

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043489**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.05.29**

**(21)** Номер заявки  
**202091382**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.12.04**

**(51)** Int. Cl. *A61K 39/09* (2006.01)  
*A61K 39/385* (2006.01)  
*A61P 31/04* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)

---

**(54) КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ КОНЬЮГАТЫ ПОЛИСАХАРИД STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE С БЕЛКОМ, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

**(31)** 62/595,388

**(32)** 2017.12.06

**(33)** US

**(43)** 2021.01.15

**(86)** PCT/US2018/063709

**(87)** WO 2019/139692 2019.07.18

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
МЕРК ШАРП И ДОУМ ЭлЭлСи (US)

**(72)** Изобретатель:  
Смит Уилльям Дж., Макхью Патрик,  
Уинтерз Майкл Алберт, Скиннер  
Джули М., Хэ Цзянь, Мусей Луви,  
Абейгунавандана Читрананда, Цуй  
Ядун Адам, Косински Майкл Дж. (US)

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

**(56)** WO-A2-2017173415

---

**(57)** Изобретение относится к поливалентным иммуногенным композициям, содержащим более одного *S. pneumoniae* полисахарид-белкового конъюгата, где каждый из конъюгатов содержит полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, который определен в настоящей заявке, конъюгированный с белком-носителем. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из полисахарид-белковых конъюгатов образуется в результате реакции конъюгации, содержащей апротонный растворитель. В других вариантах осуществления каждый из полисахарид-белковых конъюгатов образуется в результате реакции конъюгации, содержащей апротонный растворитель. Также предоставлены способы индукции защитного иммунного ответа у пациента-человека, включающие введение пациенту поливалентных иммуногенных композиций по изобретению. Поливалентные иммуногенные композиции полезны для обеспечения защиты от инфекции *S. pneumoniae* и заболеваний, вызываемых *S. pneumoniae*. Композиции по изобретению также могут быть использованы в качестве компонента режимов лечения, которые обеспечивают дополнительную защиту пациентам, которые были вакцинированы поливалентной вакциной, показанной для профилактики пневмококковой инфекции.

---

**B1**

**043489**

**043489**

**B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Неприменимо.

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к поливалентным иммуногенным композициям, содержащим отличающиеся конъюгаты полисахаридов с белком. Каждый конъюгат состоит из капсульного полисахарида, полученного из другого (отличающегося) серотипа *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированного с белком-носителем, предпочтительно CRM197. Иммуногенные композиции обеспечивают широкий спектр действия против пневмококкового заболевания.

### Уровень техники

*Streptococcus pneumoniae* является грамположительной бактерией и наиболее распространенной причиной инвазивных бактериальных заболеваний (таких как пневмония, бактериемия, менингит и средний отит) у младенцев и детей младшего возраста. Пневмококк инкапсулирован химически сшитым полисахаридом, который придает специфичность серотипа. Существует более 90 известных серотипов пневмококков, и капсула является основным фактором, определяющим вирулентность пневмококков, поскольку капсула не только защищает внутреннюю поверхность бактерий от комплемента, но сама по себе является слабо иммуногенной. Полисахариды являются Т-независимыми антигенами и, в большинстве случаев, не могут быть процессированы или презентованы молекулами МНС для взаимодействия с Т-клетками. Однако они могут стимулировать иммунную систему через альтернативный механизм, который включает перекрестное связывание поверхностных рецепторов на В-клетках.

Поливалентные пневмококковые полисахаридные вакцины, лицензированные на протяжении многих лет, доказали свою ценность в профилактике пневмококковых заболеваний у взрослых, особенно пожилых людей и лиц с высоким риском. Однако младенцы и дети младшего возраста плохо реагируют на неконъюгированные пневмококковые полисахариды. Пневмококковая конъюгатная вакцина Prevnar®, содержащая 7 наиболее часто выделяемых серотипов (4, 6В, 9V, 14, 18С, 19F и 23F), вызывающих инвазивное пневмококковое заболевание у детей младшего возраста и младенцев, была впервые лицензирована в США в феврале 2000 г. После повсеместного использования препарата Prevnar® в США произошло значительное снижение количества случаев инвазивного пневмококкового заболевания у детей, вызываемого серотипами, присутствующими в Prevnar®. См. Центры по контролю и профилактике заболеваний, MMWR, Morb. Mortal. Wkly. Rep., 2005, 54 (36):893-7. Тем не менее Prevnar® имеет ограниченный охват серотипов в некоторых регионах мира, к тому же имеются свидетельства появления в США некоторых новых серотипов (например, 19А и другие).

