

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202290148** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2022.04.27

(51) Int. Cl. *A61K 39/09* (2006.01)  
*A61P 11/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.07.27

---

(54) **ПОЛИВАЛЕНТНЫЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ КОНЬЮГАТА  
ПНЕВМОКОККОВЫЙ ПОЛИСАХАРИД-БЕЛОК И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) 10-2019-0093276; 62/949,164  
(32) 2019.07.31; 2019.12.17  
(33) KR; US  
(86) PCT/US2020/043729  
(87) WO 2021/021729 2021.02.04  
(71) Заявитель:  
**САНОФИ ПАСТЕР ИНК. (US); СК  
БИОСАЙЕНС КО., ЛТД. (KR)**

(72) Изобретатель:  
**Син Джинхван, Ким Сонхён, Ким  
Хун, Ан Гёнджун, Ли Чон-мин (KR),  
Чжо Мо (US), Талага Филипп (FR)**  
(74) Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

---

(57) Предусмотрены поливалентные композиции на основе пневмококкового конъюгата, содержащие 22-27 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок предусматривает белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. Также предусмотрены способы получения поливалентных композиций на основе пневмококкового конъюгата и способы их применения для профилактики инфекции или заболевания, вызванных *Streptococcus pneumoniae*, у субъекта. Также предусмотрены иммуногенные композиции, содержащие по меньшей мере один конъюгат полисахарид-белок, где полисахарид представляет собой капсульный полисахарид из *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15A, 15C, 23A, 23B, 24F и/или 35B, а также способы их получения.

**A1**

**202290148**

**202290148**

**A1**

# ПОЛИВАЛЕНТНЫЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ КОНЬЮГАТА ПНЕВМОКОККОВЫЙ ПОЛИСАХАРИД-БЕЛОК И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

## ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает преимущество и ссылается на дату подачи предварительной заявки на патент США № 62/949164, поданной 17 декабря 2019 года, и заявки на патент Кореи № 10-2019-0093276, поданной 31 июля 2019 года, полное раскрытие которых включено в данный документ посредством ссылки.

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Данная заявка в целом относится к поливалентным композициям на основе пневмококкового конъюгата, содержащим их вакцинам и способам применения данных композиций и вакцин для профилактики инфекции или заболевания, вызванных *Streptococcus pneumoniae*, у субъекта.

## ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Пневмококк (*Streptococcus pneumoniae*) представляет собой грамположительную ланцетовидную факультативно анаэробную бактерию, имеющую более чем 90 известных серотипов. Было показано, что большинство серотипов *S. pneumoniae* вызывают развитие заболевания (такого как пневмония, бактериемия, менингит и отит), при этом на долю 23 наиболее часто встречающихся серотипов приходится примерно 90% инвазивных заболеваний во всем мире. Серотипы классифицируют на основе серологической реакции капсульных полисахаридов, наиболее важного фактора вирулентности пневмококка. Капсульные полисахариды представляют собой независимые от Т-клеток антигены, которые индуцируют выработку антител при отсутствии Т-хелперных клеток. Независимые от Т-клеток антигены, как правило, индуцируют выработку антител с низкой аффинностью и развитие краткосрочных иммунных ответов с низким уровнем иммунологической памяти или без нее.

[0004] Первые пневмококковые вакцины включали комбинации капсульных полисахаридов из различных серотипов. Данные вакцины могут обеспечивать иммунитет против *S. pneumoniae* у пациентов с развитой или здоровой иммунной системой, однако они были неэффективны у младенцев, у которых отсутствует развитая иммунная система, и у пожилых субъектов, которые часто имеют нарушение иммунной функции. Для улучшения иммунного ответа на пневмококковые вакцины, в частности, у младенцев и пожилых субъектов, которые находятся в группе повышенного риска развития инфекции, вызванной *S. pneumoniae*, капсульные полисахариды конъюгировали с подходящими белками-носителями с получением пневмококковых конъюгированных вакцин. Конъюгация с подходящим белком-носителем превращает капсульный полисахарид из независимого от Т-клеток антигена в зависимый от Т-клеток антиген. Таким образом, иммунный ответ против конъюгированного капсульного полисахарида предусматривает участие Т-хелперных клеток, которые помогают индуцировать более сильный и быстрый иммунный ответ при повторном воздействии капсульного полисахарида.

[0005] Существуют по меньшей мере два подхода к разработке пневмококковых гликоконъюгированных вакцин: подход с применением одного носителя и подход с применением смешанного носителя. Иммуногенность конъюгатов различных капсульных полисахаридов может варьировать в зависимости от серотипа пневмококка и применяемого белка-носителя. В рамках подхода с применением одного носителя капсульные полисахариды из различных серотипов конъюгируют с одним белком-носителем. Серия вакцин PREVNAR от Pfizer представляет собой пример подхода с применением одного носителя, где различные капсульные полисахариды конъюгированы с белком-носителем CRM<sub>197</sub>, нетоксичным вариантом дифтерийного анатоксина с одной аминокислотной заменой глутаминовой кислоты на глицин. 7-валентная вакцина PREVNAR (PREVNAR) впервые прошла регистрацию в 2000 году и содержит капсульные полисахариды из серотипов *S. pneumoniae*, которые являлись наиболее распространенными на момент регистрации: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F и 23F. В 13-валентной вакцине, PREVNAR 13, серотипы 1, 5, 7F, 3, 6A и 19A были добавлены к белку-носителю CRM<sub>197</sub>. Merck разрабатывает 15-валентную вакцину V114, которая включает 13 серотипов, содержащиеся в PREVNAR 13, а также 22F и 33F,

конъюгированные с CRM<sub>197</sub>. См. патент США № 8192746. Мерск также раскрывает 21-валентную композицию на основе пневмококкового конъюгата (PCV21), которая включает следующий 21 серотип *S. pneumoniae*, конъюгированный с CRM<sub>197</sub>: 3, 6С, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F, 35B и по меньшей мере один из 15B, 15C или де-О-ацетилированный 15B. См. US 2019/0192648.

[0006] Второй подход для разработки пневмококковой конъюгированной вакцины представляет собой подход с применением смешанного носителя. В рамках подхода с применением смешанного носителя вместо применения одного белка-носителя применяют два или более белков-носителей, при этом капсульные полисахариды из определенных серотипов конъюгированы с первым белком-носителем и капсульные полисахариды из других серотипов конъюгированы с по меньшей мере вторым другим белком-носителем. Например, компания GlaxoSmithKline разработала SYNFLORIX, 10-валентную (на основе серотипов 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F и 23F) пневмококковую конъюгированную вакцину со смешанным носителем, в которой в качестве белков-носителей применяется белок D из *H. influenzae*, столбнячный анатоксин и дифтерийный анатоксин. В SYNFLORIX серотипы 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 и 23F конъюгированы с белком D; серотип 18C конъюгирован со столбнячным анатоксином и серотип 19F конъюгирован с дифтерийным анатоксином. Vesikari et al., *PIDJ*, 28(4):S66-76 (2009). Относительно недавно Sanofi Pasteur и SK Biosciences получили 16-валентную (на основе серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F), 20-валентную (на основе серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F) и 21-валентную (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F) пневмококковые конъюгированные вакцины со смешанным носителем, раскрытые в публикациях международных заявок WO 2018/027123, WO 2018/027126, WO 2019/152921 и WO 2019/152925, каждая из которых включена посредством ссылки во всей своей полноте. В данных поливалентных пневмококковых конъюгированных вакцинах со смешанным носителем два серотипа (два из серотипов 1, 3 и 5) или четыре серотипа (серотипы 15B и 22F, а также два из серотипов 1, 3 и 5) конъюгированы со столбнячным анатоксином, в то время как остальные серотипы конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

[0007] Гликоконъюгированные вакцины как с одним носителем, так и со смешанным носителем применяют для обеспечения различных уровней защиты против серотипов пневмококка, содержащихся в вакцинах, однако наблюдается и по-прежнему вызывает беспокойство замещение серотипов или повышение частоты встречаемости вирулентных штаммов/серотипов пневмококка, которые не содержатся в гликоконъюгированных вакцинах. Daniels et al., *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2016 Jan-Feb; 21(1): 27–35.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] Данная заявка предусматривает новые и улучшенные поливалентные композиции на основе пневмококкового конъюгата и содержащие их вакцины. В одном аспекте данная заявка предусматривает поливалентную композицию на основе пневмококкового конъюгата, содержащую 22-27 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок предусматривает белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. Другие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, представляющие интерес, могут быть добавлены в поливалентную композицию на основе пневмококкового конъюгата. В определенных вариантах осуществления каждый капсульный полисахарид конъюгирован с одинаковым белком-носителем. В определенных вариантах осуществления, называемых варианты осуществления с применением смешанного носителя, применяют более чем один белок-носитель, например, два различных белка-носителя. Например, в определенных вариантах осуществления определенные капсульные полисахариды конъюгированы с первым белком-носителем и остальные капсульные полисахариды присоединены ко второму белку-носителю. В определенных вариантах осуществления первый и второй белки-носители предусматривают CRM<sub>197</sub> и столбнячный анатоксин. В определенных вариантах осуществления два из капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксином и остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. В

определенных вариантах осуществления два капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5. В определенных вариантах осуществления два капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 5, 15В и 22F. В определенных вариантах осуществления четыре из капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксином и остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. В определенных вариантах осуществления четыре капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, где два из четырех капсульных полисахаридов, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5, и остальные два капсульных полисахарида представляют собой серотипы 15В и 22F.

[0009] В одном аспекте поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата содержит 27 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок предусматривает белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В.

[0010] В определенных вариантах осуществления капсульные полисахариды из серотипов 1 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, и капсульные полисахариды из серотипов 3, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. В другом варианте осуществления капсульные полисахариды из серотипов 1 и 3 конъюгированы со столбнячным анатоксином, и капсульные полисахариды из серотипов 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. В еще одном варианте осуществления капсульные полисахариды из серотипов 3 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, и капсульные полисахариды из серотипов 1, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

[0011] В определенных вариантах осуществления четыре из капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксином и остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>, где два из четырех капсульных полисахаридов, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5, и остальные два капсульных полисахарида представляют собой серотипы 15В и 22F.

[0012] В одном варианте осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем содержит 27 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где капсульные полисахариды из серотипов 1, 5, 15В и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, и капсульные полисахариды из серотипов 3, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15С, 18С, 19А, 19F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

[0013] В другом варианте осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем содержит 27 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где капсульные полисахариды из серотипов 1, 3, 15В и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, и капсульные полисахариды из серотипов 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15С, 18С, 19А, 19F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

[0014] В другом варианте осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем содержит 27 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где капсульные полисахариды из серотипов 3, 5, 15В и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, и капсульные полисахариды из серотипов 1, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15С, 18С, 19А, 19F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

[0015] В определенных вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата содержит 26 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат

пневмококковый капсульный полисахарид-белок предусматривает белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В.

[0016] В определенных вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата содержит 25 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок предусматривает белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В.

[0017] В определенных вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата содержит 24 различных конъюгата пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок предусматривает белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В.

[0018] В определенных вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата содержит 23 различных конъюгата пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок предусматривает белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В.

[0019] В определенных вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата содержит 22 различных конъюгата пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок предусматривает белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B.

[0020] В некоторых вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата дополнительно содержит адъювант, такой как адъювант на основе алюминия, включая без ограничения фосфат алюминия, сульфат алюминия и гидроксид алюминия.

[0021] Другой аспект направлен на применение поливалентной композиции на основе пневмококкового конъюгата в качестве вакцины.

[0022] Еще один аспект направлен на вакцину, содержащую поливалентную композицию на основе пневмококкового конъюгата и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[0023] Еще один аспект направлен на способ профилактики инфекции или заболевания, вызванных *Streptococcus pneumoniae*, у субъекта, такого как человек, при этом способ включает введение субъекту профилактически эффективного количества поливалентных композиций на основе пневмококкового конъюгата или содержащей их вакцины.

[0024] В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой человека, возраст которого составляет по меньшей мере 50 лет, и заболевание представляет собой пневмонию или инвазивное пневмококковое заболевание (IPD).

[0025] В других вариантах осуществления субъект представляет собой человека, возраст которого составляет по меньшей мере 6 недель, и заболевание представляет собой пневмонию, инвазивное пневмококковое заболевание (IPD) или острый средний отит (АОМ). В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта-человека

составляет от 6 недель до 5 лет. В других вариантах осуществления возраст субъекта-человека составляет 2-15 месяцев или 6-17 лет.

[0026] В определенных вариантах осуществления поливалентную композицию на основе пневмококкового конъюгата или вакцину вводят посредством внутримышечной инъекции. В определенных вариантах осуществления поливалентную композицию на основе пневмококкового конъюгата или вакцину вводят как часть серии иммунизаций.

[0027] Еще один аспект направлен на иммуногенную композицию, содержащую по меньшей мере один конъюгат полисахарид-белок, и способы ее получения, при этом полисахарид в по меньшей мере одном конъюгате полисахарид-белок представляет собой капсульный полисахарид из *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А.

[0028] Еще один аспект направлен на иммуногенную композицию, содержащую по меньшей мере один конъюгат полисахарид-белок, и способы ее получения, при этом полисахарид в по меньшей мере одном конъюгате полисахарид-белок представляет собой капсульный полисахарид из *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С.

[0029] Еще один аспект направлен на иммуногенную композицию, содержащую по меньшей мере один конъюгат полисахарид-белок, и способы ее получения, при этом полисахарид в по меньшей мере одном конъюгате полисахарид-белок представляет собой капсульный полисахарид из *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А.

[0030] Еще один аспект направлен на иммуногенную композицию, содержащую по меньшей мере один конъюгат полисахарид-белок, и способы ее получения, при этом полисахарид в по меньшей мере одном конъюгате полисахарид-белок представляет собой капсульный полисахарид из *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В.

[0031] Еще один аспект направлен на иммуногенную композицию, содержащую по меньшей мере один конъюгат полисахарид-белок, и способы ее получения, при этом полисахарид в по меньшей мере одном конъюгате полисахарид-белок представляет собой капсульный полисахарид из *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F.

[0032] Еще один аспект направлен на иммуногенную композицию, содержащую по меньшей мере один конъюгат полисахарид-белок, и способы ее получения, при этом

полисахарид в по меньшей мере одном конъюгате полисахарид-белок представляет собой капсульный полисахарид из *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В.

[0033] Вышеуказанные и другие цели, признаки и преимущества композиций на основе пневмококкового конъюгата станут более очевидными из следующего подробного описания.

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0034] В целях облегчения понимания настоящего изобретения вначале ниже приведены определения некоторых терминов. Дополнительные определения следующих терминов и других терминов изложены во всем описании.

[0035] Используемая в данном подробном описании и прилагаемой формуле изобретения форма единственного числа включает ссылку на форму множественного числа, если в контексте явно не указано иное. Так, например, ссылка на «способ» включает один или более способов и/или стадий указанного типа, описанных в данном документе и/или которые станут очевидными для специалистов в данной области при прочтении настоящего изобретения и т. д.

[0036] *Вводить.* Как используется в данном документе, «вводить» композицию субъекту означает давать, наносить или приводить композицию в контакт с субъектом. Введение может осуществляться посредством ряда путей введения, как, например, местно, перорально, подкожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, внутривенно, интратекально и внутрикожно.

[0037] *Примерно.* Как используется в данном документе, термин «примерно» или «приблизительно», применяемый в отношении одного или более значений, представляющих интерес, относится к значению, сходному с указанным эталонным значением. В определенных вариантах осуществления термин «примерно» или «приблизительно» относится к диапазону значений, находящихся в пределах 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % или меньше в любую сторону (большую или меньшую) от указанного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из

контекста (за исключением случаев, когда такое число будет превышать 100 % от возможного значения).

[0038] *Конъюгат*. Как используется в данном документе и как это понятно из надлежащего контекста, термины «конъюгат(конъюгаты)» или «гликоконъюгат(гликоконъюгаты)» относятся к полисахариду из *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированному с белком-носителем с применением любой стратегии ковалентной или нековалентной биоконъюгации.

[0039] *Степень окисления*. Используемый в данном документе термин «степень окисления» (DO) относится к числу повторяющихся сахарных звеньев на альдегидную группу, полученную при активации очищенного или отсортированного по размеру сахара с помощью окисляющего средства. Степень окисления сахара можно определять с применением обычных способов, известных специалистам в данной области.

[0040] *Варианты осуществления*. Используемые в данном документе термины «в определенных вариантах осуществления», «в некоторых вариантах осуществления» или т. п. относятся к вариантам осуществления всех аспектов настоящего изобретения, если в контексте явно не указано иное.

[0041] *Вспомогательное вещество*. Используемый в данном документе термин «вспомогательное вещество» относится к нетерапевтическому средству, которое можно включить в композицию, например, для обеспечения или содействия достижению требуемой консистенции или стабилизирующего эффекта.

[0042] *Смешанный носитель*. Как используется в данном документе, композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем относится к композиции на основе пневмококкового конъюгата, содержащей более чем один тип белка-носителя.

[0043] *22-Валентная композиция на основе пневмококкового конъюгата*. Используемый в данном документе термин «22-валентная(-валентные) композиция(композиции) на основе пневмококкового конъюгата» или «PCV-22» относится к композиции, содержащей конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок

содержат или состоят из 22 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В.

[0044] *23-Валентная композиция на основе пневмококкового конъюгата.* Используемый в данном документе термин «23-валентная(-валентные) композиция(композиции) на основе пневмококкового конъюгата» или «PCV-23» относится к композиции, содержащей конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержат или состоят из 23 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В.

[0045] *24-Валентная композиция на основе пневмококкового конъюгата.* Используемый в данном документе термин «24-валентная(-валентные) композиция(композиции) на основе пневмококкового конъюгата» или «PCV-24» относится к композиции, содержащей конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержат или состоят из 24 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В.

[0046] *25-Валентная композиция на основе пневмококкового конъюгата.* Используемый в данном документе термин «25-валентная(-валентные) композиция(композиции) на основе пневмококкового конъюгата» или «PCV-25»

относится к композиции, содержащей конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержат или состоят из 25 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В.

[0047] *26-Валентная композиция на основе пневмококкового конъюгата.* Используемый в данном документе термин «26-валентная(-валентные) композиция(композиции) на основе пневмококкового конъюгата» или «PCV-26» относится к композиции, содержащей конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержат или состоят из 26 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В.

[0048] *27-Валентная композиция на основе пневмококкового конъюгата.* Используемый в данном документе термин «27-валентная(-валентные) композиция(композиции) на основе пневмококкового конъюгата» или «PCV-27» относится к композиции, содержащей конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержат или состоят из 27 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* представляют собой 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В.

[0049] *Молекулярная масса.* Если не указано иное, используемый в данном документе термин «молекулярная масса» капсульного сахара или конъюгата капсульного сахара с белком-носителем относится к среднему значению молекулярной массы, рассчитанной посредством эксклюзионной хроматографии (SEC) в сочетании с многоугловым лазерным светорассеянием (MALLS).

[0050] *Поливалентный.* Используемый в данном документе термин «поливалентный» относится к композиции на основе пневмококкового конъюгата, содержащей пневмококковые капсульные полисахариды из более чем одного серотипа *Streptococcus pneumoniae*.

[0051] *Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.* Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, применимые в настоящем изобретении, являются традиционными. В Remington's Pharmaceutical Sciences под редакцией E. W. Martin, Mack Publishing Co., Истон, Пенсильвания, США, 15<sup>е</sup> издание (1975), описаны композиции и составы, подходящие для фармацевтической доставки одной или более терапевтических композиций, в том числе вакцин, а также дополнительных фармацевтических средств. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают, например, крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и т. п. В целом, природа вспомогательного вещества будет зависеть от применяемого конкретного режима введения. Например, составы для парентерального введения обычно содержат жидкости для инъекций, которые включают фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как вода, физиологический раствор, сбалансированные солевые растворы, буферы, водный раствор декстрозы, глицерин или т. п., в качестве среды-носителя. Для твердых композиций (например, в форме порошка, пилюли, таблетки или капсулы) традиционные нетоксичные твердые вспомогательные вещества могут включать, например, маннит, лактозу, крахмал или стеарат магния фармацевтической степени чистоты. В дополнение к биологически нейтральным носителям фармацевтические композиции, подлежащие введению, могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие

средства, поверхностно-активное средство, консерванты, и буферные средства для регуляции pH, и т. п., например, ацетат натрия или монолаурат сорбитана.

[0052] *Профилактически эффективное количество.* Как определено в данном документе, термин «профилактически эффективное количество» или «профилактически эффективная доза» относится к количеству или дозе, необходимым для индуцирования иммунного ответа, достаточного для задержки начала и/или уменьшения частоты и/или тяжести одного или более симптомов, обусловленных инфицированием *Streptococcus pneumoniae*.

[0053] *Профилактика.* Используемый в данном документе термин «профилактика» относится к избеганию проявления заболевания, задержке начала и/или уменьшению частоты и/или тяжести одного или более симптомов конкретного заболевания, нарушения или состояния (например, инфицирования *Streptococcus pneumoniae*). В некоторых вариантах осуществления профилактику оценивают на основе популяции таким образом, что считают, что средство «обеспечивает профилактику» конкретного заболевания, нарушения или состояния, если в популяции, восприимчивой к заболеванию, нарушению или состоянию, наблюдается статистически значимое уменьшение развития, частоты и/или интенсивности одного или более симптомов заболевания, нарушения или состояния.

[0054] *Субъект.* Используемый в данном документе термин «субъект» означает любое млекопитающее, включая мышей, кроликов и людей. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой взрослого, подростка или младенца. В некоторых вариантах осуществления используются термины «индивидуум» или «пациент», и подразумевается, что они являются взаимозаменяемыми с термином «субъект».

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0055] Нижеследующее описание раскрытого(раскрытых) варианта(вариантов) осуществления и примеров носит лишь иллюстративный характер и никоим образом не предназначено для ограничения настоящего изобретения, его предназначения или путей применения.

[0056] Данная заявка предусматривает новые и улучшенные поливалентные композиции на основе пневмококкового конъюгата и содержащие их вакцины. Как показано в примерах, устойчивые ответы с образованием антител были получены в отношении 27 серотипов в составе PCV-27, в том числе в отношении серотипов, которые не охвачены существующими пневмококковыми вакцинами, таких как серотип 15А, серотип 15С, серотип 23А, серотип 23В, серотип 24F и серотип 35В.

### Пневмококковый полисахарид серотипа 15А

[0057] Полисахарид серотипа 15А может быть получен непосредственно из бактерии посредством применения процедуры выделения, известной специалистам в данной области (в том числе без ограничения способами, раскрытыми в публикации заявки на патент США № 2006/0228380). Кроме того, олигосахариды 15А можно получать с применением протоколов синтеза.

[0058] Штамм *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А может быть получен из коллекций устойчивых культур (например, из референтной лаборатории по стафилококку Центров контроля и профилактики заболеваний (Атланта, Джорджия)) или клинических образцов.

[0059] Бактериальную клетку, как правило, выращивают в среде, такой как среда на основе сои. После ферментации бактериальной клетки, продуцирующей капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А, бактериальную клетку подвергают лизису с получением лизата клеток. Затем полисахарид серотипа 15А может быть выделен из лизата клеток с применением методик очистки, известных из уровня техники, включающих центрифугирование, глубинную фильтрацию, осаждение, ультрафильтрацию, обработку активированным углеродом, диафильтрацию и/или колоночную хроматографию (включая без ограничения способы, раскрытые в публикации заявки на патент США № 2006/0228380).

[0060] Очищенный полисахарид серотипа 15А конъюгируют с белком-носителем с образованием иммуногенной композиции, содержащей по меньшей мере один конъюгат полисахарид-белок, содержащий полисахарид серотипа 15А и белок-носитель. В одном аспекте конъюгат полисахарид 15А-белок может быть получен посредством способа, включающего следующие стадии:

(i) подвергание очищенного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А реакции кислотного гидролиза и нагреванию или обработке в микрофлюидайзере и последующее осуществление реакции с окисляющим средством с получением активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А;

(ii) необязательно лиофилизирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А и белка-носителя;

(iii) суспендирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А и белка-носителя в диметилсульфоксиде (DMSO);

(iv) осуществление реакции активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А и белка-носителя с восстанавливающим средством с получением конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А с белком-носителем; и

(v) кэпирование непрореагировавших альдегидов в конъюгате полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А с белком-носителем с получением иммуногенного конъюгата, содержащего полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А, ковалентно связанный с белком-носителем. Дополнительная подробная информация о реагентах (например, об окисляющем средстве, восстанавливаемом средстве, белке-носителе и т. д.) и условиях, которые можно применять в данном способе, раскрыта в других частях данной заявки, в том числе в нижеследующих разделах и примерах.

[0061] Активированный капсульный полисахарид серотипа 15А может быть охарактеризован с помощью различных параметров, включающих, например, молекулярную массу (MW) и/или степень окисления (Do).

[0062] В одном аспекте активированный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А имеет молекулярную массу, составляющую менее чем 120 кДа до

конъюгации, включая, например, активированный капсульный полисахарид серотипа 15А, имеющий молекулярную массу, составляющую приблизительно 10-120 кДа, 50-120 кДа, 70-120 кДа, 70-80 кДа, 70-118 кДа, 114-118 кДа или приблизительно 116 кДа до конъюгации. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[0063] В одном аспекте, если молекулярная масса полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А составляет менее чем 120 кДа до конъюгации, может быть получен конъюгат полисахарид-белок с молекулярной массой, составляющей приблизительно 1000-5000 кДа, такой как конъюгат полисахарид-белок с молекулярной массой, составляющей приблизительно 1200-4000 кДа, 1200-1500 кДа, 1200-3500 кДа, 1400-4000 кДа, приблизительно 1200 кДа, приблизительно 1400 кДа или приблизительно 4000 кДа. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[0064] Очищенный полисахарид серотипа 15А может быть охарактеризован с помощью степени окисления после активации с помощью окисляющего средства. В одном аспекте активированный полисахарид серотипа 15А может иметь степень окисления в диапазоне от 1 до 15, например, 4-10, 4-8, 4-5, 5-8 или приблизительно 4.

[0065] В одном аспекте активированный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А с уровнем окисления (Do), составляющим приблизительно 4, конъюгируют с белком-носителем с получением конъюгата капсульный полисахарид серотипа 15А-белок с содержанием свободного полисахарида (свободного PS), составляющим 40% или меньше, например, 5-40%, 20-40%, 25-40%, 20-35%, 25-35% или 30-35%.

[0066] Полисахарид может слегка уменьшаться в размере во время обычной процедуры очистки. Кроме того, как описано в настоящем изобретении, полисахарид может подвергаться сортировке по размеру до конъюгации. Вышеупомянутый диапазон значений молекулярной массы относится к молекулярной массе очищенного полисахарида после конечной стадии сортировки по размеру (например, после очистки, гидролиза и активации) до конъюгации.

### Пневмококковый полисахарид серотипа 15С

[0067] Полисахарид серотипа 15С может быть получен непосредственно из бактерии посредством применения процедуры выделения, известной специалистам в данной области (в том числе без ограничения способами, раскрытыми в публикации заявки на патент США № 2006/0228380). Кроме того, олигосахариды 15С можно получать с применением протоколов синтеза.

