

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 041147

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2022.09.19

(21) Номер заявки  
201990451

(22) Дата подачи заявки  
2017.08.31

(51) Int. Cl. A61K 39/09 (2006.01)  
A61K 39/39 (2006.01)  
A61K 47/62 (2017.01)  
A61K 39/00 (2006.01)

---

(54) КОМПОЗИЦИЯ МНОГОВАЛЕНТНЫХ ПНЕВМОКОККОВЫХ КОНЬЮГАТОВ  
КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА С БЕЛКОМ-НОСИТЕЛЕМ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

---

(31) 10-2016-0114591

(32) 2016.09.06

(33) KR

(43) 2019.08.30

(86) PCT/KR2017/009569

(87) WO 2018/048141 2018.03.15

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ЭлДжи КЕМ, ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:  
Ким Тэ Хён, Чже Хун Сон (KR)

(74) Представитель:  
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев  
А.В. (RU)

(56) WO-A1-2015175355  
CN-B-103893751  
KR-B1-101609032  
WO-A1-9508348  
KR-A-1020130142574  
KR-A-1020130048262

---

(57) Изобретение относится к вакцинной композиции для предупреждения пневмококковых заболеваний и к иммуногенной композиции против Streptococcus pneumoniae, которая содержит 13 или 14 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем.

---

041147

B1

041147

B1

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к вакцинной композиции для предупреждения пневмококкового заболевания и к иммуногенной композиции против *Streptococcus pneumoniae*, которые содержат 13 или 14 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем.

#### Предшествующий уровень техники

*Streptococcus pneumoniae* представляет собой ведущую причину энцефаломенингита у младенцев и маленьких детей, пневмонии и тяжелых инвазивных заболеваний. Больше чем 1,6 миллиона человек умирают каждый год от пневмококкового заболевания (данные Всемирной организации здравоохранения; 2008). В частности, заболеваемость инвазивными инфекционными заболеваниями, вызванными *Streptococcus pneumoniae*, высока у маленьких детей в возрасте 5 лет или младше и у людей в возрасте 65 лет или старше, которые имеют пониженный иммунитет.

*Streptococcus pneumoniae* классифицируется более чем на 90 серотипов, в зависимости от структурных и иммунологических характеристик капсульных полисахаридов - главных факторов вирулентности, которые окружают бактерию снаружи. Кроме того, известно, что среди них 20 или около того серотипов ассоциированы с 80-90% человеческой патогенности. Человек является единственным хозяином *Streptococcus pneumoniae*, и он обычно находится в носоглотке здоровых людей (от 20 до 40% младенцев и от 5 до 10% взрослых). В 2005 году Центры по контролю и предупреждению заболеваний (CDC) сообщали, что примерно 2,1 миллиона детей младше 5 лет в развивающихся странах умирали от пневмонии и что среди них 1,2 миллиона маленьких детей умерли от пневмококковой инфекции. Кроме того, CDC также сообщали о том, что в Соединенных Штатах энцефаломенингит и септицемия, вызванные *Streptococcus pneumoniae*, встречались приблизительно в 3000 случаях и 50000 случаях соответственно (Peters T.R. et al. (2007), JAMA, (297)1825-6; Invasive pneumococcal disease). Кроме того, согласно базе данных пневмококковых заболеваний pneumoACTION в 2000 году заболеваемость пневмококковыми инфекциями у маленьких детей в Южной Корее составляла 24047, и среди них 47 умерли ([www.pneumoadip.org](http://www.pneumoadip.org)). Кроме того, в "Studies on Streptococcus pneumoniae Serotype Analysis in Young Children and Adolescents in Korea" - недавнем исследовании, опубликованном Корейскими центрами для контроля и предупреждения заболеваний, - сообщали о том, что *Streptococcus pneumoniae* был самой обычной причиной (43,7%) инвазивных инфекций у младенцев в возрасте от 3 до 59 месяцев. Кроме того, *Streptococcus pneumoniae* вызывает инвазивные инфекционные заболевания в глобальном масштабе, и, поскольку возрастает заболеваемость от бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, демонстрирующих устойчивость не только к пенициллину, но также и к трем или более чем трем лекарственным средствам, сложность в лечении инфекционных заболеваний, вызванных *Streptococcus pneumoniae*, дополнительно усугубляется. Следовательно, существует постоянная потребность в вакцинации против *Streptococcus pneumoniae* для маленьких детей и престарелых, которые подвергаются высокому риску инфекционных заболеваний, вызванных *Streptococcus pneumoniae*.

Для того чтобы предупреждать пневмококковые заболевания, с 1977 года были разработаны и одобрены мультивалентные полисахаридные вакцины против *Streptococcus pneumoniae*, и такие вакцины на основе капсульных полисахаридов оказались полезными в предупреждении пневмококкового заболевания у престарелых и подверженных высокому риску пациентов. Однако из-за менее развитой иммунной системы, при введении одних полисахаридных вакцин, иммунная система младенцев и маленьких детей не распознает полисахарид как чужеродный антиген. Таким образом, было сложно ожидать, что полисахаридные вакцины действовали бы как полные вакцины, охватывающие все разные возрастные группы. Для того чтобы решить проблему меньшей иммуногенности полисахаридных вакцин у младенцев и маленьких детей, была разработана и использована 7-валентная пневмококковая конъюгатная вакцина (7vPnC, Превенар®), где капсульный полисахарид был конъюгирован с белком-носителем для повышения иммуногенности, и ее эффективность в предупреждении инвазивных заболеваний и отита среднего уха была широко описана. Хотя применение данной 7-валентной вакцины и привело к уменьшению частоты инвазивных заболеваний, вызванных серотипами, использованными в данной вакцине, оно также индуцировало явление, при котором заболеваемость пневмококковыми заболеваниями, вызванными невакцинными серотипами, относительно увеличивалась. В связи с этим были разработаны и имеются в продаже Синфлорикс®, которая представляет собой 10-валентную вакцину на основе конъюгатов капсульный полисахарид-белок, и Превенар 13®, которая представляет собой 13-валентную пневмококковую конъюгатную вакцину, в которой еще шесть серотипов дополняют первичную композицию Превенар®. Однако было описано то, что определенные серотипы, содержащиеся в ней, могут быть недостаточными для демонстрации оптимальной эффективности в качестве компонента вакцины (Poolman J. et al. (2011), Clin. Vaccine Immunol. (18)327; Impact of the Conjugation Method on the Immunogenicity of Streptococcus pneumoniae Serotype 19F Polysaccharide in Conjugate Vaccines/EMA Assessment Report for Prevenar, 13, (2009), EMA/798877/2009). Кроме того, из-за явления смены серотипа существует постоянная потребность в разработке новых вакцинных композиций, которые могут демонстрировать лучшую эффективность с более широким интервалом охвата.

С другой стороны, одним заметным явлением после введения пневмококковой конъюгатной вакци-

ны является повышенная заболеваемость инвазивными заболеваниями посредством смены серотипа из-за невакцинных пневмококковых серотипов, которые не содержатся в вакцине. Данные невакцинные серотипы обеспечивают преобладание в носоглотке посредством замены вакцинных серотипов, преимущественно сосредоточенных там до введения конъюгатных вакцин, и, следовательно, невакцинные серотипы являются новой угрозой в вызове пневмококковых заболеваний. В частности, рассматривая глобальное распространение *Streptococcus pneumoniae*, встречаемость серотипа 2 является более частой, чем встречаемость некоторых других серотипов (4, 7F и 3), содержащихся в Превенар 13®, и согласно литературе он представляет собой 11-й чаще всего встречающийся серотип в мире (Johnson H.L. et al. (2010), PLoS Medicine, 7:10, e1000348; Systematic Evaluation of Serotypes Causing Invasive Pneumococcal Disease among Children Under Five: The Pneumococcal Global Serotype Project). Кроме того, как описано в недавнем исследовании (Saha S.K. et al. (2012), PLoS One, 7:3, e32134; *Streptococcus pneumoniae* serotype-2 childhood meningitis in Bangladesh: a newly recognized pneumococcal infection threat), серотип 2 вызывал 20% случаев инвазивного менингита (230 случаев) у детей младше 5 лет в Бангладеш с 2001 по 2009 гг. В данном отношении, поскольку серотип 2 вызывает инвазивные пневмококковые заболевания (IPD), данный серотип является весьма важным в показателях его тяжести, а также его географического распространения. Капсульный полисахаридный антиген серотипа 2 в настоящее время не включается в какие-либо имеющиеся в продаже пневмококковые вакцины, включая Превенар 13® - 13-валентную вакцину от Pfizer Inc., которая в настоящее время имеет наибольший охват серотипов. Также отсутствуют сообщения по его перекрестной реактивности среди других серотипов Превенар 13®.

Соответственно, авторы настоящего изобретения стремились разработать вакцину для предупреждения пневмококковых заболеваний, которая имеет повышенную иммуногенность или более широкий охват серотипов по сравнению с существующими вакцинными композициями. В результате авторы изобретения разработали новую 13-валентную пневмококковую конъюгатную вакцину, которая содержит серотип, идентичный серотипу существующей 13-валентной вакцины, но демонстрирует лучшую иммуногенность, и 14-валентную пневмококковую конъюгатную вакцину, содержащую дополнительный капсульный полисахаридный антиген серотипа 2, для расширения охвата без потери ее иммуногенности, посредством этого осуществляя настоящее изобретение. 13-валентная пневмококковая конъюгатная вакцина по настоящему изобретению содержит 13 типов капсульных полисахаридных антигенов и демонстрирует лучшую иммуногенность по сравнению с существующей 13-валентной пневмококковой конъюгатной вакциной. Кроме того, 14-валентная пневмококковая конъюгатная вакцина по настоящему изобретению содержит 14 типов капсульных полисахаридных антигенов, и подвергалась специфичному в отношении серотипа способу оптимизации - гидролизу во время их конъюгирования, с получением вакцинной композиции с более широким охватом и лучшей иммуногенностью по сравнению с существующей 13-валентной вакциной. В результате ожидается то, что 13-валентная пневмококковая конъюгатная вакцина и 14-валентная пневмококковая конъюгатная вакцина по настоящему изобретению имеют превосходное влияние на предупреждение инвазивных пневмококковых заболеваний.