См. O'Brien et al., 2004, Am. J. Epidemiol., 159:634-44; Whitney et al., 2003, N. Engl. J. Med., 348:1737-46; Kyaw et al., 2006, N. Engl. J. Med., 354:1455-63; Hicks et al., 2007, J. Infect. Dis., 196:1346-54; Traore et al., 2009, Clin. Infect. Dis., 48:S181-S189.

В публикации заявки на патент США № US 2006/0228380 описана 13-валентная пневмококковая полисахарид-белковая конъюгатная вакцина, включающая серотипы 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F и 23F. В публикации заявки на патент Китая № CN 101590224 А описана 14-валентная пневмококковая полисахарид-белковая конъюгатная вакцина, включающая серотипы 1, 2, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9N, 9V, 14, 18С, 19А, 19F и 23F.

Другие PCV включают 7, 10, 11 или 13 серотипов, содержащихся в PCV-15 (публикация заявки на патент США 2011/0195086), но в отношении некоторых серотипов наблюдалась иммунная интерференция (например, более низкая защита для серотипа 3 в PCV-11 GSK) и более низкие показатели ответа на серотип 6В в PCV-13 Pfizer (PREVNAR® 13). См. Prymula et al., 2006, Lancet, 367:740-48; и Kieninger et al., Safety and Immunologic Non-inferiority of 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Compared to 7-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Given as a 4-Dose Series in Healthy Infants and Toddlers, presented at the 48th Annual ICAAC/ISDA, 46th Annual Meeting, Washington DC, October 25-28, 2008.

Современные поливалентные пневмококковые вакцины эффективны в снижении частоты пневмококковых заболеваний, связанных с серотипами, присутствующими в вакцинах. Тем не менее распространенность пневмококков, экспрессирующих серотипы, не присутствующие в доступных в настоящее время вакцинах, увеличивается. Соответственно существует потребность в дополнительных композициях пневмококковых вакцин, которые обеспечивают защиту от различных наборов пневмококковых серотипов и которые могут обеспечивать дополнительную защиту от пневмококковых серотипов, не присутствующих в доступных в настоящее время вакцинах.

### Сущность изобретения

Изобретение относится к поливалентным иммуногенным композициям, содержащим конъюгаты полисахарида *S. pneumoniae* с белком (*S. pneumoniae* полисахарид-белковые конъюгаты), где каждый из конъюгатов содержит полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, причем серотипы *S. pneumoniae* являются такими, как определено в настоящей заявке.

В конкретных вариантах осуществления изобретения серотипы *S. pneumoniae* содержат набор серотипов, выбранных из группы, состоящей из

- a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B;
- b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20; и
- c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20.

В дополнительных конкретных вариантах осуществления изобретения серотипы *S. pneumoniae* содержат набор серотипов, выбранных из группы, состоящей из

- a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B;
- b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A; и
- c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C,

17F и 20A.

В дополнительных конкретных вариантах осуществления изобретения серотипы *S. pneumoniae* содержат набор серотипов, выбранных из группы, состоящей из

- a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B;
- b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20B; и
- c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C,

17F и 20B.

