмечена у 35,3% (175/496) субъектов в группе 1 и у 35,2% (173/492) субъектов в группе 2. Головная боль отмечалась у 30,2% (150/496) субъектов в группе 1 и 30,9% (152/492) субъектов в группе 2. О недомогании сообщили 26,0% (129/496) субъектов в группе 1 и 26,4% (130/492) субъектов в группе 2. Лихорадка была отмечена у 1,4% (7/494) субъектов в группе 1 и 1,2% (6/488) субъектов в группе 2.

Доля субъектов с по меньшей мере одной запрошенной системной реакцией после вакцинации была сопоставимой в группе 3 (70,6% (274/388)) и группе 4 (65,9% (191/290)). Миалгия была наиболее часто встречающейся запрошенной системной реакцией: 61,3% (238/388) субъектов в группе 3 и 55,4% (160/289) субъектов в группе 4. Головная боль отмечалась у 33,8% (131/388) субъектов в группе 3 и 29,0% (84/290) субъектов в группе 4. Недомогание было зарегистрировано у 29,1% (113/388) субъектов в группе 3 и у 27,9% (81/290) субъектов в группе 4. О лихорадке сообщили 1,6% (6/387) субъектов в группе 3 и 0,7% (2/286) субъектов в группе 4. В целом, большинство запрошенных системных реакций имели степень 1 или 2, которые проявились в дни D0-D03 и длились от 1 до 3 дней.

В целом, доля субъектов, сообщивших о системных реакциях с интенсивностью степени 3 была сопоставимой в группе 1 (3,8% (19/496)) и группе 2 (4,3% (21/492)). Доля субъектов, сообщивших о системных реакциях степени 3 была сопоставимой в группе 3 (7,5% (29/388)) и группе 4 (5,5% (16/290)). Согласно сообщениям, наиболее частой системной реакцией степени 3 была миалгия, сопровождаемая недомоганием и головной болью. Доля субъектов, сообщивших о миалгии степени 3, была сопоставимой в группе 1 (1,6% (8/496)) и группе 2 (1,8% (9/492)), а также в группе 3 (4,6% (18/388)) и группе 4 (3,8% (11/289)). Доля субъектов, сообщивших о недомогании степени 3, была сопоставимой в группе 1 (2,2% (11/496)) и группе 2 (2,8% (14/492)). Сообщений о недомогании было больше в группе 3 (2,6% (10/388)), чем в группе 4 (1,7% (5/290)). Доля субъектов, сообщивших о головной боли степени 3, была одинаковой в группах 1 (1,8% (9/496)) и 2 (1,8% (9/492)). Головная боль чаще отмечалась в группе 3 (2,8% (11/388)), чем в группе 4 (1,7% (5/290)).

В целом, доля субъектов, сообщивших по меньшей мере об одном незапрашиваемом НЯ, возникшем между D0 и D30, была сопоставимой в 4 исследуемых группах: 22,9% (115/503) субъектов в группе 1 и 25,7% (129/501) в группе 2; 26,0% (102/392) в группе 3 и 22,6% (67/296) в группе 4. Несколько субъектов сообщили о сразу возникших незапрашиваемых НЯ: 0,6% (3/503) субъектов в группе 1, 0,2% (1/501) субъекты в группе 2, 0,8% (3/392) субъектов в группе 3 и 0,7% (2/296) субъектов в группе 4. СНЯ, возникающие сразу, включая какие-либо анафилактические или опасные для жизни события, от-

существовали. Двенадцать возникших сразу незапрашиваемых НЯ были зарегистрированы у 9 субъектов на 23-37 день. Один субъект сообщил об одном возникшем сразу незапрашиваемом НЯ через шесть месяцев после вакцинации в D0.

Доля субъектов, которые сообщили по меньшей мере об одном незапрашиваемом, не являющимся НЯ в месте инъекции после вакцинации (вакцинаций) в D0 была сопоставимой в группе 1 и группе 2: 1,4% (7/503) и 1,6% (8/501) соответственно; в группе 3 доля субъектов, сообщивших по меньшей мере об одном незапрашиваемом, не являющимся серьезным НЯ в месте инъекции была более высокой, чем в группе 4: 4,3% (17/392) и 2,0% (6/296) соответственно. Наиболее часто сообщаемой незапрашиваемой реакцией в месте инъекции был зуд, зарегистрированный у 14 субъектов, за ним следовало образование синяков, о которых сообщили 13 субъектов. Эти незапрашиваемые реакции в месте инъекции, в целом, могут возникать после любой вакцинации.

Доля субъектов, сообщивших по меньшей мере об одном незапрашиваемом, не являющимся серьезным НЯ в месте инъекции конъюгатной вакцины MenACYW-TT или MENVEO® была сопоставимой: 1,4% (7/503) в группе 1, 1,6% (8/501) в группе 2, и 1,8% (7/392) в группе 3. Один субъект в группе 2 сообщил о незапрашиваемом НЯ степени 3, проявившимся в виде жара в месте инъекции, возникшим в D01 и длившимся в течение 4 дней, которое в последствии спонтанно прекратилось. Никаких действий не было предпринято.

Незапрашиваемые, не являющиеся серьезными НЯ не были зарегистрированы в группе 1 и в месте инъекции конъюгатной вакцины MenACYW-TT в группе 3.

Доля субъектов, сообщивших в течение 30 дней по меньшей мере об одном незапрашиваемом, не являющимся серьезным НЯ была сопоставимой в 4-х исследуемых группах: 22,7% (114/503) субъектов в группе 1, 25,5% (128/501) субъектов в группе 2, 26,0% (102/392) субъектов в группе 3 и 22,3% (66/296) субъектов в группе 4. Чаще всего регистрировали инфекции и инвазии (7,2% (36/503) у субъектов в группе 1, 8,0% (40/501) субъектов в группе 2, 8,2% (32/392) субъектов в группе 3, 6,1% (18/296) субъектов в группе 4); наиболее распространенной была инфекция верхних дыхательных путей.

Во время исследования шестнадцать субъектов сообщили об СНЯ; 4 субъекта сообщили об СНЯ в течение 30 дней после вакцинации в D0. Ни одно из них не рассматривалось как связанное с вакциной, и ни одно из них не привело к прекращению участия в исследовании. Все СНЯ прошли. Во время исследования смертельные случаи не были зарегистрированы.

Было установлено, что вакцинация подростков конъюгатной вакциной MenACYW-TT является безопасной, при этом не было выявлено никаких проблем с безопасностью при ее введении отдельно или одновременно с вакцинами против Tdap и HPV. Профиль безопасности конъюгатной вакцины MenACYW-TT был сопоставим с таковым для лицензированной вакцины MENVEO®.

г) Фаза III клинических исследований 1. Иммуногенность и безопасность бустерной дозы MenACYW-TT у подростков и взрослых.

В этом исследовании оценивали безопасность и иммуногенность единичной дозы (10 мкг на се-рогруппу полисахарида, конъюгированного с TT в общем количестве 65 мкг, в 0,67% NaCl/30 mM ацетата натрия, забуференного при pH 6,0) MenACYW-TT, вводимой внутримышечно подросткам (≥ 15 до < 18 лет) и взрослым (18-59 лет). Субъектам вводили одну дозу четырехвалентной менингококковой конъюгатной вакцины ("примирующая вакцина") за 4-10 лет до введения MenACYW-TT (группа 1; n=402).

Контрольной группе (группа 2; n=407) вводили Menactra® (менингококковую (группы A, C, Y и W-135) вакцину конъюгата капсульного сахара с дифтерийным анатоксином, называемую в настоящем документе "MenACYW-DT"), лицензированной четырехвалентную конъюгатную менингококковую вакцину. Субъектам из группы 2 также вводили одну дозу примирующей вакцины 4-10 лет назад.

В обеих группах примирующей вакциной была MenACYW-DT (86,3% относительно всех субъектов), MenACYW-CRM₁₉₇ (11,25% относительно всех субъектов; MenACYW-CRM₁₉₇ обсуждалась выше в отношении клинического исследования 4) или неизвестная вакцина (2,45% относительно всех субъектов; 9 в группе 1 и 10 в группе 2).

Демография исследуемых групп приведена в табл. 17.

Таблица 17. Исследуемые группы в фазе III клинических исследований 1

Группа	n	Лечение	Мужчины	Женщины	Средний, медианный возраст (годы)	Примирующая вакцина MenACYW-DT	Примирующая вакцина MenACYW-CRM ₁₉₇
1	402	MenACYW-TT	195	207	22,0, 16,5	327	48
2	407	MenACYW-DT	207	200	22,5, 16,4	340	39

Сывороточный бактерицидный тест с hSBA и крольчонка (rSBA) проводили через 30 дней после вакцинации. Тест hSBA также проводили в день 6. Доля субъектов, у которых была обнаружена положи-

тельная сывороточная реакция, показана в табл. 18. Для теста hSBA положительная сывороточная реакция представляла собой титр после вакцинации $\geq 1:16$, если исходный титр составлял $< 1:8$, или четырехкратное увеличение после вакцинации, если исходный титр был $\geq 1:8$. 384 субъекта группы 1 и 389 субъектов группы 2 показали достоверные результаты для hSBA на 30-й день. Для результатов rSBA положительной сывороточной реакцией был либо титр после вакцинации $\geq 1:32$, если исходный титр составлял $< 1:8$, либо четырехкратное увеличение после вакцинации, если исходный титр был $\geq 1:8$.