#### **Описание изобретения техническая проблема**

Задачей настоящего изобретения является предложение вакцинной композиции для предупреждения пневмококкового заболевания, содержащей 13 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем, где в указанных 13 типах конъюгатов каждый из 13 типов капсульных полисахаридов, имеющих происхождение из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*, ковалентно конъюгирован с белком-носителем; указанный белок-носитель представляет собой белок CRM197; и каждый из конъюгатов имеет структуру, в которой каждый из капсульных полисахаридов и белок-носитель связаны через группу -O-C(NH)-NH- с использованием способа цианилирования.

Другой задачей настоящего изобретения является предложение вакцинной композиции для предупреждения пневмококкового заболевания, содержащей 14 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем, где в указанных 14 типах конъюгатов каждый из 14 типов капсульных полисахаридов, имеющих происхождение из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*, ковалентно конъюгирован с белком-носителем; указанный белок-носитель представляет собой белок CRM197 и каждый из конъюгатов имеет структуру, в которой каждый из капсульных полисахаридов и белок-носитель связаны через группу -O-C(NH)-NH- с использованием способа цианилирования.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение иммуногенной композиции против *Streptococcus pneumoniae*, содержащей 13 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем, где в указанных 13 типах конъюгатов каждый из 13 типов капсульных полисахаридов, имеющих происхождение из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*, ковалентно конъюгирован с белком-носителем; указанный белок-носитель представляет собой белок CRM197 и каждый из конъюгатов имеет структуру, в которой каждый из капсульных полисахаридов и белок-носитель связаны через группу -O-C(NH)-NH- с использованием способа цианилирования.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение иммуногенной композиции против *Streptococcus pneumoniae*, содержащей 14 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем, где в указанных 14 типах конъюгатов каждый из 14 типов капсульных полисахаридов, имеющих происхождение из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*, ковалентно конъюгирован с белком-носителем; указанный белок-носитель представляет собой белок CRM197 и каждый из конъюгатов имеет структуру, в которой каждый из капсульных полисахаридов и белок-носитель связаны через группу -O-C(NH)-NH- с использованием способа цианилирования.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение способа предупреждения пневмококкового заболевания посредством введения вакцинной композиции или иммуногенной композиции индивиду, нуждающемуся в этом.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение применения препарата вакцинной композиции для предупреждения пневмококкового заболевания, содержащей 13 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем, где в указанных 13 типах конъюгатов каждый из 13 типов капсульных полисахаридов, имеющих происхождение из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*, ковалентно конъюгирован с белком-носителем; указанный белок-носитель представляет собой белок CRM197 и каждый из конъюгатов имеет структуру, в которой каждый из капсульных полисахаридов и белок-носитель связаны через группу -O-C(NH)-NH- с использованием способа цианилирования.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение для предупреждения пневмококкового заболевания применения препарата вакцинной композиции, содержащей 14 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем, где в указанных 14 типах конъюгатов каждый из 14 типов капсульных полисахаридов, имеющих происхождение из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*, ковалентно конъюгирован с белком-носителем; указанный белок-носитель представляет собой белок CRM197 и каждый из конъюгатов имеет структуру, в которой каждый из капсульных полисахаридов и белок-носитель связан посредством группы -O-C(NH)-NH- с использованием способа цианилирования.

#### Техническое решение

В настоящем изобретении для того, чтобы разработать новую вакцинную композицию, способную предупреждать пневмококковые заболевания с лучшей эффективностью, получали композицию, содержащую 13 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем, способ конъюгирования которых отличается от способа конъюгирования существующей 13-валентной вакцины. В частности, данная композиция содержит 13 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем, которые получают ковалентным конъюгированием каждого из 13 типов капсульных полисахаридов, имеющих происхождение из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*, с CRM197, который представляет собой белок-носитель. Поскольку данные 13 типов капсульных полисахаридов демонстрировали значительно увеличенную иммуногенность по сравнению с существующей 13-валентной пневмококковой конъюгатной вакциной, можно ожидать, что композиции по настоящему изобретению имеют значительное влияние на предупреждение пневмококковых заболеваний.

Кроме того, хотя и были многочисленные сообщения о пониженной заболеваемости инвазивными заболеваниями, вызванными вакцинными серотипами, содержащимися в пневмококковой белковой конъюгатной вакцине, после того как данная вакцина появилась в продаже, заболеваемость инвазивным пневмококковым заболеванием согласно вакцинным серотипам нельзя игнорировать из-за специфического в отношении серотипа географического распространения (Lee L.H. et al. (2014), *Vaccines*, 2(112); Towards New Broader Spectrum Pneumococcal Vaccines: The Future of Pneumococcal Disease Prevention). Следовательно, объем данного изобретения должен быть расширен посредством добавления новых серотипов, при сохранении серотипов существующих пневмококковых конъюгатных вакцин.

Было известно, что на иммуногенность конъюгатных вакцин могло влиять добавление большего числа серотипов из-за иммунного мешающего влияния, индуцированного взаимодействиями среди ее компонентов, таких как полисахариды или белки-носители (Dagan R. et al. (2010), *Vaccines*, 28(5513); *Glycoconjugate vaccines and immune interference: A review*). Однако подтвердили, что 14-валентная вакцина в данном изобретении, для которой применялся способ цианилирования с оптимизированным способом гидролиза, продемонстрировала улучшенную иммуногенность во всех серотипах и/или лучший охват по сравнению с существующей 13-валентной вакциной.

Каждое описание и типичное воплощение, раскрытое в настоящем изобретении, может применяться к другим описаниям и типичным воплощениям. То есть, все комбинации разных элементов, раскрытых в настоящем изобретении, попадают в пределы объема настоящего изобретения. Дополнительно, объем настоящего изобретения не может быть истолкован как ограниченный конкретным описанием, представленным ниже.

В качестве одного аспекта приведенных выше задач согласно настоящему изобретению предложена вакцинная композиция для предупреждения пневмококкового заболевания, содержащая 13 типов конъю-

готов капсульного полисахарида с белком-носителем.

В частности, данными 13 типами конъюгатов могут быть конъюгаты, в которых каждый из 13 типов капсульных полисахаридов, имеющих происхождение из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*, ковалентно конъюгирован с CRM197, который представляет собой белок-носитель.

То есть, настоящее изобретение представляет собой вакцинную композицию, содержащую 13 разных типов конъюгатов полисахарид-белок, где каждый из конъюгатов содержит капсульные полисахариды, имеющие происхождение из разных серотипов *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированные с белком-носителем, и где данные капсульные полисахариды получают из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F.

Дополнительно, в качестве другого аспекта согласно настоящему изобретению предложена вакцинная композиция для предупреждения пневмококкового заболевания, содержащая 14 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем.

В частности, данными 14 типами конъюгатов могут быть конъюгаты, в которых каждый из 14 типов капсульных полисахаридов, имеющих происхождение из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*, ковалентно конъюгирован с CRM197, который представляет собой белок-носитель.

То есть, настоящее изобретение представляет собой вакцинную композицию, содержащую 14 разных типов конъюгатов полисахарид-белок, где каждый из конъюгатов содержит капсульные полисахариды, имеющие происхождение из *Streptococcus pneumoniae* разных серотипов, конъюгированные с белком-носителем, и где данные капсульные полисахариды получают из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F.

Для того чтобы найти способ усиления иммуногенности пневмококковой вакцины, авторы настоящего изобретения сравнили две репрезентативные реакции конъюгирования, то есть восстановительное аминирование и цианилирование. В результате подтвердили, что способ цианилирования превосходит восстановительное аминирование в показателях выхода конъюгирования и требуемого времени для реакции. На основе приведенных выше данных проводили оптимальное конъюгирование с каждым серотипом посредством применения способа цианилирования, в отличие от Превенар 13®, с теми же самыми 13 идентичными серотипами, что и в Превенар 13®, который в настоящее время имеет самый широкий охват серотипов. В результате подтвердили, что концентрация IgG на все серотипы в 13- или 14-валентной композиции выше, чем концентрация IgG Превенар 13®. В случае увеличения валентности в мультивалентной иммуногенной композиции могло бы происходить иммунное мешающее влияние из-за повышенных взаимодействий среди ее компонентов (Dagan R. et al. (2010), *Vaccines*, 28(5513); *Glycoconjugate vaccines and immune interference: A review*), и, таким образом, обычному специалисту в данной области потребовались бы дополнительные усилия по оптимизации и усилению общей иммуногенности в 13- или 14-валентной композиции по данному изобретению.

Дополнительно, авторы настоящего изобретения добавили невакцинный штамм пневмококкового серотипа 2 для расширения охвата серотипов, который в настоящее время не может быть охвачен с использованием Превенар 13®. Поскольку иммунологическое мешающее влияние, индуцированное взаимодействиями компонентов в мультивалентной иммуногенной композиции может быть дополнительно усилено из-за добавления еще одного серотипа - серотипа 2 - улучшенная иммуногенность на все 14 серотипов в данном изобретении по сравнению с Превенар 13® могла бы быть неожиданным результатом. В настоящем изобретении конъюгаты имеют структуру, в которой капсульный полисахарид и белок-носитель связываются через группу -O-C(NH)-NH-. Следовательно, на основе структурных отличий от препарата пневмококковой конъюгатной вакцины (PCV), полученного другими способами, и оптимизации детальной практики конъюгирования композиция 13-валентной или 14-валентной вакцины по настоящему изобретению может демонстрировать примечательно превосходный титр для всех серотипов по сравнению с композицией 13-валентной или 14-валентной вакцины, полученной посредством восстановительного аминирования, известного ранее.