В некоторых вариантах осуществления набор серотипов *S. pneumoniae*, перечисленных в а), б) или с), дополнительно содержит серотип 6C, серотип 6A или серотипы 6A и 6B.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из полисахарид-белковых конъюгатов образуется в результате реакции конъюгации, содержащей апротонный растворитель, например диметилсульфоксид (ДМСО). В конкретных вариантах осуществления каждый из полисахарид-белковых конъюгатов образуется в результате реакции конъюгации, содержащей апротонный растворитель. Как показано в настоящем описании, использование ДМСО в качестве растворителя во время восстановительного аминирования полисахарид-белковых конъюгатов обеспечивает неожиданно высокую стабильность и повышенную иммуногенность этих серотипов по сравнению с теми же конъюгатами, полученными в водных условиях.

Изобретение также относится к способам индукции защитного иммунного ответа у пациента-человека, включающие введение пациенту поливалентных иммуногенных композиций по изобретению. В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению пациент ранее получал лечение поливалентной пневмококковой вакциной.

Поливалентная иммуногенная композиция по изобретению может быть использована как часть схемы лечения другой комплексной пневмококковой вакциной. Соответственно изобретение относится к способу индукции защитного иммунного ответа у пациента-человека, включающему введение пациенту поливалентной иммуногенной композиции по изобретению, дополнительно включающему введение пациенту поливалентной пневмококковой вакцины в любом порядке. В конкретных вариантах осуществления поливалентная пневмококковая вакцина состоит из нескольких *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, где каждый из конъюгатов содержит полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем. В других вариантах осуществления поливалентная пневмококковая вакцина состоит из неконъюгированных капсульных полисахаридов.

Изобретение также относится к способам получения конъюгата полисахарида серотипа 8 *Streptococcus pneumoniae* с белком с помощью реакции конъюгации в апротонном растворителе, где в реакции конъюгации не используется цианоборгидрид.

Изобретение также относится к поливалентным иммуногенным композициям, содержащим *S. pneumoniae* полисахарид-белковые конъюгаты, где каждый из конъюгатов содержит полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, причем выбранные серотипы *S. pneumoniae* обеспечивают перекрестную реактивность с другими выбранными серотипами.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показан 600 МГц одномерный <sup>1</sup>H ЯМР-спектр капсульного полисахарида серотипа 6C *S. pneumoniae* в оксиде дейтерия (D<sub>2</sub>O) при 50°C. Отмечены сигналы, обусловленные внутренними стандартами (ДМСО и DSS-d<sub>6</sub>) и остаточной водой (HOD). Минорные сигналы, отмеченные \*, обусловлены остатками клеточной стенки *S. pneumoniae*, такими как С-полисахарид и/или пептидогликаны.

На фиг. 2 показан 600 МГц одномерный <sup>1</sup>H ЯМР-спектр капсульного полисахарида серотипа 15A *S. pneumoniae* в оксиде дейтерия (D<sub>2</sub>O) при 50°C. Отмечены сигналы, обусловленные внутренними стандартами (ДМСО и DSS-d<sub>6</sub>) и остаточной водой (HOD). Минорные сигналы, отмеченные \*, обусловлены остатками клеточной стенки *S. pneumoniae*, такими как С-полисахарид и/или пептидогликаны.

На фиг. 3 показан 600 МГц одномерный <sup>1</sup>H ЯМР-спектр капсульного полисахарида де-О-ацетилированного серотипа 15B *S. pneumoniae* в оксиде дейтерия (D<sub>2</sub>O) при 50°C. Отмечены сигналы, обусловленные внутренними стандартами (ДМСО и DSS-d<sub>6</sub>) и остаточной водой (HOD). Минорные сигналы, отмеченные \*, обусловлены остатками клеточной стенки *S. pneumoniae*, такими как С-полисахарид и/или пептидогликаны.

На фиг. 4 показан 600 МГц одномерный <sup>1</sup>H ЯМР-спектр капсульного полисахарида серотипа 35B

*S. pneumoniae* в D<sub>2</sub>O при 50°C. Отмечены сигналы, обусловленные внутренними стандартами (ДМСО и DSS-d<sub>6</sub>) и остаточной водой (HOD). Минорные сигналы, отмеченные \*, обусловлены остатками клеточной стенки *S. pneumoniae*, такими как С-полисахарид и/или пептидогликаны.