[0068] Штамм *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С может быть получен из коллекций устойчивых культур (например, из референтной лаборатории по стафилококку Центров контроля и профилактики заболеваний (Атланта, Джорджия)) или клинических образцов. В качестве альтернативы полисахарид серотипа 15С может быть получен посредством де-О-ацетилирования полисахарида серотипа 15В, как правило, посредством обработки щелочью.

[0069] Бактериальную клетку, как правило, выращивают в среде, такой как среда на основе сои. После ферментации бактериальной клетки, продуцирующей капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С, бактериальную клетку подвергают лизису с получением лизата клеток. Затем полисахарид серотипа 15С может быть выделен из лизата клеток с применением методик очистки, известных из уровня техники, включающих центрифугирование, глубинную фильтрацию, осаждение, ультрафильтрацию, обработку активированным углеродом, диафильтрацию и/или колоночную хроматографию (включая без ограничения способы, раскрытые в публикации заявки на патент США № 2006/0228380).

[0070] Очищенный полисахарид серотипа 15С конъюгируют с белком-носителем с образованием иммуногенной композиции, содержащей по меньшей мере один конъюгат полисахарид-белок, содержащий полисахарид серотипа 15С и белок-носитель. В одном аспекте конъюгат полисахарид 15С-белок может быть получен посредством способа, включающего следующие стадии:

(i) осуществление реакции очищенного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С с окисляющим средством с получением активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С;

(ii) необязательно лиофилизирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С и белка-носителя;

(iii) суспендирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С и белка-носителя в диметилсульфоксиде (DMSO) или фосфатном буфере;

(iv) осуществление реакции смеси активированного полисахарида серотипа 15С и белка-носителя с восстанавливающим средством с получением конъюгата полисахарида серотипа 15С с белком-носителем; и

(v) кэпирование непрореагировавших альдегидов в конъюгате полисахарида серотипа 15С с белком-носителем с получением иммуногенного конъюгата, содержащего полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С, ковалентно связанный с белком-носителем. Дополнительная подробная информация о реагентах (например, об окисляющем средстве, восстанавливающем средстве, белке-носителе и т. д.) и условиях, которые можно применять в данном способе, раскрыта в других частях данной заявки, в том числе в нижеследующих разделах и примерах.

[0071] Активированный капсульный полисахарид серотипа 15С может быть охарактеризован с помощью различных параметров, включающих, например, молекулярную массу (MW) и/или степень окисления (Do).

[0072] В одном аспекте активированный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С до конъюгации может иметь молекулярную массу, составляющую 200-1000 кДа, например, 400-800 кДа, 500-775 кДа, 470-775 кДа, 500-770 кДа, 520-680 кДа, 510-770 кДа, 510-550 кДа, 670-770 кДа, или сходные диапазоны значений молекулярной массы. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[0073] Может быть получен конъюгат полисахарид 15С-белок, имеющий молекулярную массу, составляющую приблизительно 1000-10000 кДа, например, конъюгат полисахарид 15С-белок с молекулярной массой, составляющей приблизительно 2000-6000 кДа, 2500-5000 кДа, 6000-10000 кДа или 6200-9400 кДа. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[0074] Очищенный полисахарид серотипа 15С может быть охарактеризован с помощью степени окисления после активации с помощью окисляющего средства. В одном аспекте активированный полисахарид серотипа 15С может иметь степень окисления в диапазоне от 1 до 40. Значение степени окисления, составляющее 8-35, 15-35, 8-20, 8-9, 9-20 или 30-35, может быть получено посредством добавления перйодата натрия к полисахариду *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С.

[0075] В одном аспекте активированный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С с уровнем окисления (Do), составляющим приблизительно 30-35, конъюгируют с белком-носителем с получением конъюгата капсульный полисахарид серотипа 15С-белок с содержанием свободного полисахарида (свободного PS), составляющим 40% или меньше, например, 5-40%, 20-40%, 25-40%, 20-35%, 25-35% или 30-35%.

[0076] Полисахарид может слегка уменьшаться в размере во время обычной процедуры очистки. Кроме того, как описано в настоящем изобретении, полисахарид может подвергаться сортировке по размеру до конъюгации. Вышеупомянутый диапазон значений молекулярной массы относится к молекулярной массе очищенного полисахарида после конечной стадии сортировки по размеру (например, после очистки, гидролиза и активации) до конъюгации.

### **Пневмококковый полисахарид серотипа 23А**

[0077] Полисахарид серотипа 23А может быть получен непосредственно из бактерии посредством применения процедуры выделения, известной специалистам в данной области (в том числе без ограничения способами, раскрытыми в публикации заявки на патент США № 2006/0228380). Кроме того, олигосахариды 23А можно получать с применением протоколов синтеза.

[0078] Штамм *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А может быть получен из коллекций устойчивых культур (например, из референтной лаборатории по стафилококку Центров контроля и профилактики заболеваний (Атланта, Джорджия)) или клинических образцов.

[0079] Бактериальную клетку, как правило, выращивают в среде, такой как среда на основе сои. После ферментации бактериальной клетки, продуцирующей

капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А, бактериальную клетку подвергают лизису с получением лизата клеток. Затем полисахарид серотипа 23А может быть выделен из лизата клеток с применением методик очистки, известных из уровня техники, включающих центрифугирование, глубинную фильтрацию, осаждение, ультрафильтрацию, обработку активированным углеродом, диафильтрацию и/или колоночную хроматографию (включая без ограничения способы, раскрытые в публикации заявки на патент США № 2006/0228380).

[0080] Очищенный полисахарид серотипа 23А конъюгируют с белком-носителем с образованием иммуногенной композиции, содержащей по меньшей мере один конъюгат полисахарид-белок, содержащий полисахарид серотипа 23А и белок-носитель. В одном аспекте конъюгат полисахарид 23А-белок может быть получен посредством способа, включающего следующие стадии:

(i) осуществление реакции очищенного *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А с окисляющим средством с получением активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А;

(ii) необязательно лиофилизирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А и белка-носителя;

(iii) суспендирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А и белка-носителя в диметилсульфоксиде (DMSO) или фосфатном буфере;

(iv) осуществление реакции смеси активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А и белка-носителя с восстанавливающим средством с получением конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А с белком-носителем; и

(v) кэпирование непрореагировавших альдегидов в конъюгате полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А с белком-носителем с получением иммуногенного конъюгата, содержащего полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А, ковалентно связанный с белком-носителем. Дополнительная подробная информация о реагентах (например, об окисляющем средстве, восстанавливаемом средстве, белке-носителе и т. д.) и условиях, которые можно применять в данном

способе, раскрыта в других частях данной заявки, в том числе в нижеследующих разделах и примерах.

[0081] Активированный капсульный полисахарид серотипа 23А может быть охарактеризован с помощью различных параметров, включающих, например, молекулярную массу (MW) и/или степень окисления (Do).

[0082] В одном аспекте активированный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А до конъюгации может иметь молекулярную массу, составляющую 300-700 кДа, например, 400-650 кДа, 430-650 кДа, 470-650 кДа, 470-570 кДа, 470-490 кДа, или сходные диапазоны значений молекулярной массы. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[0083] Конъюгат полисахарид серотипа 23А-белок, имеющий молекулярную массу, составляющую приблизительно 2000-7000 кДа, может быть получен с применением способов, раскрытых в данном документе. Молекулярная масса конъюгата капсульный полисахарид серотипа 23А-белок может составлять приблизительно 2000-4000 кДа, 4000-7000 кДа, 4200-6700 кДа, 4350-6650 кДа, 5000-6700 кДа, приблизительно 4300 кДа, приблизительно 5000 кДа или приблизительно 6600 кДа. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[0084] Очищенный полисахарид серотипа 23А может быть охарактеризован с помощью степени окисления после активации с помощью окисляющего средства. В одном аспекте активированный полисахарид серотипа 23А может иметь степень окисления в диапазоне от 4 до 25, например, 6-24, 6-18, 9-18, 6-9, 6-10, 6-11 или 9-11.

[0085] В одном аспекте активированный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А с уровнем окисления (Do), составляющим 9-11, конъюгируют с белком-носителем с получением конъюгата капсульный полисахарид серотипа 23А-белок с содержанием свободного полисахарида (свободного PS), составляющим 40% или меньше, например, 5-40%, 20-40%, 25-40%, 20-35%, 25-35% или 30-35%.

[0086] Для конъюгации можно применять любой подходящий буфер, в том числе DMSO или фосфатный буфер. Если применяют DMSO, реакционная концентрация

полисахарида может составлять 2,5 мг/мл или меньше, в том числе, например, от 1,0 мг/мл до 2,5 мг/мл, от 1,0 мг/мл до 2,0 мг/мл или от 1,0 мг/мл до 1,5 мг/мл. Если применяют фосфатный буфер, реакционная концентрация полисахарида может составлять 10-20 мг/мл, в том числе, например, 15 мг/мл.

[0087] Полисахарид может слегка уменьшаться в размере во время обычной процедуры очистки. Кроме того, как описано в настоящем изобретении, полисахарид может подвергаться сортировке по размеру до конъюгации.

### **Пневмококковый полисахарид серотипа 23В**

[0088] Полисахарид серотипа 23В может быть получен непосредственно из бактерии посредством применения процедуры выделения, известной специалистам в данной области (в том числе без ограничения способами, раскрытыми в публикации заявки на патент США № 2006/0228380). Кроме того, олигосахариды 23В можно получать с применением протоколов синтеза.

[0089] Штамм *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В может быть получен из коллекций устойчивых культур (например, из референтной лаборатории по стафилококку Центров контроля и профилактики заболеваний (Атланта, Джорджия)) или клинических образцов.

[0090] Бактериальную клетку, как правило, выращивают в среде, такой как среда на основе сои. После ферментации бактериальной клетки, продуцирующей капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В, бактериальную клетку подвергают лизису с получением лизата клеток. Затем полисахарид серотипа 23В может быть выделен из лизата клеток с применением методик очистки, известных из уровня техники, включающих центрифугирование, глубинную фильтрацию, осаждение, ультрафильтрацию, обработку активированным углеродом, диафильтрацию и/или колоночную хроматографию (в том числе без ограничения способы, раскрытые в публикации заявки на патент США № 2006/0228380).

[0091] Очищенный полисахарид серотипа 23В конъюгируют с белком-носителем с образованием иммуногенной композиции, содержащей по меньшей мере один конъюгат полисахарид-белок, содержащий полисахарид серотипа 23В и белок-

носитель. В одном аспекте конъюгат полисахарид 23В-белок может быть получен посредством способа, включающего следующие стадии:

(i) осуществление реакции очищенного *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В с окисляющим средством с получением активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В;

(ii) необязательно лиофилизирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В и белка-носителя;

(iii) суспендирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В и белка-носителя в диметилсульфоксиде (DMSO);

(iv) осуществление реакции смеси активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В и белка-носителя с восстанавливающим средством с получением конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В с белком-носителем; и

(v) кэпирование непрореагировавших альдегидов в конъюгате полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В с белком-носителем с получением иммуногенного конъюгата, содержащего полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В, ковалентно связанный с белком-носителем. Дополнительная подробная информация о реагентах (например, об окисляющем средстве, восстанавливающем средстве, белке-носителе и т. д.) и условиях, которые можно применять в данном способе, раскрыта в других частях данной заявки, в том числе в нижеследующих разделах и примерах.

[0092] Активированный капсульный полисахарид серотипа 23В может быть охарактеризован с помощью различных параметров, включающих, например, молекулярную массу (MW) и/или степень окисления (Do).

[0093] В одном аспекте активированный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В до конъюгации может иметь молекулярную массу, составляющую 100-800 кДа, например, 200-700 кДа, 200-650 кДа, 300-650 кДа, 380-640 кДа, 550-675 кДа, 200-250 кДа, 220-230 кДа, 220-225 кДа, или сходные диапазоны значений молекулярной массы. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных

диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[0094] Конъюгат полисахарид серотипа 23В-белок, имеющий молекулярную массу, составляющую приблизительно 2000-7000 кДа, может быть получен с применением способов, раскрытых в данном документе. Значение молекулярной массы конъюгата капсульный полисахарид серотипа 23В-белок может находиться в диапазоне приблизительно 2000-4000 кДа, 2000-5000 кДа, 4000-7000 кДа, 2400-6800 кДа, 4600-6800 кДа или 6400-6800 кДа. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[0095] Очищенный полисахарид серотипа 23В может быть охарактеризован с помощью степени окисления после активации с помощью окисляющего средства. В одном аспекте активированный полисахарид серотипа 23В может иметь степень окисления, составляющую 5,4 или меньше, например, степень окисления, составляющую 1-5,4, 2-5,4, 2,3-5,4, 2-3 или 2,3-2,8.

[0096] В одном аспекте активированный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В с уровнем окисления (Do), составляющим 3 или меньше (как рассматривалось выше) конъюгируют с белком-носителем с получением конъюгата капсульный полисахарид серотипа 23В-белок с содержанием свободного полисахарида (свободного PS), составляющим 40% или меньше, например, 5-40%, 20-40%, 25-40%, 20-35%, 25-35% или 30-35%.

[0097] Полисахарид может слегка уменьшаться в размере во время обычной процедуры очистки. Кроме того, как описано в настоящем изобретении, полисахарид может подвергаться сортировке по размеру до конъюгации.

#### **Пневмококковый полисахарид серотипа 24F**

[0098] Полисахарид серотипа 24F может быть получен непосредственно из бактерии посредством применения процедуры выделения, известной специалистам в данной области (в том числе без ограничения способами, раскрытыми в публикации заявки на патент США № 2006/0228380). Кроме того, олигосахариды 24F можно получать с применением протоколов синтеза.

[0099] Штамм *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F может быть получен из коллекций устойчивых культур (например, из референтной лаборатории по стафилококку Центров контроля и профилактики заболеваний (Атланта, Джорджия)) или клинических образцов.

[00100] Бактериальную клетку, как правило, выращивают в среде, такой как среда на основе сои. После ферментации бактериальной клетки, продуцирующей капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F, бактериальную клетку подвергают лизису с получением лизата клеток. Затем полисахарид серотипа 24F может быть выделен из лизата клеток с применением методик очистки, известных из уровня техники, включающих центрифугирование, глубинную фильтрацию, осаждение, ультрафильтрацию, обработку активированным углеродом, диафильтрацию и/или колоночную хроматографию (включая без ограничения способы, раскрытые в публикации заявки на патент США № 2006/0228380).

[00101] Очищенный полисахарид серотипа 24F конъюгируют с белком-носителем с образованием иммуногенной композиции, содержащей по меньшей мере один конъюгат полисахарид-белок, содержащий полисахарид серотипа 24F и белок-носитель. В одном аспекте конъюгат полисахарид 24F-белок может быть получен посредством способа, включающего следующие стадии:

(i) подвергание очищенного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F реакции кислотного гидролиза или обработке в микрофлюидайзере и последующее осуществление реакции с окисляющим средством с получением активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F;

(ii) необязательно лиофилизирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F и белка-носителя;

(iii) суспендирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F и белка-носителя в диметилсульфоксиде (DMSO) или фосфатном буфере;

(iv) осуществление реакции активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F и белка-носителя с восстанавливающим средством с получением конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F с белком-носителем; и

(v) кэпирование непрореагировавших альдегидов в конъюгате полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F с белком-носителем с получением иммуногенного конъюгата, содержащего полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F, ковалентно связанный с белком-носителем. Дополнительная подробная информация о реагентах (например, об окисляющем средстве, восстанавливающем средстве, белке-носителе и т. д.) и условиях, которые можно применять в данном способе, раскрыта в других частях данной заявки, в том числе в нижеследующих разделах и примерах.

[00102] Активированный капсульный полисахарид серотипа 24F может быть охарактеризован с помощью различных параметров, включающих, например, молекулярную массу (MW) и/или степень окисления (Do).

[00103] В одном аспекте активированный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F до конъюгации может иметь молекулярную массу, составляющую 100-500 кДа, например, 150-350 кДа, 200-400 кДа, 200-300 кДа, 225-275 кДа, 240-260 кДа, 245-255 кДа, приблизительно 250 кДа, или сходные диапазоны значений молекулярной массы. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[00104] Конъюгат полисахарид серотипа 24F-белок, имеющий молекулярную массу, составляющую приблизительно 1000-5000 кДа, может быть получен с применением способов, раскрытых в данном документе. Значение молекулярной массы конъюгата капсульный полисахарид серотипа 24F-белок может находиться в диапазоне приблизительно 1500-5000 кДа, 2000-4500 кДа или 2500-3500 кДа. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[00105] Очищенный полисахарид серотипа 24F может быть охарактеризован с помощью степени окисления после активации с помощью окисляющего средства. В одном аспекте активированный полисахарид серотипа 24F может иметь степень окисления, составляющую по меньшей мере 90, в том числе приблизительно 90-100.

[00106] В одном аспекте восстанавливающее средство в молярном эквиваленте, составляющем 2,0 или меньше, может применяться на стадии осуществления реакции

активированного полисахарида серотипа 24F со степенью окисления, составляющей по меньшей мере 90, и белка-носителя с получением конъюгата капсульный полисахарид серотипа 24F-белок с содержанием свободного сахара (свободного PS) 40% или меньше, например, 5-40%, 20-40%, 25-40%, 20-35%, 25-35% или 30-35%. Может применяться восстанавливающее средство в молярном эквиваленте, составляющем 0,5-1,2, 1,0-1,2 или приблизительно 1,2.

[00107] Полисахарид может слегка уменьшаться в размере во время обычной процедуры очистки. Кроме того, как описано в настоящем изобретении, полисахарид может подвергаться сортировке по размеру до конъюгации.

### **Пневмококковый полисахарид серотипа 35В**

[00108] Полисахарид серотипа 35В может быть получен непосредственно из бактерии посредством применения процедуры выделения, известной специалистам в данной области (в том числе без ограничения способами, раскрытыми в публикации заявки на патент США № 2006/0228380). Кроме того, олигосахариды 35В можно получать с применением протоколов синтеза.

[00109] Штамм *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В может быть получен из коллекций устойчивых культур (например, из референтной лаборатории по стафилококку Центров контроля и профилактики заболеваний (Атланта, Джорджия)) или клинических образцов.

[00110] Бактериальную клетку, как правило, выращивают в среде, такой как среда на основе сои. После ферментации бактериальной клетки, продуцирующей капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В, бактериальную клетку подвергают лизису с получением лизата клеток. Затем полисахарид серотипа 35В может быть выделен из лизата клеток с применением методик очистки, известных из уровня техники, включающих центрифугирование, глубинную фильтрацию, осаждение, ультрафильтрацию, обработку активированным углеродом, диафильтрацию и/или колоночную хроматографию (в том числе без ограничения способы, раскрытые в публикации заявки на патент США № 2006/0228380).

[00111] Очищенный полисахарид серотипа 35В конъюгируют с белком-носителем с образованием иммуногенной композиции, содержащей по меньшей мере

один конъюгат полисахарид-белок, содержащий полисахарид серотипа 35В и белок-носитель. В одном аспекте конъюгат полисахарид 35В-белок может быть получен посредством способа, включающего следующие стадии:

(i) осуществление реакции очищенного *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В с окисляющим средством с получением активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В;

(ii) необязательно лиофилизирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В и белка-носителя;

(iii) суспендирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В и белка-носителя в диметилсульфоксиде (DMSO) или фосфатном буфере;

(iv) осуществление реакции активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В и белка-носителя с восстанавливающим средством с получением конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В с белком-носителем; и

(v) кэпирование непрореагировавших альдегидов в конъюгате полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В с белком-носителем с получением иммуногенного конъюгата, содержащего полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В, ковалентно связанный с белком-носителем. Дополнительная подробная информация о реагентах (например, об окисляющем средстве, восстанавливающем средстве, белке-носителе и т. д.) и условиях, которые можно применять в данном способе, раскрыта в других частях данной заявки, в том числе в нижеследующих разделах и примерах.

[00112] Активированный капсульный полисахарид серотипа 35В может быть охарактеризован с помощью различных параметров, включающих, например, молекулярную массу (MW) и/или степень окисления (Do).

[00113] Например, размер очищенного полисахарида серотипа 35В может быть уменьшен, например, посредством гомогенизации под высоким давлением или механической гомогенизации, до конъюгации с белком-носителем. В одном аспекте активированный полисахарид серотипа 35В имеет молекулярную массу,

составляющую 10-20000 кДа, 10-1000 кДа, 10-500 кДа, 10-300 кДа, 20-200 кДа или 20-120 кДа, до конъюгации.

[00114] Очищенный полисахарид серотипа 35В может быть охарактеризован с помощью степени окисления после активации с помощью окисляющего средства. В одном аспекте активированный полисахарид серотипа 35В может иметь степень окисления, составляющую 1-50, 1-45, 1-40, 1-35, 1-30, 2-50, 2-45, 2-40, 2-35, 2-30, 3-40, 3-35, 3-30, 4-40, 4-35 или 4-30.

[00115] В одном аспекте активированный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В с уровнем окисления (Do), составляющим 4-30, конъюгируют с белком-носителем с получением конъюгата капсульный полисахарид серотипа 23А-белок с содержанием свободного полисахарида (свободного PS), составляющим 40% или меньше, например, 5-40%, 20-40%, 25-40%, 20-35%, 25-35% или 30-35%.

[00116] Для получения гликоконъюгата серотипа 35В, обладающего выгодными иммуногенными свойствами, можно сочетать один или более из следующих технологических параметров на стадиях активации (окисления), конъюгации и/или кэпирования:

- на стадии активации осуществляют реакцию перйодата (например, перйодата натрия или калия) с полисахаридом серотипа 35В в молярном эквиваленте, составляющем 0,005-0,5, 0,005-0,3, 0,005-0,2 или 0,007-0,15 на 1 М;
- стадию активации можно осуществлять в водном растворе, например, в натрий-ацетатном буфере или деионизированной воде;
- стадию активации можно осуществлять в 0,1-15 мМ или 0,1-10 мМ натрий-ацетатном буфере;
- стадию активации можно осуществлять при рН 4-8 или рН 4-7,5;
- на стадии активации перйодат может подвергаться обработке при температуре от 21°C до 25°C;
- на стадии активации перйодат и полисахарид серотипа 35В можно подвергать реакции в течение 0,5-50 часов или 1-25 часов;

- после стадии активации активированный полисахарид серотипа 35В можно концентрировать с применением, например, фильтра для ультрафильтрации с MWCO 30 кДа;
- на стадии конъюгации концентрация активированного полисахарида серотипа 35В в реакции конъюгации может составлять от 5 мг/мл до 30 мг/мл или от 10 мг/мл до 20 мг/мл;
- на стадии конъюгации исходное соотношение белка-носителя и активированного полисахарида серотипа 35В (PR:PS) при загрузке может составлять 1:0,3, 1:0,4, 1:0,5, 1:0,6, 1:0,7, 1:0,8, 1:0,9, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9, 1:2, 1:2,1, 1:2,2, 1:2,3, 1:2,4, 1:2,5, 1:2,6, 1:2,7, 1:2,8, 1:2,9 или 1:3, и предпочтительно 1:0,5-2;
- на стадии конъюгации количество применяемого восстанавливающего средства может составлять 0,1-5 молярных эквивалентов или 0,5-2 молярных эквивалента на 1 М активированного полисахарида, предпочтительно 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2 молярных эквивалента на 1 М активированного сахара, или более предпочтительно 0,8-1,6 молярного эквивалента восстанавливающего средства на 1 М активированного полисахарида;
- на стадии конъюгации температура может составлять от 20°C до 45°C, от 30°C до 40°C, от 35°C до 40°C или  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ ;
- на стадии конъюгации рН может составлять от 5,5 до 8,5, от 5,5 до 7,5 или от 6 до 7,5;
- на стадии конъюгации белок-носитель и активированный полисахарид серотипа 35В можно подвергать реакции с восстанавливающим средством в течение 1-70 часов или 40-60 часов;
- после стадии конъюгации выход гликоконъюгата серотипа 35В может составлять по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90%;
- на стадии кэпирования борогидрид натрия можно обрабатывать при 0,5-5 молярных эквивалентах на 1 М активированного полисахарида серотипа 35В,

например, при 1-3 или 1,5-2,5 молярного эквивалента на 1 М активированного полисахарида серотипа 35В, или при 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 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 молярных эквивалентах борогидрида натрия на 1 М активированного полисахарида;

- на стадии кэпирования температура может составлять 10-40°C, 15-30°C, 20-26°C или  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ;
- на стадии кэпирования продолжительность осуществления реакции может составлять 0,5-10 часов или 2-8 часов; и/или
- после стадии кэпирования гликоконъюгат серотипа 35В можно концентрировать с применением, например, фильтра для ультрафильтрации с MWCO 100 кДа.

[00117] В одном иллюстративном варианте осуществления способ получения гликоконъюгата серотипа 35В включает следующие стадии:

(i) разбавление выделенного полисахарида серотипа 35В натрий-ацетатным буфером (NaOAc, от pH 4,5 до pH 6,0) или DW (деионизированной водой);

(ii) осуществление реакции полисахарида серотипа 35В с 0,005-0,5 молярного эквивалента периодата натрия с получением активированного полисахарида серотипа 35В;

(iii) очистка активированного полисахарида серотипа 35В и последующее смешивание с криопротектором;

(iv) лиофилизирование активированного серотипа 35В и белка-носителя соответственно;

(v) повторное суспендирование активированного полисахарида серотипа 35В и белка-носителя в DMSO или фосфатном буфере;

(vi) смешивание повторно суспендированного активированного полисахарида серотипа 35В с белком-носителем и осуществление реакции с цианоборогидридом натрия с получением конъюгата полисахарида серотипа 35В с белком-носителем;

(vii) кэпирование непрореагировавшего альдегида в конъюгате полисахарида серотипа 35В с белком-носителем с помощью борогидрида натрия; и

(viii) получение иммуногенного конъюгата, содержащего полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В, ковалентно связанный с белком-носителем.

[00118] В другом иллюстративном варианте осуществления способ получения гликоконъюгата серотипа 35В включает следующие стадии:

(i) разбавление выделенного полисахарида серотипа 35В натрий-ацетатным буфером (NaOAc, от pH 4,5 до pH 6,0) или DW (деионизированной водой);

(ii) осуществление реакции полисахарида серотипа 35В с 0,005-0,5 молярного эквивалента периодата натрия с получением активированного полисахарида серотипа 35В;

(iii) очистка активированного полисахарида серотипа 35В;

(iv) смешивание активированного полисахарида серотипа 35В с белком-носителем и последующее совместное лиофилизирование;

(v) повторное суспендирование совместно лиофилизированных активированного полисахарида серотипа 35В и белка-носителя в DMSO или фосфатном буфере;

(vi) осуществление реакции с цианоборогидридом натрия с получением конъюгата полисахарида серотипа 35В с белком-носителем;

(vii) кэпирование непрореагировавшего альдегида в конъюгате полисахарида серотипа 35В с белком-носителем с помощью борогидрида натрия; и

(viii) получение иммуногенного конъюгата, содержащего полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В, ковалентно связанный с белком-носителем.