Термин "пневмония" в том виде, в котором он здесь используется, относится к острому воспалительному заболеванию легочной паренхимы, которое, главным образом, вызвано *Streptococcus pneumoniae* и *Klebsiella pneumoniae*. В частности, на долю пневмококковой пневмонии приходится примерно 50% всех случаев пневмонии, и ее симптомами являются тяжелая простуда, лихорадка, кашель и боль в груди. Кроме того, может продуцироваться кровянистая мокрота, и из-за нее могут развиваться такие осложнения, как плеврит, менингит, эндокардит, перитонит и т.д. (Stein G.E. et al. (2001 Mar), *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* 39:181-185; *Comparative serum bactericidal activity of clarithromycin and azithromycin against macrolide-sensitive and resistant strains of Streptococcus pneumoniae*).

Термин "пневмококк" в том виде, в котором он здесь используется, относится к *Streptococcus pneumoniae*, и он обычно представляет собой комменсальный организм, заселяющий поверхность слизистой человеческой носоглотки. Когда факторы хозяина обеспечивают доступ данного организма в нижний респираторный тракт, следует интенсивный воспалительный ответ, приводящий к плотной консоли-

дации, так как альвеолярные воздушные пространства заполняются экссудатом, и посредством этого может запускаться пневмония. Пневмококк может синтезировать 90 или более чем 90 структурно уникальных капсульных полисахаридов, и серотип пневмококка классифицируется согласно структурным и иммунологическим характеристикам капсульных полисахаридов. Следовательно, при приготовлении препарата вакцины с использованием капсульных полисахаридов пневмококка иммунный ответ может проявляться по-разному, в зависимости от типа капсульного полисахарида, т.е. серотипа пневмококка, из которого имеют происхождение капсульные полисахариды. Вакцинная композиция по настоящему изобретению, в частности, может быть получена с использованием 13 типов капсульных полипептидов, имеющих происхождение из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*. Дополнительно, вакцинная композиция по настоящему изобретению, в частности, может быть получена с использованием 14 типов капсульных полипептидов, имеющих происхождение из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*.

Капсульный полисахарид распознается как антиген при введении в организм таким образом, что может быть продуцировано антитело против него, и, следовательно, может быть получена вакцинная композиция для предупреждения пневмококкового заболевания. Термин "антиген" в том виде, в котором он здесь используется, относится к веществу, которое может специфично индуцировать иммунный ответ при поступлении данного вещества в организм. В настоящем изобретении каждый из 13 типов капсульных полипептидов, имеющих происхождение из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*, может действовать как антиген. Кроме того, в настоящем изобретении каждый из 14 типов капсульных полипептидов, имеющих происхождение из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*, может действовать как антиген.

Капсульные полисахариды могут быть получены стандартными методиками, известными обычному специалисту в данной области, и способы их получения не являются особенно ограниченными. Размер капсульного полисахарида можно уменьшать посредством гидролиза для того, чтобы уменьшать вязкость и индуцировать эффективную иммуногенность.

В типичном воплощении настоящего изобретения каждый из 14 разных серотипов *Streptococcus pneumoniae* (1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F) лизировали с использованием дезокси-холата натрия и затем высвобождали полисахариды, связанные с клетками. Затем 12 серотипов - 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 18C, 19A, 19F и 23F - очищали посредством применения цетилтриметиламмония бромида (СТАВ), так как данные серотипы способны к ионному связыванию с СТАВ, и затем два серотипа, не реагирующих с СТАВ - 7F и 14, - очищали с использованием раствора Algel.

При получении вакцинной композиции просто с использованием капсульных полисахаридов иммунная система младенцев и маленьких детей, которая слабее, чем иммунная система взрослых, может не распознавать данные капсульные полисахариды в качестве антигена, и в результате иммунный ответ может не развиваться. Соответственно, в настоящем изобретении вакцину получали в виде конъюгата, в котором были объединены и использованы белок-носитель и капсульный полисахарид.

Термин "белок-носитель" в том виде, в котором он здесь используется, относится к белку, который может быть ковалентно конъюгирован с капсульным полисахаридом для увеличения иммуногенности полисахаридного антигена, и CRM197 использовали в настоящем изобретении в качестве белка-носителя. Белок-носитель может быть конъюгирован с капсульным полисахаридом посредством стандартного способа конъюгирования, и конъюгат полисахарид-белок-носитель, образованный из него, может представлять собой конъюгат, в котором один или более чем один капсульный полисахарид конъюгирован с белком-носителем.

Термин "CRM197" в том виде, в котором он здесь используется, относится к нетоксичному варианту (то есть анатоксину) дифтерийного токсина, выделенному из культуры штамма C7 ( $\beta$ 197) *Corynebacterium diphtheriae*. CRM197 можно очищать посредством ультрафильтрации, осаждения сульфатом аммония и ионообменной хроматографии. Кроме того, CRM197 можно получать рекомбинантно согласно патенту США № 5614382, но не ограничиваясь им.

В пределы объема настоящего изобретения могут быть включены любые известные способы получения конъюгата капсульного полисахарида с белком-носителем, и данный конъюгат имеет структуру, в которой капсульный полисахарид и белок-носитель связываются через группу -O-C(NH)-NH- с использованием способа цианилирования. Способ цианилирования может подходящим образом практиковать обычный специалист в данной области посредством способа, известного в данной области; например способ цианилирования можно осуществлять с использованием тетрафторбората 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP) или CNBr, но не ограничиваясь ими.

В качестве примера получения конъюгата капсульного полисахарида с белком-носителем данный гликоконъюгат может быть образован посредством химической активации очищенных капсульных полисахаридов, с последующим конъюгированием каждого из химически активированных капсульных полисахаридов с белком-носителем. Активация посредством цианилирования благодаря обработке тетрафторборатом 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP) может модифицировать гидроксильную группу капсульного полипептида до цианатной группы, и то же самое можно использовать для образования ковалентной связи с аминогруппой CRM197, который представляет собой белок-носитель. Реакция циани-

лирования посредством CDAP может проводиться конкретно посредством добавления раствора глицина в 3 мол.экв. относительно 1 мол.экв. CDAP, и посредством доведения pH до 9,0, но не ограничиваясь им. Кроме того, обычный специалист в данной области может подходящим образом корректировать реакционный раствор и условия реакции согласно задачам.

Полученный конъюгат капсульного полисахарида с белком-носителем можно очищать разными способами. Примеры данных способов включают способ концентрирования/диафильтрации, колоночную хроматографию и многослойное фильтрование. Очищенные конъюгаты полисахарид-белок могут быть приготовлены в виде вакцинной композиции по настоящему изобретению, и ее можно использовать. Приготовление вакцинной композиции по настоящему изобретению может проводиться с использованием способов, известных в данной области. Например, данную композицию можно получать посредством приготовления каждого из 13 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем совместно с физиологически приемлемым носителем. Примером такого носителя может быть, вода, забуференный физиологический раствор, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) или раствор декстрозы, но без ограничения ими.

В типичном воплощении настоящего изобретения 13 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем получали посредством 1) растворения и гидролиза 13 типов капсульных полисахаридов, 2) способа реакции конъюгирования каждого из капсульных полисахаридов и белка-носителя с использованием тетрафторбората 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP), 3) термации реакции конъюгирования, 4) ультрафильтрации, 5) стерилизующей фильтрации и 6) адсорбции.

В другом типичном воплощении настоящего изобретения 14 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем получали посредством 1) растворения и гидролиза 14 типов капсульных полисахаридов, 2) способа реакции конъюгирования каждого из капсульных полисахаридов и белка-носителя с использованием тетрафторбората 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP), 3) термации реакции конъюгирования, 4) ультрафильтрации, 5) стерилизующей фильтрации и 6) адсорбции.

Термин "вакцина" в том виде, в котором он здесь используется, представляет собой биологическое вещество, содержащее антиген, которое иммунизирует живой организм, посредством этого относясь к иммуногену или антигенному веществу, дающему живому организму иммунитет, посредством его введения человеку или животному для предупреждения инфекционных заболеваний.

Вакцинная композиция может дополнительно содержать по меньшей мере один компонент, выбранный из группы, состоящей из адъюванта, консерванта, буфера, криопротектора, соли, двухвалентного катиона, неионного детергента и ингибитора свободнорадикального окисления.

Термин "адъювант" в том виде, в котором он здесь используется, относится к веществу, которое служит для повышения иммуногенности иммуногенной композиции по настоящему изобретению. Адъювант часто предоставляется для усиления иммунного ответа, и он хорошо известен обычному специалисту в данной области. Подходящий адъювант для усиления эффективности вакцинной композиции по настоящему изобретению включает:

(1) соли алюминия (алюминиевые квасцы), такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия и т.д.;

(2) препараты эмульсии типа "масло в воде" (с другими конкретными иммуностимулирующими агентами, такими как мурамилпептиды (как определено ниже) или компоненты бактериальных клеточных стенок, или без них), такие как (а) MF59 (WO 90/14837), содержащий 5% сквалена, 0,5% Tween80 и 0,5% Span 85 (возможно содержащий разные количества МТП-РЕ (см. ниже, хотя он и не требуется), приготовленные в виде субмикрометровых частиц с использованием микропсевдоожижителя, такого как микропсевдоожижитель модели 110Y (Microfluidics, Newton, Mass.), (б) SAF, содержащий 10% сквалена, 0,4% Tween 80, 5% блок-полимера плороника L121 и thr-MDP (см. ниже), либо микропсевдоожиженный до субмикрометровой эмульсии, либо взболтанный на вихревой мешалке с получением эмульсии с частицами большего размера, и (в) адъювантная система Ribit<sup>TM</sup> (RAS), (Corixa, Hamilton, Mont.), содержащая 2% сквалена, 0,2% Tween80 и один или более чем один компонент бактериальной клеточной стенки, выбранный из группы, состоящей из 3-О-деацелированного монофосфорилилипида А (MPL<sup>TM</sup>), описанного в патенте США № 4912094 (Corixa), трегалозы димиколята (TDM) и скелета клеточной стенки (CWS), предпочтительно MPL плюс CWS (Detox<sup>TM</sup>);