На фиг. 5 показана <sup>1</sup>H ЯМР-идентичная область, полезная для идентификации серотипа 6С *S. pneumoniae*. Отмечены положения сигналов каждого аномерного протона повторяющегося звена каждого моносахаридного остатка.

На фиг. 6 показана <sup>1</sup>H ЯМР-идентичная область, полезная для идентификации серотипа 15А *S. pneumoniae*. Отмечены положения сигналов каждого аномерного протона повторяющегося звена каждого моносахаридного остатка.

На фиг. 7 показана <sup>1</sup>H ЯМР-идентичная область, полезная для идентификации де-О-ацетилированного серотипа 15В *S. pneumoniae*. Отмечены положения сигналов каждого аномерного протона каждого моносахаридного остатка.

На фиг. 8 показана <sup>1</sup>H ЯМР-идентичная область, полезная для идентификации серотипа 35В *S. pneumoniae*. Отмечены положения сигналов каждого аномерного протона повторяющегося звена каждого моносахаридного остатка.

На фиг. 9А-9С показан 600 МГц одномерный <sup>1</sup>H ЯМР-спектр нативного капсульного полисахарида серотипа 15В *S. pneumoniae* (фиг. 9А), де-О-ацетилированного капсульного полисахарида серотипа 15В *S. pneumoniae* (фиг. 9В) и капсульного полисахарида серотипа 15С *S. pneumoniae* (фиг. 9С). Спектры получены в оксиде дейтерия (D<sub>2</sub>O) при 50°C. Отмечены сигналы, обусловленные внутренними стандартами (ДМСО и DSS-d<sub>6</sub>) и остаточной водой (HOD). Сигналы, отмеченные \*, обусловлены остатками клеточной стенки *S. pneumoniae*, такими как С-полисахарид и/или пептидогликаны.

На фиг. 10А-10С показана аномерная область 600 МГц одномерного <sup>1</sup>H ЯМР спектра нативного капсульного полисахарида серотипа 15В *S. pneumoniae* (фиг. 10А), де-О-ацетилированного капсульного полисахарида серотипа 15В *S. pneumoniae* (фиг. 10В) и капсульного полисахарида серотипа 15С *S. pneumoniae* (фиг. 10С). На фиг. 10D-10F показаны области спектра сигналов О-ацетил- и N-ацетилметила нативного капсульного полисахарида серотипа 15В *S. pneumoniae* (фиг. 10D), де-О-ацетилированного капсульного полисахарида серотипа 15В *S. pneumoniae* (фиг. 10E) и капсульного полисахарида серотипа 15С *S. pneumoniae* (фиг. 10F).

На фиг. 11 показано влияние времени и температуры (до 12 недель при 4°C (ромбы), до 4 недель при 25°C (квадраты), до 4 недель при 37°C (треугольники)) на концентрацию полисахарида в лекарственных препаратах PCV16 (0,128 мг/мл) или PCV21 (0,084 или 0,169 мг/мл), определенное с помощью методов HPSEC-UV/MALS/RI (см. пример 39).

На фиг. 12 показано влияние перемешивания при горизонтальном вращении и температуры (1 неделя при 4°C, 25°C или 37°C) на концентрацию полисахарида в лекарственных препаратах PCV16 (0,128 мг/мл) или PCV21 (0,084 или 0,169 мг/мл), находящихся в предварительно заполненных шприцах (см. пример 39).

На фиг. 13 показано влияние концентрации PS в зависимости от времени и температуры (до 4 недель при 4, 25 или 37°C) на среднюю молекулярную массу (Mw и Mn) лекарственных препаратов PCV16 (0,128 мг/мл) или PCV21 (0,084 или 0,169 мг/мл), определенное с помощью методов HPSEC-UV/MALS/RI.