### **Пневмококковый полисахарид серотипа 22F**

[00119] Активированный капсульный полисахарид серотипа 22F может быть охарактеризован с помощью различных параметров, включающих, например, степень окисления (Do), после активации с помощью окисляющего средства. В определенных вариантах осуществления активированный полисахарид серотипа 22F может иметь Do, составляющую 20-100, 20-80, 20-60, 20-50, 20-40, 20-35, 25-100, 25-50, 25-35, 28-32 или

29-31. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[00120] Конъюгат полисахарид серотипа 22F-белок может быть охарактеризован с помощью различных параметров, включающих, например, соотношение белка и полисахарида (PS/PR), содержание свободного сахара (свободного PS), MSD% или молекулярную массу (MALLS) после конъюгации. В определенных вариантах осуществления соотношение PS/PR конъюгата капсульный полисахарид 22F-белок (например, 22F-ТТ) может составлять 0,2-1,5, 0,2-0,5, 0,3-0,4, 0,6-1,0, 0,7-0,9 или 0,6-0,8. В определенных вариантах осуществления конъюгат капсульный полисахарид 22F-белок (например, 22F-ТТ) характеризуется содержанием свободного PS, составляющим 40% или меньше, например, 2-40%, 2-20%, 2-10%, 5-30%, 10-25%, 15-25%, 17-21% или приблизительно 19%. В определенных вариантах осуществления конъюгат капсульный полисахарид серотипа 22F-белок (например, 22F-ТТ) характеризуется показателем MSD (%), составляющим 5-60%, 5-10%, 5-50%, 10-50%, 25-50%, 40-50%, 42-46% или приблизительно 44%. В определенных вариантах осуществления значение молекулярной массы конъюгата капсульный полисахарид 22F-белок (например, 22F-ТТ) может находиться в диапазоне от приблизительно 1000-600 кДа, 2000-5000 кДа, 2500-4000 кДа, 3000-3500 кДа или 3000-3100 кДа. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[00121] Любые из вышеописанных параметров для серотипа 22F можно сочетать по мере необходимости. Например, в определенных вариантах осуществления активированный полисахарид серотипа 22F, применяемый для получения конъюгата полисахарид серотипа 22F-белок, характеризуется  $D_0$ , составляющей приблизительно 29-31, и реакционным соотношением белка (ТТ) и полисахарида, составляющим приблизительно 1:1. И в определенных вариантах осуществления соотношение полисахарид/белок-носитель (PS/PR) в конечном конъюгате составляет приблизительно 0,6-0,8, содержание свободного PS составляет приблизительно 17-21% и показатель MSD% составляет приблизительно 42-46%, необязательно при молекулярной массе, составляющей приблизительно 3000-3100 кДа согласно MALLS.

### **Пневмококковый полисахарид серотипа 15В**

[00122] Активированный капсульный полисахарид серотипа 15В может быть охарактеризован с помощью различных параметров, включающих, например, степень окисления (Do), после активации с помощью окисляющего средства. В определенных вариантах осуществления активированный полисахарид серотипа 15В может иметь степень окисления, составляющую 1-15, 5-10, 6-8 или приблизительно 7. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[00123] Конъюгат полисахарид серотипа 15В-белок может быть охарактеризован с помощью различных параметров, включающих, например, соотношение белка и полисахарида (PS/PR), содержание свободного сахара (свободного PS), MSD% или молекулярную массу (MALLS) после конъюгации. В определенных вариантах осуществления соотношение PS/PR конъюгата капсульный полисахарид 15В-белок (например, 15В-ТТ) может составлять 0,2-1,5, 0,2-0,5, 0,3-0,4, 0,6-1,0, 0,7-0,9 или 0,8-1,0. В определенных вариантах осуществления конъюгат капсульный полисахарид 15В-белок (например, 15В-ТТ) характеризуется содержанием свободного PS, составляющим 30% или меньше, например, 2-30%, 2-20%, 2-10%, 5-10%, 8-10% или приблизительно 9%. В определенных вариантах осуществления конъюгат капсульный полисахарид 15В-белок (например, 15В-ТТ) характеризуется показателем MSD (%), составляющим 50-90%, 60-85%, 65-80%, 70-80%, 74-78% или приблизительно 76%. В определенных вариантах осуществления значение молекулярной массы конъюгата капсульный полисахарид 15В-белок (например, 15В-ТТ) может находиться в диапазоне от приблизительно 2000-5000 кДа, 10000-15000 кДа, 2000-10000 кДа, 3000-7500 кДа, 4000-6000 кДа, 5000-6000 кДа или 5500-5600 кДа. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[00124] Любые из вышеописанных параметров для серотипа 15В можно сочетать по мере необходимости. Например, в определенных вариантах осуществления активированный полисахарид серотипа 15В, применяемый для получения конъюгата полисахарид серотипа 15В-белок, характеризуется Do, составляющей приблизительно 7,0, и реакционным соотношением белка (ТТ) и полисахарида, составляющим приблизительно 1,25:1. И в определенных вариантах осуществления соотношение

полисахарид/белок-носитель (PS/PR) в конечном конъюгате составляет приблизительно 0,8-1,0, содержание свободного PS составляет приблизительно 8-10% и показатель MSD% составляет приблизительно 74-78%, необязательно при молекулярной массе, составляющей приблизительно 5500-5600 кДа согласно MALLS.

### **Пневмококковый полисахарид серотипа 19А**

[00125] Активированный капсульный полисахарид серотипа 19А может быть охарактеризован с помощью различных параметров, включающих, например, степень окисления (Do), после активации с помощью окисляющего средства. В определенных вариантах осуществления активированный полисахарид серотипа 19А может иметь степень окисления, составляющую 20-40, 30-40, 35-40, 30-35, 20-30, 22-28, 24-28, 25-30 или 25-27. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[00126] Конъюгат полисахарид серотипа 19А-белок может быть охарактеризован с помощью различных параметров, включающих, например, соотношение белка и полисахарида (PS/PR), содержание свободного сахара (свободного PS), MSD (%) или молекулярную массу (MALLS) после конъюгации. В определенных вариантах осуществления соотношение PS/PR конъюгата капсульный полисахарид 19А-белок (например, 19А-CRM<sub>197</sub>) может составлять 0,2-1,5, 0,2-0,5, 0,3-0,4, 0,6-1,0, 0,7-0,9 или 0,6-0,8. В определенных вариантах осуществления конъюгат капсульный полисахарид 19А-белок (например, 19А-CRM<sub>197</sub>) характеризуется содержанием свободного PS, составляющим 50% или меньше, например, 10-40%, 15-40%, 20-40%, 25-40%, 25-35%, 30-40%, 30-35%, 32-34% или приблизительно 33%. В определенных вариантах осуществления конъюгат капсульный полисахарид серотипа 19А-белок (например, 19А-CRM<sub>197</sub>) характеризуется показателем MSD (%), составляющим 35-70%, 40-50%, 50-70%, 60-70%, 63-68% или приблизительно 65%. В определенных вариантах осуществления значение молекулярной массы конъюгата капсульный полисахарид серотипа 19А-белок (например, 19А-CRM<sub>197</sub>) может находиться в диапазоне от приблизительно 2000-8000 кДа, 3500-7000 кДа, 4500-6500 кДа, 5000-6500 кДа или 5250-6250 кДа. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[00127] Любые из вышеописанных параметров для серотипа 19А можно сочетать по мере необходимости. Например, в определенных вариантах осуществления активированный полисахарид серотипа 19А, применяемый для получения конъюгата полисахарид серотипа 19А-белок, характеризуется  $D_o$ , составляющей приблизительно 25-27, и реакционным соотношением белка ( $CRM_{197}$ ) и полисахарида, составляющим приблизительно 1:1. И в определенных вариантах осуществления соотношение полисахарид/белок-носитель (PS/PR) в конечном конъюгате составляет приблизительно 0,7, содержание свободного PS составляет приблизительно 30-35% и показатель MSD% составляет приблизительно 63-68%, необязательно при молекулярной массе, составляющей приблизительно 5250-6250 кДа согласно MALLS.

### **Пневмококковый полисахарид серотипа 19F**

[00128] Активированный капсульный полисахарид серотипа 19F может быть охарактеризован с помощью различных параметров, включающих, например, степень окисления ( $D_o$ ), после активации с помощью окисляющего средства. В определенных вариантах осуществления активированный полисахарид серотипа 19F может иметь степень окисления, составляющую 20-50, 30-50, 40-50, 25-35, 20-30, 22-28, 25-30, 23-27 или 24-26. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[00129] Конъюгат полисахарид серотипа 19F-белок быть охарактеризован с помощью различных параметров, включающих, например, соотношение белка и полисахарида, MSD (%) или содержание свободного сахара (свободного PS) после конъюгации. В определенных вариантах осуществления соотношение PS/PR конъюгата капсульный полисахарид 19F-белок (например, 19F- $CRM_{197}$ ) может составлять 0,2-1,5, 0,2-0,5, 0,3-0,4, 0,6-1,0, 0,7-0,9 или 0,6-0,8. В определенных вариантах осуществления конъюгат капсульный полисахарид серотипа 19F-белок (например, 19F- $CRM_{197}$ ) характеризуется показателем MSD (%), составляющим 25-80%, 35-75%, 40-60%, 70-80%, 75-80% или приблизительно 77%. В определенных вариантах осуществления конъюгат капсульный полисахарид серотипа 19F-белок (например, 19F- $CRM_{197}$ ) характеризуется содержанием свободного PS, составляющим 30% или меньше, например, 2-30%, 2-20%, 2-10%, 2-9%, 3-7%, 4-6% или приблизительно 5%.

[00130] Любые из вышеописанных параметров для серотипа 19F можно сочетать по мере необходимости. Например, в определенных вариантах осуществления активированный полисахарид серотипа 19F, применяемый для получения конъюгата полисахарид серотипа 19F-белок, характеризуется  $D_0$ , составляющей приблизительно 24-26, и реакционным соотношением белка ( $CRM_{197}$ ) и полисахарида, составляющим приблизительно 1,5:1. И в определенных вариантах осуществления соотношение полисахарид/белок-носитель (PS/PR) в конечном конъюгате составляет приблизительно 0,7, содержание свободного PS составляет приблизительно 4-6% и показатель MSD% составляет приблизительно 75-80%.

#### **Пневмококковый полисахарид серотипа 4**

[00131] Конъюгат полисахарид серотипа 4-белок может быть охарактеризован с помощью различных параметров, включающих, например, соотношение белка и полисахарида (PS/PR), содержание свободного сахара (свободного PS), MSD (%) или молекулярную массу (MALLS) после конъюгации. В определенных вариантах осуществления соотношение PS/PR конъюгата капсульный полисахарид 4-белок (например, 4- $CRM_{197}$ ) может составлять 0,2-1,5, 0,8-1,1, 0,8-1,3, 0,9-1,1 или приблизительно 1,0. В определенных вариантах осуществления конъюгат капсульный полисахарид серотипа 4-белок (например, 4- $CRM_{197}$ ) характеризуется содержанием свободного PS, составляющим 40% или меньше, например, 5-30%, 15-35%, 5-15%, 7-13%, 9-11% или приблизительно 10%. В определенных вариантах осуществления конъюгат капсульный полисахарид серотипа 4-белок (например, 4- $CRM_{197}$ ) характеризуется показателем MSD (%), составляющим 40-80%, 45-75%, 45-55%, 60-75% или 70-75%. В определенных вариантах осуществления значение молекулярной массы конъюгата капсульный полисахарид серотипа 4-белок (например, 4- $CRM_{197}$ ) может находиться в диапазоне от приблизительно 500-2500 кДа, 500-1000 кДа, 1000-2000 кДа, 1500-2000 кДа, 1800-2000 кДа или 1850-1950 кДа. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[00132] Любые из вышеописанных параметров для серотипа 4 можно сочетать по мере необходимости. Например, в определенных вариантах осуществления активированный полисахарид серотипа 4, применяемый для получения конъюгата

полисахарид серотипа 4-белок, характеризуется  $D_0$ , составляющей приблизительно 1,4, и реакционным соотношением белка ( $CRM_{197}$ ) и полисахарида, составляющим приблизительно 1,25:1. И в определенных вариантах осуществления соотношение полисахарид/белок-носитель (PS/PR) в конечном конъюгате составляет приблизительно 1,0, содержание свободного PS составляет приблизительно 9-11% и показатель MSD% составляет приблизительно 70-75%, необязательно при молекулярной массе, составляющей приблизительно 1850-1950 кДа согласно MALLS.

### **Пневмококковый полисахарид серотипа 9V**

[00133] Конъюгат полисахарид серотипа 9V-белок может быть охарактеризован с помощью различных параметров, включающих, например, соотношение белка и полисахарида (PS/PR), содержание свободного сахара (свободного PS), MSD (%) или молекулярную массу (MALLS) после конъюгации. В определенных вариантах осуществления соотношение PS/PR конъюгата капсульный полисахарид 9V-белок (например, 9V- $CRM_{197}$ ) может составлять 0,2-1,5, 0,2-0,5, 0,3-0,4, 0,8-1,3, 1,0-1,2 или приблизительно 1,1. В определенных вариантах осуществления конъюгат капсульный полисахарид серотипа 9V-белок (например, 9V- $CRM_{197}$ ) характеризуется содержанием свободного PS, составляющим 35% или меньше, например, 10-35%, 20-35%, 5-15%, 7-13%, 9-11% или приблизительно 10%. В определенных вариантах осуществления конъюгат капсульный полисахарид серотипа 9V-белок (например, 9V- $CRM_{197}$ ) характеризуется показателем MSD (%), составляющим 40-80%, 45-75%, 45-60%, 50-65%, 55-65%, 57-61% или приблизительно 59%. В определенных вариантах осуществления значение молекулярной массы конъюгата капсульный полисахарид серотипа 9V-белок (например, (9V- $CRM_{197}$ )) может находиться в диапазоне от приблизительно 500-2000 кДа, 500-1500 кДа, 1000-2000 кДа, 1000-1500 кДа, 1000-1200 кДа или 1100-1200 кДа. Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[00134] Любые из вышеописанных параметров для серотипа 9V можно сочетать по мере необходимости. Например, в определенных вариантах осуществления активированный полисахарид серотипа 9V, применяемый для получения конъюгата полисахарид серотипа 9V-белок, характеризуется  $D_0$ , составляющей приблизительно

7,4, и реакционным соотношением белка (CRM<sub>197</sub>) и полисахарида, составляющим приблизительно 1,25:1. И в определенных вариантах осуществления соотношение полисахарид/белок-носитель (PS/PR) в конечном конъюгате составляет приблизительно 1,1, содержание свободного PS составляет приблизительно 9-11% и показатель MSD% составляет приблизительно 57-61%, необязательно при молекулярной массе, составляющей приблизительно 1100-1200 кДа согласно MALLS.

[00135]

### **Поливалентные композиции на основе пневмококкового конъюгата и способы их получения**

[00136] Настоящее изобретение предусматривает поливалентные композиции на основе пневмококкового конъюгата, содержащие различные конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*. В данном документе описаны различные аспекты и варианты осуществления поливалентных композиций на основе пневмококкового конъюгата.

[00137] В одном аспекте поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата содержит конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержат или состоят из 22-27 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B.

[00138] В одном аспекте поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата содержит конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержат или состоят из 27 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-

носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* представляют собой 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. Данная поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата также называется PCV-27.

[00139] В одном аспекте поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата содержит конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержат или состоят из 26 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. Данная поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата также называется PCV-26. В определенных вариантах осуществления PCV-26 по меньшей мере один из серотипов *Streptococcus pneumoniae* представляет собой 35B. В определенных вариантах осуществления PCV-26 серотипы *Streptococcus pneumoniae* содержат или состоят из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F и 35B, а также четырех серотипов, выбранных из 15A, 15C, 23A, 23B и 24F. Например, PCV-26 содержит конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок могут содержать или состоять из 26 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* представляют собой

a) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 15C, 23A и 23B;

b) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 15C, 23A и 24F;

с) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 15C, 23B и 24F.

d) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 23A, 23B и 24F; или

e) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15C, 23A, 23B и 24F

[00140] В одном аспекте поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата содержит конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержат или состоят из 25 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. Данная поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата также называется PCV-25. В определенных вариантах осуществления PCV-25 по меньшей мере один из серотипов *Streptococcus pneumoniae* представляет собой 35B. В определенных вариантах осуществления PCV-25 серотипы *Streptococcus pneumoniae* содержат или состоят из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F и 35B, а также трех серотипов, выбранных из 15A, 15C, 23A, 23B и 24F. Например, PCV-25 содержит конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок могут содержать или состоять из 25 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* представляют собой

a) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 15C и 23A;

b) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 15C и 23B;

c) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 15C и 24F;

d) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 23A и 23B;

e) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 23A и 24F;

f) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 23B и 24F;

g) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15C, 23A и 23B;

h) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15C, 23A и 24F;

i) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15C, 23B и 24F; или

j) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 23A, 23B и 24F.

[00141] В одном аспекте поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата содержит конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержат или состоят из 24 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. Данная поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата также называется PCV-24. В определенных вариантах осуществления PCV-24 по меньшей мере один из серотипов *Streptococcus pneumoniae* представляет собой

35В. В определенных вариантах осуществления PCV-24 серотипы *Streptococcus pneumoniae* содержат или состоят из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 33F и 35В, а также двух серотипов, выбранных из 15А, 15С, 23А, 23В и 24F. Например, PCV-24 содержит конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок могут содержать или состоять из 24 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* представляют собой

а) 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 33F, 35В, 15А и 15С;

б) 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 33F, 35В, 15А и 23А;

в) 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 33F, 35В, 15А и 23В;

г) 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 33F, 35В, 15А и 24F;

д) 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 33F, 35В, 15С и 23А;

е) 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 33F, 35В, 15С и 23В;

ж) 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 33F, 35В, 15С и 24F;

з) 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 33F, 35В, 23А и 23В;

и) 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 33F, 35В, 23А и 24F; или

j) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 23B и 24F.

[00142] В одном аспекте поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата содержит конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержат или состоят из 23 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. Данная поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата также называется PCV-23. В определенных вариантах осуществления PCV-23 по меньшей мере один из серотипов *Streptococcus pneumoniae* представляет собой 35B. В определенных вариантах осуществления PCV-23 серотипы *Streptococcus pneumoniae* содержат или состоят из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F и 35B, а также одного серотипа, выбранного из 15A, 15C, 23A, 23B и 24F. Например, PCV-23 содержит конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок могут содержать или состоять из 23 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* представляют собой

a) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B и 15A;

b) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B и 15C;

c) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B и 23A;

d) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B и 23B; или

e) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B и 24F.

[00143] В одном аспекте поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата содержит конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержат или состоят из 22 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. Данная поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата также называется PCV-22. Например, PCV-22 содержит конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок могут содержать или состоять из 22 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок содержит белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* представляют собой

a) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F и 15A;

b) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F и 15C;

c) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F и 23A;

d) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F и 23B;

e) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F и 24F; или

f) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F и 35B.

[00144] Варианты осуществления PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 и PCV-27 могут также включать серотипы *Streptococcus pneumoniae*, представляющие интерес, помимо серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. Например, в определенных вариантах осуществления PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27 дополнительно включают один или более из серотипов 2, 12A, 16F, 17F, 20A, 20B, 20F, 31, 45 и 46 *Streptococcus pneumoniae*. В определенных вариантах осуществления PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27 дополнительно включают один или более из серотипов 6C, 6D, 7B, 7C, 18B, 21, 22A, 24B, 27, 28A, 34, 35F, 38 и 39 *Streptococcus pneumoniae*. Другие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, представляющие интерес, могут также быть добавлены к любой из PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27.

[00145] Также существует возможность заместить один или более из серотипов *Streptococcus pneumoniae* из PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27 одним или более серотипами *Streptococcus pneumoniae*, представляющими интерес, помимо серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B. Например, в определенных вариантах осуществления один или более из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B в PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27 замещают одним или более из серотипов 2, 12A, 14, 16F, 20A, 20B, 20F, 31, 45 и 46 *Streptococcus pneumoniae*. В определенных вариантах осуществления один или более из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B в PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27 замещают одним или более из серотипов 6C, 6D, 7B, 7C, 18B, 21, 22A, 24B, 27, 28A, 34, 35F, 38 и 39 *Streptococcus pneumoniae*. Другие серотипы *Streptococcus pneumoniae*, представляющие интерес, можно также применять для замещения одного или более из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B,

23F, 24F, 33F и 35B в любом из PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27.

#### [00146] Белок-носитель

[00147] В вакцине на основе конъюгата полисахарид-белок белок-носитель конъюгирован с полисахаридным антигеном с образованием гликоконъюгата. Белок-носитель помогает усиливать иммунный ответ (например, ответ в виде выработки антител) на полисахаридный антиген. Белки-носители должны поддаваться конъюгации с пневмококковым полисахаридом с применением стандартных процедур конъюгации.

[00148] Белки-носители, которые можно применять в гликоконъюгате, включают без ограничения DT (дифтерийный анатоксин), TT (столбнячный анатоксин), С-фрагмент из TT, CRM<sub>197</sub> (полученный посредством генной инженерии нетоксичный вариант дифтерийного токсина, который сохраняет иммунологические свойства дифтерийного токсина дикого типа), другие варианты дифтерийного токсина, полученные посредством генной инженерии (например, CRM176, CRM228, CRM45 (Uchida et al. (1973) *J. Biol. Chem.* 218:3838-3844), CRM9, CRM102, CRM103 или CRM107; и другие мутантные формы, описанные Nicholls и Youle в *Genetically Engineered Toxins*, Ed: Frankel, Marcel Dekker Inc. (1992); формы с делецией или мутацией с заменой Glu-148 на Asp, Gln или Ser и/или Ala 158 на Gly, и другие формы с мутациями, раскрытые в патентах США №№ 4709017 и 4950740; формы с мутацией по меньшей мере одного или более остатков Lys 516, Lys 526, Phe 530 и/или Lys 534, и другие формы с мутациями, раскрытые в патентах США №№ 5917017 и 6455673; или фрагмент, раскрытый в патенте США № 5843711, пневмококковый пневмолизин (ply) (Kuo et al. (1995) *Infect Immun* 63:2706-2713), в том числе ply, детоксифицированный каким-либо способом, например, dPLY-GMBS (WO 2004/081515, WO 2006/032499) или dPLY-формол, PhtX, в том числе PhtA, PhtB, PhtD, PhtE (последовательности PhtA, PhtB, PhtD или PhtE раскрыты в WO 00/37105 и WO 00/39299), и слитые белки Pht, например, слитые белки PhtDE, слитые белки PhtBE, Pht A-E (WO 01/98334, WO 03/054007, WO 2009/000826), OMPC (белок наружной мембраны менингококка), который обычно экстрагируют из *Neisseria meningitidis* серогруппы B (EP0372501), PorB (из *N. meningitidis*), PD (белок D *Haemophilus influenzae*; см., например,

EP0594610 B), или их иммунологически функциональные эквиваленты, синтетические пептиды (EP0378881, EP0427347), белки теплового шока (WO 93/17712, WO 94/03208), белки коклюша (WO 98/58668, EP0471177), цитокины, лимфокины, факторы роста или гормоны (WO 91/01146), искусственные белки, содержащие множественные эпитопы человеческих CD4<sup>+</sup> Т-клеток из различных антигенов, полученных из патогенов (Falugi et al. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824), например, белок N19 (Baraldoi et al. (2004) *Infect Immun* 72:4884-4887), пневмококковый поверхностный белок PspA (WO 02/091998), белки захвата железа (WO 01/72337), токсин А или В из *Clostridium difficile* (WO 00/61761), белки, связывающие трансферрин, пневмококковый адгезионный белок (PsaA), рекомбинантный экзотоксин А *Pseudomonas aeruginosa* (в частности, его нетоксичные мутантные формы (например, экзотоксин А, несущий замену в положении глутаминовой кислоты 553 (Douglas et al. (1987) *J. Bacteriol.* 169(11):4967-4971)). Другие белки, такие как овальбумин, гемоцианин фиссуреллы (KLH), бычий сывороточный альбумин (BSA) или очищенное белковое производное туберкулина (PPD) также могут применяться в качестве белков-носителей. Другие подходящие белки-носители включают инактивированные бактериальные токсины, такие как анатоксин холеры (например, как описано в WO 2004/083251), LT *Escherichia coli*, ST *E. coli* и экзотоксин А из *P. aeruginosa*, и их иммунологически функциональные эквиваленты также могут применяться в качестве белков-носителей в настоящем изобретении. В случае упоминания в настоящем описании каждого из белков-носителей, подразумевается, что они охватывают их иммунологически функциональные эквиваленты.

[00149] В определенных вариантах осуществления белок-носитель гликоконъюгата выбран из группы, состоящей из ТТ (в том числе С-фрагмента ТТ), DT (в том числе вариантов DT, таких как CRM<sub>197</sub> и др., рассмотренных выше), PD, слитых белков PhtX, PhtD, PhtDE (в особенности таковых, раскрытых в WO 01/98334 и WO 03/054007), детоксифицированного пневмолизина, PorB, белка N19, PspA, OMPC, токсина А или В из *Clostridium difficile* и PsaA. В случае упоминания в настоящем описании каждого из белков-носителей, подразумевается, что они охватывают их иммунологически функциональные эквиваленты. Специалистам в данной области будет понятно, что, например, в случае упоминания DT в настоящем описании также

включены мутантные формы DT, которые представляют собой их иммунологически функциональные эквиваленты, в том числе без ограничения таковые, рассмотренные выше.

[00150] В определенных вариантах осуществления белок-носитель гликоконъюгата выбран из группы, состоящей из DT (дифтерийного анатоксина), CRM<sub>197</sub>, TT (столбнячного анатоксина), С-фрагмента TT и PD (белка D *Haemophilus influenza*).

[00151] В одном варианте осуществления белок-носитель гликоконъюгата по настоящему изобретению может представлять собой DT (дифтерийный анатоксин). Дифтерийные токсины, встречающиеся в природе, или дикого типа могут быть получены из продуцирующих токсин штаммов, доступных из различных общедоступных источников, в том числе из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Подразумевается, что используемый в данном документе термин DT (дифтерийный анатоксин) включает все варианты DT, которые действуют как его функциональные эквиваленты. Такие мутантные формы DT включают, например, CRM176, CRM228, CRM45, CRM9, CRM102, CRM103 или CRM107; формы с мутацией или делецией с заменой Glu148 на Asp по сравнению с DT дикого типа (раскрытые в патенте США № 4709017); формы с делецией или мутацией с заменой Glu148 на Asp, формы с делецией или мутацией с заменой Ala158 на Gly, раскрытые в патентах США №№ 4709017 и 4950740; формы с мутацией по меньшей мере одного или более остатков, выбранных из группы, состоящей из Lys 516, Lys 526, Phe 530 и Lys 534, раскрытые в патенте США №5917017, и формы с мутацией Glu148, Glu349, Lys516 или/и Phe530, раскрытые в патенте США № 6455673 или в патенте США № 5843711, и т. п, но не ограничиваясь ими. В одном варианте осуществления выделенный капсульный сахарид конъюгирован с белком CRM<sub>197</sub>. Белок CRM<sub>197</sub> представляет собой нетоксичную форму дифтерийного токсина, которая сохраняет иммунологические свойства дифтерийного токсина дикого типа. CRM<sub>197</sub> вырабатывается *Corynebacterium diphtheriae*, инфицированной нетоксигенным фагом β<sub>197</sub>tox<sup>-</sup>, полученным посредством мутагенеза токсигенного коринефага бета с применением нитрозогуанидина (Uchida et al. (1971) *Nature New Biology* 233:8-11). Белок CRM<sub>197</sub> имеет такую же молекулярную массу, как и дифтерийный токсин, однако

отличается от него заменой одного основания (гуанина на аденин) в структурном гене. Данная замена одного основания обуславливает одну аминокислотную замену (глутаминовой кислоты на глицин) в зрелом белке и устраняет токсические свойства дифтерийного токсина. Белок CRM<sub>197</sub> представляет собой безопасный и эффективный зависимый от Т-клеток носитель для сахаридов. Дополнительную подробную информацию о CRM<sub>197</sub> и его получении можно найти, например, в патенте США № 5614382, который настоящим включен посредством ссылки во всей своей полноте.