(3) сапониновые адъюванты, такие как Quil A или STIMULON<sup>TM</sup> QS-21 (Antigenics, Framingham, Mass.) (патент США № 5057540), или полученные из них частицы, такие как ISCOM (иммуностимулирующие комплексы);

(4) бактериальные липополисахариды, синтетические гомологи липида А, такие как аминокилглюкозаминфосфатные соединения (AGP) или их производные, или гомологи, которые имеются в продаже у Corixa и которые описаны в патенте США № 6113918; одним таким AGP является 2-[(R)-3-тетрадеканоилокситетрадеканоиламино]этил-2-дезоксид-4-О-фосфоно-3-О-[(R)-3-тетрадеканоилокситетрадеканоил]-2-[(R)-3-тетрадеканоилокситетрадеканоиламино]-b-D-глюкопиранозид, который также известен как 529 (ранее известен как RC529), который приготовлен в водной форме или в виде стабильной эмульсии;

(5) синтетические полинуклеотиды, такие как олигонуклеотиды, содержащие мотив(ы) CpG (патент США № 6207646);

(6) цитокины, такие как интерлейкины (например, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 и т.д.), интерфероны (например, интерферон-гамма), гранулоцитарно-макрофагальный колоние-стимулирующий фактор (GM-CSF), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), фактор некроза опухолей (TNF), костимулирующие молекулы B7-1 и B7-2 и т.д.

(7) детоксифицированные мутанты бактериального АДФ-рибозилирующего токсина, такого как холерный токсин (СТ), либо дикого типа, либо в мутантной форме, например, где глутаминовая кислота в положении аминокислоты 29 заменена другой аминокислотой, в частности гистидином, согласно WO 00/18434 (см. также WO 02/098368 и WO 02/098369), коклюшный токсин (РТ) или лабильный в условиях нагревания токсин *E. coli* (LT), в частности LT-K63, LT-R72, СТ-S109, РТ-K9/G129 (WO 93/13302 и WO 92/19265); и

(8) компоненты комплемента, такие как тример компонента комплемента C3d, но не ограничиваются ими.

Мурампептиды могут включать N-ацетил-мурампептид-L-треонил-D-изоглутамин (thr-MDP) и N-ацетил-нормурампептид-L-аланин-2-(1'-2'-дипальмитойл-sn-глицеро-3-гидроксифосфорил)этиламин (MTP-PE), но не ограничиваются ими.

Адьювантом на основе соли алюминия может быть вакцина, осажденная на алюминиевых квасцах, или вакцина, адсорбированная на алюминиевых квасцах. Соли алюминия могут включать гидроокись алюминия, гидрат оксида алюминия, оксид алюминия тригидрат (ATH), гидрат алюминия, тригидрат алюминия, Алгидрогель, Суперфос, Амфоджел, гидроксид алюминия, гидроксифосфат сульфат алюминия (адьювант на основе фосфата алюминия (АРА)), аморфный алюминий и т.д., но не ограничиваются ими. АРА относится к суспензии гидроксифосфата алюминия. При смешивании хлорида алюминия и фосфата натрия в соотношении 1:1 выпадает в осадок гидроксифосфат сульфат алюминия. Данные осадки доводят до размера от 2 до 8 мкм с использованием миксера с высоким усилием сдвига и диализируют с физиологическим раствором с последующей стерилизацией. В одном воплощении для адсорбции белком используется имеющийся в продаже  $Al(OH)_3$  (например, Алгидрогель или Суперфос). Белок (от 50 до 200 г) можно адсорбировать на 1 мг гидроксида алюминия, и данное отношение зависит от изоэлектрической точки (pI) белков и pH растворителей. Белки с низкой pI сильно адсорбируются по сравнению с белками с высокой pI. Соли алюминия могут образовывать депо антигена, которое медленно высвобождает антигены на протяжении 2-3 недель, посредством этого неспецифично активируя фагоциты, комплементы и врожденный иммунный механизм.

Термин "консервант" в том виде, в котором он здесь используется, относится к противовирусному веществу и/или к противомикробному веществу, которое ингибирует рост микроорганизмов в вакцинной композиции. Например, консервантом может быть тиомерсал, 2-феноксиэтанол, формальдегид или их смесь, но без ограничения ими. Кроме того, можно использовать все традиционные консерванты, используемые в данной области.

Дополнительно, вакцинная композиция может включать один или более чем один физиологически приемлемый буфер. Например, если вакцинная композиция представляет собой инфузию или инъекцию, данный буфер может иметь буферную емкость при pH от 4,0 до 10,0, в частности при pH от 5,0 до 9,0, более конкретно при pH от 6,0 до 8,0. Буфер может быть выбран из группы, состоящей из TRIS, ацетатного, глутаматного, лактатного, малеатного, тартратного, фосфатного, цитратного, карбонатного, глицинатного, гистидинового, глицинового, сукцинатного и триэтаноламинного буфера.

В частности, если вакцинная композиция по настоящему изобретению предназначена для парентерального введения, буфер может быть выбран из буферов, приемлемых согласно Фармакопее Соединенных Штатов (USP). Например, буфер может быть выбран из группы, состоящей из одноосновной кислоты, такой как уксусная кислота, бензойная кислота, глюконовая кислота, глицериновая кислота и молочная кислота; двухосновной кислоты, такой как аконитовая кислота, адипиновая кислота, аскорбиновая кислота, угольная кислота, глутаминовая кислота, яблочная кислота, янтарная кислота и винная кислота; многоосновной кислоты, такой как лимонная кислота и фосфорная кислота; и основания, такого как аммиак, диэтаноламин, глицин, триэтаноламин и TRIS.

Дополнительно, вакцинная композиция по настоящему изобретению может включать неионный детергент. Например, вакцинная композиция по настоящему изобретению может включать сложный эфир полиоксиэтилена и сорбитана (обычно именуемый Tween), в частности полисорбат 20 и полисорбат 80; сополимеры (такие как DOWFAX™) этиленоксида (EO), пропиленоксида (PO) и бутиленоксида (BO); октоксинолы с разным числом повторов этокси (окси-1,2-этандинил) группы, в частности октоксинол-9 (Triton-100); этилфеноксиполиэтоксизэтанол (IGEPAL CA-630/NP-40); фосфолипид, такой как лецитин; нонилфенолэтоксилат, такой как серии NP; простой эфир полиоксиэтилена и жирной кислоты, образованный из лаурилового, цетилового, стеарилового, олеилового спирта (поверхностно-активное вещество Brij), в частности монолауриловый простой эфир триэтиленгликоля (Brij 30); и поверхностно-активные вещества, такие как простой эфир сорбитана, известный как SPAN, в частности сорбитана триолеат (Span 85) и сорбитана монолаурат, но не ограничиваются ими. В данную эмульсию может быть включен Tween

80, и также могут использоваться смеси неионных детергентов, таких как Tween 80/Span 85. Также подходит комбинация простого эфира полиоксиэтиленсорбитана, такого как Tween 80, и октоксинола, такого как Triton X-100. Также подходит комбинация Laureth 9 и Tween и/или октоксинола. В частности, включенное количество простого эфира полиоксиэтиленсорбитана (такого как Tween 80) может составлять от 0,01 до 1 мас./об.%, в частности 0,1%; включенное количество октилфеноксиполиоксиэтанола или нонилфеноксиполиоксиэтанола (такого как Triton X-100) может составлять от 0,001 до 0,1 мас./об.%, в частности от 0,005 до 0,02%; и количество включенного простого эфира полиоксиэтилена (такого как Laureth 9) может составлять от 0,1 до 20 мас./об.%, возможно от 0,1 до 10%, в частности от 0,1 до 1% или примерно 0,5%.

Композиция по настоящему изобретению может быть приготовлена в виде однократного флакона, многократного флакона или предварительно заполненного шприца, и данная композиция может дополнительно включать физиологически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель, используемый для жидкой композиции, включает водный или неводный растворитель, суспензию, эмульсию или масло. Примеры неводного растворителя включают пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и этилолеат. Водные носители включают воду, водно-спиртовой растворитель, эмульсию или суспензию, физиологический раствор и буферный раствор. Примеры масла включают растительное или животное масло, арахисовое масло, соевое масло, оливковое масло, подсолнечное масло, печеночный жир, синтетическое масло, такое как "морское масло" (marine oil), и липиды, полученные из молока или яиц. Вакцинная композиция по настоящему изобретению может быть изотоничной, гипертоничной или гипотоничной. Однако предпочтительным является то, чтобы фармацевтическая композиция для инфузии или инъекции была в основном изотоничной, но без ограничения ею. Тем временем, изотоничность или гипертоничность может быть полезной для хранения композиции. Когда фармацевтическая композиция является гипертоничной, данная композиция может быть разбавлена до изотоничности перед введением. Регулятор тоничности для разведения может представлять собой изотоничный регулятор тоничности, такой как соль или неионный регулятор тоничности, такой как углевод. Ионный регулятор тоничности включает хлорид натрия, хлорид кальция, хлорид калия, хлорид магния и т.д., но не ограничивается ими. Неионный регулятор тоничности включает сорбит, глицерин и т.д., но не ограничивается ими.

Конъюгат в каждой дозе вакцины может быть выбран в количестве, которое индуцирует иммунопротективный ответ без значительных побочных эффектов, и такое количество может варьировать в зависимости от серотипа пневмококка. В частности, в вакцинной композиции по отношению к капсульному полисахариду, имеющему происхождение из серотипа 1, каждый из капсульных полисахаридов, имеющих происхождение из серотипов 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, может иметь относительное содержание от 0,9 до 1,1, и капсульный полисахарид, имеющий происхождение из серотипа 6B, может иметь относительное содержание от 1,8 до 2,2, но они не ограничиваются ими.