Таблица 18. hSBA и rSBA результаты клинических исследований 5

hSBA, день 30	группа 1 (MenACYW-TT)		группа 2 (MenACYW-DT)	
Серогруппа	% субъектов	95%CI	% субъектов	95%CI
A	92,2	(89,0;94,7)	87,1	(83,4;90,3)
C	97,1	(94,9;98,6)	91,8	(88,6;94,3)
Y	97,4	(95,3;98,7)	95,6	(93,1;97,4)
W	98,2	(96,3;99,3)	90,7	(87,4;93,4)
hSBA, день 6	Группа 1 (MenACYW-TT)		Группа 2 (MenACYW-DT)	
Серогруппа	% субъектов	95%CI	% субъектов	95%CI
A	72,7	(59,0;83,9)	66,1	(53,0;77,7)
C	83,6	(71,2;92,2)	87,1	(76,1;94,3)
Y	90,9	(80,0;97,0)	83,9	(72,3;92,0)
W	94,5	(84,9;98,9)	83,9	(72,3;92,0)
rSBA, день 30	Группа 1 (MenACYW-TT)		Группа 2 (MenACYW-DT)	
Серогруппа	% субъектов	95%CI	% субъектов	95%CI
A	80,2	(70,6;87,8)	71	(61,1;79,6)
C	98,9	(94,0;100,0)	96	(90,1;98,9)
Y	95,6	(89,1;98,8)	87	(78,8;92,9)
W	94,5	(87,6;98,2)	95	(88,7;98,4)

Доля субъектов, у которых титр hSBA был $\geq 1:8$ в день 30, составила $\geq 99\%$ для всех серогрупп и сильно не изменялась в зависимости от типа ранее введенной вакцины (данные не показаны). В табл. 19 показаны среднегеометрические титры (GMT) в день 0 (предварительная обработка) и день 30, измеренные с помощью hSBA и rSBA. В день 30 результаты hSBA представлены для групп в целом и для подгрупп, которые ранее получали MenACYW-DT и MenACYW-CRM₁₉₇.

Таблица 19. Среднегеометрические титры

hSBA		Группа 1 (все)		Группа 2 (все)		Группа 1/группа 2 GMT	
Серо- группа		GMT	95%CI	GMT	95%CI	отнош ение	
А	D0	13,7	(12,2;15,5)	15,1	(13,5;16,9)		
	D30	497	(436;568)	296	(256;343)	1,68	(1,38;2,05)
С	D0	11,0	(9,32;13,1)	10,6	(9,10;12,4)		
	D30	2618	(2227;3078)	599	(504;71)	4,37	(3,45;5,53)

Y	D0	7,7	(6,56;9,04)	7,27	(6,21;8,50)		
	D30	2070	(1807;2371)	811	(699;941)	2,55	(2,09;3,12)
W	D0	9,76	(8,46;11,2)	10,6	(9,21;12,2)		
	D30	1747	(1508;2025)	723	(614;853)	2,42	(1,94;3,01)
hSBA		Группа 1 (ранее получавшая MenACYW-DT)		Группа 2 (ранее получавшая MenACYW-DT)		Группа 1/группа 2 GMT	
Серо-группа		GMT	95%CI	GMT	95%CI	отношение	
A	D30	490	(424;565)	298	(255;349)	1,64	(1,33;2,03)
C	D30	2505	(2096;2993)	575	(478;691)	4,36	(3,37;5,63)
Y	D30	2009	(1737;2324)	771	(660;902)	2,61	(2,10;3,23)
W	D30	1758	(1497;2065)	671	(563;800)	2,62	(2,06;3,32)
hSBA		Группа 1 (ранее получавшая MenACYW-CRM ₁₉₇)		Группа 2 (ранее получавшая MenACYW-CRM ₁₉₇)		Группа 1/группа 2 GMT	
Серо-группа		GMT	95%CI	GMT	95%CI	отношение	
A	D30	636	(439;920)	238	(148;384)	2,67	(1,49;4,79)
C	D30	4096	(2745;6113)	771	(439;1351)	5,31	(2,74;10,3)
Y	D30	2981	(2011;4420)	1245	(738;2101)	2,39	(1,27;4,51)
W	D30	1773	(1185;2651)	1202	(697;2071)	1,48	(0,768;2,83)
rSBA		Группа 1		Группа 2			
Серо-		GMT	95%CI	GMT	95%CI		

группа					
A	D0	1097	(724;1662)	1144	(812;1613)
	D30	1085 9	(8844;1333 3)	6608	(5410;8071)
C	D0	15,2	(9,38;24,5)	9,1	(5,90;14,1)
	D30	1189 8	(9425;1502 1)	2665	(1934;3672)
Y	D0	84,2	(45,7;155)	52,7	(29,0;95,9)
	D30	9468	(7447;1203 7)	3848	(2778;5331)
W	D0	141	(74,3;269)	145	(85,0;247)
	D30	2122 7	(17199;262 00)	9410	(7203;1229 4)

Представленные выше результаты оценки hSBA показывают, что во всех 4-х серогруппах в день 30 после бустера доля субъектов, у которых наблюдалась сывороточная реакция после введения MenACYW-TT, была выше, чем после введения MenACYW-DT. Значения GMT по данным hSBA также были выше во всех 4-х серогруппах после вакцинации MenACYW-TT по сравнению с MenACYW-DT.

Кроме того, единичная доза MenACYW-TT, введенная взрослым и подросткам, которые получили одну дозу MenACYW-DT или MenACYW-CRM₁₉₇ 4-10 лет назад, была хорошо переносимой и не вызвала никаких новых проблем, связанных с безопасностью или сигналами безопасности. В отношении безопасности наблюдали следующее: возникновение, характер, продолжительность, интенсивность и связь с вакцинацией любых незапрашиваемых системных НЯ, зарегистрированных через 30 мин после вакцинации; возникновение, время начала, количество дней проявления, интенсивность, предпринятые действия и то, привели ли эти реакции к раннему прекращению исследования, для запрошенных реакций в месте инъекции в течение 7 дней после вакцинации; возникновение, время начала, количество дней проявления, интенсивность, предпринятые действия и то, привели ли эти реакции к преждевременному прекращению исследования, для запрошенных системных реакций в течение 7 дней после вакцинации; возникновение, характер, время начала, длительность, интенсивность, предпринятые действия, отношение к вакцинации (только для системных НЯ) и то, привели ли эти события к преждевременному прекращению исследования, для незапрашиваемых НЯ, о которых сообщалось вплоть до D30 (+14 дней); и возникновение, характер, время начала, продолжительность, степень тяжести, отношение к вакцинации, исход и, привели ли СНЯ к досрочному прекращению исследования, для СНЯ, о которых сообщалось течение всего исследования. Запрошенные НЯ были по существу такими же, как описано выше для фазы II клинического исследования 4.

В целом доля субъектов, сообщивших по меньшей мере об одной запрошенной реакции, была сопоставимой в группе 1 и группе 2: 64,3% (256/398) субъектов в группе 1 и 65,4% (263/402) субъектов в группе 2 соответственно. Доля субъектов, сообщивших по меньшей мере об одной запрошенной реакции степени 3 была сопоставимой в группе 1 и группе 2: 5,0% (20/398) субъектов в группе 1 и 5,5% (22/402) субъектов в группе 2, соответственно. Доля субъектов, сообщивших по меньшей мере об одной запрошенной реакции в месте инъекции, была сопоставимой в группе 1 и группе 2: 46,5% (185/398) субъектов в группе 1 и 49,3% (198/402) субъектов в группе 2, соответственно. Наиболее часто сообщаемой реакцией в месте инъекции была боль, о которой сообщали 44,7% (178/398) субъектов в группе 1 и 48,8% (196/402) субъектов в группе 2. Покраснение и отек регистрировали реже. Более высокая частота покраснения и отека была отмечена в группе 1 (5,0% (20/398) и 4,0% (16/398), соответственно) по сравнению с группой 2 (1,5% (6/402) и 0,7% (3/402) соответственно). Интенсивность большинства реакций имела степень 1; доля субъектов, сообщивших о покраснении и отеке степени 2, была сопоставимой в группе 1 (0,5% (2/398) и 0,8% (3/398) соответственно) и группе 2 (0,2% (1/402) и 0,5% (2/402) соответственно). Ни в одной группе не было зарегистрировано покраснение или отек степени 3. Большинство реакций на конъюгатную вакцину MenACYW или Menactra® в местах инъекций имели интенсивность степени 1 или 2, большинство из которых начинались между D0 и D03, и большинство из которых продолжались от 1

до 3 дней. Несколько субъектов сообщило о реакции степени 3 в месте инъекции: 1,0% (4/398) субъектов в группе 1 и 2,0% (8/402) субъектов в группе 2 сообщили о боли степени 3. Ни один из участников ни в одной из групп не сообщил о покраснении или отеке степени 3.