[00152] В другом варианте осуществления белок-носитель гликоконъюгата представляет собой ТТ (столбнячный анатоксин). Столбнячный анатоксин получают и применяют во всем мире для крупномасштабной иммунизации против столбняка (или спазма жевательных мышц), вызванного *Clostridium tetani*. Столбнячный анатоксин также применяют по отдельности или в сочетании с дифтерийной и/или коклюшной вакциной. Родительский белок, столбнячный токсин, как правило, получают в культурах *Clostridium tetani*. Столбнячный токсин представляет собой белок с молекулярной массой, составляющей приблизительно 150 кДа, и состоит из двух субъединиц (приблизительно 100 кДа и приблизительно 50 кДа), соединенных посредством дисульфидной связи. Токсин, как правило, детоксифицируют формальдегидом, и его можно получать посредством очистки из фильтратов культуры с применением известных способов, таких как осаждение сульфатом аммония (см., например, Levin и Stone, *J. Immunol.*, 67:235-242 (1951); W.H.O. Manual for the Production and Control of Vaccines: Tetanus Toxoid, 1977 (BLG/UNDP/77.2 Rev.I.)) или методики хроматографии, раскрытые, например, в WO 1996/025425. Столбнячный токсин также можно инактивировать рекомбинантными генетическими способами.

[00153] В другом варианте осуществления белок-носитель гликоконъюгата может представлять собой PD (белок D *Haemophilus influenzae*; см., например, EP 0594610B).

[00154] В определенных вариантах осуществления в поливалентной композиции на основе пневмококкового конъюгата применяют один белок-носитель. В определенных вариантах осуществления применяют более чем один белок-носитель («смешанный носитель»). В данных вариантах осуществления с применением смешанного носителя могут применяться 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более белков-носителей. Как правило, варианты осуществления с применением смешанного носителя включают

два белка-носителя. Например, в определенных вариантах осуществления определенные капсульные полисахариды конъюгированы с первым белком-носителем и остальные капсульные полисахариды присоединены ко второму белку-носителю.

[00155] В одном аспекте первый белок-носитель представляет собой CRM<sub>197</sub>, а второй белок-носитель представляет собой столбнячный анатоксин. В определенных вариантах осуществления два из капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. В определенных вариантах осуществления два капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5. В определенных вариантах осуществления четыре из капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. В определенных вариантах осуществления четыре капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 5, 15B и 22F. В определенных вариантах осуществления четыре капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, представляют собой серотипы 1, 5, 15B и 22F; серотипы 1, 3, 15B и 22F; или серотипы 3, 5, 15B и 22F.

[00156] В некоторых вариантах осуществления PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27 капсульные полисахариды из серотипов 1 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, и капсульные полисахариды из остальных серотипов конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. В другом варианте осуществления PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27 капсульные полисахариды из серотипов 1 и 3 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. В другом варианте осуществления PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27 капсульные полисахариды из серотипов 3 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. В другом варианте осуществления PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27 капсульные полисахариды из серотипов 1, 5, 15B и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. В другом варианте осуществления PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27 капсульные полисахариды из серотипов

1, 3, 15В и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. В другом варианте осуществления PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27 капсульные полисахариды из серотипов 3, 5, 15В и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

[00157] Пневмококковые капсульные полисахариды, применяемые в композициях и вакцинах, описанных в данном документе, в том числе капсульные полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В, могут быть получены из *Streptococcus pneumoniae* с применением любой доступной методики, в том числе стандартных методик, известных специалисту в данной области, включающих, например, таковые, раскрытые в WO 2006/110381, WO 2008/118752, WO 2006/110352 и публикациях заявок на патент США №№ 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, 2008/0102498 и 2008/0286838, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте. Например, каждый серотип пневмококкового капсульного полисахарида может быть выращен в среде для культивирования (например, среде на основе сои). Клетки подвергают лизису, и отдельные полисахариды можно получать посредством очистки из лизата посредством центрифугирования, осаждения, ультрафильтрации и/или колоночной хроматографии. Кроме того, пневмококковые капсульные олигосахариды можно получать с применением протоколов синтеза.

[00158] Капсульные полисахариды *Streptococcus pneumoniae* содержат повторяющиеся олигосахаридные звенья, которые могут содержать до 8 сахарных остатков. Капсульный сахаридный антиген может представлять собой полноразмерный полисахарид, или он может быть уменьшен в размере (например, одно олигосахаридное звено или сахаридная цепь из повторяющихся олигосахаридных звеньев, имеющая длину короче нативной). Размер капсульных полисахаридов может быть уменьшен посредством различных способов, известных из уровня техники, таких как обработка посредством кислотного гидролиза, обработка пероксидом водорода, сортировка по размеру с помощью высоконапорного гомогенизатора, необязательно с последующей обработкой пероксидом водорода с получением олигосахаридных

фрагментов, или микрофлюидизация. В определенных вариантах осуществления перед осуществлением реакции очищенного капсульного полисахарида с окисляющим средством с получением активированного капсульного полисахарида очищенный капсульный полисахарид подвергают стадии сортировки по размеру, такой как обработка посредством кислотного гидролиза или микрофлюидизация, с уменьшением его размера. В определенных вариантах осуществления капсульный полисахарид не подвергают стадии сортировки по размеру, такой как обработка посредством кислотного гидролиза или микрофлюидизация, перед осуществлением реакции очищенного капсульного полисахарида с окисляющим средством с получением активированного капсульного полисахарида.

[00159] Пневмококковый конъюгат для каждого из серотипов может быть получен посредством конъюгирования капсульного полисахарида каждого серотипа с белком-носителем. Различные пневмококковые конъюгаты могут быть составлены в композицию, в том числе в состав для однократного введения.

#### [00160] Активация капсульного полисахарида

[00161] Для получения конъюгата полисахарид-белок капсульные полисахариды, полученные из каждого пневмококкового серотипа, могут быть химически активированы таким образом, чтобы капсульные полисахариды могли вступать в реакцию с белком-носителем. После активации каждый капсульный полисахарид может быть отдельно конъюгирован с белком-носителем с образованием гликоконъюгата. Химической активации полисахаридов и последовательной конъюгации с белком-носителем можно достигать традиционными способами.

[00162] Например, вицинальные гидроксильные группы на конце капсульных полисахаридов можно подвергать окислению до альдегидных групп с помощью окисляющих средств, таких как перйодаты (в том числе перйодат натрия, перйодат калия или перйодная кислота), как раскрыто, например, в патентах США №№ 4365170, 4673574 и 4902506, которые настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте. Перйодат произвольно окисляет вицинальную гидроксильную группу углевода с образованием реакционноспособной альдегидной группы и вызывает расщепление связи С-С. Термин «перйодат» включает как перйодат, так и перйодную

кислоту. Данный термин также включает как метаперйодат ( $\text{IO}_4^-$ ), так и ортоперйодат ( $\text{IO}_6^{5-}$ ). Термин «перйодат» также включает различные соли перйодата, в том числе перйодат натрия и перйодат калия. В определенных вариантах осуществления полисахарид может окисляться в присутствии метаперйодата натрия.

[00163] В определенных вариантах осуществления перйодат можно применять в количестве, составляющем приблизительно 0,03-0,17 мкг на 1 мкг полисахарида. В определенных вариантах осуществления перйодат можно применять в количестве, составляющем приблизительно 0,025-0,18 мкг или приблизительно 0,02-0,19 мкг на 1 мкг полисахарида. Сахарид можно активировать по мере необходимости в пределах вышеуказанного диапазона. За пределами вышеуказанного диапазона эффект может быть неудовлетворительным.

[00164] Полисахариды можно активировать с помощью тетрафторбората 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP) с образованием цианатного эфира. Затем активированный полисахарид непосредственно или посредством спейсера или линкерной группы соединяют с аминогруппой на белке-носителе.

[00165] Например, спейсер может представлять собой цистамин или цистеамин для получения тиолированного полисахарида, который можно соединять с носителем посредством тиоэфирной связи, полученной после осуществления реакции с активированным малеимидом белком-носителем (например, с применением сложного эфира N-[γ-малеимидобутирилокси]сукцинимид (GMBS)) или галогеноацетилированным белком-носителем (например, с применением йодацетимида, N-сукцинимидилбромацетата (SBA; SIB), N-сукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоата (SIAB), сульфосукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоата (сульфо-SIAB), N-сукцинимидилйодацетата (SIA) или сукцинимидил-3-[бромацетамидо]пропионата (SBAP)). Предпочтительно цианатный эфир (необязательно полученный посредством химии COAP) соединяют с гександиамином или дигидразидом адипиновой кислоты (АОН), и аминопроизводное сахара конъюгируют с белком-носителем с применением химии карбодимидов (например, EDAC или EDC) посредством карбоксильной группы на белке-носителе. Такие конъюгаты описаны, например, в WO 93/15760, WO 95/08348 и WO 96/129094, все из которых настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте.

[00166] После стадии активации активированный капсульный полисахарид необязательно лиофилизируют перед смешиванием активированного полисахарида с белком-носителем. Активированный полисахарид и белок-носитель можно лиофилизировать по отдельности или можно комбинировать друг с другом и затем лиофилизировать.

[00167] Активированный капсульный полисахарид можно лиофилизировать в присутствии любого криопротектора, такого как сахарид. Например, сахарид может быть выбран из без ограничения сахарозы, трегалозы, рафинозы, стахиозы, мелезитозы, декстрана, маннита, лактита и палатинита. В определенных вариантах осуществления сахарид представляет собой сахарозу. Затем лиофилизированный полисахарид повторно суспендируют в растворителе перед осуществлением реакции конъюгации. Лиофилизированные активированные капсульные полисахариды могут быть смешаны с раствором, содержащим белок-носитель. В качестве альтернативы совместно лиофилизированные полисахарид и белок-носитель повторно суспендируют в растворителе перед осуществлением реакции конъюгации.

**[00168] Конъюгация активированного капсульного полисахарида с белком-носителем**

[00169] Конъюгации активированных капсульных полисахаридов и белков-носителей можно достигать, например, посредством восстановительного аминирования, как описано, например, в публикациях заявок на патент США №№ 2006/0228380, 2007/0231340, 2007/0184071 и 2007/0184072, WO 2006/110381, WO 2008/079653 и WO 2008/143709, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте. Например, активированные капсульные полисахариды и белок-носитель можно подвергать реакции с восстанавливающим средством с образованием конъюгата. Восстанавливающие средства, которые являются подходящими, включают борогидриды, такие как цианоборогидрид натрия, боранпириндин, триацетоксиборогидрид натрия, натрий или борогидрид, или ионообменную смолу с борогидридом. По завершении реакции восстановления в конъюгатах могут оставаться непрореагировавшие альдегидные группы. Непрореагировавшие альдегидные группы можно кэпировать с применением подходящего кэпирующего средства, такого как борогидрид натрия ( $\text{NaBH}_4$ ). В варианте осуществления реакцию восстановления

осуществляют в водном растворителе. В другом варианте осуществления реакцию осуществляют в апротонном растворителе. В варианте осуществления реакцию восстановления осуществляют в растворителе, представляющем собой DMSO (диметилсульфоксид) или в DMF (диметилформамид). Другие возможные восстанавливающие средства включают без ограничения аминбораны, такие как пиридинборан, 2-пиколинборан, 2,6-диборанметанол, диметиламинборан, трет-БуMeiPrN-BH<sub>3</sub>, бензиламин-BH<sub>3</sub> или 5-этил-2-метилпиридинборан (PEMB).

[00170] Активированные капсульные полисахариды можно конъюгировать непосредственно с белком-носителем или опосредованно с применением спейсера или линкера, такого как бифункциональный линкер. Линкер необязательно является гетеробифункциональным или гомобифункциональным, содержащим, например, реакционноспособную аминогруппу и реакционноспособную группу карбоновой кислоты, 2 реакционноспособных аминогруппы или две реакционноспособных группы карбоновой кислоты.

[00171] В других подходящих методиках конъюгации применяют карбодиимиды, гидразиды, активные сложные эфиры, нонборан, п-нитробензойную кислоту, N-гидроксисукцинимид, S--NHS, EDC, TSTU, как описано, например, в публикации международной заявки на патент № WO 98/42721, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте. Конъюгация может предусматривать применение карбонильного линкера, который может быть образован посредством осуществления реакции свободной гидроксильной группы сахара с 1,1'-карбонилдиимдазолом (CDI) (см. Bethell et al. (1979) *J. Biol. Chem.* 254:2572-2574; Hearn et al. (1981) *J. Chromatogr.* 218:509-518) и последующим осуществлением реакции с белком с образованием карбаматной связи. Это может предусматривать восстановление аномерного конца до первичной гидроксильной группы, необязательное обеспечение защитной группы/удаление защитной группы для первичной гидроксильной группы, осуществление реакции первичной гидроксильной группы с CDI с образованием карбаматного промежуточного соединения CDI и связывание карбаматного промежуточного соединения CDI с аминогруппой на белке.

[00172] Значение соотношения полисахарида и белка-носителя для вакцин на основе пневмококкового конъюгата, как правило, находится в диапазоне 0,3-3,0

(вес/вес), однако оно может варьировать в зависимости от серотипа. Соотношение можно определить либо посредством независимого измерения количества присутствующего белка и полисахарида, либо способами, которые обеспечивают непосредственное измерение соотношения, известными из уровня техники. Способы, включающие <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопию или SEC-HPLC-UV/RI с двойным мониторингом (например, показатель преломления и УФ для общего содержания материала и белка соответственно), могут обеспечивать профиль соотношения сахарид/белок для конъюгатов, распределенных по размеру, а также SEC-HPLC-MALLS или MALDI-TOF-MS.

[00173] Конъюгаты полисахарид-белок, полученные таким образом, можно очищать и обогащать различными способами. Данные способы включают концентрирование/диафильтрацию, колоночную хроматографию и глубинную фильтрацию. Очищенные конъюгаты полисахарид-белок объединяют с составлением поливалентной композиции на основе пневмококкового конъюгата, которую можно применять в качестве вакцины.

#### [00174] Состав

[00175] Составление вакцинной композиции можно осуществлять с применением способов, принятых в данной области техники. Вакцинную композицию составляют таким образом, чтобы она была совместима с ее предполагаемым путем введения. Отдельные конъюгаты пневмококковый капсульный полисахарид-белок можно составлять совместно с физиологически приемлемой средой-носителем с получением композиции. Примеры таких сред-носителей включают без ограничения воду, забуференный солевой раствор, полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и растворы декстрозы.

[00176] В некоторых вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата дополнительно содержит адъювант. Используемый в данном документе термин «адъювант» относится к веществу или среде-носителю, которые неспецифически усиливают иммунный ответ в отношении антигена. Адъюванты могут включать без ограничения следующее

[00177] (1) соли алюминия (алюминиевые квасцы), такие как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия, гидроксифосфат сульфат алюминия и т. д.;

[00178] (2) составы в виде эмульсии «масло-в-воде» (с другими специфическими иммуностимулирующими средствами, такими как мурамилпептиды (определенные ниже) или компоненты бактериальной клеточной стенки, или без них), такие как, например, (a) MF59 (WO 90/14837), содержащий 5% сквалена, 0,5% Tween 80 и 0,5% Span 85 (необязательно содержащий различные количества МТР-РЕ (см. ниже), хотя это не требуется), составленные в субмикронные частицы с применением микрофлюидайзера, такого как микрофлюидайзер модели 110Y (Microfluidics, Ньютон, Массачусетс), (b) SAF, содержащий 10% сквалена, 0,4% Tween 80, 5% плуроникового блок-сополимера L121 и thr-MDP (см. ниже), либо микрофлюидизированный в субмикронную эмульсию или перемешанный вихревым способом с получением эмульсии с более крупным размером частиц, и (c) адьювантная система Ribi™ (RAS) (Cogiа, Гамильтон, Монтана), содержащая 2% сквалена, 0,2% Tween 80 и один или более компонентов бактериальной клеточной стенки из группы, состоящей из 3-О-деацелированного монофосфорил-липида А (MPL™), описанного в патенте США № 4912094 (Cogiа), димиколята трегалозы (TDM) и скелета клеточной стенки (CWS), предпочтительно MPL+CWS (Detox™);

[00179] (3) сапониновые адьюванты, такие как Quil А или STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Фреймингем, Массачусетс) (патент США № 5057540) или полученные из них частицы, такие как ISCOM (иммуностимулирующие комплексы);

[00180] (4) бактериальные липополисахариды, синтетические аналоги липида А, такие как соединения аминоалкилглюкозаминфосфата (AGP) или их производные или аналоги, которые доступны от Cogiа и которые описаны в патенте США № 6113918; один такой AGP представляет собой 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 известный как RC529), который составляют в виде водной формы или в виде стабильной эмульсии,

[00181] (5) синтетические полинуклеотиды, такие как олигонуклеотиды, содержащие мотив(мотивы) CpG (патент США № 6207646);

[00182] (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, гамма-интерферон), гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), фактор некроза опухоли (TNF), костимулирующие молекулы B7-1 и B7-2 и т.д.;

[00183] (7) детоксифицированные мутантные формы бактериального АДФ-рибозилирующего токсина, такого как холерный токсин (СТ) либо в форме дикого типа, либо в мутантной форме, например, где глутаминовая кислота в аминокислотном положении 29 замещена другой аминокислотой, предпочтительно гистидином, в соответствии с WO 00/18434 (см. также WO 02/098368 и WO 02/098369), коклюшный токсин (РТ) или термолабильный токсин (LT) *E. coli*, в частности, LT-K63, LT-R72, СТ-S109, РТ-K9/G129 (см., например, WO 93/13302 и WO 92/19265); и

[00184] (8) компоненты комплемента, такие как тример компонента комплемента C3d;

[00185] (9) биологические молекулы, такие как липиды и костимулирующие молекулы. Иллюстративные биологические адъюванты включают AS04, IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L и 41 BBL.

[00186] Мурамилпептиды включают без ограничения N-ацетилмурамил-L-треонил-D-изоглутамин (thr-MDP), N-ацетилнормурамил-L-аланин-2-(1'-2'-дипальмитоил-sn-глицеро-3-гидроксифосфорилокси)-этиламин (MTP-PE) и т. д.

[00187] Адъювант надлежащим образом выбирают в соответствии с количеством и валентностью конъюгата в композиции. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой адъювант на основе алюминия. Если применяют адъювант на основе алюминия, элементарный алюминий в композиции на основе элементарного алюминия можно добавлять с обеспечением содержания от 0,01 мг/мл до 1 мг/мл. Как правило, однократную дозу вакцины объемом 0,5 мл составляют таким образом, чтобы она содержала от приблизительно 0,1 мг до 2,5 мг адъюванта на основе алюминия. В других вариантах осуществления однократную дозу вакцины объемом

0,5 мл составляют таким образом, чтобы она содержала от 0,1 мг до 2 мг, от 0,1 мг до 1 мг, от 0,1 мг до 0,5 мг, от 0,1 мг до 0,2 мг, от 0,125 мг до 2,5 мг, от 0,125 мг до 0,5 мг, от 0,125 мг до 0,2 мг или от 0,125 мг до 0,25 мг адьюванта на основе алюминия. В определенных вариантах осуществления однократную дозу вакцины объемом 0,5 мл составляют таким образом, чтобы она содержала от приблизительно 0,125 мг до приблизительно 0,250 мг адьюванта на основе алюминия. В определенных вариантах осуществления однократную дозу вакцины объемом 0,5 мл составляют таким образом, чтобы она содержала приблизительно 0,125 мг адьюванта на основе алюминия. В определенных вариантах осуществления однократную дозу вакцины объемом 0,5 мл составляют таким образом, чтобы она содержала приблизительно 0,250 мг адьюванта на основе алюминия.

[00188] В определенных вариантах осуществления адьювант выбран из группы, состоящей из фосфата алюминия, сульфата алюминия и гидроксида алюминия.

[00189] В определенных вариантах осуществления адьювант представляет собой фосфат алюминия.

[00190] В некоторых вариантах осуществления композиция предназначена для применения в качестве вакцины против инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae*.

#### **Определение характеристик конъюгатов пневмококкового капсульного полисахарида с белком-носителем**

[00191] В определенных вариантах осуществления конъюгат полисахарида с белком-носителем может иметь молекулярную массу, составляющую 100-10000 кДа. В определенных вариантах осуществления конъюгат имеет молекулярную массу, составляющую 200-9000 кДа. В определенных вариантах осуществления конъюгат имеет молекулярную массу, составляющую 300-8000 кДа. В определенных вариантах осуществления конъюгат имеет молекулярную массу, составляющую 400-7000 кДа. В определенных вариантах осуществления конъюгат имеет молекулярную массу, составляющую 500-6000 кДа. В определенных вариантах осуществления конъюгат имеет молекулярную массу, составляющую 600-5000 кДа. В определенных вариантах осуществления конъюгат имеет молекулярную массу, составляющую 500-4000 кДа.

Любое целое число в пределах любого из вышеуказанных диапазонов рассматривается в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

[00192] Если значение молекулярной массы находится в пределах вышеуказанного диапазона, конъюгат может стабильно образовываться с высокими показателями выхода. Кроме того, может быть снижена доля свободного полисахарида. Более того, в пределах вышеуказанного диапазона значений молекулярной массы может быть достигнута превосходная иммуногенность.

[00193] После того, как отдельные конъюгаты полисахарид-белок были очищены, их смешивают с получением состава иммуногенной композиции по настоящему изобретению.

[00194] Конъюгаты сахарид-белок серотипов по настоящему изобретению могут быть охарактеризованы с помощью соотношения полисахарида и белка-носителя (количество полисахарида/количество белка-носителя, вес/вес).

[00195] В определенных вариантах осуществления соотношение (вес/вес) полисахарида и белка-носителя в конъюгате полисахарида с белком-носителем для каждого серотипа составляет 0,5-2,5, 0,4-2,3, 0,3-2,1, 0,24-2, 0,2-1,8, 0,18-1,6, 0,16-1,4, 0,14-1,2, 0,12-1, 0,1-1, 0,4-1,3, 0,5-1 или 0,7-0,9 (например, приблизительно 0,7, приблизительно 0,8, приблизительно 0,9, приблизительно 1,0, приблизительно 1,1, приблизительно 1,2, приблизительно 1,3, приблизительно 1,4, приблизительно 1,5, приблизительно 1,6, приблизительно 1,7, приблизительно 1,8, приблизительно 1,9, приблизительно 2,0, приблизительно 2,1, приблизительно 2,2, приблизительно 2,3, приблизительно 2,4 или приблизительно 2,5).

[00196] Если соотношение полисахарида и белка-носителя находится в пределах вышеуказанного диапазона, конъюгат может стабильно образовываться с высокими показателями выхода. Кроме того, может быть снижена доля свободного полисахарида. Более того, в пределах вышеуказанного диапазона может быть достигнута превосходная иммуногенность и конъюгат может стабильно поддерживаться без влияния со стороны других серотипов.

[00197] Конъюгаты и иммуногенные композиции по настоящему изобретению могут содержать свободный полисахарид, который не является ковалентно

конъюгированным с белком-носителем, однако тем не менее присутствует в композиции на основе конъюгата полисахарида с белком-носителем. Свободный полисахарид может быть нековалентно ассоциирован с конъюгатом полисахарида с белком-носителем (т. е. нековалентно связан, поглощен или захвачен в конъюгат полисахарида с белком-носителем, или захвачен им).

[00198] В определенных вариантах осуществления конъюгат полисахарида с белком-носителем содержит менее чем приблизительно 60%, приблизительно 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20% или 15% свободного полисахарида каждого серотипа исходя из общего количества полисахарида каждого серотипа. В определенных вариантах осуществления конъюгат полисахарида с белком-носителем каждого серотипа содержит менее чем приблизительно 60% свободного полисахарида каждого серотипа исходя из общего количества полисахарида каждого серотипа. В определенных вариантах осуществления конъюгат полисахарида с белком-носителем каждого серотипа содержит менее чем приблизительно 50% свободного полисахарида каждого серотипа исходя из общего количества полисахарида каждого серотипа. В определенных вариантах осуществления конъюгат полисахарида с белком-носителем каждого серотипа содержит менее чем приблизительно 40% свободного полисахарида каждого серотипа исходя из общего количества полисахарида каждого серотипа. В определенных вариантах осуществления конъюгат полисахарида с белком-носителем каждого серотипа содержит менее чем приблизительно 30% свободного полисахарида каждого серотипа исходя из общего количества полисахарида каждого серотипа. В определенных вариантах осуществления конъюгат полисахарида с белком-носителем каждого серотипа содержит менее чем приблизительно 25% свободного полисахарида каждого серотипа исходя из общего количества полисахарида каждого серотипа. В определенных вариантах осуществления конъюгат полисахарида с белком-носителем каждого серотипа содержит менее чем приблизительно 20% свободного полисахарида каждого серотипа исходя из общего количества полисахарида каждого серотипа. В определенных вариантах осуществления конъюгат полисахарида с белком-носителем каждого серотипа содержит менее чем приблизительно 15% свободного полисахарида каждого серотипа исходя из общего количества полисахарида каждого серотипа. В определенных вариантах осуществления конъюгат полисахарида с белком-носителем

каждого серотипа содержит менее чем приблизительно 10% свободного полисахарида каждого серотипа исходя из общего количества полисахарида каждого серотипа.

[00199] Конъюгат полисахарида с белком-носителем каждого серотипа может также быть охарактеризован с помощью распределения по размеру молекул ( $K_d$ ). Среду для эксклюзионной хроматографии (CL-4B; поперечно-сшитые агарозные гранулы, 4%) можно применять для определения относительного распределения размеров молекул конъюгата. Эксклюзионную хроматографию (SEC) осуществляют в колонке с подачей самотеком для определения профиля распределения размеров молекул конъюгата. Крупные молекулы, вытесненные из пор в среде, элюируют быстрее, чем мелкие молекулы. Коллектор фракций применяют для сбора элюата из колонки. Фракции тестируют колориметрически посредством анализа сахаридов. Для определения  $K_d$  колонку калибруют для установления фракции, где молекулы полностью вытеснены ( $V_0$ ;  $K_d = 0$ ), и фракции, представляющей максимальное удерживание ( $V_i$ ;  $K_d = 1$ ). Фракция, где достигается определенное свойство образца ( $V_e$ ), соотносится с  $K_d$  посредством выражения  $K_d = (V_e - V_0)/(V_i - V_0)$ .

[00200] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 15% конъюгата полисахарида с белком-носителем каждого серотипа может иметь значение  $K_d$ , составляющее 0,3 или меньше, в колонке CL-4B.

[00201] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 20% конъюгата полисахарида с белком-носителем каждого серотипа может иметь значение  $K_d$ , составляющее 0,3 или меньше, в колонке CL-4B. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90% конъюгата полисахарида с белком-носителем каждого серотипа может иметь значение  $K_d$ , составляющее 0,3 или меньше, в колонке CL-4B. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 60% конъюгата полисахарида с белком-носителем каждого серотипа может иметь значение  $K_d$ , составляющее 0,3 или меньше, в колонке CL-4B. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 50-80% конъюгата полисахарида с белком-носителем каждого серотипа может иметь значение  $K_d$ , составляющее 0,3 или меньше, в колонке CL-4B. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 65-80% конъюгата полисахарида с белком-носителем каждого серотипа может иметь значение  $K_d$ ,

составляющее 0,3 или меньше, в колонке CL-4B. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 15-60% конъюгата сахарид-белок каждого серотипа может иметь значение  $K_d$ , составляющее 0,3 или меньше, в колонке CL-4B.