Кроме того, в вакцинной композиции капсульный полисахарид, имеющий происхождение из серотипа 2, может иметь относительное содержание от 0,9 до 1,1 относительно капсульного полисахарида, имеющего происхождение серотипа 1, но конкретно не ограничиваясь им.

В качестве примера получения конъюгата каждый конъюгат может содержать от 0,1 до 100 мкг, в частности от 0,1 до 10 мкг, более конкретно от 1 до 5 мкг полисахаридов. Более конкретно, помимо капсульного полисахарида, имеющего происхождение из серотипа 6B, другие полисахариды, т.е. каждый из капсульных полисахаридов, имеющих происхождение из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, могут содержаться в количестве 2,2 мкг, и капсульный полисахарид, имеющий происхождение из серотипа 6B, может содержаться в количестве 4,4 мкг, но не ограничиваясь ими. В данном случае белок CRM197 может содержаться в композиции в количестве от 0,1 до 100 мкг, в частности от 1 до 50 мкг, более конкретно от 28 до 31 мкг и наиболее конкретно 29,3 мкг, но не ограничиваясь ими. Оптимальные количества компонентов для конкретной вакцины могут быть определены стандартными исследованиями, включающими наблюдение подходящих иммунных ответов у индивидов. Например, количество для вакцинации человека может быть определено экстраполяцией результатов анализа на животных. Кроме того, обычный специалист в данной области может эмпирически определять ее дозировку, при необходимости.

Вакцинная композиция может дополнительно содержать хлорид алюминия и натрия, но не ограничиваясь ими. Кроме того, вакцинная композиция может содержать или может не содержать консервант, в зависимости от ее назначения и применения.

Вакцинную композицию по настоящему изобретению можно использовать для защиты индивидов, чувствительных к пневмококковой инфекции, и для предупреждения пневмококкового заболевания посредством введения фармацевтически эффективного количества системным путем или путем через слизистую. Термин "предупреждение" в том виде, в котором он здесь используется, относится ко всем действиям, которые ингибируют или откладывают инфекцию, вызванную пневмококковым заболеванием, посредством введения вакцинной композиции по настоящему изобретению. Фармацевтически эффективное количество, определенное в настоящем изобретении, относится к требующейся дозировке для индуцирования антител в такой степени, что может быть значительно снижена вероятность инфицирования пневмококком или тяжесть инфекции. Термин "введение" в том виде, в котором он здесь использу-

ется, относится к введению заданного вещества индивиду любым подходящим способом. Вакцинную композицию по настоящему изобретению можно вводить пероральным, назальным, ректальным, чрескожным путем или ингаляцией с использованием аэрозоля или в качестве альтернативы вакцинную композицию можно вводить в виде болюса или можно медленно инъектировать, но без ограничения этим. Данное введение может включать инъекцию внутримышечным, внутривенным, внутрикожным или подкожным путем или введение через слизистую в полость рта/желудочно-кишечный, респираторный тракт или мочеполовые пути. В одном воплощении для лечения пневмонии или отита среднего уха используется введение в нос. В таком случае может более эффективно предупреждаться носоглоточное носительство пневмококка, таким образом ослабляя инфекцию на ее начальной стадии.

Термин "индивид" в том виде, в котором он здесь используется, относится к живому организму, который может быть инфицирован патогенами, в частности он относится к высшим позвоночным и, более конкретно, относится к млекопитающему, но конкретно не ограничиваясь ими.

В другом воплощении настоящего изобретения композиция по настоящему изобретению можно вводить за одно введение или ее можно вводить 2, 3, 4 или более раз с подходящими временными интервалами, но не ограничиваясь этим. Например, традиционной схемой для младенцев и детей, начинающих ходить, против инвазивных заболеваний, вызванных *Streptococcus pneumoniae*, может быть введение в возрасте 2, 4, 6, и 12-15 месяцев.

Кроме того, данная композиция может дополнительно включать один или более чем один белок, имеющий происхождение из *Streptococcus pneumoniae*. Примеры белков *Streptococcus pneumoniae*, подходящих для включения в данную композицию, включают белки, идентифицированные в международной патентной заявке WO 2002/053761, а также идентифицированные в международной патентной заявке WO 2002/083855, и все эти белки могут быть включены в объем настоящего изобретения.

В типичном воплощении настоящего изобретения композиция 13-валентной вакцины (обозначенная "LBVE013") для предупреждения пневмококкового заболевания была приготовлена в общем объеме 0,5 мл, при смешивании 2,2 мкг каждого полисахарида, за исключением 4,4 мкг 6В; примерно 29,3 мкг белка-носителя CRM197; 0,5 мг адьюванта на основе алюминиевого компонента (2 мг фосфата алюминия); примерно 4,25 мг хлорида натрия (с консервантом) или примерно 3,5 мг хлорида натрия (без консерванта); примерно 295 мкг сукцинатного буфера и примерно 3 мг 2-феноксизанола и примерно 60 мкг формальдегида (с консервантом).

В другом типичном воплощении настоящего изобретения композиция 14-валентной вакцины (обозначенная как "LBVE014") для предупреждения пневмококкового заболевания была приготовлена в общем объеме 0,5 мл, при смешивании 2,2 мкг каждого полисахарида, за исключением 4,4 мкг 6В; примерно 31 мкг белка-носителя CRM197; 0,5 мг адьюванта на основе алюминиевого компонента (2 мг фосфата алюминия); примерно 4,25 мг хлорида натрия (с консервантом) или примерно 3,5 мг хлорида натрия (без консерванта); примерно 295 мкг сукцинатного буфера и примерно 3 мг 2-феноксизанола и примерно 60 мкг формальдегида (с консервантом).

В еще одном типичном воплощении настоящего изобретения в сыворотке от кролика, иммунизированного вакцинными композициями, было подтверждено, что концентрация специфичного в отношении серотипа IgG была выше, чем концентрация при использовании Превенар 13® (табл. 1а и 1б). Кроме того, анализ опсонофагоцитирующей активности (OPA) также подтвердил, что вакцинная композиция по настоящему изобретению демонстрировала повышенный уровень функциональных антител по сравнению с Превенар 13® (табл. 2а и 2б). Соответственно, высокопрогнозируемым является то, что вакцинной композицией по настоящему изобретению могли бы иметь значимое влияние на предупреждение пневмококковых заболеваний.

Другим аспектом настоящего изобретения является иммуногенная композиция против пневмококка, содержащая 13 типов или 14 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем.

Эти 13 типов или 14 типов конъюгатов и пневмококк являются такими же, как описано выше.

Композиция по настоящему изобретению, которая содержит 13 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем, содержит капсульные полисахариды, имеющие происхождение от *Streptococcus pneumoniae*, имеющего 13 разных типов серотипов. Кроме того, при введении данной композиции в организм она распознается как антиген и вызывает иммунный ответ таким образом, что продуцируется антитело против нее. Соответственно, композицию по настоящему изобретению можно использовать в качестве иммуногенной композиции против пневмококка.

Еще одним аспектом настоящего изобретения является способ предупреждения пневмококкового заболевания посредством введения вакцинной композиции или иммуногенной композиции индивиду, нуждающемуся в этом.

Еще одним аспектом настоящего изобретения является предложение применения препарата вакцинной композиции для предупреждения пневмококкового заболевания, содержащего 13 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем, где в данных 13 типах конъюгатов каждый из 13 типов капсульных полисахаридов, имеющих происхождение из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*, ковалентно конъюгирован с белком-носителем; ука-

занный белок-носитель представляет собой CRM197; и каждый из конъюгатов имеет структуру, в которой каждый из капсульных полисахаридов и белок-носитель связаны через группу -O-C(NH)-NH- с использованием способа цианилирования.

Еще одним аспектом настоящего изобретения является предложение применения препарата вакцинной композиции для предупреждения пневмококкового заболевания, содержащего 14 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем, где в данных 14 типах конъюгатов каждый из 14 типов капсульных полисахаридов, имеющих происхождение из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*, ковалентно конъюгирован с белком-носителем; указанный белок-носитель представляет собой белок CRM197; и каждый из конъюгатов имеет структуру, в которой каждый из капсульных полисахаридов и белок-носитель связаны через группу -O-C(NH)-NH- с использованием способа цианилирования.

Вакцинная композиция, иммуногенная композиция и предупреждение пневмококкового заболевания являются такими же, как описано выше.

Еще одним аспектом настоящего изобретения является способ получения иммуногенной композиции, включающий стадию конъюгирования каждого из 13 типов выделенных капсульных полисахаридов, имеющих происхождение из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*, с CRM197-белком-носителем, с использованием способа цианилирования, таким образом, что капсульный полисахарид и белок-носитель образуют структуру, которая связана через группу -O-C(NH)-NH-.

Еще одним аспектом настоящего изобретения является способ получения иммуногенной композиции, включающий стадию конъюгирования каждого из 14 типов выделенных капсульных полисахаридов, имеющих происхождение из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*, с CRM197-белком-носителем, с использованием способа цианилирования, таким образом, что капсульный полисахарид и белок-носитель образуют структуру, которая связана через группу -O-C(NH)-NH-.

Иммуногенная композиция и способ ее получения являются такими же, как описано выше.

#### **Полезные эффекты**

Композиции по настоящему изобретению содержат капсульные полисахариды, имеющие происхождение из *Streptococcus pneumoniae*, имеющего 13 разных серотипов, или дополнительно содержат капсульный полисахарид, имеющий происхождение из серотипа 2 *Streptococcus pneumoniae*, где каждый из таких капсульных полисахаридов конъюгирован с CRM197, который представляет собой белок-носитель, с использованием способа цианилирования, приводя, посредством этого, к повышенному сывороточному титру IgG и активности функционального антитела. Следовательно, вакцинная композиция и иммуногенная композиция по настоящему изобретению могут быть преимущественно использованы для предупреждения пневмококкового заболевания у младенцев, маленьких детей и взрослых.