Доля субъектов, сообщивших по меньшей мере об одной запрошенной системной реакции, была сопоставимой в группе 1 и группе 2: 55,3% (220/398) субъектов в группе 1 и 54,2% (218/402) субъектов в группе 2, соответственно. Миалгия и головная боль были наиболее часто встречающимися запрошенными системными реакциями:

- о миалгии сообщили 36,7% (146/398) субъектов в группе 1 и 38,8% (156/402) субъектов в группе 2;
- о головной боли сообщили 37,9% (151/398) субъектов в группе 1 и 33,3% (134/402) субъектов в группе 2;
- о недомогании сообщили 27,6% (110/398) субъектов в группе 1 и 26,9% (108/402) субъектов в группе 2.

Лихорадка не была отмечена в группе 1 (0,0% (0/390)), но зарегистрирована у 0,5% (2/395) субъектов в группе 2. В целом, наиболее частые запрошенные системные реакции имели интенсивность степени 1 или 2, которые возникали между D0 и D30 и длились от 1 до 3 дней. Мало кто из испытуемых сообщил о системных реакциях степени 3. Доля субъектов, сообщивших о запрошенной системной реакции степени 3, была одинаковой в группе 1 и группе 2: повышение температуры (0,0% (0/390) и 0,3% (1/395), соответственно), головная боль (2,3% (9/398)) и 3,5% (14/402) соответственно), недомогание (2,8% (11/398) и 3,5% (14/402) соответственно) и миалгия (2,0% (8/398) и 2,2% (9/402) соответственно).

Доля субъектов, сообщивших по меньшей мере об одном незапрашиваемом, не являющимся серьезным НЯ между D0 и D30, была сопоставимой в группе 1 (26,1% (105/402)) и группе 2 (25,3% (103/407)). Количество незапрашиваемых, не являющихся серьезными было одинаковым в группе 1 (n=164 НЯ) и в группе 2 (n=164 НЯ). Небольшой и сопоставимый процент незапрашиваемых, не являющихся серьезными НЯ был признан связанным с вакциной, введенной в D0: 3,0% (12/402) субъектов в группе 1 и 2,9% (12/407) субъектов в группе 2. Большинство из этих событий имели интенсивность степени 1 или 2.

Два субъекта (0,5%) в группе 1 сообщили по меньшей мере об одном возникшем сразу незапрашиваемом НЯ (головное головокружение у обоих субъектов), а в группе 2 такие события отсутствовали (0,0%).

В общей сложности 5 субъектов (1,2%) в группе 1 и 6 субъектов (1,5%) в группе 2 сообщили по меньшей мере об одном незапрашиваемом, не являющимся серьезным НЯ в месте инъекции. О возникновении синяков в месте инъекции сообщили 2 субъекта (0,5%) в группе 1 и 3 субъекта (0,7%) в группе 2. О зуде в месте инъекции сообщили 2 субъекта (0,5%) в группе 1 и 1 субъект (0,2%) в группе 2. О жаре в месте инъекции сообщил 1 субъект (0,2%) в группе 1. Обесцвечивание в месте инъекции и крапивница в месте инъекции были отмечены у 1 субъекта (0,2%) в группе 2. Изменение цвета в месте инъекции имело интенсивность степени 3 и продолжалось до конца исследования.

Инфекции и инвазии были наиболее часто встречающимися незапрашиваемыми, не являющимися серьезными системными НЯ (7,5% (30/402) субъектов в группе 1 и 6,6% (27/407) субъектов в группе 2). Часто сообщаемым типом инфекций или инвазий были назофарингит, о которых сообщали 1,7% (7/402) субъектов в группе 1 и 1,7% (7/407) субъектов в группе 2; и инфекции верхних дыхательных путей, о которых сообщили 1,0% (4/402) субъектов в группе 1 и 1,7% (7/407) субъектов в группе 2. Также часто сообщалось о заболеваниях дыхательных путей, органов грудной клетки и медиастинальных заболеваниях согласно SOC: 6,0% (24/402) субъектов в группе 1 и 6,6% (27/407) субъектов в группе 2, включая кашель и боль в ротоглотке. Большинство незапрашиваемых НЯ, о которых сообщалось в течение 30 дней после введения вакцины, имели интенсивность степени 1 или 2. Доля субъектов, которые сообщили по меньшей мере о системном не являющимся серьезным НЯ степени 1, была сопоставимой в обеих группах: 3,7% (15/402) субъектов в группе 1 и 4,2% (17/407) субъектов в группе 2.

Незапрашиваемые, не являющиеся серьезными системные НЯ, о которых сообщили 2,2% (9/402) субъектов в группе 1 и 1,7% (7/407) субъектов в группе 2, чаще всего соответствовали классификации общих расстройств и состоянию места введения вакцины. Наиболее часто сообщаемым незапрашиваемым, не являющимся серьезным системным НЯ по этой классификации была усталость, о которой сообщили 0,5% (2/402) субъектов в группе 1 и 0,2% (1/407) субъектов в группе 2. Только 1 субъект в группе 2 сообщил о незапрашиваемых, не являющихся серьезными системных ПР степени 2: тошнота степени 3 при желудочно-кишечных расстройствах по SOC и усталость степени 3 согласно классификации общих расстройств и состоянию места введения вакцины. Оба начались в D0 и длились 2 дня. Было дано лекарство от тошноты; для снятия усталости никакие действия не предпринимались.

В обеих группах отсутствовали НЯ или ПР, которые привели к прекращению исследования. Три субъекта испытывали СНЯ в течение первых 30 дней после вакцинации: двусторонняя легочная эмболия у одного субъекта в группе 1 и в группе 2 у одного субъекта серьезное депрессивное расстройство и у одного субъекта боль в груди. Ни одно из этих СНЯ не рассматривалось исследователем как связанное с вакциной, и ни одно из СНЯ не привело к прекращению исследования.

Шесть субъектов (4 в группе 1 и 2 в группе 2) испытали в общей сложности 6 СНЯ после D30 в течение 6-месячного периода наблюдения: 4 субъекта (1,0%) в группе 1 испытали 4 СНЯ и 2 субъекта

(0,5%) в группе 2 испытали 2 СНЯ. Ни одно из СНЯ не рассматривалось как связанное с вакциной, и ни одно из них не привело к прекращению исследования. Во время исследования смертельные случаи не зарегистрированы.

Было установлено, что вакцинация бустерной дозой конъюгатной вакцины MenACYW у подростков и взрослых в возрасте по меньшей мере 15 лет, примированных четырехвалентной менингококковой, конъюгатной вакциной, является безопасной, без каких-либо проблем, связанных с безопасностью. В целом профиль безопасности конъюгатной вакцины MenACYW был сопоставим с таковым для лицензированной вакцины Menactra®.

Стабильность жидких составов MenACYW-TT.

Некоторые или все компоненты существующих конъюгатных менингококковых полисахаридных вакцин, таких как MenACWY-CRM₁₉₇/Menveo® (четырёхвалентный конъюгат с CRM₁₉₇, в котором конъюгат MenA лиофилизирован) и MCV4-TT/Nimenrix® (полностью лиофилизированный четырёхвалентный конъюгат с TT) не хранятся в течение длительного времени в виде жидких составов. Menactra® (четырёхвалентный конъюгат с TT) хранится в виде жидкой композиции, но его срок годности составляет 24 месяца. В недавней публикации Beresford et al., охарактеризовали стабильность различных существующих вакцин и наблюдаемую деполимеризацию и потерю иммуногенности при определенных условиях, в результате чего было сделано заключение о том, что для "любых вновь разрабатываемых вакцин конъюгатов белка с сахаридом MenACWY основной рекомендацией является рассмотрение возможности лиофилизации конечного продукта для предотвращения вредного воздействия деградации, которая может повлиять на иммуногенность". Beresford et al., *Vaccine* 2017 Jun 16; 35 (28): 3598-3606; реферат.

Жидкие составы являются предпочтительными по меньшей мере потому, что они не требуют стадии лиофилизации во время производства, не требуют стадии восстановления перед введением и позволяют избежать риска возможных ошибок, связанных с восстановлением. Конечно, эти преимущества не имеют значения, если сам продукт подвергается деградации, которая оказывает отрицательное влияние на иммуногенность. Соответственно, было бы желательно, чтобы конъюгатная вакцина MenACYW была стабильной в виде жидкой композиции в течение более 24 месяцев. Стабильность MenACYW-TT согласно настоящему раскрытию была охарактеризована следующим образом.

MenACYW-TT хранили в смеси 0,67% NaCl/30 mM ацетата натрия, забуференной при pH 6,0, в течение 54 месяцев при температуре 2-8°C и тестировали на стабильность в моменты времени, выбранные из: 0, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 и 54 месяцев (см. Таблицу 20). Измеряемые параметры включали внешний вид, стерильность, отсутствие аномальной токсичности, общий уровень полисахарида каждой серогруппы, процент свободного полисахарида, молекулярная масса, полидисперсность, pH и иммуногенность.

Также проводили ускоренный тест стабильности MenACYW-TT путем хранения композиции при температуре 23-27°C. Тесты проводили в течение одной или нескольких недель, трех месяцев и шести месяцев (см. табл. 21).

Что касается внешнего вида, раствор оставался прозрачным в течение всего периода времени продолжительностью 54 месяца при 2-8°C и в течение 6 месяцев при 23-27°C, никаких дефектов не было отмечено (были протестированы все перечисленные выше моменты времени).