### Способы профилактики и пути применения

[00202] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает вакцину, содержащую поливалентную композицию на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество предусматривает по меньшей мере буфер, такой как сукцинатный буфер, соль, такую как хлорид натрия, и/или поверхностно-активное средство, такое как полиоксиэтиленовый сложный эфир сорбитана (например, полисорбат 80).

[00203] В некоторых вариантах осуществления вакцина вызывает защитный иммунный ответ у субъекта-человека в отношении заболевания, обусловленного инфекцией, вызванной *Streptococcus pneumoniae*.

[00204] Согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение предусматривает способ профилактики инфекции или заболевания, вызванных *Streptococcus pneumoniae*, при этом способ включает введение субъекту-человеку профилактически эффективного количества поливалентной композиции на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) или содержащей ее вакцины. Поливалентную композицию на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) или содержащую ее вакцину можно вводить любым путем, в том числе, например, системно или через слизистую оболочку, как более подробно описано ниже.

[00205] В определенных вариантах осуществления субъект-человек представляет собой субъекта пожилого возраста, и заболевание представляет собой пневмонию или инвазивное пневмококковое заболевание (IPD). В определенных вариантах осуществления возраст субъекта пожилого возраста составляет по меньшей мере 50 лет. В других вариантах осуществления возраст субъекта пожилого возраста составляет по

меньшей мере 55 лет. В еще одних других вариантах осуществления возраст субъекта пожилого возраста составляет по меньшей мере 60 лет.

[00206] В других вариантах осуществления субъект-человек представляет собой младенца, и заболевание представляет собой пневмонию, инвазивное пневмококковое заболевание (IPD) или острый средний отит (АОМ). В определенных вариантах осуществления возраст младенца составляет 0-2 года. В других вариантах осуществления возраст младенца составляет 2-15 месяцев.

[00207] В еще одном варианте осуществления возраст субъекта-человека составляет от 6 недель до 17 лет, и заболевание представляет собой пневмонию, инвазивное пневмококковое заболевание (IPD) или острый средний отит (АОМ). В определенных вариантах осуществления возраст субъекта-человека составляет от 6 недель до 5 лет. В других вариантах осуществления возраст субъекта-человека составляет 5-17 лет.

[00208] Количество конъюгата в каждой дозе вакцины или профилактически эффективное количество поливалентной композиции на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем может быть выбрано в качестве количества, которое индуцирует профилактический эффект без развития значительных нежелательных явлений. Такое количество может варьировать в зависимости от серотипа пневмококка. Как правило, каждая доза может включать от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 100 мкг полисахарида, конкретно приблизительно 0,1-10 мкг, и, более конкретно, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 5 мкг. Оптимальные количества компонентов для определенной вакцины можно определить посредством стандартных исследований, предусматривающих наблюдение за соответствующим иммунным ответом у субъектов. Например, количество для вакцинации субъекта-человека можно определить посредством экстраполирования результата тестирования на животных. Кроме того, дозу можно определить эмпирически.

[00209] В некоторых вариантах осуществления вакцина или поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) может представлять собой однократную дозу

объемом 0,5 мл, составленную таким образом, чтобы она содержала от приблизительно 1 мкг до приблизительно 5 мкг каждого капсульного полисахарида; от приблизительно 20 мкг до приблизительно 85 мкг белка-носителя (например, CRM<sub>197</sub>) и необязательно от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 0,5 мг адьюванта в виде элементарного алюминия. В некоторых вариантах осуществления вакцина или поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) может представлять собой однократную дозу объемом 0,5 мл, составленную таким образом, чтобы она содержала от приблизительно 2 мкг до приблизительно 2,5 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением серотипа 6В и необязательно серотипа 3, который(которые) присутствует(присутствуют) в количестве, составляющем от приблизительно 4 мкг до приблизительно 5 мкг; от приблизительно 40 мкг до приблизительно 75 мкг белка-носителя (например, CRM<sub>197</sub>) и необязательно от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 0,25 мг адьюванта в виде элементарного алюминия.

[00210] В некоторых вариантах осуществления вакцина или поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) может представлять собой однократную дозу объемом 0,5 мл, составленную таким образом, чтобы она содержала от приблизительно 1 мкг до приблизительно 5 мкг каждого капсульного полисахарида; от приблизительно 1 мкг до приблизительно 30 мкг первого белка-носителя (например, TT); от приблизительно 20 мкг до приблизительно 100 мкг второго белка-носителя (например, CRM<sub>197</sub>) и необязательно от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 0,5 мг адьюванта в виде элементарного алюминия.

[00211] В некоторых вариантах осуществления вакцина или поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) может представлять собой однократную дозу объемом 0,5 мл, составленную таким образом, чтобы она содержала от приблизительно 2 мкг до приблизительно 2,5 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением серотипа 6В и необязательно серотипа 3, который(которые) присутствует(присутствуют) в количестве, составляющем от

приблизительно 4 мкг до приблизительно 5 мкг; от приблизительно 2 мкг до приблизительно 25 мкг первого белка-носителя (например, TT); от приблизительно 40 мкг до приблизительно 100 мкг второго белка-носителя (например, CRM<sub>197</sub>) и необязательно от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 0,25 мг адьюванта в виде элементарного алюминия.

[00212] В некоторых вариантах осуществления вакцина или поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) может представлять собой однократную дозу объемом 0,5 мл, составленную таким образом, чтобы она содержала приблизительно 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением серотипа 6В, который присутствует в количестве, составляющем приблизительно 4,4 мкг.

[00213] В некоторых вариантах осуществления вакцина или поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) может представлять собой однократную дозу объемом 0,5 мл, составленную таким образом, чтобы она содержала от приблизительно 2 мкг до приблизительно 2,5 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением вплоть до шести капсульных полисахаридов, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 9V, 19А и 19F, каждый из которых присутствует в количестве, составляющем от приблизительно 4 мкг до приблизительно 5 мкг. В одном варианте осуществления указанные до шести капсульных полисахаридов, присутствующие в количестве, составляющем от приблизительно 4 мкг до приблизительно 5 мкг, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 4, 6В, 9V, 19А и 19F. В других вариантах осуществления вакцина или поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) может представлять собой однократную дозу объемом 0,5 мл, составленную таким образом, чтобы она содержала приблизительно 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением до шести капсульных полисахаридов, выбранных из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 4, 5, 6В, 9V, 19А и 19F, каждый из которых присутствует в количестве, составляющем приблизительно 4,4 мкг. В одном варианте осуществления указанные до шести капсульных

полисахаридов, присутствующие в количестве, составляющем приблизительно 4,4 мкг, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 4, 6В, 9V, 19А и 19F.

[00214] В некоторых вариантах осуществления вакцина или поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) может представлять собой однократную дозу объемом 0,5 мл, составленную таким образом, чтобы она содержала от приблизительно 2 мкг до приблизительно 2,5 мкг капсульных полисахаридов серотипов 1, 5, 6А, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и/или 35В, и от приблизительно 4 мкг до приблизительно 5 мкг капсульных полисахаридов серотипов 3, 4, 6В, 9V, 19А и/или 19F.

[00215] В определенных вариантах осуществления вакцина или поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) может представлять собой однократную дозу объемом 0,5 мл, составленную таким образом, чтобы она содержала от приблизительно 2 мкг до приблизительно 2,5 мкг капсульных полисахаридов серотипов 1, 4, 5, 6А, 7F, 8, 9V, 9N, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и/или 35В, и от приблизительно 4 мкг до приблизительно 5 мкг капсульных полисахаридов серотипов 3 и/или 6В.

[00216] В некоторых вариантах осуществления вакцина или поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) может представлять собой однократную дозу объемом 0,5 мл, составленную таким образом, чтобы она содержала от приблизительно 2 мкг до приблизительно 2,5 мкг капсульных полисахаридов серотипов 1, 4, 5, 6А, 7F, 8, 9V, 9N, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и/или 35В, и от приблизительно 4 мкг до приблизительно 5 мкг капсульных полисахаридов серотипа 6В, и/или от приблизительно 8 мкг до приблизительно 9 мкг капсульных полисахаридов серотипа 3, и более предпочтительно приблизительно 8,8 мкг капсульных полисахаридов серотипа 3.

[00217] В определенных вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25,

PCV-26 или PCV-27) или содержащая ее вакцина дополнительно содержит хлорид натрия и натрий-сукцинатный буфер в качестве вспомогательных веществ.

[00218] В некоторых вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) может быть составлена в виде жидкого состава, где каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов из серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и/или 35В конъюгирован с белком-носителем (например, CRM<sub>197</sub>). Каждая доза объемом 0,5 мл может быть составлена в виде жидкости, содержащей приблизительно 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением серотипа 6В в количестве приблизительно 4,4 мкг; от приблизительно 40 мкг до приблизительно 100 мкг белка-носителя (например, CRM<sub>197</sub>); от приблизительно 0,125 мг до 0,250 мг элементарного алюминия (от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 1,2 мг фосфата алюминия) в качестве адъюванта и хлорид натрия и натрий-сукцинатный буфер в качестве вспомогательных веществ.

[00219] В некоторых вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) содержит два или более белков-носителей (смешанный носитель). Например, в определенных вариантах осуществления по меньшей мере два серотипа конъюгированы с первым белком-носителем (например, со столбнячным анатоксином), и оставшиеся серотипы конъюгированы со вторым белком-носителем (например, CRM<sub>197</sub>). В определенных вариантах осуществления два капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3 и 5. В определенных вариантах осуществления два капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 5, 15В и 22F. Также может являться возможной конъюгация одного или более из серотипов 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15С, 18С, 19А, 19F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и/или 35В со столбнячным анатоксином вместо или в дополнение к серотипам, выбранным из серотипов 1, 3, 5, 15В и 22F. Другие серотипы, представляющие интерес, могут быть конъюгированы со столбнячным анатоксином.

[00220] В некоторых вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) может быть составлена в виде жидкого состава, где каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 1 и 3 конъюгирован с ТТ, и капсульные полисахариды из серотипов 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и/или 35В конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. Каждая доза объемом 0,5 мл может быть составлена в виде жидкости, содержащей приблизительно 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением серотипа 6В в количестве приблизительно 4,4 мкг; от приблизительно 2 мкг до приблизительно 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 1 и 3) и приблизительно от 40 мкг до приблизительно 100 мкг белка-носителя CRM<sub>197</sub>; от приблизительно 0,125 мг до 0,250 мг элементарного алюминия (от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 1,2 мг фосфата алюминия) в качестве адьюванта и хлорид натрия и натрий-сукцинатный буфер в качестве вспомогательных веществ.

[00221] В некоторых вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем может быть составлена в виде жидкого состава, где каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 1 и 5 конъюгирован с ТТ, и капсульные полисахариды из серотипов 3, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и/или 35В конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. В одном варианте осуществления каждая доза объемом 0,5 мл может быть составлена в виде жидкости, содержащей приблизительно 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением серотипа 6В в количестве приблизительно 4,4 мкг и серотипа 3 в количестве приблизительно 2,2-8,8 мкг; от приблизительно 2 мкг до приблизительно 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 1 и 5) и от приблизительно 40 мкг до приблизительно 100 мкг белка-носителя CRM<sub>197</sub>; от приблизительно 0,125 мг до 0,250 мг адьюванта в виде элементарного алюминия (от приблизительно 0,5 мг до 1,2 мг фосфата алюминия) и хлорид натрия и натрий-сукцинатный буфер в качестве вспомогательных веществ. В определенных вариантах осуществления серотип 3 присутствует в количестве, составляющем приблизительно

2,2 мкг. В других вариантах осуществления серотип 3 присутствует в количестве, составляющем приблизительно 4,4 мкг. В других вариантах осуществления серотип 3 присутствует в количестве, составляющем приблизительно 8,8 мкг. В еще одном варианте осуществления каждая доза объемом 0,5 мл может быть составлена в виде жидкости, содержащей приблизительно 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением до шести капсульных полисахаридов, выбранных из группы, состоящей из серотипа 1, 3, 4, 5, 6В, 9V, 19А и 19F, в количестве приблизительно 4,4 мкг; от приблизительно 2 мкг до приблизительно 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 1 и 5) и от приблизительно 40 мкг до приблизительно 100 мкг белка-носителя CRM<sub>197</sub>; от приблизительно 0,125 мг до 0,250 мг адьюванта в виде элементарного алюминия (от 0,5 мг до 1,2 мг фосфата алюминия) и хлорид натрия и натрий-сукцинатный буфер в качестве вспомогательных веществ. В одном варианте осуществления указанные до шести капсульных полисахаридов в количестве приблизительно 4,4 мкг выбраны из группы, состоящей из серотипа 1, 3, 4, 6В, 9V, 19А и 19F. В другом варианте осуществления каждая доза объемом 0,5 мл может быть составлена в виде жидкости, содержащей приблизительно 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением серотипов 3, 4, 6В, 9V, 19А и 19F, в количестве приблизительно 4,4 мкг; от приблизительно 2 мкг до приблизительно 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 1 и 5) и от приблизительно 40 мкг до приблизительно 100 мкг белка-носителя CRM<sub>197</sub>; от приблизительно 0,125 мг до 0,250 мг адьюванта в виде элементарного алюминия (от 0,5 мг до 1,2 мг фосфата алюминия) и хлорид натрия и натрий-сукцинатный буфер в качестве вспомогательных веществ. В другом варианте осуществления каждая доза объемом 0,5 мл может быть составлена в виде жидкости, содержащей приблизительно 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением серотипов 3 и 4 в количестве приблизительно 4,4 мкг; от приблизительно 2 мкг до приблизительно 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 1 и 5) и от приблизительно 40 мкг до приблизительно 100 мкг белка-носителя CRM<sub>197</sub>; от приблизительно 0,125 мг до 0,250 мг адьюванта в виде элементарного алюминия (от 0,5 мг до 1,2 мг фосфата алюминия) и хлорид натрия и натрий-сукцинатный буфер в качестве вспомогательных веществ.

[00222] В некоторых вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем может быть составлена в виде жидкого состава, где каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 3 и 5 конъюгирован с ТТ, и капсульные полисахариды из серотипов 1, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. Каждая доза объемом 0,5 мл может быть составлена в виде жидкости, содержащей приблизительно 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением 6В в количестве приблизительно 4,4 мкг; от приблизительно 2 мкг до приблизительно 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 3 и 5) и от приблизительно 40 мкг до приблизительно 100 мкг белка-носителя CRM<sub>197</sub>; от приблизительно 0,125 мг до 0,250 мг адьюванта в виде элементарного алюминия (от приблизительно 0,5 мг до 1,2 мг фосфата алюминия) и хлорид натрия и натрий-сукцинатный буфер в качестве вспомогательных веществ.

[00223] В некоторых вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем может быть составлена в виде жидкого состава, где по меньшей мере два из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 1, 3 и 5 и обоих из серотипов 15В и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, и капсульные полисахариды из остальных серотипов конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

[00224] В некоторых вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем может быть составлена в виде жидкого состава, где каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 1, 5, 15В и 22F конъюгирован со столбнячным анатоксином, и капсульные полисахариды из серотипов 3, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15С, 18С, 19А, 19F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. Каждая доза объемом 0,5 мл может быть составлена в виде жидкости, содержащей приблизительно 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением 6В в количестве приблизительно 4,4 мкг; от приблизительно 2 мкг до приблизительно 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 3 и 5) и от приблизительно 40 мкг до приблизительно 100 мкг белка-носителя CRM<sub>197</sub>; от приблизительно 0,125 мг до

0,250 мг адьюванта в виде элементарного алюминия (от приблизительно 0,5 мг до 1,2 мг фосфата алюминия) и хлорид натрия и натрий-сукцинатный буфер в качестве вспомогательных веществ.

[00225] В некоторых вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем может быть составлена в виде жидкого состава, где каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 1, 3, 15В и 22F конъюгирован со столбнячным анатоксином, и капсульные полисахариды из серотипов 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15С, 18С, 19А, 19F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. Каждая доза объемом 0,5 мл может быть составлена в виде жидкости, содержащей приблизительно 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением 6В в количестве приблизительно 4,4 мкг; от приблизительно 2 мкг до приблизительно 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 3 и 5) и от приблизительно 40 мкг до приблизительно 100 мкг белка-носителя CRM<sub>197</sub>; от приблизительно 0,125 мг до 0,250 мг адьюванта в виде элементарного алюминия (от приблизительно 0,5 мг до 1,2 мг фосфата алюминия) и хлорид натрия и натрий-сукцинатный буфер в качестве вспомогательных веществ.

[00226] В некоторых вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем может быть составлена в виде жидкого состава, где каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 3, 5, 15В и 22F конъюгирован со столбнячным анатоксином, и капсульные полисахариды из серотипов 1, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15С, 18С, 19А, 19F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В конъюгированы с CRM<sub>197</sub>. Каждая доза объемом 0,5 мл может быть составлена в виде жидкости, содержащей приблизительно 2,2 мкг каждого капсульного полисахарида, за исключением 6В в количестве приблизительно 4,4 мкг; от приблизительно 2 мкг до приблизительно 25 мкг белка-носителя ТТ (только для серотипов 3 и 5) и от приблизительно 40 мкг до приблизительно 100 мкг белка-носителя CRM<sub>197</sub>; от приблизительно 0,125 мг до 0,250 мг адьюванта в виде элементарного алюминия (от приблизительно 0,5 мг до 1,2 мг фосфата алюминия) и хлорид натрия и натрий-сукцинатный буфер в качестве вспомогательных веществ.

[00227] В некоторых вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем может быть составлена в виде жидкого состава, где каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 1 и 5 конъюгирован с ТТ.

[00228] В некоторых вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем может быть составлена в виде жидкого состава, где каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 3 и 5 конъюгирован с ТТ.

[00229] В некоторых вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем может быть составлена в виде жидкого состава, где каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 1 и 3 конъюгирован с ТТ.

[00230] В некоторых вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем может быть составлена в виде жидкого состава, где каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 1, 5, 15В и 22F конъюгирован с ТТ.

[00231] В некоторых вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем может быть составлена в виде жидкого состава, где каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 3, 5, 15В и 22F конъюгирован с ТТ.

[00232] В некоторых вариантах осуществления поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата со смешанным носителем может быть составлена в виде жидкого состава, где каждый из пневмококковых капсульных полисахаридов серотипов 1, 3, 15В и 22F конъюгирован с ТТ.

[00233] В некоторых вариантах осуществления указанным жидким составом может быть наполнен шприц, содержащий однократную дозу, без добавления консерванта. После встряхивания жидкий состав становится вакциной, которая представляет собой гомогенную белую суспензию, готовую для внутримышечного введения.

[00234] Поливалентную композицию на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) можно вводить в виде однократной инъекции или как часть серии иммунизаций. Например, поливалентную композицию на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) можно вводить 2, 3, 4 или более раз с соответствующим образом разделенными интервалами времени, например, с интервалом в 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления поливалентную композицию на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) вводят младенцу 4 раза в пределах первых 15 месяцев жизни, в том числе, например, в возрасте приблизительно 2, 3, 4 и 12-15 месяцев; в возрасте приблизительно 3, 4, 5 и 12-15 месяцев; или в возрасте приблизительно 2, 4, 6 и 12-15 месяцев. Данную первую дозу можно вводить уже в возрасте 6 недель. В другом варианте осуществления поливалентную композицию на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) вводят младенцу 3 раза в пределах первых 15 месяцев жизни, в том числе, например, в возрасте приблизительно 2, 4 и 11-12 месяцев.

[00235] Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) также может включать один или более белков из *Streptococcus pneumoniae*. Примеры белков *Streptococcus pneumoniae*, подходящих для включения, включают таковые, идентифицированные в международной заявке на патент WO 02/083855, а также белки, описанные в международной заявке на патент WO 02/053761.

[00236] Поливалентную композицию на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) можно вводить субъекту посредством одного или более путей введения, известных специалисту в данной области, таких как парентеральный, чрескожный или чресслизистый, интраназальный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутрикожный, внутривенный или подкожный путь введения, и она может быть составлена соответствующим образом. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) может

быть составлена таким образом, чтобы она являлась совместимой с ее предполагаемым путем введения.

[00237] В некоторых вариантах осуществления поливалентную композицию на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) можно вводить в виде жидкого состава посредством внутримышечной, внутрибрюшинной, подкожной, внутривенной, внутриартериальной или чрескожной инъекции или посредством введения через слизистую дыхательных путей. Поливалентные композиции на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) могут быть составлены в жидкой форме или в лиофилизированной форме. В некоторых вариантах осуществления инъекционные композиции получают в традиционных формах, либо в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, либо в виде эмульсий. В некоторых вариантах осуществления инъекционные растворы и суспензии получают из стерильных порошков или гранул. Общие соображения по составлению и изготовлению фармацевтических средств для введения данными путями можно найти, например, в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995; включенной в данный документ посредством ссылки. В настоящее время для доставки терапевтических средств непосредственно в легкие и дыхательную систему чаще всего используют пероральный или назальный путь введения спрея или аэрозоля (например, посредством ингаляции). В некоторых вариантах осуществления поливалентную композицию на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) вводят с применением устройства, которое доставляет отмеренную дозу композиции. Подходящие устройства для применения при доставке описанных в данном документе фармацевтических композиций для внутрикожного введения включают устройства с короткой иглой, такие как описанные в патенте США № 4886499, патенте США № 5190521, патенте США № 5328483, патенте США № 5527288, патенте США № 4270537, патенте США № 5015235, патенте США № 5141496, патенте США № 5417662 (все из которых включены в данный документ посредством ссылки). Композиции для внутрикожного введения также можно вводить с помощью устройств, которые ограничивают

эффективную длину проникновения иглы в кожу, таких как описанные в WO 1999/34850, включенной в данный документ посредством ссылки, и их функциональных эквивалентов. Также подходят устройства для безыгольного впрыскивания, которые доставляют жидкие вакцины в дерму посредством жидкоструйного инжектора или посредством иглы, которая прокалывает роговой слой и создает струю, которая достигает дермы. Устройства для безыгольного впрыскивания описаны, например, в патенте США № 5480381, патенте США № 5599302, патенте США № 5334144, патенте США № 5993412, патенте США № 5649912, патенте США № 5569189, патенте США № 5704911, патенте США № 5383851, патенте США № 5893397, патенте США № 5466220, патенте США № 5339163, патенте США № 5312335, патенте США № 5 503 627, патенте США № 5064413, патенте США № 5520639, патенте США № 4596556, патенте США № 4790824, патенте США № 4941880, патенте США № 4940460, WO 1997/37705 и WO 1997/13537 (все из которых включены в данный документ посредством ссылки). Также подходят баллистические устройства для доставки порошка/частиц, в которых используется сжатый газ для ускоренного введения вакцины в форме порошка через внешние слои кожи в дерму. Кроме того, в классическом способе внутрикожного введения по Манту можно применять традиционные шприцы.

[00238] Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Примеры масла включают растительное масло или масло животного происхождения, арахисовое масло, соевое масло, оливковое масло, подсолнечное масло, масло, полученное из печени, синтетическое масло, такое как пиронафт, и липиды, полученные из молока или яиц. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе физиологический раствор и буферные среды. Среда-носители для парентерального введения включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или нелетучие масла. Среда-носители для внутривенного введения включают растворы для восполнения жидкости и питательных веществ, растворы для восполнения электролитов (например, таковые на

основе раствора Рингера с декстрозой) и т. п. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие средства и инертные газы и т. п.

[00239] Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) может быть составлена в форме однодозового флакона, многодозового флакона или предварительно заполненного шприца. Фармацевтически приемлемый носитель для жидкого состава включает водный или неводный растворитель, суспензию, эмульсию или масло. Композиция может быть изотонической, гипертонической или гипотонической. Однако предпочтительным является, чтобы композиция для инфузии или инъекции являлась по сути изотонической. Таким образом, изотоничность или гипертоничность могут являться преимуществом для хранения композиции. Если композиция является гипертонической, композицию можно разбавить до изотонического состояния перед введением. Средство, регулирующее тоничность, может представлять собой ионное средство, регулирующее тоничность, такое как соль, или неионное средство, регулирующее тоничность, такое как углевод. Ионное средство, регулирующее тоничность, включает без ограничения хлорид натрия, хлорид кальция, хлорид калия и хлорид магния. Неионное средство, регулирующее тоничность, включает без ограничения сорбит и глицерин. Предпочтительным является включение по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого буфера. Например, если композиция представляет собой композицию для инфузии или инъекции, предпочтительно составлять ее в буфере с буферной емкостью от pH 4 до pH 10, например, от pH 5 до pH 9 или от pH 6 до pH 8. Буфер может быть выбран из буферов, являющихся подходящими согласно фармакопее Соединенных Штатов Америки (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, диэтанолламин, глицин, триэтанолламин и TRIS.

[00240] Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) может содержать поверхностно-активное средство. Примеры поверхностно-активного средства включают без ограничения полиоксиэтиленовый сложный эфир сорбитана (как правило, называемый Tween), в частности, полисорбат 20 и полисорбат 80; сополимеры (такие как DOWFAX) этиленоксида (EO), пропиленоксида (PO), бутиленоксида (BO); октоксинолы с различным числом повторов группы этокси(окси-1,2-этандиол), в частности, октоксинол-9 (Triton-100); этилфеноксиполиэтоксиэтанол (IGEPAL CA-630/NP-40); фосфолипид, такой как лецитин; нонилфенолэтоксилат, такой как TERGITOL серии NP; полиоксиэтиленовый эфир жирной кислоты, полученный из лаурилового, цетилового, стеарилового, олеилового спирта (поверхностно-активное вещество Brij), в частности, монолауриловый эфир триэтиленгликоля (Brij 30); эфир сорбитана, известный как SPAN, в частности, триолеат сорбитана (Span 85) и монолаурат сорбитана.

[00241] Можно применять смеси поверхностно-активных средств, такие как Tween 80/Span 85. Также является подходящей комбинация полиоксиэтиленового сложного эфира сорбитана, например, Tween 80, и октоксинола, например, Triton X-100. Комбинация Laureth 9 и Tween и/или октоксинола также обладает преимуществом. Предпочтительно количество включенного полиоксиэтиленового сложного эфира сорбитана (такого как Tween 80) может составлять от 0,01% до 1% (вес/об.), от 0,01% до 0,1% (вес/об.), от 0,01% до 0,05% (вес/об.) или приблизительно 0,02%; количество включенного октилфеноксиполиоксиэтанола или нонилфеноксиполиоксиэтанола (такого как Triton X-100) может составлять от 0,001% до 0,1% (вес/об.), в частности, от 0,005% до 0,02%; и количество включенного полиоксиэтиленового эфира (такого как Laureth 9) может составлять от 0,1% до 20% (вес/об.), возможно от 0,1% до 10%, в частности, от 0,1% до 1% или приблизительно 0,5%.

[00242] В некоторых вариантах осуществления поливалентную композицию на основе пневмококкового конъюгата (например, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 или PCV-27) можно доставлять посредством системы с контролируемым высвобождением. Например, для введения можно применять внутривенную инфузию,

трансдермальный пластырь, липосомы или другие пути введения. В одном аспекте можно применять макромолекулы, такие как микросфера или имплант.