На фиг. 14А и 14В показано влияние времени и температуры (до 1 недели при 4 или 37°C) на стабильность пневмококковой конъюгатной вакцины (PCV15 или PCV16), приготовленной с лекарственными веществами, конъюгированными в А) протонном растворителе (PCV15 полученная в результате конъюгации в полностью водной среде) или В) апротонном растворителе (PCV16, полученная в результате конъюгации в ДМСО при 0,064 мг/мл PnPs) с помощью флуоресцентной спектроскопии с внутренним белком с длиной волны возбуждения 280 нм (пример 40).

На фиг. 15 показаны титры разведения антител IgG по результатам ELISA (после введения дозы 2) у кроликов, иммунизированных моновалентными серотипами *S. pneumoniae*, конъюгированными с CRM197 и приготовленными с адьювантом на основе фосфата алюминия. Символы показывают отдельные титры, а планки погрешностей представляют 95% доверительные интервалы (CI) средних геометрических титров (GMT).

На фиг. 16 представлены специфичные для серотипа титры разведения ОРА (после введения дозы 2) у кроликов, иммунизированных моновалентными серотипами *S. pneumoniae*, конъюгированными с CRM197 и приготовленными с адьювантом на основе фосфата алюминия (АРА). Символы показывают отдельные титры, а планки погрешностей представляют 95% доверительные интервалы (CI) средних геометрических титров (GMT).

На фиг. 17 представлены титры разведения антител IgG по результатам ELISA (после введения дозы 2) у кроликов, иммунизированных моновалентными конъюгатами серотипа 15 *S. pneumoniae*. На оси Х показана вакцина, используемая для иммунизации кроликов. Пунктирные линии разделяют три отдельных анализа ELISA с использованием отдельного пневмококкового полисахарида в качестве покрывающего антигена. Символы показывают отдельные титры, а планки погрешностей представляют 95% доверительные интервалы (CI) средних геометрических титров (GMT).

На фиг. 18 показаны специфичные для серотипа титры разведения ОРА (до иммунизации, после введения дозы 1 (PD1), объединенные) и после введения дозы 2 (PD2)) у кроликов, иммунизированных моновалентными конъюгатами серотипа 15 S. pneumoniae. На оси X показана вакцина, используемая для иммунизации кроликов. Пунктирные линии разделяют три анализа ОРА с использованием отдельных бактериальных штаммов S. pneumoniae. Символы показывают отдельные титры, а планки погрешностей представляют 95% доверительные интервалы (CI) средних геометрических титров (GMT).

На фиг. 19А представлено сравнение ответов антител PD1 у NZWR (5 на группу) после вакцинации 4, 2, 1, 0,4, 0,08 или 0,016 мкг/дозу PCV21. Символы означают отношения среднего геометрического титра (GMT) PD1 (группа 2 мкг/дозу по сравнению с группами, получившими другие дозы), а планки погрешностей представляют 95% доверительный интервал (CI). На фиг. 19В показаны отношения GMT PD1 (95% CI) для сравниваемых доз PCV21, соответствующие отношениям GMT на фиг. 19А, нижняя 95% доверительная граница которых, превышающая 1,0, закрашена светло-серым, и отношениям GMT, верхняя 95% доверительная граница которых, находящаяся ниже 1,0, закрашены темно-серым. Данные по серотипу 15В включены для оценки перекрестной защиты.

На фиг. 20А представлено сравнение ответов PD2 антител у NZWR (5 на группу) после вакцинации 4, 2, 1, 0,4, 0,08 или 0,016 мкг/дозу PCV21. Символы обозначают отношения GMT PD2 (группа 2 мкг/дозу по сравнению с группами, получившими другие дозы), а планки погрешностей представляют 95% CI. На фиг. 20В показаны отношения GMT PD2 (доверительный интервал 95%) для сравниваемых доз PCV21, соответствующие отношениям GMT на фиг. 20А, у которых нижний 95% доверительный интервал, превышающий 1,0, заштрихован светло-серым цветом. Данные по серотипу 15В включены для оценки перекрестной защиты.