Отсутствие аномальной токсичности определяли путем наблюдения за грызунами (мышами или морскими свинками) после введения дозы MenACYW-TT. Во всех тестах все животные пережили тестируемый период 28 дней после введения; не было никаких неспецифических или неожиданных ответов; животные не худели в течение всего периода испытаний. Тестирование на аномальную токсичность проводили в моменты времени: 0, 12, 24, 36, 42, 48 и 54 месяца.

Значение pH находилось на уровне 6, 1 в 0 месяцев, и все измеренные значения находились в диапазоне от 6,1 до 6,3 во всех временных диапазонах (временные точки для pH составляли 0, 1, 6, 12, 24, 36, 42, 48 и 54 месяца при 2-8°C и 6 месяцев при 23-27°C). Никакого роста не наблюдали ни в одном из тестируемых моментов времени, включая 54 месяца (временные точки для тестирования стерильности были следующими: 0, 12, 24, 36, 42, 48 и 54 месяца при 2-8°C и 6 месяцев при 23-27°C).

Общий уровень полисахарида измеряли методом хроматографии Dionex™. Долю свободного полисахарида измеряли методом хроматографии Dionex™ и осаждением дезоксихолатом. Молекулярную массу и полидисперсность измеряли методом гель-фильтрационной хроматографии/многоугольного рассеяния света (SEC/MALS).

Результаты для 2-8°C приведены в табл. 20, а результаты для 23-27°C приведены в табл. 21.

Таблица 20. Результаты изучения стабильности при хранении при температуре 2-8°C.

Тест	Серо- группа	Время 0	1 месяц	3 месяца	6 месяце в	9 месяце в	12 месяце в	18 месяце в
Общий поли- сахарид (мкг/мл)	A	20,2	19,3	16,6	18,2	18,8	21,3	21,9
	C	19,4	20,8	15,0	14,5	16,2	18,3	20,4
	Y	16,7	16,2	20,7	16,8	16,9	17,2	16,4
	W-135	15,9	15,6	12,4	15,9	15,5	16,3	17,5
Свободного поли- сахарида	A	<15%	<16%	<18%	<17%	<16%	<14%	<14%
	C	<16%	<14%	<20%	<21%	<19%	<16%	<15%
	Y	<18%	19%	<15%	<18%	<18%	18%	<18%
	W-135	<19%	<19%	<24%	<19%	<19%	<18%	<17%
Молекулярн ая масса	все	9,122 Е5	5,095Е 5	7,679Е 5	7,713Е 5	1,533Е 6	8,348Е 5	9,958Е 5
Полидиспер сность	все	1,381	1,359	1,298	1,311	1,862	1,256	1,581
Тест	Серо- группа	Время 0	24 месяца	30 месяце в	36 месяце в	42 месяца	48 месяце в	54 месяца
Общий поли- сахарид (мкг/мл)	A	20,2	19,4	19,4	18,4	19,2	18,6	18,8
	C	19,4	17,7	18,2	18,2	22,4	21,6	20,0
	Y	16,7	13,5	14,6	14,7	18,5	14,8	14,2
	W-135	15,9	14,6	13,3	13,5	15,3	15,5	14,5
Свободного поли- сахарида	A	<15%	<15%	<15%	<16%	<16%	17	17
	C	<16%	<17%	<16%	<16%	<13%	<14	<15
	Y	<18%	<22%	<20%	<20%	21%	<20	<21
	W-135	<19%	<21%	<23%	<22%	<20%	<19	<21
Молекулярн ая масса	All	9,122 Е5	9,958Е 5	1,192Е 6	5,419Е 5	8,286Е 5	7,700Е 5	8,092Е 5
Полидиспер сность	All	1,381	1,581	1,432	1,288	1,485	1,572	1,495

NS: не запланировано, t: до тестирования образцы сыворотки хранили течение примерно 6-7 месяцев при температуре <-20°C, т.е. в условиях, при которых считается, что образцы остаются стабильными.

Таблица 21. Результаты изучения стабильности при хранении при температуре 23-27°C

Тест	Серогруппа	1 неделя	3 месяца	6 месяцев
Общий полисахарид (мкг/мл)	A	19,4	22,0	22,0
	C	14,1	20,5	19,9
	Y	13,9	17,0	15,9
	W-135	15,5	17,3	16,2
% свободного полисахарида	A	<15%	27%	31%
	C	<21%	25%	18%
	Y	<22%	<18%	30%
	W-135	<19%	17%	28%
Молекулярная масса	Все	8,212E5	8,285E5	6,209E5
Полидисперсность	Все	1,335	1,361	1,474

NS: не запланировано.

Результаты свидетельствуют о хорошей стабильности в течение всех периодов времени на протяжении 54 месяцев при 2-8°C и 6 месяцев при 23-27°C. В частности, при 2-8°C для всех четырех серогрупп наблюдали минимальную потерю конъюгации полисахарида с ТТ (увеличение свободного полисахарида на 0-3%), и иммуногенность по существу сохранилась во всех временных точках, за исключением 24 месяцев, в которой низкие значения, по-видимому, являются выпадающими значениями и/или возникли в результате технической ошибки, основанной на наблюдениях через 36 месяцев и позже, которые более похожи на измерения, сделанные во временных точках 0 и 12 месяцев. При температуре 23-27°C наблюдалось увеличение уровня свободного полисахарида для MenA, MenY и MenW через шесть месяцев, но уровни оставались ниже допустимого предела - 40%. Иммуногенность все еще сохранялась на протяжении шести месяцев.

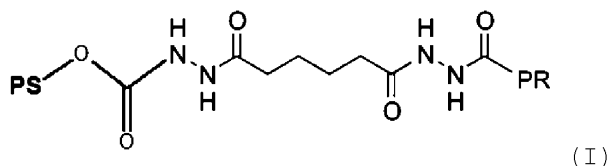
Исходя из этих результатов можно сделать вывод, что MenACYW-ТТ может храниться в течение длительного времени в виде жидкой композиции при охлаждении, например, во время упаковки, распределения и хранения, и что лиофилизация или другие меры по сохранению не требуются.

Хотя вышеизложенное изобретение было описано более подробно в качестве иллюстрации и примера для ясности понимания, это описание и примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцинная композиция *Neisseria meningitidis*, содержащая:

- первый конъюгат капсульного полисахарида MenA с белком-носителем;
 - второй конъюгат капсульного полисахарида MenC с белком-носителем;
 - третий конъюгат капсульного полисахарида MenW-135 с белком-носителем; и
 - четвертый конъюгат капсульного полисахарида MenY с белком-носителем;
- (i) где второй конъюгат представляет собой популяцию, содержащую связанные обоими концами конъюгированные полисахариды и связанные одним концом конъюгированные полисахариды, причем полисахариды второго конъюгата имеют уровень О-ацетилирования от 0,3 мкмоль/мг полисахарида до 1,6 мкмоль/мг полисахарида;
- (ii) где капсульный полисахарид MenA присоединен к белку-носителю через линкер формулы (I):



где PS означает присоединение к полисахариду, а PR означает присоединение к белку-носителю, и первый конъюгат имеет массовое отношение полисахарида к белку-носителю от 0,3 до 1,5;

(iii) капсульные полисахариды MenC, MenW-135 и MenY непосредственно присоединены к белку-носителю через вторичный амин; и по меньшей мере один из конъюгатов имеет средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от 300 до 1500 кДа;

(iv) где белок-носитель представляет собой столбнячный анатоксин; и

(v) композиция содержит менее 20% по массе свободного полисахарида относительно общего количества полисахарида

2. Вакцинная композиция *Neisseria meningitidis* по п.1, где первый, второй, третий и/или четвертый конъюгаты представляют собой популяцию, содержащую молекулы с молекулярной массой в диапазоне от 700 до 1400 кДа или от 800 до 1300 кДа.

3. Вакцинная композиция *Neisseria meningitidis*, содержащая конъюгат капсульного полисахарида MenC с белком-носителем, представляющим собой столбнячный анатоксин, где конъюгат представляет собой популяцию, содержащую связанные обоими концами конъюгированные полисахариды и связанные одним концом конъюгированные полисахариды, которые оба непосредственно присоединены к белку-носителю через вторичный амин, и полисахариды конъюгата капсульного полисахарида MenC с белком-носителем имеют уровень О-ацетилирования в диапазоне от 0,3 мкмоль/мг полисахарида до 1,6 мкмоль/мг полисахарида.

4. Вакцинная композиция *Neisseria meningitidis* по п.3, в которой конъюгат

(а) имеет средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от 300 до 1500 кДа; или

(б) представляет собой популяцию, включающую молекулы, имеющие молекулярную массу в диапазоне от 700 до 1400 кДа или от 800 до 1300 кДа.

5. Вакцинная композиция *Neisseria meningitidis* по любому из пп.1-4, где полисахарид MenC имеет уровень О-ацетилирования в диапазоне от 0,6 до 1,5 мкмоль/мг полисахарида или от 0,8 до 1,4 мкмоль/мг полисахарида.

6. Вакцинная композиция *Neisseria meningitidis* по любому из пп.1-5, в которой конъюгат, содержащий полисахарид MenC, содержит одну или более модификаций, выбранных из (i) первичного гидроксильного в положении 7, (ii) (2-гидрокси)этоксигруппы на восстанавливаемом конце и (iii) конъюгации с белком-носителем, где модификации присутствуют в количестве не менее 25 нмоль/мг полисахарида.