[00243] Вышеизложенное раскрытие в целом описывает настоящее изобретение. Более полное понимание можно получить при обращении к нижеследующим конкретным примерам. Данные примеры описаны исключительно в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

### **Примеры**

#### **[00244] Пример 1. Получение капсульных полисахаридов *S. pneumoniae***

[00245] Культивирование *S. pneumoniae* и очистку капсульных полисахаридов осуществляли способом, известным специалисту в данной области. Серотипы *S. pneumoniae* получали из Американской коллекции типовых культур (АТСС) (серотип 1: АТСС № 6301; серотип 3: АТСС № 6303; серотип 4: АТСС № 6304; серотип 5: АТСС № 6305; серотип 6А: АТСС № 6306; серотип 6В: АТСС № 6326; серотип 7F: АТСС № 10351; серотип 9N: АТСС № 6309; серотип 9V: АТСС № 10368; серотип 14: АТСС № 6314; серотип 18С: АТСС № 10356; серотип 19А: АТСС № 10357; серотип 19F: АТСС № 6319; серотип 23В: АТСС № 10364; серотип 23F: АТСС № 6323). Для серотипов 8, 10А, 11А, 12F, 15А, 15В, 15С, 22F, 23А, 23В, 24F, 33F и 35В применяли внутренние штаммы компании или штаммы, полученные из других источников, однако можно применять любой общедоступный штамм. *S. pneumoniae* характеризовались наличием капсул и неподвижностью, грамположительностью, диплококками ланцетовидной формы и альфа-гемолизом в среде с кровяным агаром. Серотипы идентифицировали посредством реакции набухания с применением специфичной антисыворотки (патент США № 5847112).

#### **[00246] Получение клеточных банков**

[00247] Получали несколько поколений посевного материала с целью размножения штаммов и удаления компонентов животного происхождения (поколения F1, F2 и F3). Получали два дополнительных поколения посевного материала. Первое дополнительное поколение культивировали из флакона с F3, и следующее поколение культивировали из флакона с первым дополнительным поколением. Флаконы с

посевным материалом хранили замороженными (при температуре ниже  $-70^{\circ}\text{C}$ ) с синтетическим глицерином в качестве средства для криоконсервации. Для получения клеточных банков все культуры выращивали в среде на основе сои. Перед замораживанием клетки концентрировали центрифугированием, отработанную среду удаляли и клеточные осадки повторно суспендировали в свежей среде, содержащей средство для криоконсервации (такое как синтетический глицерин).

#### **[00248] Культивирование и сбор**

[00249] Культуры из рабочего клеточного банка инокулировали в посевные колбы, содержащие среду на основе сои, и культивировали. После достижения целевой оптической плотности (поглощения) посевную колбу применяли для инокуляции ферментера, содержащего среду на основе сои. Культивирование завершали, когда начинали сохраняться постоянные значения оптической плотности. После завершения культивирования к культуре добавляли дезоксихолат натрия для лизирования клеток. Полученное содержимое ферментера охлаждали, и индуцировали осаждение белка. Затем смесь центрифугировали с удалением осажденных белков и клеточного дебриса.

#### **[00250] Очистка**

[00251] Раствор, полученный после центрифугирования, фильтровали через глубинный фильтр с удалением белков и клеточного дебриса, которые не были осаждены при центрифугировании. Фильтрат концентрировали на мембране с отсечкой по 100 кДа MW, и концентрат подвергали диафильтрации с помощью 10 объемов 25 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7,2) с получением образца. Образец фильтровали со сбором надосадочной жидкости, полученные из нее полисахариды осаждали и фильтровали. Фильтрат концентрировали на мембране с отсечкой по 30 кДа, и концентрат подвергали диафильтрации с применением приблизительно 10 объемов воды тройной очистки. После осуществления диафильтрации оставшийся раствор фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм. Фильтрат подвергали внутрипроизводственному контрольному тестированию (внешний вид, остаточные белки, остаточные нуклеиновые кислоты, эндотоксины, показатели молекулярной массы и общее количество полисахаридов). Концентрат подвергали стерилизующей фильтрации и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

[00252] **Пример 2. Получение конъюгата капсульного полисахарида *S. pneumoniae* с белком-носителем (серотипы 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F)**

[00253] Полисахариды различных серотипов активировали следуя различным путям, а затем конъюгировали с белком-носителем, CRM<sub>197</sub> или ТТ. В частности, поливалентный конъюгат пневмококковый полисахарид-белок, содержащий капсульные полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, получали посредством конъюгирования каждого из капсульных полисахаридов для серотипов 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F с CRM<sub>197</sub>, и посредством конъюгирования каждого из капсульных полисахаридов серотипов 1 и 5 с ТТ, как раскрыто ниже. Конъюгирование серотипов 15A, 15C, 23A, 23B, 24F и 35B с CRM<sub>197</sub> описано в примерах 3-8. Другой поливалентный конъюгат пневмококковый полисахарид-белок, содержащий капсульные полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B, получали посредством конъюгирования каждого из капсульных полисахаридов серотипов 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F и 33F с CRM<sub>197</sub>, и посредством конъюгирования каждого из капсульных полисахаридов серотипов 1, 5, 15B и 22F с ТТ, как раскрыто ниже.

[00254] Предполагается, что вместо или в качестве дополнения к серотипам 1 или 5 серотип 3 может быть конъюгирован с ТТ, как раскрыто в WO 2019/152925. В зависимости от размера нативного серотипа способ активации может включать уменьшение размера каждого капсульного полисахарида до целевой молекулярной массы, химическую активацию и замену буфера посредством ультрафильтрации.

[00255] Полисахариды различных серотипов активировали следуя различным путям, а затем конъюгировали с белком-носителем, CRM<sub>197</sub> или ТТ. В частности, конъюгаты получали посредством конъюгирования каждого из капсульных полисахаридов всех серотипов, за исключением 15B и 22F, с CRM<sub>197</sub>, и посредством конъюгирования каждого из капсульных полисахаридов серотипов 1, 3, 5, 15B и 22F с ТТ. В зависимости от размера нативного серотипа способ активации может включать уменьшение размера каждого капсульного полисахарида до целевой молекулярной

массы, химическую активацию и замену буфера посредством ультрафильтрации. Конъюгаты очищали с применением ультрафильтрации, и в конечном итоге фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм. Параметры способа, такие как рН, температура, концентрация и время, представляли собой следующие параметры.

[00256] (1) Способ активации

[00257] Стадия 1. Гидролиз

[00258] Восстановительное аминирование представляет собой известный способ конъюгации полимеров, где между первичной аминогруппой ( $-NH_2$ ) белка и альдегидной группой сахара образуется амидная связь. Альдегидные группы добавляли к пневмококковому капсульному полисахариду для содействия конъюгации с белком-носителем. Вицинальную диольную структуру моносахарида можно окислять периодатом натрия ( $NaIO_4$ ) с образованием альдегидных групп. Капсульные полисахариды из серотипов 1, 3, 4, 6A, 8, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 22F и 33F подвергали предварительной обработке, как указано ниже.

[00259] В случае серотипа 1 к раствору капсульного полисахарида добавляли гидроксид натрия (при конечной концентрации основания, составляющей 0,05 М), и раствор инкубировали при  $50 \pm 2^\circ C$ . Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от приблизительно  $21^\circ C$  до приблизительно  $25^\circ C$ , и к нему добавляли хлористоводородную кислоту до достижения конечного значения рН  $6,0 \pm 0,1$ , тем самым останавливая гидролиз.

[00260] В случае серотипа 3, 8, 11A и 15B к раствору капсульного полисахарида добавляли хлористоводородную кислоту (при конечной концентрации кислоты, составляющей 0,01 М), и раствор инкубировали при  $60 \pm 2^\circ C$ . Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от приблизительно  $21^\circ C$  до приблизительно  $25^\circ C$ , и к нему добавляли 0,1 М фосфат натрия до достижения конечного значения рН  $6,0 \pm 0,1$ , тем самым останавливая гидролиз.

[00261] В случае серотипа 4 к раствору капсульного полисахарида добавляли хлористоводородную кислоту (при конечной концентрации кислоты, составляющей 0,1 М), и раствор инкубировали при  $45 \pm 2^\circ C$ . Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от приблизительно  $21^\circ C$  до приблизительно  $25^\circ C$ , и к нему добавляли 1 М

фосфат натрия до достижения конечного значения рН  $6,0 \pm 0,1$ , тем самым останавливая гидролиз.

[00262] В случае серотипа 6А к раствору капсульного полисахарида добавляли ледяную уксусную кислоту (при конечной концентрации кислоты, составляющей 0,1 М), и раствор инкубировали при  $60 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от приблизительно  $21^\circ\text{C}$  до приблизительно  $25^\circ\text{C}$ , и к нему добавляли 1 М гидроксид натрия до достижения конечного значения рН  $6,0 \pm 0,1$ , тем самым останавливая гидролиз.

[00263] В случае серотипа 12F к раствору капсульного полисахарида добавляли хлористоводородную кислоту (при конечной концентрации кислоты, составляющей 0,01 М), и раствор инкубировали при  $70 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от приблизительно  $21^\circ\text{C}$  до приблизительно  $25^\circ\text{C}$ , и к нему добавляли 0,1 М фосфат натрия до достижения конечного значения рН раствора, составляющего  $6,0 \pm 0,1$ , тем самым останавливая гидролиз.

[00264] В случае серотипов 14 и 18С к раствору капсульного полисахарида добавляли ледяную уксусную кислоту (при конечной концентрации кислоты, составляющей 0,2 М), и раствор инкубировали при  $94 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от приблизительно  $21^\circ\text{C}$  до приблизительно  $25^\circ\text{C}$ , и к нему добавляли 1 М фосфат натрия, таким образом, чтобы конечное значение рН раствора составляло  $6,0 \pm 0,1$ , тем самым останавливая гидролиз.

[00265] В случае серотипов 22F и 33F к раствору капсульного полисахарида добавляли хлористоводородную кислоту (при конечной концентрации кислоты, составляющей 0,01 М), и раствор инкубировали при  $60 \pm 2^\circ\text{C}$ . Затем раствор охлаждали до температуры в диапазоне от приблизительно  $21^\circ\text{C}$  до приблизительно  $25^\circ\text{C}$ , и к нему добавляли 0,1 М фосфат натрия до достижения конечного значения рН  $6,0 \pm 0,1$ , таким образом останавливая гидролиз.

[00266] Каждый из капсульных полисахаридов разбавляли в воде для инъекции (WFI), ацетате натрия и фосфате натрия до достижения конечной концентрации, составляющей от приблизительно 1,0 мг/мл до приблизительно 2,0 мг/мл.

[00267] Стадия 2. Осуществление реакции с периодатом

[00268] Молярные эквиваленты периодата натрия, требуемые для активации пневмококковых сахаридов, определяли исходя из молярной массы повторяющихся звеньев. Обеспечивали протекание реакции окисления при интенсивном перемешивании в течение 16-20 часов при температуре от 21°C до 25°C для всех серотипов, за исключением 1, 7F и 19F, для которых температура составляла 10°C или меньше. Для содействия поддержанию постоянного и стабильного получения конъюгатов в ходе способа конъюгации для каждого серотипа устанавливают целевой диапазон уровней степени окисления (Do). Предпочтительный целевой диапазон уровней Do для каждого серотипа показан в таблице 1 и таблице 2.

Таблица 1. Диапазон значений Do для всех серотипов, подлежащих конъюгации с CRM<sub>197</sub>

<b>Серотип</b>	<b>Диапазон значений Do</b>	<b>Серотип</b>	<b>Диапазон значений Do</b>
Серотип 1	4-10	Серотип 10A	1-12
Серотип 3	2-8	Серотип 11A	1-15
Серотип 4	1-5	Серотип 12F	1-9
Серотип 6A	5-15	Серотип 14	6-13
Серотип 6B	7-13	Серотип 18C	6-14
Серотип 7F	2-8	Серотип 19A	20-40
Серотип 8	1-17	Серотип 19F	20-40
Серотип 9N	5-10	Серотип 23F	6-14
Серотип 9V	4-9	Серотип 33F	1-15

Таблица 2. Диапазон значений Do для серотипов 1, 3, 5, 15В и 22F, подлежащих конъюгации с ТТ

Серотип	Диапазон значений Do	Серотип	Диапазон значений Do
Серотип 1 (1-ТТ)	1-15	Серотип 15В (15В-ТТ)	1-15
Серотип 3 (3-ТТ)	2-14	Серотип 22F (22F-ТТ)	20-50
Серотип 5 (5-ТТ)	1-15		

#### [00269] Стадия 3. Ультрафильтрация

[00270] Окисленный сахарид концентрировали и подвергали диафильтрации с помощью WFI на ультраfiltре с MWCO 100 кДа (ультрафильтр 30 кДа для серотипа 1 и ультрафильтр 5 кДа для серотипа 18С). Диафильтрацию выполняли с применением 0,9% раствора хлорида натрия для серотипа 1, 0,01 М натрий-ацетатного буфера (рН 4,5) для серотипа 7F и 23F и 0,01 М натрий-фосфатного буфера (рН 6,0) для серотипа 19F. Пермеат отбрасывали, и ретентат фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм.

#### [00271] Стадия 4. Лиофилизация

[00272] В случае капсульных полисахаридов серотипов 3, 4, 5, 8, 9N, 9V, 10A, 14 и 33F, которые подлежали конъюгированию с белком-носителем посредством применения водного растворителя, получали смешанный раствор полисахаридов и белка-носителя без добавления дополнительного количества сахарозы, лиофилизировали и затем хранили при  $-25\pm 5^{\circ}\text{C}$ .

[00273] В случае капсульных полисахаридов серотипов 1 и 18С, которые подлежали конъюгированию с белком-носителем посредством применения водного растворителя, полисахариды и белок-носитель получали по отдельности без добавления дополнительного количества сахарозы, лиофилизировали и затем хранили при  $-25\pm 5^{\circ}\text{C}$ .

[00274] В случае капсульных полисахаридов серотипов 6A, 6B, 7F, 15В-ТТ, 19A, 19F, 22F-ТТ и 23F, которые подлежали конъюгированию с белком-носителем

посредством применения растворителя в виде DMSO, к активированным сахаридам добавляли предварительно определенное количество сахарозы для достижения конечной концентрации сахарозы, составляющей  $5\pm 3\%$  (вес/об.), и образцы получали по отдельности, лиофилизировали и затем хранили при  $-25\pm 5^\circ\text{C}$ .

[00275] В случае капсульного полисахарида серотипа 11А к активированному сахариду добавляли предварительно определенное количество сахарозы для достижения конечной концентрации сахарозы, составляющей  $20\pm 5\%$  (вес/об.), и полисахариды и белок-носитель получали по отдельности, лиофилизировали и затем хранили при  $-25\pm 5^\circ\text{C}$ .

[00276] В случае капсульного полисахарида серотипа 12F к активированному сахариду добавляли предварительно определенное количество сахарозы для достижения конечной концентрации сахарозы, составляющей  $10\pm 5\%$  (вес/об.), и полисахариды и белок-носитель получали по отдельности, лиофилизировали и затем хранили при  $-25\pm 5^\circ\text{C}$ .

#### [00277] (2) Способ конъюгации

[00278] Конъюгацию в водном растворе выполняли для серотипов 1, 3, 4, 5, 8, 9N, 9V, 10A, 14, 18C и 33F, и конъюгацию в DMSO выполняли для серотипов 6A, 6B, 7F, 11A, 12F, 15B-ТТ, 19A, 19F, 22F-ТТ и 23F. Каждый из капсульных полисахаридов конъюгировали с белком-носителем при соотношении от 0,2 до 2:1.

#### [00279] Стадия 1. Растворение

#### [00280] Конъюгация в водном растворе

[00281] В случае серотипов 1, 3, 4, 5, 8, 9N, 9V, 10A, 14, 18C и 33F лиофилизированный образец размораживали и уравнивали при комнатной температуре. Лиофилизированный образец восстанавливали до реакционной концентрации посредством применения раствора натрий-фосфатного буфера при  $23\pm 2^\circ\text{C}$  в соотношении, определенном для каждого серотипа.

#### [00282] Конъюгация в диметилсульфоксиде (DMSO)

[00283] В случае серотипов 6А, 6В, 7F, 11А, 12F, 15В-ТТ, 19А, 19F, 22F-ТТ и 23F лиофилизированный образец размораживали, уравнивали при комнатной температуре и восстанавливали в DMSO.

[00284] Стадия 2. Осуществление реакции конъюгации

#### [00285] Конъюгация в водном растворе

[00286] В случае серотипов 3-ТТ, 4, 5-ТТ, 8, 9N, 9V, 10А, 14, 18С и 33F реакцию конъюгации инициировали посредством добавления раствора цианоборогидрида натрия (100 мг/мл) до 1,0-1,4 моль цианоборогидрида натрия на моль сахара. Однако в случае серотипов 1, 1-ТТ и 3 реакцию конъюгации инициировали посредством добавления раствора цианоборогидрида натрия до 0,5 моль цианоборогидрида натрия на моль сахара.

[00287] Реакционную смесь инкубировали при температуре от 23°C до 37°C в течение 44-106 часов. Температуру и время протекания реакции регулировали в зависимости от серотипа. Затем температуру снижали до 23±2°C, и в реактор добавляли 0,9% раствор хлорида натрия. Добавляли раствор борогидрида натрия (100 мг/мл) для достижения 1,8-2,2 молярного эквивалента борогидрида натрия на моль сахара. Смесь инкубировали при 23±2°C в течение 3-6 часов. Данная процедура обеспечивала восстановление любых непрореагировавших альдегидов, присутствующих на сахарах. Затем смесь разбавляли 0,9% раствором хлорида натрия, и разбавленную смесь для конъюгации фильтровали с применением префильтра с размером пор 0,8 мкм или 0,45 мкм.

#### [00288] Конъюгация в DMSO

[00289] В случае капсульных полисахаридов серотипов 6А, 6В, 7F, 11А, 12F, 15В-ТТ, 19А, 19F, 22F-ТТ и 23F реакцию конъюгации инициировали посредством добавления раствора цианоборогидрида натрия (100 мг/мл) до достижения соотношения 0,8-1,2 молярных эквивалентов цианоборогидрида натрия на один моль активированного сахара. WFI добавляли к реакционной смеси до целевой концентрации 1% (об./об.), и смесь инкубировали в течение 12-26 часов при 23±2°C. Раствор борогидрида натрия в концентрации 100 мг/мл (обычно 1,8-2,2 молярного эквивалента борогидрида натрия на моль активированного сахара) и WFI (целевая

концентрация 5% об./об.) добавляли к реакционной смеси, и смесь инкубировали в течение 3-6 часов при  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . Данная процедура обеспечивала восстановление любых непрореагировавших альдегидов, присутствующих на сахарадах. Затем реакционную смесь разбавляли 0,9% раствором хлорида натрия, и разбавленную смесь для конъюгации фильтровали с применением префильтра с размером пор 0,8 мкм или 0,45 мкм.

#### [00290] Стадия 3. Ультрафильтрация

[00291] Разбавленную смесь конъюгата концентрировали и подвергали диафильтрации на фильтре для ультрафильтрации с MWCO 100 кДа или на фильтре для ультрафильтрации с MWCO 300 кДа с помощью минимум 15 объемов 0,9% раствора хлорида натрия или буфера. Кроме того, композиция и pH буфера, применяемого в способе, варьировали в зависимости от каждого из серотипов.

#### [00292] Стадия 4. Стерилизующая фильтрация

[00293] После ультрафильтрации ретентат подвергали стерилизующей фильтрации (0,2 мкм) и выполняли внутривыпускные контроли (внешний вид, свободный белок, свободный сахарид, распределение размеров молекул, стерильность, содержание сахарада, содержание белка, pH, эндотоксин, остаточный цианид, остаточный DMSO, идентификация сахарада, идентификация TT и идентификация CRM<sub>197</sub>) в отношении отфильтрованных конъюгатов. Конечный концентрат помещали в холодильник и хранили при  $2-8^\circ\text{C}$ .

[00294] Конъюгирование серотипов 15A, 15C, 23A, 23B, 24F и 35B с CRM<sub>197</sub> описано в примерах 3-8.

#### [00295] Пример 3. Получение моноконъюгата серотипа 15A с CRM<sub>197</sub>

[00296] Полисахарид серотипа 15A можно подвергать очистке, как описано выше или по ссылке на способы очистки полисахаридов других серотипов, описанные в WO 2013/191459. Кислотный гидролиз выполняли посредством применения кислоты и нагревания в отношении очищенного полисахарида серотипа 15A, как показано в таблице 1, и затем осуществляли способ активации. Наблюдали, что условия осуществления гидролиза влияли на степень окисления (Do) и молекулярную массу активированного полисахарида, а также на результаты конъюгации. Способ активации

и способ конъюгации осуществляли при одинаковых условиях. Добавляли периодат натрия, и реакцию окисления осуществляли при 21-25°C в течение 16-20 часов. Активированный полисахарид и белок CRM<sub>197</sub> лиофилизировали и суспендировали в DMSO. Активированный полисахарид и белок смешивали в соотношении 1:1, при этом реакционная концентрация составляла 1,5 мг/мл исходя из содержания полисахарида. Добавляли цианоборогидрид с инициацией реакции конъюгации, и смесь инкубировали при 23±2°C в течение 20-28 часов. Смесь с раствором борогидрида инкубировали при 23±2°C в течение 3-6 часов. В ходе данного способа подвергали восстановлению любой непрореагировавший альдегид, присутствующий в сахариде, с последующим концентрированием и диализом с помощью фильтра для ультрафильтрации.

[00297] Таблица 3. Результаты конъюгации 15А в соответствии с условиями осуществления гидролиза

Активированный полисахарид			Конъюгат 15А-CRM <sub>197</sub>			
Условие осуществления гидролиза	Do	M.W. активированного PS (кДа)	Соотношение (PS/PR)	Содержание свободного PS (%)	MSD (%)	MALL S (кДа)
-	13,4	340,8	0,98	76,5	86	30517
0,01 М HCl, 60°C, 60 мин.	11,5	304,5	1,20	79,0	93	25933
0,01 М HCl, 60°C, 90 мин.	10,6	373,4	1,09	76,7	94	25899
0,01 М HCl, 60°C, 120 мин.	10,8	350,8	0,97	73,7	88	24734

Активированный полисахарид			Конъюгат 15A-CRM <sub>197</sub>			
Условие осуществления гидролиза	Do	M.W. активированного PS (кДа)	Соотношение (PS/PR)	Содержание свободного PS (%)	MSD (%)	MALL S (кДа)
0,1 М HCl, 60°C, 45 мин.	16,0	197,0	1,34	76,6		32898
0,1 М HCl, 60°C, 90 мин.	7,9	116,3	0,73	11,4		3924

[00298] Оценивали влияние уровней окисления (Do) на конъюгацию серотипа 15А с CRM<sub>197</sub>. 0,1 М HCl добавляли к полисахариду 15А при 60°C в течение 90 минут. Регулировали количество периодата натрия и осуществляли реакцию окисления при 21-25°C в течение 16-20 часов. Активированный полисахарид и белок CRM<sub>197</sub> лиофилизировали и суспендировали в DMSO. Активированный полисахарид и белок смешивали в соотношении 1:1, при этом реакционная концентрация составляла 1,5 мг/мл исходя из содержания полисахарида, и конъюгацию с применением цианоборогидрида осуществляли, как описано выше при оценке влияния кислотного гидролиза на серотип 15А.

[00299] Таблица 4. Результаты конъюгации 15А в соответствии с уровнями окисления



		ние (PR:PS)		свободно го PS (%)			конъюга ции (%)
4, 7	67,9	2:1	0,44	3,2	69	3631	59,0
		1,75:1	0,46	3,2	71	3616	50,8
		1,5:1	0,52	1,9	71	3834	39,0
		1,25:1	0,66	3,1	61	2027	50,5
		1:1	0,62	3,3	59	1707	40,8

**[00302] Пример 4. Получение моноконъюгата серотипа 15С и CRM<sub>197</sub>**

[00303] Полисахарид серотипа 15С можно подвергать очистке, как описано выше или со ссылкой на способы очистки полисахаридов других серотипов, описанные в WO2013/191459. Регулировали количество периодата натрия, добавляемого к полисахариду 15С, и реакцию окисления осуществляли при 21-25°C в течение 16-20 часов. Активированный полисахарид и белок CRM<sub>197</sub> лиофилизировали и суспендировали в фосфатном буфере. Активированный полисахарид и белок смешивали в соотношении 1:1, при этом реакционная концентрация составляла 15 мг/мл исходя из содержания полисахарида. Добавляли цианоборогидрид с инициацией реакции конъюгации, и смесь инкубировали при 37±2°C в течение 44-52 часов. Смесь с раствором борогидрида инкубировали при 23±2°C в течение 3-6 часов. В ходе данного способа подвергали восстановлению любой непрореагировавший альдегид, присутствующий в сахариде, с последующим концентрированием и диализом с помощью фильтра для ультрафильтрации.

[00304] Таблица 6. Результаты конъюгации 15С в соответствии с уровнями окисления с применением фосфатного буфера

Активированный полисахарид		Конъюгат 15C-CRM <sub>197</sub>				
Do	M.W. активированного PS (кДа)	Соотношение (PS/PR)	Содержание свободного PS (%)	MSD (%)	MALLS (кДа)	Выход продукта конъюгации (%)
35,1	657,6	5,49	31,2	85	1506	67,4
31,1	549,9	5,71	37,8	77	1268	73,2
18,4	678,6	3,24	12,5	89	2885	67,0
16,3	525,3	3,29	17,8	76	1877	68,3
8,9	768,5	1,83	4,6	91	2767	54,8
8,1	510,1	2,26	7,8	78	4833	63,4
5,5	755,7	1,50	1,8	85	3899	17,4
4,5	472,4	1,67	7,2	75	5618	39,2
2,3	471,0	1,36	3,2	62	2610	13,8

[00305] Оценивали влияние уровней окисления (Do) на конъюгацию серотипа 15А и CRM<sub>197</sub> с применением DMSO. Регулировали количество периодата натрия, добавляемого к полисахариду 15С, и реакцию окисления осуществляли при 21-25°С в течение 16-20 часов. Активированный полисахарид и белок CRM<sub>197</sub> лиофилизировали и суспендировали в DMSO. Активированный полисахарид и белок смешивали в соотношении 1:1, при этом реакционная концентрация составляла 1,5 мг/мл исходя из содержания полисахарида. Добавляли цианоборогидрид с инициацией реакции конъюгации, и смесь инкубировали при 23±2°С в течение 20-28 часов. Смесь с раствором борогидрида инкубировали при 23±2°С в течение 3-6 часов. В ходе данного способа подвергали восстановлению любой непрореагировавший альдегид, присутствующий в сахариде, с последующим концентрированием и диализом с помощью фильтра для ультрафильтрации.