#### **Подробное описание воплощения**

Настоящее изобретение будет ниже подробно описано с сопровождающими типичными воплощениями. Однако раскрытые здесь типичные воплощения служат только для иллюстративных целей, и их не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Пример 1. Получение капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae*.

1-1. Получение банка клеток.

Штаммы *Streptococcus pneumoniae* сеяли штрихом на среду на основе кровяного агара для отделения одной колонии. После выбора одной колонии с хорошей скоростью роста среди 10 или более из них, данную колонию затем иммунизировали и культивировали в жидкой среде, которая не содержит какого-либо ингредиента животного происхождения, и закладывали исследовательский банк клеток (RCB) посредством создания глицеринового маточного раствора.

Из данного исследовательского банка клеток отбирали один флакон, для которого подтверждали, что в нем экспрессируются полисахариды, имеющие присущие серотипы, и затем клетки пролиферировали в жидкой среде, не содержащей ингредиентов животного происхождения. Затем добавляли в нее синтетический глицерин для получения маточного банка клеток. Кроме того, один флакон отбирали из маточного банка клеток и клетки пролиферировали в жидкой среде, не содержащей ингредиентов животного происхождения. Затем добавляли в нее синтетический глицерин для получения рабочего банка клеток. Полученный банк клеток хранили при условиях сверхзамораживания при -70°C или ниже и использовали.

1-2. Ферментация и выделение полисахарида.

Один флакон из рабочего банка клеток оттаивали и затем иммунизировали в жидкую среду, не содержащую ингредиентов животного происхождения. Культивирование для посева проводили при 37±2°C без перемешивания до достижения оптической плотности (OD<sub>600</sub>). После подтверждения того, была ли загрязненной культуральная среда, в которой было завершено культивирование для посева, продукты иммунизировали в ферментер, содержащий жидкую среду, не содержащую ингредиентов животного происхождения.

Затем проводили главное культивирование, поддерживая pH среды с использованием стерилизо-

ванного раствора гидроксида калия, при  $37\pm 2^\circ\text{C}$  при условиях минимального перемешивания. Концентрацию клеток в культуральной среде и концентрацию глюкозы, содержащейся в среде, измеряли каждые 2 ч, и культивирование завершали во время, когда глюкоза в среде истощалась.

После завершения культивирования добавляли в культуру подходящее количество стерилизованного 12%-ного дезоксихолата натрия до конечной концентрации 0,12% для индуцирования лизиса клеток и затем высвобождались полисахариды, связанные с клетками.

### 1-3. Очистка капсульного полисахарида.

К образцам, обработанным в течение 1 ч дезоксихолатом натрия, добавляли фосфорную кислоту и супернатант получали центрифугированием. Полученный супернатант пропускали через глубинный фильтр с последующим центрифугированием и заменой буфера на буфер на основе фосфорной кислоты. После замены буфера образцы пропускали через фильтр на основе активированного угля и удаляли примеси следующими двумя способами.

1) Поскольку 12 серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 18C, 19A, 19F и 23F были способны к ионному связыванию с цетилтриметиламмония бромидом (СТАВ), проводили способ с СТАВ. Осуществляли обработку СТАВ, центрифугирование, обработки хлоридом натрия (NaCl) и йодидом натрия (NaI) и способы центрифугирования.

2) Два серотипа - 7F и 14, которые не реагировали с СТАВ, подвергали взаимодействию добавлением раствора геля на основе фосфата алюминия (Алгель) и затем использовали супернатант, полученный в результате центрифугирования.

После двух описанных выше стадий удаления примесей образцы подвергали способам глубоинной фильтрации и ультрафильтрации/диафильтрации (UF/DF). Затем образцы обрабатывали этанолом и хлоридом натрия с образованием основного объема порошка капсульного полисахарида.

Пример 2. Получение конъюгата капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* - белок.

### 2-1. Сравнение между способом восстановительного аминирования и способом цианилирования.

Выход конъюгирования (т.е. восстановительного аминирования и цианилирования) сравнивали с использованием очищенного полисахарида 9V и белка-носителя CRM197. Конкретные способы конъюгирования являются следующими.

#### (1) Способ восстановительного аминирования.

11,7 мг периодата натрия добавляли в маточный раствор полисахарида 9V и полисахариды активировали при перемешивании данной смеси при  $21-25^\circ\text{C}$ . Окисленные полисахариды концентрировали и подвергали диафильтрации с использованием фильтра для ультрафильтрации (100 кДа) и WFI (вода для инъекции). Затем остальные полисахариды смешивали с CRM197 при отношении полисахарид/ CRM197, равном 0,5, и лиофилизировали. Лيوфилизированный комплекс оттаивали и стабилизировали (уравновешивали) при  $21-25^\circ\text{C}$ . Уравновешенный комплекс растворяли инкубированием ( $37\pm 2^\circ\text{C}$ ) в натрий-фосфатном ( $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ) буфере в соотношении 0,1 М на 20 г сахаридов и затем добавляли цианоборгидрид (100 мг/мл) для иницирования реакции конъюгирования. После инкубации при  $37\pm 2^\circ\text{C}$  в течение примерно 44-52 ч температуру снижали до  $23\pm 2^\circ\text{C}$  и добавляли в реактор 0,9%-ный раствор NaCl (1 мл). Добавляли раствор боргидрида натрия (100 мг/мл) с получением 1,8-2,2 мол.экв. боргидрида натрия на 1 моль сахаридов. Затем данную смесь инкубировали при перемешивании при  $23\pm 2^\circ\text{C}$  для того, чтобы уменьшить уровень каких-либо непрореагировавших альдегидов, присутствующих в сахарадах. Данную смесь разводили с использованием 0,9%-ного раствора хлорида натрия (5 мл) и затем разведенную смесь конъюгата подвергали диафильтрации с использованием мембраны с MWCO (порог отсека молекулярной массы) (100 кДа).

#### (2) Способ цианилирования.

Раствор полисахарида в 2 М NaCl получали добавлением порошков хлорида натрия в маточный раствор полисахарида 9V, полученный без гидролиза. Для того чтобы активировать полисахариды, тетрафторборат 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP) растворяли при отношении 0,5 мас./мас.% к полисахаридам, добавляли в маточный раствор полисахарида 9V и затем перемешивали в течение 15 мин для индуцирования активации полисахарида. Затем добавляли раствор гидроксида натрия, пока pH не достигал  $9,5\pm 0,1$ , и затем его перемешивали в течение 3 мин для полной активации гидроксильной группы полисахаридов посредством CDAP. В раствор полисахаридов, в котором были активированы полисахариды, добавляли CRM197 при отношении 1,0 мас./мас.% CRM197 к полисахаридам и реакцию конъюгирования проводили при комнатной температуре в течение 1 ч. В реакции конъюгирования 2 М раствор глицина добавляли в количестве 3 мол.экв. относительно 1 мол.экв. CDAP и pH доводили до 9,0 с последующим инкубированием продуктов в течение ночи, посредством этого завершая реакцию. После завершения реакции конъюгата его концентрировали и подвергали диафильтрации через фильтр для ультрафильтрации с использованием буфера, содержащего 0,9%-ный хлорид натрия.

В результате подтвердили, что выход конъюгатов, полученных способом цианилирования, был по меньшей мере в 4 раза выше, чем выход конъюгатов, полученных способом восстановительного аминирования. Соответственно, авторы настоящего изобретения получили конъюгаты с капсульными полисахаридами и CRM197 с использованием способа цианилирования.

## 2-2. Конъюгирование и очистка конъюгата.

Получение конъюгата капсульных полисахаридов *Streptococcus pneumoniae* и CRM196 проводили посредством следующих 6 стадий.

### Стадия 1-1. Растворение и гидролиз 13 капсульных полисахаридов.

Порошки капсульных полисахаридов, полученных из каждого серотипа, растворяли в воде для инъекции таким образом, что интервал их конечной концентрации является таким, как описано ниже, и затем фильтровали через фильтр (0,45 мкм).

В частности, фильтрацию проводили растворением порошков капсульных полисахаридов в интервале от 0,8 до 2,0 мг/мл для серотипов 1, 3 и 4; в интервале от 4 до 8 мг/мл для серотипов 5, 6B, 9V, 18C и 19F; в интервале от 8 до 12 мг/мл для серотипов 6A и 19A и в интервале от 2 до 4 мг/мл для серотипов 7F, 14 и 23F.

Данный раствор инкубировали в интервале pH и температуры, описанном ниже для каждого серотипа, и затем проводили гидролиз. В частности, для серотипов 1, 3, 5, 6B, 7F, 14 и 23F инкубацию проводили при 70-80°C в течение ночи; для серотипов 6A и 19F инкубацию проводили при 70-80°C в течение 1-4 ч и для серотипов 9V и 18C инкубацию проводили при pH 2,0 при 65-80°C в течение 1-3 ч с использованием раствора фосфорной кислоты. Гидролиз затем прерывали охлаждением раствора до 21-24°C и добавляли гидроксид натрия до достижения целевого pH  $6,0 \pm 1,0$ . Гидролиз не проводили для серотипов 4 и 19A.

### Стадия 1-2. Растворение и гидролиз 14 капсульных полисахаридов.

Порошки капсульных полисахаридов, полученные из каждого серотипа, растворяли в воде для инъекции таким образом, что размах их конечной концентрации является таким, как описано ниже, и затем фильтровали через фильтр (0,45 мкм).

В частности, фильтрацию проводили растворением порошков капсульных полисахаридов в интервале от 0,8 до 2,0 мг/мл для серотипов 1, 2, 3 и 4; в интервале от 4 до 8 мг/мл для серотипов 5, 6B, 9V, 18C и 19F; в интервале от 8 до 12 мг/мл для серотипов 6A и 19A; в интервале от 2 до 4 мг/мл для серотипов 14 и 23F и в интервале от 6 до 10 мг/мл для серотипа 7F.