7. Вакцинная композиция *Neisseria meningitidis* по любому из пп.1-6, в которой размер полисахарида MenC уменьшен в 3-8 раз по сравнению с нативным полисахаридом MenC.

8. Вакцинная композиция *Neisseria meningitidis* по любому из пп.1, 2 или 5-7, в которой:

(i) первый конъюгат имеет массовое отношение капсульного полисахарида MenA к белку-носителю от 0,5 до 1,5 или от 0,7 до 1,4;

(ii) второй конъюгат имеет массовое отношение капсульного полисахарида MenC к белку-носителю от 0,3 до 1,1;

(iii) третий конъюгат имеет массовое отношение капсульного полисахарида MenY к белку-носителю от 0,3 до 1,1; и/или

(iv) четвертый конъюгат имеет массовое отношение капсульного полисахарида MenW-135 к белку-носителю от 0,3 до 1,3.

9. Вакцинная композиция *Neisseria meningitidis* по любому из пп.3-7, в которой конъюгат имеет массовое отношение капсульного полисахарида MenC к белку-носителю от 0,3 до 1,1.

10. Способ получения конъюгата капсульного полисахарида MenC *Neisseria meningitidis* с белком-носителем, включающий:

(i) а) частичное де-О-ацетилирование полисахарида MenC щелочным гидролизом;

б) активацию полисахарида MenC обработкой периодатом с превращением, таким образом, диолов в альдегиды до уровня по меньшей мере 20 нмоль альдегида на мг полисахарида; и

с) конъюгацию активированного полисахарида MenC с белком-носителем путем восстановительного аминирования, причем полисахарид MenC присутствует в реакции конъюгации в массовом отношении к белку-носителю от 1:1 до 5:1, образуя, таким образом, конъюгат; или

(ii) а) активацию полисахарида MenC обработкой периодатом с превращением, таким образом, диолов в альдегиды в количестве по меньшей мере 50 нмоль альдегида на мг полисахарида; и

б) конъюгацию активированного полисахарида MenC с белком-носителем путем восстановительного аминирования, причем полисахарид MenC присутствует в реакции конъюгации в массовом отношении к белку-носителю от 1:1 до 5:1, с формированием, таким образом, конъюгата;

где белок-носитель представляет собой столбнячный анатоксин.

11. Способ по п.10, включающий:

а) частичное де-О-ацетилирование полисахарида MenC щелочным гидролизом;

б) активацию полисахарида MenC обработкой периодатом с превращением, таким образом, диолов в альдегиды до уровня по меньшей мере 20 нмоль альдегида на мг полисахарида; и

с) конъюгацию активированного полисахарида MenC с белком-носителем путем восстановительного аминирования, причем полисахарид MenC присутствует в реакции конъюгации в массовом отношении к белку-носителю от 1:1 до 5:1, с формированием, таким образом, конъюгата.

12. Способ по п.11, в котором полисахарид MenC присутствует в реакции конъюгации в массовом отношении к белку-носителю от 1,5 до 3:1.

13. Способ по п.11, в котором де-О-ацетилирование снижает начальное количество О-ацетилирования в полисахариде MenC на 40-70% или на 50-60%.

14. Способ по любому из пп.11-13, в котором после де-О-ацетилирования полисахарид MenC имеет уровень О-ацетилирования от 0,6 мкмоль/мг полисахарида до 1,5 мкмоль/мг полисахарида или от 0,8 до 1,4 мкмоль/мг полисахарида.

15. Способ по п.10, включающий:

- а) активацию полисахарида MenC обработкой периодатом с превращением, таким образом, диолов в альдегиды в количестве по меньшей мере 50 нмоль альдегида на мг полисахарида;
- б) конъюгацию активированного полисахарида MenC с белком-носителем путем восстановительного аминирования, причем полисахарид MenC присутствует в реакции конъюгации в массовом отношении к белку-носителю от 1:1 до 5:1, с формированием, таким образом, конъюгата.

16. Способ очистки конъюгата капсульного полисахарида MenC *Neisseria meningitidis* с белком-носителем из смеси, содержащей конъюгат, соль и свободный полисахарид MenC, включающий:

- а) приведение в контакт смолы для хроматографии гидрофобного взаимодействия со смесью, при котором конъюгат связывается со смолой;
- б) элюирование свободного полисахарида MenC из смолы; и
- с) элюирование конъюгата из смолы водной жидкостью, где водная жидкость не содержит соли или содержит соли меньше, чем смесь, с получением, таким образом, композиции, содержащей очищенный конъюгат;

причем конъюгат представляет собой популяцию, содержащую связанные двумя концами конъюгированные полисахариды и связанные одним концом конъюгированные полисахариды, которые оба непосредственно присоединены к белку-носителю через вторичный амин, и полисахариды конъюгата капсульного полисахарида MenC с белком-носителем имеют уровень О-ацетилирования в диапазоне от 0,3 мкмоль/мг полисахарида до 1,6 мкмоль/мг полисахарида, и

где белок-носитель представляет собой столбнячный анатоксин.

17. Вакцинная композиция *Neisseria meningitidis* по любому из пп.1-9, которая не содержит адьюванта.

18. Вакцинная композиция *Neisseria meningitidis* по пп.1-9 или 17, содержащая ацетатный буфер с pH от 5,5 до 6,5.

19. Способ вакцинации пациента против *Neisseria meningitidis*, включающий введение пациенту дозы вакцинной композиции *Neisseria meningitidis* по любому из пп.1-9, 17 или 18.

20. Применение вакцинной композиции *Neisseria meningitidis* по любому из пп.1-9, 17 или 18 для иммунизации пациента против *Neisseria meningitidis*.

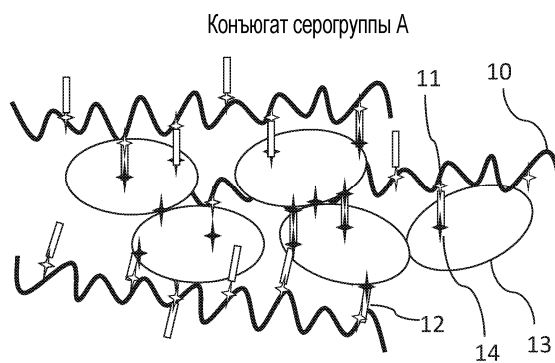
21. Применение вакцинной композиции *Neisseria meningitidis* по любому из пп.1-9, 17 или 18 для получения лекарственного средства для иммунизации пациента против *Neisseria meningitidis*.

22. Способ по п.19, где вакцинную композицию *Neisseria meningitidis* вводят внутримышечно.

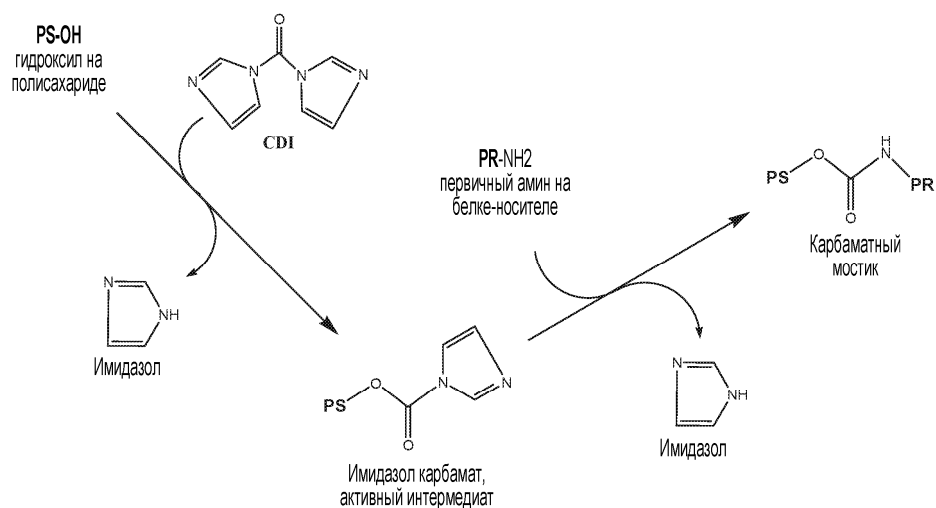
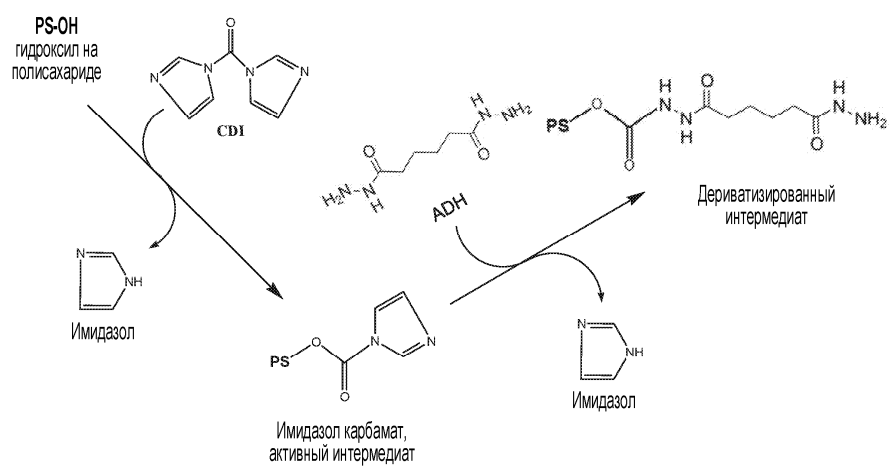
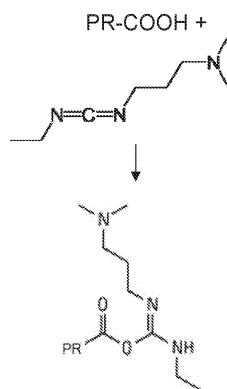
23. Способ по п.19 или 22, где возраст пациента составляет от 6 недель до 3 лет, или 50 лет, или более.