[00306] Таблица 7. Результаты конъюгации 15С в соответствии с уровнями окисления с применением DMSO

Активированный полисахарид		Конъюгат 15C-CRM <sub>197</sub>				
Do	M.W. активированного PS (кДа)	Соотношение (PS/PR)	Содержание свободного PS (%)	MSD (%)	MALLS (кДа)	Выход продукта конъюгации (%)
31,1	549,9	1,28	19,8	91	13992	61,6
16,3	525,3	1,16	4,7	86	13733	57,2
8,1	510,1	1,11	2,7	77	6248	18,0
4,5	472,4	1,04	2,5	78	9364	31,0
2,3	471,0	0,87	2,7	80	8105	41,7

**[00307] Пример 5. Получение моноконъюгата серотипа 23А и CRM<sub>197</sub>**

[00308] Полисахарид серотипа 23А можно подвергать очистке, как описано выше или по ссылке на способы очистки полисахаридов других серотипов, описанные в WO 2013/191459. Для оценки влияния степени окисления (Do) на конъюгацию регулировали количество периодата натрия, и осуществляли реакцию окисления при 21-25°C в течение 16-20 часов. Активированный полисахарид и белок CRM<sub>197</sub> лиофилизировали и суспендировали в DMSO. Активированный полисахарид и белок смешивали в соотношении 1:1, при этом реакционная концентрация составляла 1 мг/мл исходя из содержания полисахарида. В качестве альтернативы активированный полисахарид и белок смешивали в соотношении, описанном в таблице 8, при этом реакционная концентрация составляла 1,5 мг/мл исходя из содержания полисахарида. Добавляли цианоборогидрид с инициацией реакции конъюгации, и смесь инкубировали при 23±2°C в течение 20-28 часов. Смесь с раствором борогидрида инкубировали при 23±2°C в течение 3-6 часов. В ходе данного способа подвергали восстановлению любой непрореагировавший альдегид, присутствующий в сахариде, с последующим концентрированием и диализом с помощью фильтра для ультрафильтрации. Влияние различных уровней Do на конъюгацию показано в таблице 8.

[00309] Таблица 8. Результаты конъюгации 23А в соответствии с уровнями окисления

Активированный полисахарид		Конъюгат 23A-CRM <sub>197</sub>				
Do	M.W. активированного PS (кДа)	Соотношение (PS/PR)	Содержание свободного PS (%)	MSD (%)	MALLS (кДа)	Выход продукта конъюгации (%)
23,9	429,0	1,17	32,2	98	6561	27,9
17,3	472,6	1,11	19,7	96	4982	69,9
10,9	640,0	0,97	3,2	92	4335	62,2
9,7	486,8	1,08	21,5	89	2917	55,9
8,8	565,0	1,22	33,7	91	5081	45,3
6,7	489,0	1,01	19,2	87	2635	71,1

[00310] Влияние реакционного соотношения полисахарида и белка на конъюгацию показано в таблице 9.

[00311] Таблица 9. Результаты конъюгации 23A в соответствии с соотношением полисахарида и белка

Активированный полисахарид		Реакционное соотношение	Конъюгат 23A-CRM <sub>197</sub>				
Do	M.W. активированного PS (кДа)	Реакционное соотношение (PR:PS)	Соотношение (PS/PR)	Содержание свободного PS (%)	MSD (%)	MALLS (кДа)	Выход продукта конъюгации (%)
10,9	640,0	2:1	0,49	0	91	11065	36,0
		1,75:1	0,59	0,2	91	8345	52,9
		1,5:1	0,66	1,3	90	4963	26,7
		1,25:1	0,80	1,1	91	5524	52,0
		1:1	0,97	3,2	92	4335	62,2

[00312] Оценивали влияние реакционной концентрации на конъюгацию между серотипом 23А и CRM<sub>197</sub>. Очищенный полисахарид серотипа 23А активировали с помощью перйодата натрия, как описано выше. Активированный полисахарид и белок CRM<sub>197</sub> лиофилизировали и суспендировали в DMSO. Активированный полисахарид и белок смешивали в соотношении 1:1, при этом реакционная концентрация являлась такой, как описано в таблице 10, исходя из содержания полисахарида, и конъюгацию с применением цианоборогидрида осуществляли как описано выше при оценке влияния Do на серотип 23А.

[00313] Таблица 10. Результаты конъюгации 23А в соответствии с концентрациями для осуществления реакции конъюгации

Активированный полисахарид		Реакционная концентрация	Конъюгат 23А-CRM <sub>197</sub>				
Do	M.W. активированного PS (кДа)		Реакционная концентрация (мг/мл)	Соотношение (PS/PR)	Содержание свободного PS (%)	MSD (%)	MALLS (кДа)
8,8	565,0	1,0	1,22	33,7	91	5081	45,3
		1,5	1,27	20,5	93	6612	29,4
		2,0	1,37	35,1	96	4373	19,3
		2,5	2,63	21,3	-	2223	4,1
		3,0	-	-	-	2471	2,3

[00314] Оценивали влияние кислотного гидролиза на конъюгацию между серотипом 23А и CRM<sub>197</sub>. Кислотный гидролиз выполняли посредством применения кислоты и нагревания в отношении очищенного полисахарида серотипа 23А, как показано в таблице 11, и затем осуществляли способ активации. Способ активации и способ конъюгации осуществляли при одинаковых условиях. Добавляли перйодат натрия, и реакцию окисления осуществляли при 21-25°C в течение 16-20 часов. Активированный полисахарид и белок CRM<sub>197</sub> лиофилизировали и суспендировали в

фосфатном буфере. Активированный полисахарид и белок смешивали в соотношении 1:1, при этом реакционная концентрация составляла 1,5 мг/мл исходя из содержания полисахарида. Добавляли цианоборогидрид с инициацией реакции конъюгации, и смесь инкубировали при  $37\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 44-52 часов. Смесь с раствором борогидрида инкубировали при  $23\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 3-6 часов. В ходе данного способа подвергали восстановлению любой непрореагировавший альдегид, присутствующий в сахариде, с последующим концентрированием и диализом с помощью фильтра для ультрафильтрации.

[00315] Таблица 11. Получение гликоконъюгатов 23А после кислотного гидролиза полисахаридов

Активированный полисахарид			Конъюгат 23А-CRM <sub>197</sub>				
Условие осуществления гидролиза	Do	M.W. активированного PS (кДа)	Соотношение (PS/PR)	Содержание свободного PS (%)	MSD (%)	MALL S (кДа)	Выход продукта конъюгации (%)
X	10,9	639,3	1,21	22,0	89	5981	19,6
0,1 М HCl, 60°C, 30 мин.	9,4	595,4	1,17	17,0	91	5844	13,2
0,1 М HCl, 60°C, 60 мин.	9,1	571,1	1,21	10,9	82	3360	10,5
0,1 М HCl, 60°C, 90 мин.	9,0	535,3	1,07	9,9	83	2911	10,3
0,1 М HCl, 60°C, 120 мин.	9,3	507,9	1,26	5,2	64	1846	5,6

[00316] Оценивали влияние применения фосфатного буфера на конъюгацию между серотипом 23А и CRM<sub>197</sub>. Регулировали количество перйодата натрия с целью активации серотипа 23А, и осуществляли реакцию окисления при  $21-25^\circ\text{C}$  в течение 16-20 часов. Активированный полисахарид серотипа 23А и белок CRM<sub>197</sub> лиофилизировали и суспендировали в фосфатном буфере. Активированный

полисахарид и белок смешивали в соотношении 1:1, при этом реакционная концентрация составляла 15 мг/мл исходя из содержания полисахарида. Добавляли цианоборогидрид с инициацией реакции конъюгации, и смесь инкубировали при  $23\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 20-28 часов. Смесь с раствором борогидрида инкубировали при  $23\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 3-6 часов. В ходе данного способа подвергали восстановлению любой непрореагировавший альдегид, присутствующий в сахариде, с последующим концентрированием и диализом с помощью фильтра для ультрафильтрации.

[00317] Таблица 12. Получение гликоконъюгатов 23А с применением фосфатного буфера

Активированный полисахарид		Конъюгат 23А-CRM <sub>197</sub>				
Do	M.W. активированного PS (кДа)	Соотношение (PS/PR)	Содержание свободного PS (%)	MSD (%)	MALL S (кДа)	Выход продукта конъюгации (%)
18,0	630,1	2,98	73,1	89	2790	58,9
9,5	633,1	2,41	61,5	88	1901	35,9
6,6	627,5	1,74	33,0	77	2067	21,8
5,1	613,4	1,50	27,9	80	2794	20,9
4,5	608,0	1,07	19,4	81	6182	37,5

[00318] Пример 6. Получение моноконъюгата серотипа 23В и CRM<sub>197</sub>

[00319] Полисахарид серотипа 23В можно подвергать очистке, как описано выше или по ссылке на способы очистки полисахаридов других серотипов, описанные в WO 2013/191459. Для оценки влияния степени окисления (Do) на конъюгацию регулировали количество перйодата натрия с целью активации серотипа 23В, и реакцию окисления осуществляли при  $21-25^\circ\text{C}$  в течение 16-20 часов. Активированный полисахарид и белок CRM<sub>197</sub> лиофилизировали и суспендировали в DMSO. Активированный полисахарид и белок смешивали в соотношении 1:1, при этом реакционная концентрация составляла 1,5 мг/мл исходя из содержания полисахарида. В качестве альтернативы количество перйодата натрия сохраняли постоянным, и

активированный полисахарид и белок смешивали в соотношении, описанном в таблице 13, при этом реакционная концентрация составляла 1,5 мг/мл исходя из содержания полисахарида. Добавляли цианоборогидрид с инициацией реакции конъюгации, и смесь инкубировали при  $23\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 20-28 часов. Смесь с раствором борогидрида инкубировали при  $23\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 3-6 часов. В ходе данного способа подвергали восстановлению любой непрореагировавший альдегид, присутствующий в сахариде, с последующим концентрированием и диализом с помощью фильтра для ультрафильтрации. Влияние различных уровней Do на конъюгацию показано в таблице 13.

[00320] Таблица 13. Результаты конъюгации 23В в соответствии с уровнями окисления

Активированный полисахарид		Конъюгат 23В-CRM <sub>197</sub>				
Do	M.W. активированного PS (кДа)	Соотношение (PS/PR)	Содержание свободного PS (%)	MSD (%)	MALLS (кДа)	Выход продукта конъюгации (%)
23,3	590,8	1,33	87,1	98	34676	67,7
14,2	583,7	1,25	74,4	99	20774	63,0
7,4	674,5	0,74	36,7	95	4891	47,0
6,6	547,3	0,95	65,4	97	9609	57,7
5,7	631,4	0,84	46,9	81	5149	52,9
5,5	549,7	1,12	85,6	92	8839	70,2
5,4	635,8	1,03	50,9	90	5647	63,9
2,8	391,4	0,64	50,3	77	5213	31,1
2,3	221,6	0,27	26,3	56	3878	21,2
0,9	267,5	0,23	39,9	49	2588	7,2

[00321] Влияние реакционного соотношения полисахарида и белка на конъюгацию показано в таблице 14.

[00322] Таблица 14. Результаты конъюгации 23В в соответствии с соотношением полисахарида и белка

Активированный полисахарид		Реакционное соотношение	Конъюгат 23В-CRM <sub>197</sub>				
Do	M.W. активированного PS (кДа)		Реакционное соотношение (PR:PS)	Соотношение (PS/PR)	Содержание свободного PS (%)	MSD (%)	MALL S (кДа)
2,3	221,6	2:1	0,21	15,2	69	6720	25,0
		1,75:1	0,22	20,5	71	6408	22,6
		1,5:1	0,23	19,6	68	4694	16,7
		1,25:1	0,31	34,0	58	2448	21,2
		1:1	0,27	26,3	56	3878	12,0

[00323] Пример 7. Получение моноконъюгата серотипа 24F и CRM<sub>197</sub>

[00324] Полисахарид серотипа 24F можно подвергать очистке, как описано выше или со ссылкой на способы очистки полисахаридов других серотипов, описанные в WO 2013/191459. Очищенный полисахарид серотипа 24F подвергали кислотному гидролизу или обработке в микрофлюидайзере, затем к полисахариду серотипа 24F добавляли перйодат натрия, и реакцию окисления осуществляли при 21-25°C в течение 16-20 часов. Активированный полисахарид и белок CRM<sub>197</sub> лиофилизировали и суспендировали в фосфатном буфере. Активированный полисахарид и белок смешивали в соотношении 1:1, при этом реакционная концентрация составляла 10 мг/мл исходя из содержания полисахарида. Добавляли цианоборогидрид с инициацией реакции конъюгации, и смесь инкубировали при 37±2°C в течение 44-52 часов. Смесь с раствором борогидрида инкубировали при 23±2°C в течение 3-6 часов. В ходе данного способа подвергали восстановлению любой непрореагировавший альдегид, присутствующий в сахариде, с последующим концентрированием и диализом с помощью фильтра для ультрафильтрации. Молярный эквивалент

цианоборогидрида и борогидрида являлся таким, как описано в таблице 15. При добавлении к активированному полисахариду 24F и белку CRM<sub>197</sub> цианоборогидрида вместо кэпирующего реагента (борогидрида) качество конъюгата улучшается, на что указывало повышение молекулярной массы конъюгата. Добавление избыточного количества кэпирующего реагента (борогидрида) оказывало отрицательное влияние на конъюгат 24F-CRM<sub>197</sub>, на что указывало снижение молекулярной массы конъюгата.

[00325] Таблица 15. Результаты конъюгации в соответствии с количеством восстанавливающего средства (буфера PO<sub>4</sub>)

Активированный полисахарид		Конъюгат 24F-CRM <sub>197</sub>				
Do	M.W. активированного PS (кДа)	NaCNB НЗ Meq	NaBH 4 Meq	Соотношение (PS/PR)	Содержание свободного PS (%)	MALLS (кДа)
98,5	241,8	1,2	-	3,72	35,5	3295
		1,2/0,5	-	3,91	32,4	3413
		1,2/1,0	-	3,81	29,5	4562
		1,2	0,1	3,39	30,2	3096
		1,2	0,5	3,33	23,0	2615
		1,2	1,0	3,51	27,7	1807

[00326] Пример 8. Получение моноконъюгата серотипа 35B и CRM<sub>197</sub>

[00327] Полисахарид серотипа 35B можно подвергать очистке, как описано выше или по ссылке на способы очистки полисахаридов других серотипов, описанные в WO 2013/191459. Очищенный полисахарид серотипа 35B разбавляли в DW (дистиллированной воде) до конечной концентрации, составляющей от 1,0 мг/мл до 2,0 мг/мл.

[00328] Осуществление реакции с периодной кислотой. Для оценки влияния степени окисления (Do) на конъюгацию регулировали количество периодата натрия с целью активации серотипа 35B, и реакцию окисления осуществляли при 21-25°C в

течение 16-20 часов. Перйодат натрия применяли в молярном эквиваленте 0,007-0,15 по отношению к содержанию полисахарида.

**[00329] Ультрафильтрация.** Активированные полисахариды серотипа 35В концентрировали и подвергали диафильтрации с помощью DW с применением фильтра для ультрафильтрации с MWCO 30 кДа. Пермеат отбрасывали, и остаток фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм.

**[00330] Лиофилизация.** Определенное количество сахарозы, рассчитанное таким образом, чтобы достичь концентрации сахарозы  $5\pm 3\%$ , добавляли к активированному полисахариду серотипа 35В. Каждым из концентрированного сахара и белка-носителя CRM<sub>197</sub> заполняли флаконы и подвергали лиофилизации. В качестве альтернативы активированный полисахарид серотипа 35В и белок-носитель смешивали, и заполняли ими стеклянную бутылку, и подвергали лиофилизации.

**[00331] Растворение.** Лиофилизированный активированный сахарид серотипа 35В и лиофилизированный белок-носитель CRM<sub>197</sub> уравнивали при комнатной температуре. Активированный сахарид серотипа 35В повторно суспендировали в фосфатном буфере при концентрации сахара от 12,5 г/л до 17,5 г/л. pH фосфатного буфера для реакции конъюгации довели до диапазона от pH 6,0 до pH 7,2. В данном случае белок-носитель применяли в концентрации от 6,25 г/л до приблизительно 35 г/л (весовое соотношение PR:PS соответствует 1:0,5-2).

**[00332] Реакция конъюгации.** Реакцию конъюгации инициировали посредством добавления раствора цианоборогидрида натрия (100 мг/мл) в соотношении 1,0-1,4 молярного эквивалента на 1 моль активированного сахара. Смесь инкубировали при  $37\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 44-52 часов. 100 мг/мл раствора борогидрида натрия (обычно 1,8-2,2 молярного эквивалента борогидрида натрия на 1 моль активированного сахара) добавляли к реакционному материалу, и смесь инкубировали при  $23\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 3-6 часов. В ходе данного способа подвергали восстановлению любой непрореагировавший альдегид, присутствующий в сахариде, с последующим концентрированием и диализом с помощью фильтра для ультрафильтрации. Затем реакционную смесь разбавляли 0,9% раствором хлорида натрия и разбавленную смесь конъюгата фильтровали через фильтр с размером пор 0,45 мкм.

[00333] **Ультрафильтрация.** Разбавленную смесь конъюгата концентрировали и подвергали диафильтрации на фильтре для ультрафильтрации с MWCO 100 кДа с помощью по меньшей мере 20 объемов 0,9% раствора хлорида натрия или буфера. Пермеат отбрасывали.

[00334] **Стерилизующая фильтрация.** Остаток после диафильтрации с MWCO 100 кДа фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Внутрипроизводственный контроль (содержание сахара, свободный белок, свободный сахарид и остаточный цианид) осуществляли в отношении отфильтрованного продукта в виде конъюгата 35В-CRM<sub>197</sub>. Внутрипроизводственный контроль осуществляли в отношении отфильтрованного остатка для определения необходимости дополнительного концентрирования, диафильтрации и/или разбавления. При необходимости отфильтрованный конъюгат разбавляли 0,9% раствором хлорида натрия таким образом, чтобы конечная концентрация составляла менее чем 0,55 г/л. На данной стадии выполняли тестирование в отношении содержания сахара, содержания белка и соотношений сахарид:белок. Конъюгат фильтровали (фильтр с размером пор 0,22 мкм) и выполняли свободны тесты (внешний вид, свободные белки, свободные сахара, эндотоксины, размер молекул, остаточный цианид, идентификация сахара и идентификация CRM<sub>197</sub>). Гликоконъюгат серотипа 35В содержит по меньшей мере 0,2 мМ ацетата на мМ полисахарида 35В. Конечный концентрат конъюгата помещали в холодильник при 2-8°C. Результаты анализа для некоторых репрезентативных примеров получения гликоконъюгата серотипа 35В показаны в таблице 16 ниже.

[00335] Таблица 16. Результаты конъюгации в соответствии с уровнями окисления (буфер PO<sub>4</sub>)

Условия и результаты активации		Конъюгат 35В-CRM <sub>197</sub>				
Молекулярная масса (кДа)	Степень активации	pH буфера	Соотношение (PS/PR)	Содержание свободного сахара (%)	MALLS (кДа)	Показатели выхода продукта конъюгации (%)

103,6	26,8	7,2	1,51	26,8	1162	48,4
85,7	26,2	7,2	1,74	26,0	413	75,2
97,8	26,2	7,2	2,04	29,6	323	30,9
97,8	26,2	6,0	1,27	19,1	3153	40,9
104,5	25,0	7,2	1,80	15,8	449	46,2
101,8	23,3	7,2	1,55	37,5	433	23,6
99,0	23,0	6,0	1,76	28,0	2211	43,7
93,8	21,3	7,2	2,20	32,8	568	21,6
80,6	20,5	6,0	1,53	35,4	2621	23,4
84,8	20,5	6,0	1,93	26,1	4301	31,6
63,1	20,1	7,2	1,31	23,1	370	43,7
63,1	20,1	6,0	1,08	17,5	1966	42,0
81,0	19,5	6,0	1,37	23,4	1043	25,2
58,9	18,5	7,2	1,74	14,6	1211	66,6
70,5	17,7	7,2	1,56	18,1	786	37,4
56,6	17,1	6,0	1,42	17,3	1044	51,3
61,9	16,5	7,2	1,39	12,5	722	60,4
48,6	14,6	7,2	1,21	18,5	584	47,0
45,4	12,9	7,2	1,12	12,6	716	60,9
41,8	12,8	7,2	1,51	14,6	1031	49,0
46,1	12,7	6,0	1,21	14,8	1539	49,1
45,0	12,6	6,0	1,17	11,2	1219	54,8
45,0	12,6	7,2	1,36	12,4	676	42,4
36,5	12,2	6,0	0,96	7,7	1155	66,0
34,8	12,0	7,2	0,90	5,0	643	23,3
47,0	11,9	7,2	1,33	19,1	826	47,5
37,1	9,7	6,0	1,10	11,7	1202	41,8

35,9	7,1	6,0	0,96	12,6	1079	33,4
------	-----	-----	------	------	------	------

[00336] Как показано в таблице 16, способы получения гликоконъюгата серотипа 35В, описанные в данном документе, продемонстрировали высокие показатели выхода продукта конъюгации и обеспечивают получение конъюгатов с низкой процентной долей свободного сахара и высокой стабильностью.

#### [00337] Пример 9. Измерения концентрации серотип-специфичного IgG

[00338] Моноконъюгат серотип 15А-CRM<sub>197</sub>, полученный в примере 3, моноконъюгат серотип 15С-CRM<sub>197</sub>, полученный в примере 4, моноконъюгат серотип 23А-CRM<sub>197</sub>, полученный в примере 5, моноконъюгат серотип 23В-CRM<sub>197</sub>, полученный в примере 6, моноконъюгат серотип 24F-CRM<sub>197</sub>, полученный в примере 7, и моноконъюгат серотип 35В-CRM<sub>197</sub>, полученный в примере 8, тестировали в отношении способности индуцировать иммуногенный ответ у кроликов. Оценку иммуногенности выполняли посредством определения концентраций антиген-специфичных IgG в сыворотке крови с помощью ELISA и определения функциональности антител с помощью анализа опсонофагоцитирующей активности (ОРА). Новозеландских белых кроликов иммунизировали на неделе 0 и неделе 2 посредством внутримышечного введения дозы, предназначенной для человека (2,2 мкг полисахарида). Сбор образцов сыворотки крови выполняли каждые 2 недели после иммунизации.

[00339] Капсульные полисахариды (PnPs) для каждого из серотипов 15А, 15С, 23А, 23В, 24F и 35В наносили на 96-луночный планшет при 0,5-1 мкг/луночка. Выполняли сбор эквивалентного количества сыворотки крови от каждого субъекта и объединяли по группам. Планшеты промывали буфером для промывки и инкубировали с блокирующим буфером в течение 1 часа при 37°C. Пул сыворотки крови серийно разбавляли в 2,5 раза с помощью буфера для разбавления антител, содержащего Tween 20 и пневмококковый полисахарид клеточной стенки (CWPS), полученного из Государственного института сывороток Дании (5 мкг/мл), и затем обеспечивали протекание реакции при комнатной температуре в течение 30 минут. Планшет 5 раз промывали буфером для промывки, и затем 50 мкл предварительно адсорбированной и разбавленной сыворотки крови добавляли в покрытый луночный планшет с

последующим инкубированием при комнатной температуре в течение 2-18 часов. Луночный планшет промывали тем же способом, и затем в каждую лунку добавляли антитело козы к IgG кролика, конъюгированное со щелочной фосфатазой, с последующим инкубированием при комнатной температуре в течение 2 часов. Планшеты промывали, как описано выше, и в каждую лунку в качестве субстрата добавляли 1 мг/мл п-нитрофениламинового буфера, и затем обеспечивали протекание реакции при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакцию гасили посредством добавления 50 мкл 3 М NaOH и измеряли поглощение при 405 нм и 690 нм. Результаты показаны в таблице 17.

[00340] Таблица 17. Концентрация IgG (ЕД/мл) через 2 недели после вторичной иммунизации

Серотип	Перед 1	После 1	Перед 2	После 2
15A	312,5	5637,2	312,5	5703,2
15C	130	84369,0	-	-
23A	130	367,9	-	-
23B	141,5	30775,9	152,1	185474,0
24F	309,0	3200,1	476,1	4529,5

[00341] В случае серотипа 35В концентрацию IgG измеряли для разных групп гликоконъюгатов исходя из рН протекания реакции конъюгации и молекулярной массы гликоконъюгата 35В, как изложено в таблице 18.

[00342] Таблица 18. Концентрация IgG через 2 недели после вторичной иммунизации

Группа	Гликоконъюгат 35В		Концентрация IgG в ЕД/мл (95% CI)	
	рН протекания реакции конъюгации	Молекулярная масса (кДа)	До тестирования	После тестирования
1	7,2	1162	130 (130-130)	19333 (7330-50991)

2	7,2	323	130 (130-130)	10309 (5271-20160)
3	6,0	3153	130 (130-130)	12317 (6718-22584)

\* CI: доверительный интервал

Значимость группы 1, 2 и 3: P=0,384

**[00343] Тестирование функциональной иммуногенности (МОРА) для моновалентных конъюгатов**

[00344] Функции антител оценивали посредством тестирования сыворотки крови в анализе МОРА. Штамм *S. Pneumoniae* для МОРА, который хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  или ниже, разбавляли до соответствующей кратности конечного разбавления таким образом, чтобы концентрация каждого штамма составляла приблизительно 50000 КОЕ/мл. Собирали эквивалентное количество сыворотки крови от каждого субъекта, объединяли по группам и осуществляли 2-кратное серийное разбавление таким образом, чтобы в планшете с U-образным дном оставалось 20 мкл сыворотки крови. После разбавления образца 10 мкл штамма, полученного для каждого серотипа, смешивали с разбавленным образцом и обеспечивали протекание реакции в смеси при комнатной температуре в течение 30 минут при тщательном перемешивании *S. pneumoniae* и антитела. Добавляли смесь предварительно дифференцированных клеток HL-60 и комплемента, и обеспечивали протекание реакции в инкубаторе с  $\text{CO}_2$  ( $37^{\circ}\text{C}$ ) в течение 45 минут. Температуру снижали для остановки фагоцитоза и 10 мкл реакционного раствора наносили на планшет ТНУ с агаром, предварительно высушенный в течение 30-60 минут, и затем обеспечивали абсорбцию в планшет в течение 20 минут до высыхания. 25 мг/мл исходного раствора ТТС добавляли к подготовленному верхнему слою агара, и к нему добавляли антитело, подходящее для соответствующего штамма. Смесь тщательно перемешивали, и затем приблизительно 25 мл смеси добавляли в планшет и обеспечивали затвердевание в течение приблизительно 30 минут. Планшет с полностью затвердевшим содержимым инкубировали в инкубаторе с  $\text{CO}_2$  ( $37^{\circ}\text{C}$ ) в течение 12-18 часов, и затем осуществляли

подсчет колоний. Титр МОРА выражали в степени разбавления, при которой наблюдали 50% гибель клеток. Результаты показаны в таблице 19.

[00345] Таблица 19. Титры МОРА для моноконъюгатов через 2 недели после вторичной иммунизации

Серотип	Перед 1	После 1	Перед 2	После 2
15А	5	3555	10	3107
15С	2	31575,3	-	-
23А	2	313,7	-	-
23В	28	18807	57	7375
24F	2	260	2	367

[00346] В случае серотипа 35В титры МОРА измеряли для разных групп гликоконъюгатов исходя из рН протекания реакции конъюгации и молекулярной массы гликоконъюгата 35В, как изложено в таблице 20.