Было широко известно, что на иммуногенность конъюгатной вакцины, в общем, отрицательно влияло увеличение ее валентности из-за иммунного мешающего влияния, индуцированного взаимодействием среди ее компонентов (Dagan R. et al. (2010), *Vaccines*, 28(5513); *Glycoconjugate vaccines and immune interference: A review*). Для того чтобы минимизировать иммунологическую потерю и улучшить иммуногенность LBVE014, авторы изобретения применили разные специфичные в отношении серотипа стадии гидролиза к полисахариду в определенных серотипах (серотип 3, 4, 6A, 7F) для оптимизации ее общей иммуногенности. Раствор гидролизировали в интервале pH и температуры, и общие условия гидролиза, специфичные в отношении серотипа, описаны ниже.

В частности, для серотипов 1, 2, 4, 5, 6A, 6B, 14 и 23F инкубацию проводили при 70-80°C в течение ночи; для серотипа 19F инкубацию проводили при 70-80°C в течение 1-4 ч и для серотипов 3, 7F, 9V и 18C инкубацию проводили при pH 2,0 при 65-80°C в течение 1-3 ч с использованием раствора фосфорной кислоты. Гидролиз затем останавливали охлаждением раствора до 21-24°C и добавляли гидроксид натрия до достижения целевого pH  $6,0 \pm 1,0$ . Гидролиз не проводили для серотипа 19A.

### Стадия 2. Реакция конъюгирования капсульного полисахарида и CRM197.

Раствор полисахарида в 2 M NaCl получали добавлением порошков хлорида натрия ко всем серотипам. Для каждой сыворотки подходящее количество тетрафторбората 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP) растворяли в соотношении 1 г CDAP на 100 мл раствора 50/50 ацетонитрил/вода для инъекции (об./об.). В частности, CDAP растворяли в соотношении 1 мас./мас.% относительно полисахарида для серотипов 6A и 14; CDAP растворяли в соотношении 2 мас./мас.% для серотипов 2 и 4; CDAP растворяли в соотношении 3 мас./мас.% для серотипов 1, 3, 6B, 7F и 19A и CDAP растворяли в соотношении 4 мас./мас.% для серотипов 5, 9V, 18C, 19F и 23F. Каждый из продуктов добавляли в раствор каждого полисахарида. Через 1-3 мин добавляли в него гидроксид натрия для повышения pH до 9,4-9,7 и данную смесь перемешивали в течение 3-7 мин таким образом, что гидроксильная группа полисахарида была достаточно активированной CDAP. В каждый из растворов полисахарида определенного серотипа добавляли от 0,5 до 1,0 мас./мас.% CRM197 относительно полисахаридов и реакцию конъюгирования проводили в течение 1-4 ч. Кроме того, степень превращения в реакции измеряли с использованием HPLC-SEC (высокоэффективная жидкостная хроматография-гель-фильтрация) и дополнительное количество CDAP вводили по мере необходимости.

### Стадия 3. Завершение реакции конъюгирования.

От 3 до 6 мол.экв. раствора глицина добавляли относительно 1 мол.экв. CDAP, который был добавлен ко всем серотипам, и затем реакцию завершали доведением pH до 9,0. Раствор конъюгата перемешивали при 21-24°C в течение 1 ч и затем хранили в течение ночи при низкой температуре от 2 до 8°C.

### Стадия 4. Ультрафильтрация.

Смесь разбавленного конъюгата концентрировали и подвергали диафильтрации через фильтр для ультрафильтрации с использованием минимум 20 объемов буфера. В частности, поддерживали pH буфе-

ра от 5,5 до 6,5 и использовали буфер, содержащий 0,9% хлорида натрия. Пороги отсекающей молекулярной массы фильтра для ультрафильтрации составляли 300 кДа для всех серотипов, и фильтрат отбрасывали.

#### Стадия 5. Стерилизующая фильтрация.

Ретентат после диафильтрации разводили до концентрации меньше чем 0,4 г/л на основе концентрации полисахарида с использованием буфера и фильтровали через фильтр (0,22 мкм). Контроли в ходе процесса (содержание сахаридов и остаточный DMAP) проводили на отфильтрованном продукте. Контроли в ходе процесса на отфильтрованном ретентате проводили для определения того, требовалось ли дополнительное концентрирование, диафильтрация и/или разведение.

#### Стадия 6. Адсорбция.

Соль алюминия (главным образом, фосфат алюминия) добавляли к стерильному фильтрату таким образом, что конечная концентрация иона алюминия достигала 1 мг/мл, и добавляли дополнительные соли для поддержания интервала pH от 5,5 до 6,5. Оценивали маточный раствор, в котором была завершена адсорбция, для определения того, был ли он подходящего качества, и его хранили охлажденным при 2-8°C до применения.

#### Пример 3. Приготовление вакцины против мультивалентного пневмококкового конъюгата.

##### 3-1. Приготовление 13-валентной пневмококковой конъюгатной вакцины (LBVE013).

Требуемое количество конечного основного объема концентрата рассчитывали на основе объема партии и концентрации основного объема полисахарида. После добавления требуемого количества 0,85% хлорида натрия, сукцинатного буфера, 2-феноксиэтанола и формальдегида в предварительно помеченный сосуд для препарата добавляли основной объем концентрата. Затем продукты тщательно смешивали и фильтровали через фильтр (0,22 мкм). Приготовленный основной объем раствора медленно смешивали и добавляли к нему основной объем фосфата алюминия с последующим тщательным смешиванием данной смеси. pH проверяли и корректировали по мере необходимости. Приготовленный основной объем продукта хранили при 2-8°C. Полученная вакцинная композиция (далее именуемая "LBVE013") содержала в общем объеме 0,5 мл 2,2 мкг каждого полисахарида, за исключением 4,4 мкг 6В; примерно 29,3 мкг белка-носителя CRM197; 0,5 мг адъюванта на основе алюминиевого компонента (2 мг фосфата алюминия); примерно 4,25 мг хлорида натрия; примерно 295 мкг сукцинатного буфера и примерно 3 мг \*2-феноксиэтанола и примерно 60 мкг \*формальдегида (\* применимы при добавлении консерванта).

##### 3-2. 14-Валентная пневмококковая конъюгатная вакцина (LBVE014).

Требуемое количество конечного основного объема концентрата рассчитывали на основе объема партии и концентрации основного объема полисахарида. После добавления требуемого количества 0,85% хлорида натрия, сукцинатного буфера, 2-феноксиэтанола и формальдегида в предварительно помеченный сосуд для препарата добавляли основной объем концентрата. Затем продукты тщательно смешивали и фильтровали через фильтр (0,22 мкм). Приготовленный основной объем раствора медленно смешивали и добавляли к нему основной объем фосфата алюминия с последующим тщательным смешиванием данной смеси. pH проверяли и корректировали, по мере необходимости. Приготовленный основной объем продукта хранили при 2-8°C. Полученная вакцинная композиция (далее именуемая "LBVE014") содержала в общем объеме 0,5 мл 2,2 мкг каждого полисахарида, за исключением 4,4 мкг 6В; примерно 31 мкг белка-носителя CRM197; 0,5 мг адъюванта на основе алюминиевого компонента (2 мг фосфата алюминия); примерно 4,25 мг хлорида натрия; примерно 295 мкг сукцинатного буфера и примерно 3 мг \*2-феноксиэтанола и примерно 60 мкг \*формальдегида (\* применимы при добавлении консерванта).

#### Пример 4. Оценка иммуногенности LBVE013 и LBVE014.

Проводили исследование для того, чтобы оценить, имеют ли композиции мультивалентной пневмококковой вакцины (LBVE013 и LBVE014), полученные в примере 3, способность индуцировать иммунный ответ у кроликов. Данные иммуногенные эффекты подтверждали измерением концентрации сывороточного уровня IgG посредством ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), специфичного в отношении антигена, и уровня функциональных антител посредством анализа опсонифаготирующей активности (ОРА).

Белых новозеландских кроликов внутримышечно иммунизировали в неделю 0, неделю 2 и неделю 4 с использованием запланированной человеческой клинической дозы, приготовленной в виде препарата LBVE013 или LBVE014, или контроля - Превенар 13® (2,2 мкг каждого полисахарида, за исключением 4,4 мкг 6В). Сыворотки отбирали каждые 2 недели после иммунизации. Концентрацию IgG сыворотки измеряли с использованием ELISA, и его результаты показаны в табл. 1а и 1б. Данные результаты будут подробно описаны следующим образом.

##### 4-1. Определение концентрации IgG, специфичного в отношении серотипа.

Капсульными полисахаридами каждого из 13 или 14 пневмококковых серотипов покрывали 96-луночный планшет в количестве 5 мкг/луночку при комнатной температуре в течение 16 ч. Для того чтобы минимизировать неспецифичные ответы антиген-антител, сыворотку от каждого субъекта адсорбировали с использованием 333,3 мкг/мл С-PS и 333,3 мкг/мл капсульного полисахарида серотипа 22F

(PnPs 22F) при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем продукты разводили при подходящей степени разведения с использованием буфера для разведения антитела, содержащего Tween 20. Покрываемый планшет промывали 4 раза промывочным буфером и 50 мкл предварительно адсорбированной и разведенной сыворотки добавляли в луночный планшет с последующим обеспечением реакции при комнатной температуре в течение 1 ч. Луночный планшет после реакции 4 раза промывали тем же самым способом и затем в каждую лунку добавляли конъюгаты антитела козы-IgG кролика-HRP (пероксидаза хрена) (1:20000). Затем реакцию проводили при комнатной температуре в течение 30 мин. Планшет промывали 4 раза тем же самым способом, что и описанный выше. В каждую лунку добавляли 100 мкл раствора ТМВ (тетраметилбензидин), стабилизированного при комнатной температуре, и давали реагировать при комнатной температуре в течение 15 мин. Добавляли к ним 100 мкл 1н. раствора серной кислоты для прерывания реакции и измеряли поглощение при 450 и 650 нм. В качестве контроля также анализировали сыворотку, полученную иммунизацией индивида Превенар 13®.