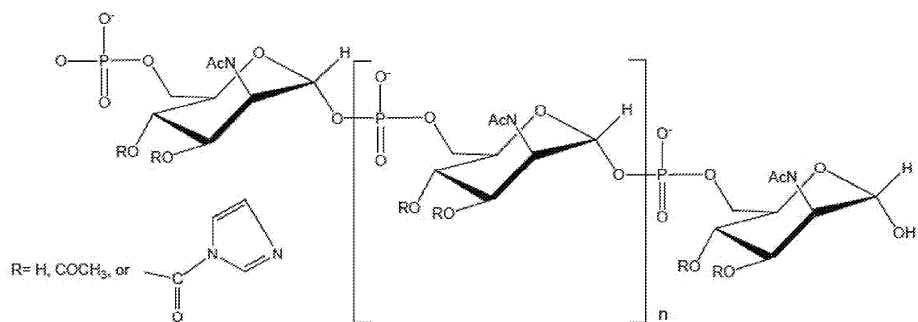
24. Применение по п.20 или 21, где вакцинную композицию *Neisseria meningitidis* вводят внутримышечно.

25. Применение по любому из пп.20, 21 или 24, где возраст пациента составляет от 6 недель до 3 лет, или 50 лет, или более.

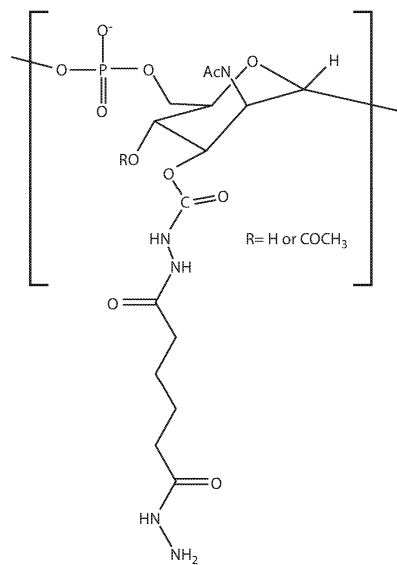


Фиг. 1А

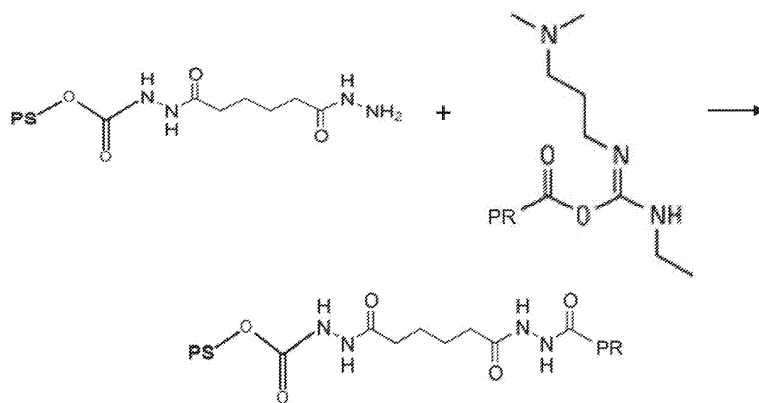




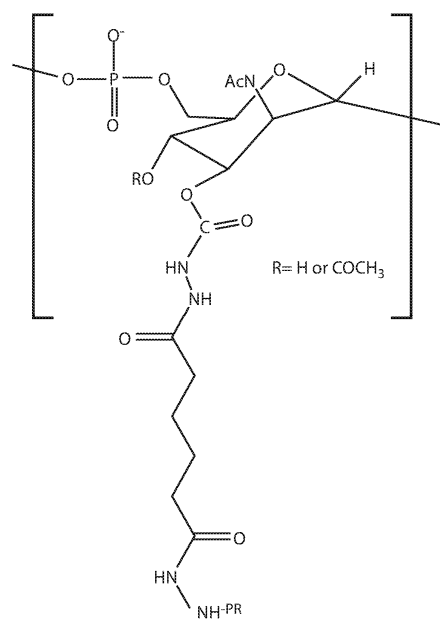
Фиг. 1Е



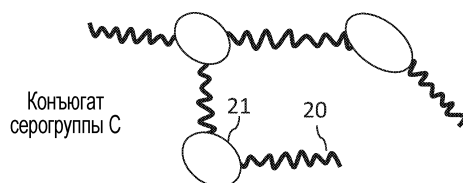
Фиг. 1F



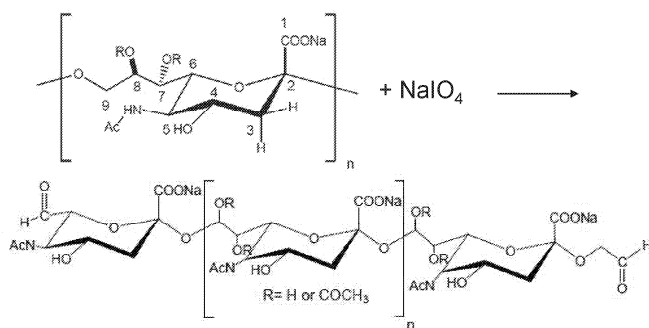
Фиг. 1G



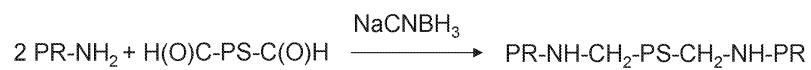
Фиг. 1Н