[00347] Таблица 20. Титры МОРА для 35В-CRM<sub>197</sub> через 2 недели после вторичной иммунизации

Группа	Гликоконъюгат 35В		Геометрическое среднее значение титра (95% CI*)	
	рН протекания реакции конъюгации	Молекулярная масса (кДа)	До тестирования	После тестирования
1	7,2	1162	2	16019 (8621-29766)
2	7,2	323	2	11568 (6434-20798)
3	6,0	3153	2	14151 (9027-22183)

\* CI: доверительный интервал

Значимость группы 1, 2 и 3: P=0,621

**[00348] Пример 10. Составление 27-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины с полисахаридами из серотипов 1 и 5, конъюгированными со столбнячным анатоксином**

[00349] Требуемые объемы конечных нерасфасованных концентратов, полученных в примерах 2-8, рассчитывали исходя из объема партии и концентраций нерасфасованного сахара. После того, как в предварительно маркированный сосуд для составления добавляли 0,85% раствор хлорида натрия (физиологический раствор), полисорбат 80 и сукцинатный буфер, добавляли нерасфасованные концентраты. Затем препарат тщательно перемешивали и подвергали стерилизующей фильтрации через мембрану с размером пор 0,2 мкм. Составленный нерасфасованный продукт осторожно перемешивали во время и после добавления нерасфасованного фосфата алюминия. pH проверяли и регулировали при необходимости. Составленный нерасфасованный продукт хранили при 2-8°C. Был получен следующий состав поливалентной пневмококковой конъюгированной вакцины, и он был назван PCV27-(1/5)-ТТ.

[00350] PCV27(1/5)-ТТ включает полисахаридные конъюгаты, полученные посредством конъюгирования каждого полисахарида серотипов 1 и 5 с ТТ и каждого полисахарида серотипов 3, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В с CRM<sub>197</sub>.

[00351] PCV27(1/5)-ТТ в общей дозе объемом 0,5 мл включал 2,2 мкг каждого сахара, за исключением серотипа 6В в количестве 4,4 мкг; от приблизительно 2 мкг до 25 мкг ТТ (для серотипов 1 и 5) и от приблизительно 45 мкг до 100 мкг CRM<sub>197</sub>; 0,125 мг адьюванта в виде элементарного алюминия (0,5 мг фосфата алюминия); 4,25 мг хлорида натрия; приблизительно 295 мкг раствора сукцинатного буфера и приблизительно 120 мкг полисорбата 80.

**[00352] Пример 11. Иммуногенность поливалентной пневмококковой конъюгированной вакцины (PCV27(1/5)-ТТ)**

[00353] Поливалентную пневмококковую вакцину со смешанным носителем PCV27(1/5)-ТТ, полученную в примере 10, тестировали в отношении способности индуцировать иммуногенный ответ у кроликов. Оценку иммуногенности выполняли

посредством определения концентраций антиген-специфичных IgG в сыворотке крови с помощью ELISA и определения функциональности антител с помощью анализа опсонофагоцитирующей активности (OPA). Новозеландских белых кроликов иммунизировали на неделе 0 и неделе 2 посредством внутримышечного введения дозы, предназначенной для человека (2,2 мкг каждого полисахарида, за исключением 6В в количестве 4,4 мкг). Сбор образцов сыворотки крови выполняли каждые 2 недели после иммунизации.

#### **[00354] Измерение концентрации серотип-специфичного IgG**

[00355] Капсульные полисахариды (PnPs) для каждого серотипа наносили на 96-луночный планшет при 0,5-1 мкг/лунка. Выполняли сбор эквивалентного количества сыворотки крови от каждого субъекта и объединяли по группам. Пул сыворотки крови серийно разбавляли в 2,5 раза с помощью буфера для разбавления антител, содержащего Tween 20 и пневмококковый полисахарид клеточной стенки (CWPS), полученного из Государственного института сывороток Дании (5 мкг/мл), и затем обеспечивали протекание реакции при комнатной температуре в течение 30 минут. Планшет 5 раз промывали буфером для промывки, и затем 50 мкл предварительно адсорбированной и разбавленной сыворотки крови добавляли в покрытый луночный планшет с последующим инкубированием при комнатной температуре в течение 2-18 часов. Луночный планшет промывали тем же способом, и затем в каждую лунку добавляли антитело козы к IgG кролика, конъюгированное со щелочной фосфатазой, с последующим инкубированием при комнатной температуре в течение 2 часов. Планшеты промывали, как описано выше, и в каждую лунку в качестве субстрата добавляли 1 мг/мл п-нитрофениламинового буфера, и затем обеспечивали протекание реакции при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакцию гасили посредством добавления 50 мкл 3 М NaOH и измеряли поглощение при 405 нм и 690 нм. Результаты показаны в таблице 21.

[00356] Таблица 21. Концентрация IgG (ЕД/мл) через 2 недели после вторичной иммунизации

Серотип	PCV27(1/5)-ТТ	PCV27(1/5)-ТТ
	До тестирования	После тестирования
1	130,0	5929,1
3	130,0	3161,6
4	130,0	5883,6
5	130,0	14645,5
6A	130,0	5823,0
6B	130,0	725,1
7F	130,0	6569,9
8	251,4	11743,1
9N	130,0	20552,6
9V	130,0	13890,2
10A	130,0	5400,2
11A	130,0	5769,0
12F	130,0	2004,1
14	147,9	2631,1
15A	130,0	1632,9
15B	130,0	13427,9
15C	130,0	22777,7
18C	130,0	12984,3
19A	130,0	2117,9
19F	130,0	5464,1
22F	130,0	11996,1
23A	130,0	173,7
23B	155,4	4392,8
23F	130,0	568,7
24F	361,1	1141,5
33F	130,0	11650,0
35B	130,0	656,6

[00358] Функции антител оценивали посредством тестирования сыворотки крови в анализе МОРА. Штамм *S. pneumoniae* для МОРА, который хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  или ниже, разбавляли до соответствующей кратности конечного разбавления таким образом, чтобы концентрация каждого штамма составляла приблизительно 50000 КОЕ/мл. Собирали эквивалентное количество сыворотки крови от каждого субъекта, объединяли по группам и осуществляли 2-кратное серийное разбавление таким образом, чтобы в планшете с U-образным дном оставалось 20 мкл сыворотки крови. После разбавления образца 10 мкл штамма, полученного для каждого серотипа, смешивали с разбавленным образцом и обеспечивали протекание реакции в смеси при комнатной температуре в течение 30 минут при тщательном перемешивании *S. pneumoniae* и антитела. Добавляли смесь предварительно дифференцированных клеток HL-60 и комплемента, и обеспечивали протекание реакции в инкубаторе с  $\text{CO}_2$  ( $37^{\circ}\text{C}$ ) в течение 45 минут. Температуру снижали для остановки фагоцитоза и 10 мкл реакционного раствора наносили на планшет с агаром, предварительно высушенный в течение 30-60 минут, и затем обеспечивали абсорбцию в планшет в течение 20 минут до высыхания. 25 мг/мл исходного раствора ТТС добавляли к подготовленному верхнему слою агара, и к нему добавляли антитело, подходящее для соответствующего штамма. Смесь тщательно перемешивали, и затем приблизительно 25 мл смеси добавляли в планшет и обеспечивали затвердевание в течение приблизительно 30 минут. Планшет с полностью затвердевшим содержимым инкубировали в инкубаторе с  $\text{CO}_2$  ( $37^{\circ}\text{C}$ ) в течение 12-18 часов, и затем осуществляли подсчет колоний. Титр МОРА выражали в степени разбавления, при которой наблюдали 50% гибель клеток. Результаты показаны в таблице 22.

[00359] Таблица 22. Титры МОРА через 2 недели после вторичной иммунизации

Серотип	PCV27(1/5)-ТТ	PCV27(1/5)-ТТ
	До тестирования	После тестирования
1	2	237
3	2	240
4	2	1564
5	2	975

Серотип	PCV27(1/5)-ТТ	
	До тестирования	После тестирования
6A	2	981
6B	2	241
7F	2	479
8	36	901
9N	2	2108
9V	2	261
10A	2	219
11A	16	730
12F	2	193
14	22	416
15A	2	3099
15B	22	501
15C	2	6743
18C	2	816
19A	2	261
19F	2	571
22F	6	477
23A	2	203
23B	2	565
23F	2	221
24F	2	143
33F	2	312
35B	6	627

**[00360] Пример 12. Составление 27-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины с полисахаридами из серотипов 1, 5, 15B и 22F, конъюгированными со столбнячным анатоксином**

[00361] Моноконъюгаты получали согласно общим способам, описанным в примерах 2-8. Требуемые объемы конечных нерасфасованных концентратов

рассчитывали исходя из объема партии и концентраций нерасфасованного сахара. После того, как в предварительно маркированный сосуд для составления добавляли 0,85% раствор хлорида натрия (физиологический раствор), полисорбат 80 и сукцинатный буфер, добавляли нерасфасованные концентраты. Затем препарат тщательно перемешивали и подвергали стерилизующей фильтрации через мембрану с размером пор 0,2 мкм. Составленный нерасфасованный продукт осторожно перемешивали во время и после добавления нерасфасованного фосфата алюминия. pH проверяли и регулировали при необходимости. Составленный нерасфасованный продукт хранили при 2-8°C. Был получен следующий состав поливалентной пневмококковой конъюгированной вакцины, и он был назван PCV27-(1/5/15B/22F)-ТТ.

[00362] PCV27(1/5/15B/22F)-ТТ включает полисахаридные конъюгаты, полученные посредством конъюгирования каждого полисахарида серотипов 1, 5, 15B и 22F с ТТ и каждого полисахарида серотипов 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B с CRM<sub>197</sub>.

[00363] PCV27(1/5/15B/22F)-ТТ в общей дозе объемом 0,5 мл включал 2,2 мкг каждого сахара, за исключением серотипа 6B в количестве 4,4 мкг; от приблизительно 2 мкг до 25 мкг ТТ (для серотипов 1, 5, 15B, 22F) и от приблизительно 45 мкг до 100 мкг CRM<sub>197</sub>; 0,125 мг адьюванта в виде элементарного алюминия (0,5 мг фосфата алюминия); 4,25 мг хлорида натрия; приблизительно 295 мкг раствора сукцинатного буфера и приблизительно 120 мкг полисорбата 80.

[00364] **Пример 13. Иммуногенность поливалентной пневмококковой конъюгированной вакцины PCV27(1/5/15B/22F)-ТТ**

[00365] Поливалентную пневмококковую вакцину со смешанным носителем PCV27(1/5/15B/22F)-ТТ, полученную в примере 12, тестировали в отношении способности индуцировать иммуногенный ответ у кроликов. Оценку иммуногенности выполняли посредством определения концентраций антиген-специфичных IgG в сыворотке крови с помощью ELISA и определения функциональности антител с помощью анализа опсонофагоцитирующей активности (OPA). Новозеландских белых кроликов иммунизировали на неделе 0 и неделе 2 посредством внутримышечного введения дозы, предназначенной для человека (2,2 мкг каждого полисахарида, за

исключением 6В в количестве 4,4 мкг). Сбор образцов сыворотки крови выполняли каждые 2 недели после иммунизации.

### [00366] Измерение концентрации серотип-специфичного IgG

[00367] Капсульные полисахариды (PnPs) для каждого серотипа наносили на 96-луночный планшет при 0,5-1 мкг/лунка. Выполняли сбор эквивалентного количества сыворотки крови от каждого субъекта и объединяли по группам. Пул сыворотки крови серийно разбавляли в 2,5 раза с помощью буфера для разбавления антител, содержащего Tween 20 и пневмококковый полисахарид клеточной стенки (CWPS), полученного из Государственного института сывороток Дании (5 мкг/мл), и затем обеспечивали протекание реакции при комнатной температуре в течение 30 минут. Планшет 5 раз промывали буфером для промывки, и затем 50 мкл предварительно адсорбированной и разбавленной сыворотки крови добавляли в покрытый луночный планшет с последующим инкубированием при комнатной температуре в течение 2-18 часов. Луночный планшет промывали тем же способом, и затем в каждую лунку добавляли антитело козы к IgG кролика, конъюгированное со щелочной фосфатазой, с последующим инкубированием при комнатной температуре в течение 2 часов. Планшеты промывали, как описано выше, и в каждую лунку в качестве субстрата добавляли 1 мг/мл п-нитрофениламинового буфера, и затем обеспечивали протекание реакции при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакцию гасили посредством добавления 50 мкл 3 М NaOH и измеряли поглощение при 405 нм и 690 нм. В качестве сравнительного примера, коммерчески доступную 13-валентную вакцину (PREVNAR13) подвергали такой же процедуре. Результаты показаны в таблице 23.

[00368] Таблица 23. Концентрация IgG (ЕД/мл) через 2 недели после вторичной иммунизации

Серотип	Pevnar13		PCV27(1/5/15B/22F)-ТТ	
	До тестирования	После тестирования	До тестирования	После тестирования
1	130,0	471,2	130,0	6174,5
3	173,7	1052,8	130,0	4296,6
4	130,0	1267,1	130,0	5237,9

5	130,0	1551,7	130,0	28839,0
6A	130,0	722,4	130,0	2538,2
6B	130,0	252,9	130,0	671,5
7F	130,0	5969,8	130,0	6056,5
8	130,0	130,0	140,6	7108,9
9N	169,4	225,0	211,2	25748,1
9V	130,0	7085,3	130,0	6228,0
10A	130,0	130,0	130,0	3022,1
11A	130,0	130,0	130,0	3928,1
12F	130,0	130,0	130,0	1393,4
14	130,0	777,7	107,3	1132,9
15A	130,0	130,0	130,0	416,8
15B	130,0	130,0	130,0	4196,6
15C	130,0	130,0	130,0	5882,5
18C	143,2	2387,1	130,0	7544,2
19A	147,7	1643,5	130,0	899,9
19F	130,0	6623,0	130,0	12785,6
22F	130,0	130,0	130,0	5492,0
23A	130,0	158,5	130,0	840,1
23B	203,4	2098,3	141,6	2765,6
23F	130,0	566,4	130,0	588,8
24F	377,6	362,7	362,7	2351,9
33F	130,0	130,0	130,0	3573,9
35B	148,0	150,5	130,0	936,6

**[00369] Тестирование функциональной иммуногенности (MOPA)**

[00370] Если капсульные полисахариды серотипов 1 и 5 были конъюгированы с ТТ, концентрация серотип-специфичного IgG значительно повышалась по сравнению с таковой, полученной при их конъюгации с CRM<sub>197</sub>. Кролики, иммунизированные с помощью PCV27(1/5/15B/22F)-ТТ, также демонстрировали значительное повышение концентрации IgG в отношении дополнительных четырнадцати серотипов, не присутствующих в PREVNAR13 (т. е. 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 22F, 23A,

23B, 24F, 33F и 35B). Для серотипов 8 и 9N, в частности, наблюдали более чем 50-кратное повышение концентрации специфических IgG в сыворотке крови по сравнению с PREVNAR13.

[00371] Функции антител оценивали посредством тестирования сыворотки крови в анализе МОРА. Штамм *S. pneumoniae* для МОРА, который хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  или ниже, разбавляли до соответствующей кратности конечного разбавления таким образом, чтобы концентрация каждого штамма составляла приблизительно 50000 КОЕ/мл. Собирали эквивалентное количество сыворотки крови от каждого субъекта, объединяли по группам и осуществляли 2-кратное серийное разбавление таким образом, чтобы в планшете с U-образным дном оставалось 20 мкл сыворотки крови. После разбавления образца 10 мкл штамма, полученного для каждого серотипа, смешивали с разбавленным образцом и обеспечивали протекание реакции в смеси при комнатной температуре в течение 30 минут при тщательном перемешивании *S. pneumoniae* и антитела. Добавляли смесь предварительно дифференцированных клеток HL-60 и комплемента, и обеспечивали протекание реакции в инкубаторе с  $\text{CO}_2$  ( $37^{\circ}\text{C}$ ) в течение 45 минут. Температуру снижали для остановки фагоцитоза и 10 мкл реакционного раствора наносили на планшет с агаром, предварительно высушенный в течение 30-60 минут, и затем обеспечивали абсорбцию в планшет в течение 20 минут до высыхания. 25 мг/мл исходного раствора ТТС добавляли к подготовленному верхнему слою агара, и к нему добавляли антитело, подходящее для соответствующего штамма. Смесь тщательно перемешивали, и затем приблизительно 25 мл смеси добавляли в планшет и обеспечивали затвердевание в течение приблизительно 30 минут. Планшет с полностью затвердевшим содержимым инкубировали в инкубаторе с  $\text{CO}_2$  ( $37^{\circ}\text{C}$ ) в течение 12-18 часов, и затем осуществляли подсчет колоний. Титр МОРА выражали в степени разбавления, при которой наблюдали 50% гибель клеток. В качестве сравнительного примера, коммерчески доступную 13-валентную вакцину (PREVNAR13) подвергали такой же процедуре. Результаты показаны в таблице 24.

[00372] Таблица 24. Титры МОРА через 2 недели после вторичной иммунизации

Серотип	Prevnar13	PCV27(1/5/15B/22F)-ТТ
---------	-----------	-----------------------

	До тестирования	После тестирования	До тестирования	После тестирования
1	2	72	61	527
3	18	154	131	280
4	2	91	2	374
5	2	213	182	1967
6A	2	253	2	292
6B	2	250	2	591
7F	2	218	2	259
8	2	2	2	671
9N	2	2	2	1564
9V	2	289	2	99
10A	2	2	2	92
11A	2	2	2	10923
12F	2	2	2	140
14	2	213	2	273
15A	2	80	2	635
15B	10	40	49	199
15C	25	73	56	1837
18C	2	356	2	940
19A	2	468	2	211
19F	2	240	2	628
22F	2	2	2	639
23A	2	66	2	404
23B	2	426	2	823
23F	2	223	2	222
24F	2	2	2	169
33F	2	2	2	80
35B	2	51	2	237

[00373] Если серотипы 1 и 5 были конъюгированы с ТТ, функциональные титры МОРА значительно повышались по сравнению с титрами МОРА, полученными при их

конъюгации с CRM<sub>197</sub>. Кролики, иммунизированные с помощью PCV27(1/5/15B/22F)-ТТ, также демонстрировали значительное повышение функциональных титров МОРА в отношении каждого из дополнительных четырнадцати серотипов, которые не присутствуют в PREVNAR13 (т. е. 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 22F, 23A, 23B, 24F, 33F и 35B).

[00374] В настоящем описании были описаны один или более иллюстративных вариантов осуществления, однако специалистам в данной области будет понятно, что различные изменения формы и деталей могут быть внесены без отклонения от истинной сущности и объема идеи настоящего изобретения, как определено нижеследующей формулой изобретения.

## Формула изобретения

1. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата, содержащая 22-27 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок предусматривает белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 22F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В.

2. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата по п. 1, содержащая 27 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок предусматривает белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 18С, 19А, 19F, 23А, 23В, 22F, 23F, 24F, 33F и 35В.

3. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата по п. 1, содержащая 26 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок предусматривает белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 33F и 35В и четырех серотипов, выбранных из 15А, 15С, 23А, 23В и 24F.

4. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата по п. 1, содержащая 25 различных конъюгатов пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок

предусматривает белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 33F и 35В и трех серотипов, выбранных из 15А, 15С, 23А, 23В и 24F.

5. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата по п. 1, содержащая 24 различных конъюгата пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок предусматривает белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 33F и 35В и двух серотипов, выбранных из 15А, 15С, 23А, 23В и 24F.

6. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата по п. 1, содержащая 23 различных конъюгата пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок предусматривает белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 33F и 35В и одного серотипа, выбранного из 15А, 15С, 23А, 23В и 24F.

7. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата по п. 1, содержащая 22 различных конъюгата пневмококковый капсульный полисахарид-белок, где каждый конъюгат пневмококковый капсульный полисахарид-белок предусматривает белок-носитель, конъюгированный с капсульным полисахаридом из отличного серотипа *Streptococcus pneumoniae*, где серотипы *Streptococcus pneumoniae* выбраны из 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F, 33F и 35В.

8. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата по любому из предыдущих пунктов, где белок-носитель предусматривает CRM<sub>197</sub> и/или столбнячный анатоксин.

9. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата по п. 8, где по меньшей мере два из капсульных полисахаридов конъюгированы со столбнячным анатоксином, а остальные капсульные полисахариды конъюгированы с CRM<sub>197</sub>, где по меньшей мере два капсульных полисахарида, которые конъюгированы со столбнячным анатоксином, выбраны из группы, состоящей из серотипов 1, 3, 5, 15B и 22F.

10. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата по п. 2, где капсульные полисахариды из серотипов 1 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, и капсульные полисахариды из серотипов 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

11. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата по п. 2, где капсульные полисахариды из серотипов 1 и 3 конъюгированы со столбнячным анатоксином, и капсульные полисахариды из серотипов 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

12. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата по п. 2, где капсульные полисахариды из серотипов 3 и 5 конъюгированы со столбнячным анатоксином, и капсульные полисахариды из серотипов 1, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

13. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата по п. 2, где капсульные полисахариды из серотипов 1, 5, 15В и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, и капсульные полисахариды из серотипов 3, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15С, 18С, 19А, 19F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

14. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата по п. 2, где капсульные полисахариды из серотипов 1, 3, 15В и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, и капсульные полисахариды из серотипов 4, 5, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15С, 18С, 19А, 19F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

15. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата по п. 2, где капсульные полисахариды из серотипов 3, 5, 15В и 22F конъюгированы со столбнячным анатоксином, и капсульные полисахариды из серотипов 1, 4, 6А, 6В, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15С, 18С, 19А, 19F, 23А, 23В, 23F, 24F, 33F и 35В конъюгированы с CRM<sub>197</sub>.

16. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащая адъювант.

17. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата по п. 16, где адъювант представляет собой адъювант на основе алюминия.

18. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата по п. 17, где адъювант выбран из группы, состоящей из фосфата алюминия, сульфата алюминия и гидроксида алюминия.

19. Поливалентная композиция на основе пневмококкового конъюгата по п. 18, где адъювант представляет собой фосфат алюминия.

20. Применение поливалентной композиции на основе пневмококкового конъюгата по любому из предыдущих пунктов для профилактики инфекции или заболевания, вызванных *Streptococcus pneumoniae*, у субъекта.

21. Вакцина, содержащая поливалентную композицию на основе пневмококкового конъюгата по любому из пп. 1–19 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

22. Способ профилактики инфекции или заболевания, вызванных *Streptococcus pneumoniae*, у субъекта, при этом способ включает введение субъекту профилактически эффективного количества поливалентной композиции на основе пневмококкового конъюгата по любому из пп. 1–19 или вакцины по п. 21.

23. Способ по п. 22, где субъект представляет собой человека, возраст которого составляет по меньшей мере 50 лет, и заболевание представляет собой пневмонию или инвазивное пневмококковое заболевание (IPD).

24. Способ по п. 22, где субъект представляет собой человека, возраст которого составляет по меньшей мере 6 недель, и заболевание представляет собой пневмонию, инвазивное пневмококковое заболевание (IPD) или острый средний отит (АОМ).

25. Способ по п. 24, где возраст субъекта составляет от 6 недель до 5 лет, 2-15 месяцев или 6-17 лет.

26. Применение по п. 20 или способ по п. 22, где субъект представляет собой человека.

27. Способ по любому из пп. 22–26, где поливалентную композицию на основе пневмококкового конъюгата или вакцину вводят посредством внутримышечной инъекции.

28. Способ по любому из пп. 22–27, где поливалентную композицию на основе пневмококкового конъюгата или вакцину вводят как часть серии иммунизаций.

29. Иммуногенная композиция, содержащая по меньшей мере один конъюгат полисахарид-белок, где полисахарид в по меньшей мере одном конъюгате полисахарид-белок представляет собой капсульный полисахарид из *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А, серотипа 15С, серотипа 23А, серотипа 23В, серотипа 24F или серотипа 35В.

30. Способ получения капсульного полисахарида из *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А, серотипа 15С, серотипа 23А, серотипа 23В, серотипа 24F или серотипа 35В, описанный в данном документе.

31. Способ по п. 30, где серотип представляет собой серотип 15А, и способ включает

(i) подвергание очищенного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А реакции кислотного гидролиза и нагреванию или обработке в микрофлюидайзере и последующее осуществление реакции с окисляющим средством с получением активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А;

(ii) необязательно лиофилизирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А и белка-носителя;

(iii) суспендирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А и белка-носителя в диметилсульфоксиде (DMSO);

(iv) осуществление реакции активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А и белка-носителя с восстанавливающим средством с получением конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А с белком-носителем; и

(v) кэпирование непрореагировавших альдегидов в конъюгате полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А с белком-носителем с получением иммуногенного конъюгата, содержащего полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А, ковалентно связанный с белком-носителем.

32. Способ по п. 30, где серотип представляет собой серотип 15С, и способ включает

(i) осуществление реакции очищенного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С с окисляющим средством с получением активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С;

(ii) необязательно лиофилизирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С и белка-носителя;

(iii) суспендирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С и белка-носителя в диметилсульфоксиде (DMSO) или фосфатном буфере;

(iv) осуществление реакции смеси активированного полисахарида серотипа 15С и белка-носителя с восстанавливающим средством с получением конъюгата полисахарида серотипа 15С с белком-носителем; и

(v) кэпирование непрореагировавших альдегидов в конъюгате полисахарида серотипа 15С с белком-носителем с получением иммуногенного конъюгата, содержащего полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С, ковалентно связанный с белком-носителем.

33. Способ по п. 30, где серотип представляет собой серотип 23А, и способ включает

(i) осуществление реакции очищенного *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А с окисляющим средством с получением активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А;

(ii) необязательно лиофилизирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А и белка-носителя;

(iii) суспендирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А и белка-носителя в диметилсульфоксиде (DMSO) или фосфатном буфере;

(iv) осуществление реакции смеси активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А и белка-носителя с восстанавливающим средством с получением конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А с белком-носителем; и

(v) кэпирование непрореагировавших альдегидов в конъюгате полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А с белком-носителем с получением иммуногенного конъюгата, содержащего полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23А, ковалентно связанный с белком-носителем.

34. Способ по п. 30, где серотип представляет собой серотип 23В, и способ включает

(i) осуществление реакции очищенного *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В с окисляющим средством с получением активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В;

(ii) необязательно лиофилизирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В и белка-носителя;

(iii) суспендирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В и белка-носителя в диметилсульфоксиде (DMSO);

(iv) осуществление реакции смеси активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В и белка-носителя с восстанавливающим средством с получением конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В с белком-носителем; и

(v) кэпирование непрореагировавших альдегидов в конъюгате полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В с белком-носителем с получением иммуногенного конъюгата, содержащего полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 23В, ковалентно связанный с белком-носителем.

35. Способ по п. 30, где серотип представляет собой серотип 24F, и способ включает

(i) подвергание очищенного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F реакции кислотного гидролиза или обработке в микрофлюидайзере и последующее осуществление реакции с окисляющим средством с получением активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F;

(ii) необязательно лиофилизирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F и белка-носителя;

(iii) суспендирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F и белка-носителя в диметилсульфоксиде (DMSO) или фосфатном буфере;

(iv) осуществление реакции активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F и белка-носителя с восстанавливающим средством с получением конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F с белком-носителем; и

(v) кэпирование непрореагировавших альдегидов в конъюгате полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F с белком-носителем с получением иммуногенного конъюгата, содержащего полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 24F, ковалентно связанный с белком-носителем.

36. Способ по п. 30, где серотип представляет собой серотип 35В, и способ включает

(i) осуществление реакции очищенного *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В с окисляющим средством с получением активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В;

(ii) необязательно лиофилизирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В и белка-носителя;

(iii) суспендирование активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В и белка-носителя в диметилсульфоксиде (DMSO) или фосфатном буфере;

(iv) осуществление реакции активированного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В и белка-носителя с восстанавливающим средством с получением конъюгата полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В с белком-носителем; и

(v) кэпирование непрореагировавших альдегидов в конъюгате полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В с белком-носителем с получением иммуногенного конъюгата, содержащего полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 35В, ковалентно связанный с белком-носителем.