В результате неожиданно обнаружили, что картина иммунного ответа в каждом серотипе LBVE013 значительно отличалась от картины Превенар 13® (табл. 1а и 1б), в которых показано, что LBVE013 представляет собой иммунологически отличную композицию от Превенар 13®, несмотря на то, что они содержат одни и те же серотипы и что кролики, иммунизированные LBVE013, демонстрировали более высокий уровень концентрации IgG во всех серотипах по сравнению с Превенар 13®. В частности, серотипы 1, 6В, 7F, 9V, 14 и 19F демонстрировали в 2-6 раз большие концентрации IgG по сравнению с Превенар 13® (табл. 1а и 1б).

В случае LBVE014 серотипы 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18С, 19А и 19F демонстрировали в 2-6 раз большие концентрации IgG по сравнению с концентрациями от Превенар 13® (табл. 1а и 1б).

Таблица 1а

| LBVE013 |              | Превенар13® |              |
|---------|--------------|-------------|--------------|
| Серотип | IgG (мкг/мл) | Серотип     | IgG (мкг/мл) |
| 19F     | 82,4         | 6А          | 46,5         |
| 6А      | 64,7         | 6В          | 22,4         |
| 14      | 61,1         | 23F         | 18,3         |
| 6В      | 59,5         | 19F         | 17,6         |
| 19А     | 26,7         | 19А         | 17,2         |
| 23F     | 21,8         | 14          | 10,1         |
| 7F      | 13,4         | 5           | 8,4          |
| 5       | 11,4         | 4           | 6,7          |
| 4       | 9,1          | 7F          | 6,3          |
| 1       | 5,3          | 18С         | 4,4          |
| 18С     | 4,7          | 3           | 2,7          |
| 3       | 3,0          | 1           | 1,6          |
| 9V      | 2,7          | 9V          | 1,2          |

Таблица 1б

| LBVE014 |              | Превенар13® |              |
|---------|--------------|-------------|--------------|
| Серотип | IgG (мкг/мл) | Серотип     | IgG (мкг/мл) |
| 18C     | 157,3        | 23F         | 35,6         |
| 19A     | 120,3        | 6A          | 34,3         |
| 23F     | 75,7         | 18C         | 26,5         |
| 7F      | 65,6         | 6B          | 21,2         |
| 19F     | 56,2         | 19A         | 18,9         |
| 9V      | 54,8         | 7F          | 12,3         |
| 6B      | 50,0         | 19F         | 10,2         |
| 6A      | 48,0         | 4           | 8,9          |
| 2       | 42,6         | 14          | 7,9          |
| 14      | 38,6         | 5           | 7,8          |
| 4       | 38,5         | 9V          | 6,8          |
| 5       | 29,5         | 1           | 3,6          |
| 1       | 10,8         | 3           | 1,6          |
| 3       | 2,7          | 2*          | -            |

\*Серотип 2 не включен в Превенар 13® 4-2.

Определение уровня функционального антитела (анализ опсонофагоцитирующей активности, ОРА)

Уровни функционального антитела, индуцированные специфичными в отношении серотипа антигенами, оценивали посредством проведения анализа ОРА с сывороткой, полученной от кроликов, иммунизированных LBVE013, или LBVE014, или Превенар 13®.

В частности, эквивалентное количество сыворотки отбирали от каждого индивида и объединяли по группе. *Streptococcus pneumoniae* культивировали в среде ТНУ (бульон Todd-Hewitt, 2% по массе дрожжевого экстракта) для каждого серотипа и разводили опсонизирующим буфером таким образом, что достигалось от 200 до 300 (колониеобразующая единица)/10 мкл. 20 мкл разведенной сыворотки и 10 мкл разведенного *Streptococcus pneumoniae* смешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем добавляли 50 мкл смеси предварительно дифференцированных клеток HL-60 и комплементов (клетка:комплемента - 4:1) и осуществляли взаимодействие в инкубаторе с CO<sub>2</sub> (37°C) в течение 45 мин. Для завершения фагоцитоза температуру снижали и 10 мкл реакционной смеси наносили мазком на чашку с агаром, предварительно высушенным в течение 30-60 мин. Планшет инкубировали в инкубаторе с CO<sub>2</sub> (37°C) в течение от 12 до 18 ч и затем подсчитывали колонии. Титр ОРА выражали как степень разведения, при которой наблюдается 50% умерщвления (табл. 2: титр ОРА 2187 показывает, что титр не мог достигнуть уровня 50% даже в самой разведенной области по сравнению с титром негативного контроля, т.е. данный титр является весьма высоким).

Таблица 2а

| Серотип | Титр ОРА |             | LBVE013 /<br>Превенар 13® |
|---------|----------|-------------|---------------------------|
|         | LBVE013  | Превенар13® |                           |
| 1       | 208      | 44          | 4,7                       |
| 3       | 218      | 190         | 1,1                       |
| 4       | 1775     | 836         | 2,1                       |
| 5       | 493      | 228         | 2,2                       |
| 6A      | 1606     | 1375        | 1,2                       |
| 6B      | 1751     | 784         | 2,2                       |
| 7F      | 2187     | 2187        | 1,0                       |
| 9V      | 1032     | 512         | 2,0                       |
| 14      | 2187     | 1761        | 1,2                       |
| 18C     | 1222     | 1035        | 1,2                       |
| 19A     | 2187     | 1468        | 1,5                       |
| 19F     | 2187     | 847         | 2,6                       |
| 23F     | 752      | 320         | 2,4                       |

Следовательно, приведенными выше экспериментальными результатами было подтверждено, что титр ОРА от всей 13-валентной иммуногенной композиции по настоящему изобретению показывал более высокий уровень функциональных антител по сравнению с титром ОРА Превенар 13®. Соответственно, иммуногенная композиция по настоящему изобретению могла бы быть весьма эффективной для преду-

преждедения заболеваний, вызванных *Streptococcus pneumoniae*.

Таблица 26

| Серотип | Титр ОРА |             | LBVE014 /<br>Превенар 13® |
|---------|----------|-------------|---------------------------|
|         | LBVE014  | Превенар13® |                           |
| 1       | 1626     | 392         | 4,1                       |
| 2       | 3729     | 20          | 186,5                     |
| 3       | 1853     | 801         | 2,3                       |
| 4       | 6798     | 3395        | 2,0                       |
| 5       | 7357     | 904         | 8,1                       |
| 6A      | 11207    | 4623        | 2,4                       |
| 6B      | 16694    | 7001        | 2,4                       |
| 7F      | 7811     | 2215        | 3,5                       |
| 9V      | 4543     | 1178        | 3,9                       |
| 14      | 5991     | 2001        | 3,0                       |
| 18C     | 14327    | 1587        | 9,0                       |
| 19A     | 16131    | 2067        | 7,8                       |
| 19F     | 5941     | 1205        | 4,9                       |
| 23F     | 6636     | 5351        | 1,2                       |

На основе результатов из табл. 26 очевидно, что уровень каждого функционального антитела из сыворотки от кролика, иммунизированного LBVE014, выше, чем уровень функционального антитела при иммунизации Превенар 13®. Соответственно, иммуногенная композиция по настоящему изобретению могла бы быть весьма эффективной для предупреждения заболеваний, вызванных *Streptococcus pneumoniae*.

В то время как настоящее изобретение было описано со ссылкой на конкретные иллюстративные воплощения, специалистам в области, к которой относится настоящее изобретение, будет понятно, что настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отступления от технической сущности или существенных характеристик настоящего изобретения. Следовательно, описанные выше воплощения считаются во всех отношениях иллюстративными и неограничивающими. Кроме того, объем настоящего изобретения определяется приложенной формулой изобретения, а не подробным описанием, и следует понимать, что все модификации или вариации, имеющие происхождение из значений и объема настоящего изобретения и их эквивалентов, включены в объем приложенной формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцинная композиция для предупреждения пневмококкового заболевания, содержащая 14 типов конъюгатов капсульного полисахарида с белком-носителем, где

в указанных 14 типах конъюгатов каждый из 14 типов капсульных полисахаридов, имеющих происхождение из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*, ковалентно конъюгирован с белком-носителем;

указанный белок-носитель представляет собой белок CRM197 и

каждый из конъюгатов имеет структуру, в которой каждый из капсульных полисахаридов и белок-носитель связаны через группу -O-C(NH)-NH- с использованием способа цианилирования.

2. Композиция по п.1, где способ цианилирования проводится с использованием тетрафторбората 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP) или CNBr.

3. Композиция по п.1, дополнительно содержащая по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из адъюванта, консерванта, буфера, криопротектора, соли, двухвалентного катиона, неионного детергента и ингибитора свободнорадикального окисления.

4. Композиция по п.3, где адъювант выбран из группы, состоящей из фосфата алюминия, сульфата алюминия, гидроксида алюминия и их смеси.

5. Композиция по п.3, где консервант представляет собой 2-феноксизтанол, формальдегид или их смесь.

6. Композиция по п.1, дополнительно содержащая физиологически приемлемый носитель.

7. Композиция по п.1, где по отношению к капсульному полисахариду, имеющему происхождение из серотипа 1, каждый из капсульных полисахаридов, имеющих происхождение из серотипов 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, имеет относительное содержание от 0,9 до 1,1; и капсульный полисахарид, имеющий происхождение из серотипа 6B, имеет относительное содержание от 1,8 до 2,2.

8. Композиция по п.1, где капсульный полисахарид, имеющий происхождение из серотипа 2, имеет относительное содержание от 0,9 до 1,1 по отношению к капсульному полисахариду, имеющему проис-

хождение из серотипа 1.

9. Способ получения вакцинной композиции по п.1, включающий стадию конъюгирования каждого из 14 типов выделенных капсульных полисахаридов, имеющих происхождение из серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F *Streptococcus pneumoniae*, с белком-носителем CRM197, с использованием способа цанилирования таким образом, что капсульный полисахарид и белок-носитель образуют структуру, которая связана через группу -O-C(NH)-NH-.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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

---