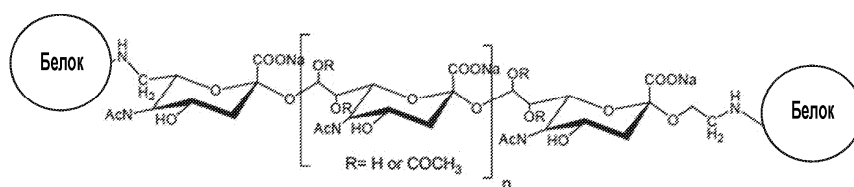
Фиг. 2А



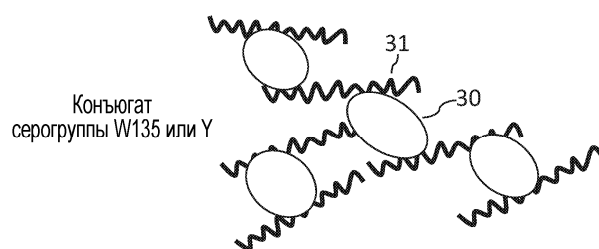
Фиг. 2В



Фиг. 2С



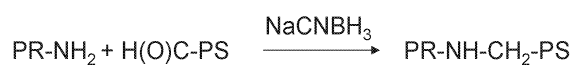
Фиг. 2D



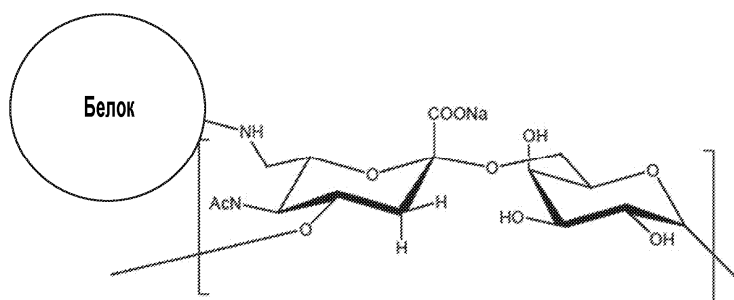
Фиг. 3



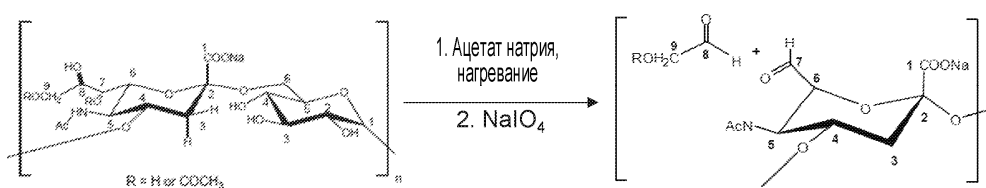
Фиг. 4А



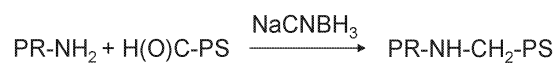
Фиг. 4В



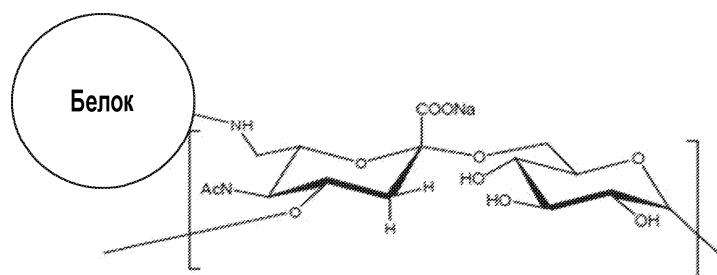
Фиг. 4С



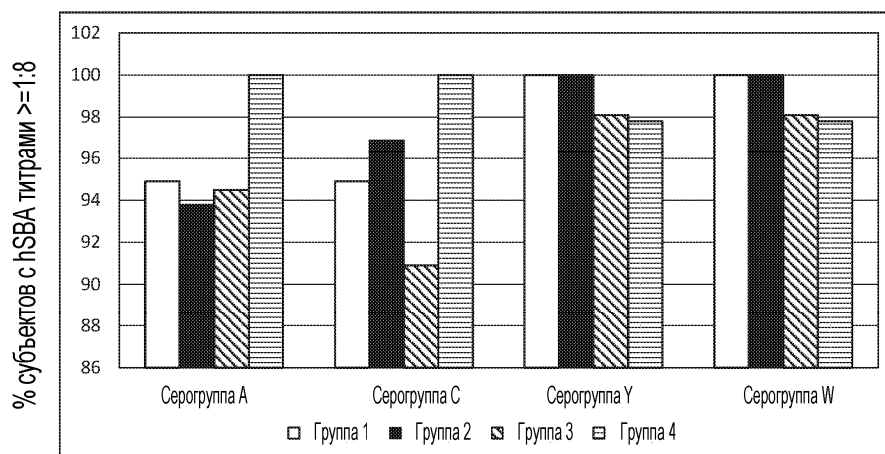
Фиг. 5А



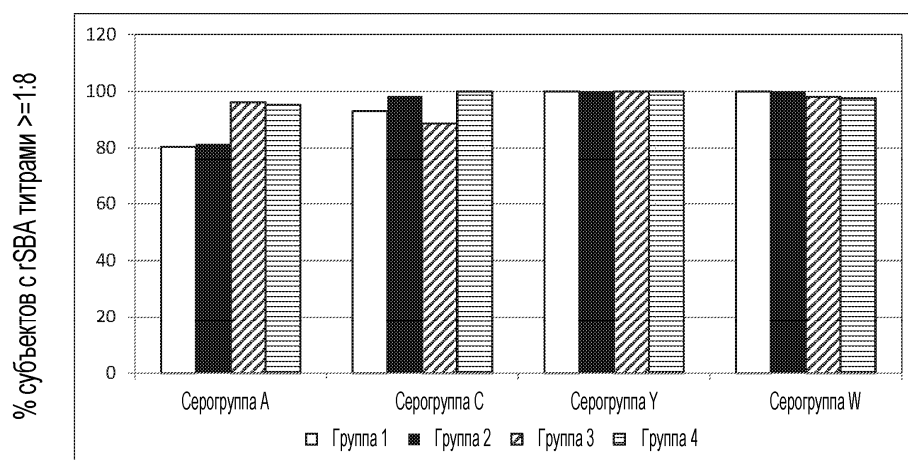
Фиг. 5В



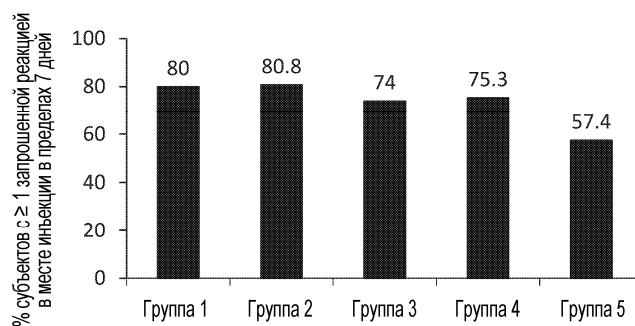
Фиг. 5С



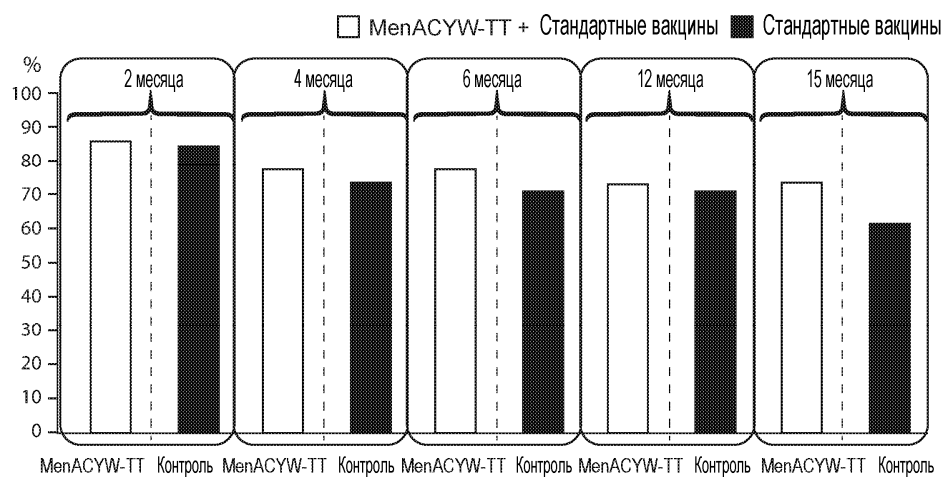
Фиг. 6



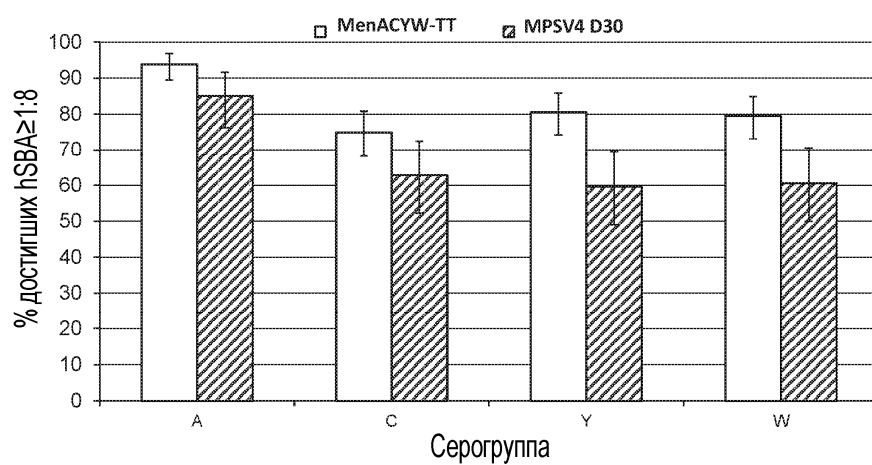
Фиг. 7



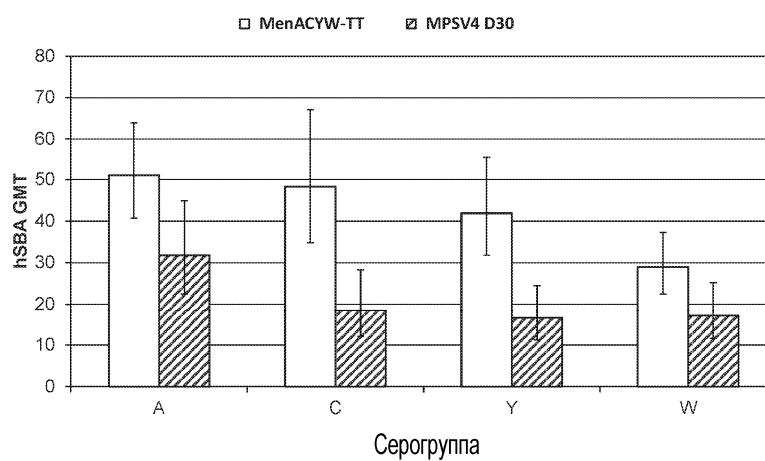
Фиг. 8



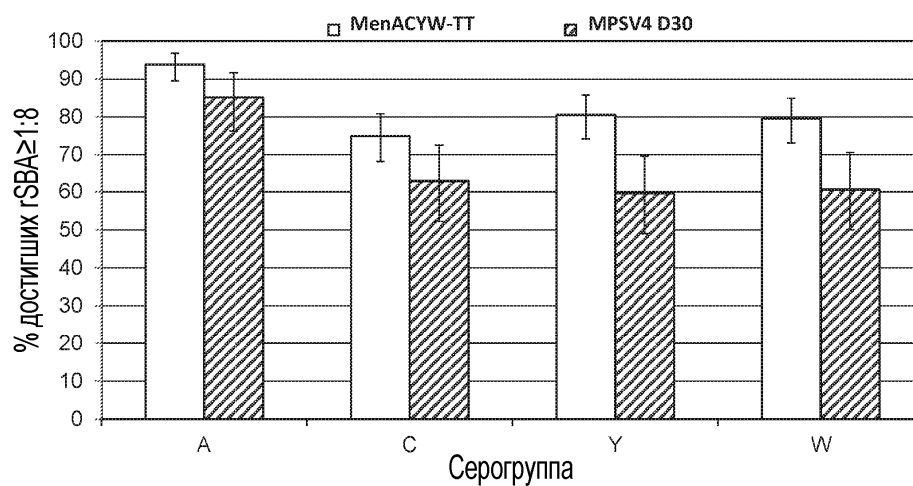
Фиг. 9



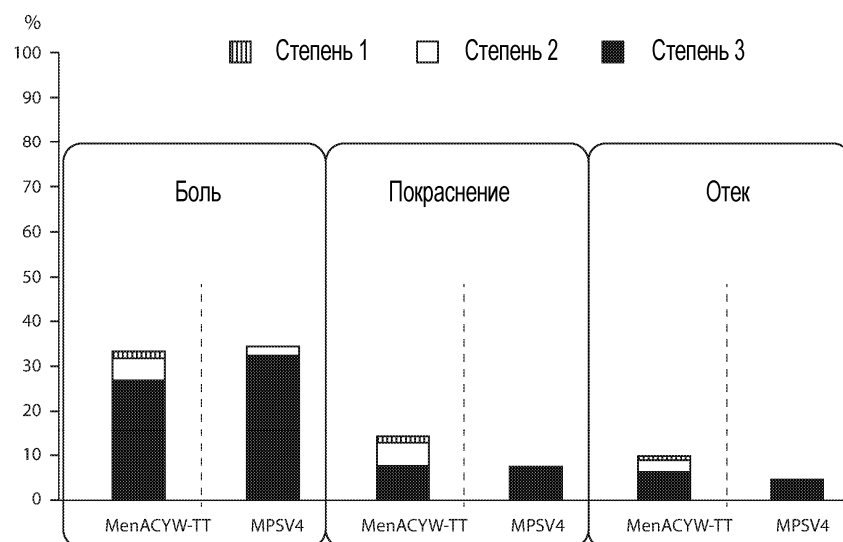
Фиг. 10



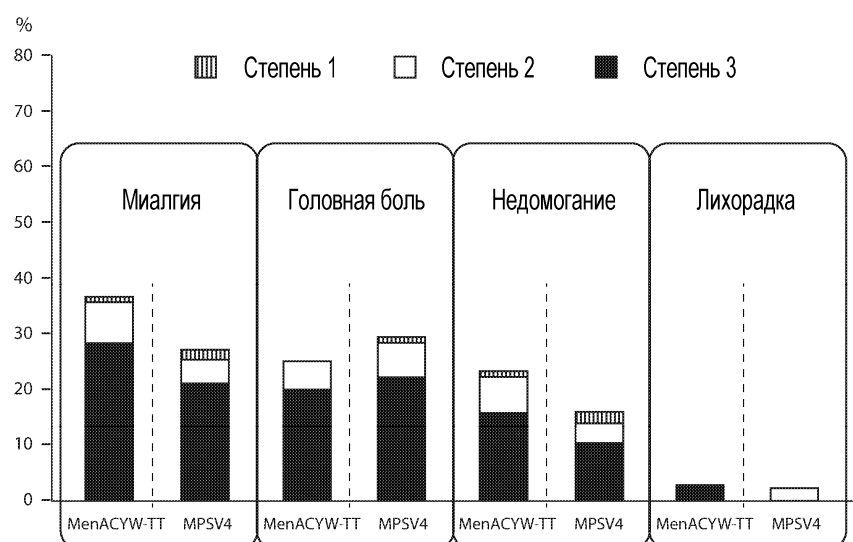
Фиг. 11



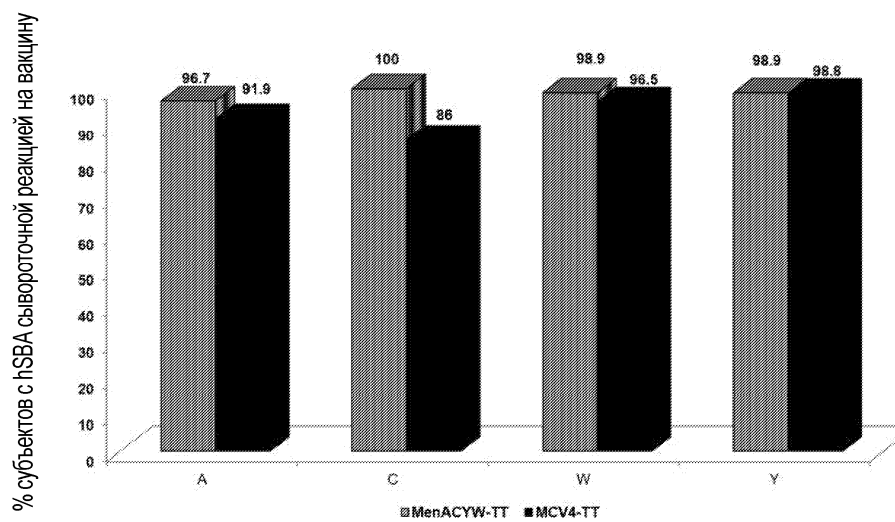
Фиг. 12



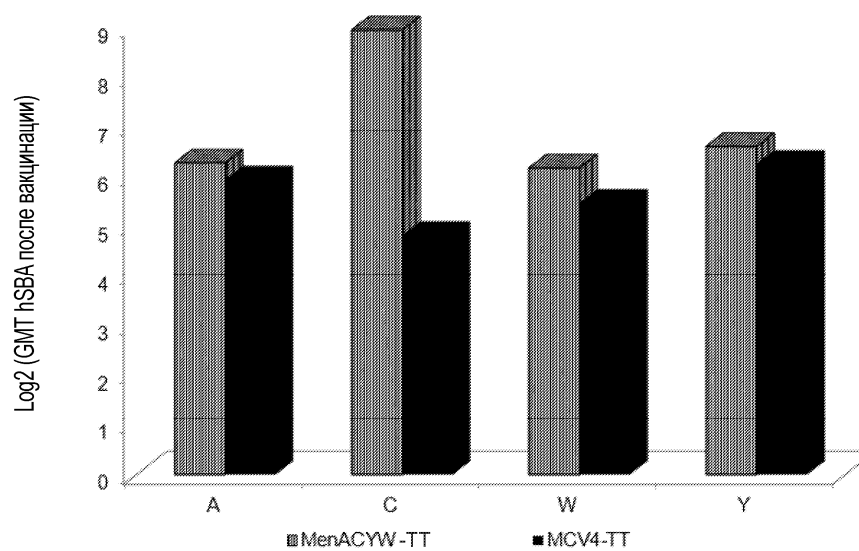
Фиг. 13



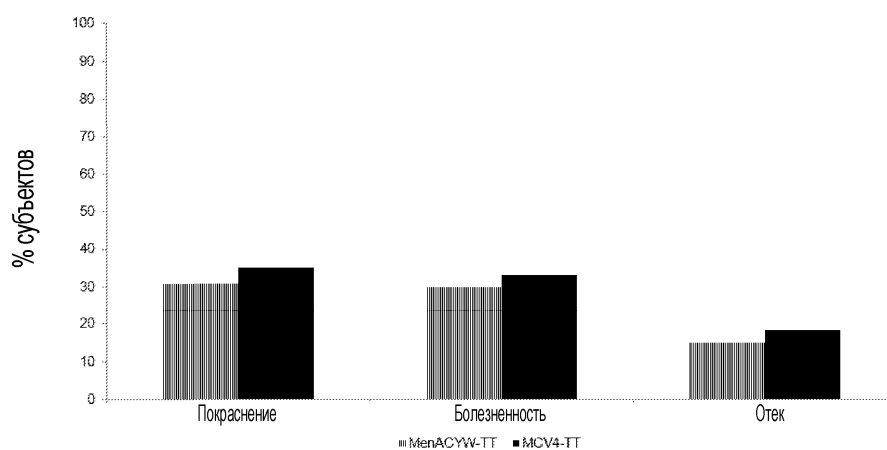
Фиг. 14



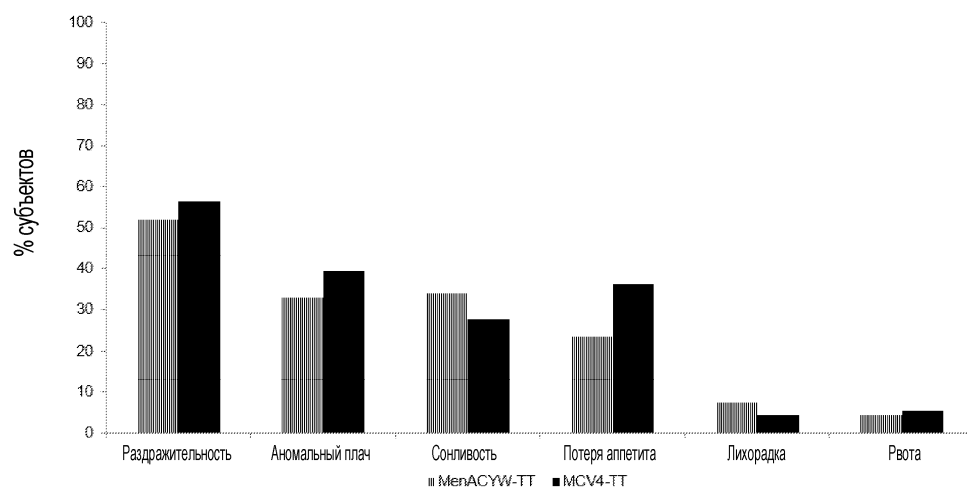
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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