На фиг. 21А показаны специфичные для серотипа титры разведения ОРА PD1, у кроликов, иммунизированных PCV21 (2 мкг/PnPs). Символы обозначают отдельные титры, а планки погрешностей представляют 95% доверительные интервалы (CI) средних геометрических титров (GMT). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . На фиг. 21В показаны титры разведения в точке PD2 по результатам ОРА у кроликов, иммунизированных PCV21 (2 мкг/PnPs). Символы обозначают отдельные титры, а планки погрешностей представляют 95% доверительные интервалы (CI) средних геометрических титров (GMT), \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Данные серотипа 15В включены для оценки перекрестной защиты.

На фиг. 22А-22С показано влияние времени и температуры (т.е. 7 дней при 4°C, 1 день при 37°C или 7 дней при 37°C) на стабильность трех пневмококковых конъюгатных вакцин (PCV1, PCV7 и PCV14), приготовленных со всеми лекарственными веществами, конъюгированными либо в водном растворителе, либо в растворителе ДМСО, методом флуоресцентной спектроскопии с внутренним белком с длиной волны возбуждения 280 нм. На фиг. 22D показано влияние времени и температуры (т.е. 7 дней при 4 или 37°C) на стабильность 21-валентной пневмококковой конъюгатной вакцины (PCV21 при 0,084 мг/мл PnPs), приготовленной со всеми лекарственными веществами, конъюгированными в растворителе ДМСО, методом флуоресцентной спектроскопии с внутренним белком с длиной волны возбуждения 280 нм.

На фиг. 23 показано влияние температуры (7 дней при 4 или 37°C) и перемешивания при 4°C на распределение частиц по размерам по результатам анализа траектории наночастиц (NTA) для шести (6) вакцинных препаратов на основе пневмококкового конъюгата PCV21, приготовленных с PS-20 (0, 0,025, 0,05, 0,1, 0,15 или 0,2%; все в единицах мас./об. PS-20) при 0,084 мг/мл PnPs.

На фиг. 24 показано влияние температуры (4 и 37°C) и перемешивания на среднюю молекулярную массу трех лекарственных препаратов PCV21 по результатам анализа HPSEC/UV/MALS/RI. Три вакцинных препарата на основе пневмококкового конъюгата PCV21 готовили с различными концентрациями PS-20 (0,05, 0,1 и 0,15% мас./об.) при 0,084 мг/мл PnPs.

На фиг. 25 показано, что мыши, иммунизированные PCV21, защищены от интратрахеального заражения 24F S. pneumoniae.

На фиг. 26А и 26В показаны титры разведения антител IgG до иммунизации (объединенные), PD1 (объединенные) и PD2, определенные по ECL у кроликов, иммунизированных PCV21, приготовленной без адьювантов или с АРА. Планки погрешностей представляют 95% доверительные интервалы (CI) среднего геометрического титра (GMT). Данные серотипа 15В включены для оценки перекрестной защиты.

На фиг. 27А-27С показаны титры разведения антител IgG до иммунизации (объединенные), PD1 (объединенные) и PD2, определенные по ECL у кроликов, иммунизированных PCV8 без адьювантов, PCV16 без адьювантов и PCV31 с АРА. Планки погрешностей представляют 95% доверительные интервалы (CI) среднего геометрического титра (GMT). Данные серотипа 15В включены для оценки перекрестной защиты.

На фиг. 28 показано сравнение PD2 уровней синтеза антител по результатам ECL у NZWR (5 на группу) после вакцинации PCV21 с АРА или без него. Символы обозначают отношения GMT PD2 с планками погрешностей, представляющими 95% CI. Данные серотипа 15В включены для оценки перекрестной защиты.

На фиг. 29 показано сравнение PD2 уровней синтеза антител по результатам ECL у NZWR (5 на группу) для общих серотипов и перекрестно защищенного серотипа 15В после вакцинации PCV21, PCV8

или PCV16. Символы обозначают отношения GMT PD2 по результатам ECL с планками погрешностей, представляющими 95% CI.

На фиг. 30 показано сравнение PD2 уровней синтеза антител по результатам ECL у NZWR (5 на группу) для общих серотипов и перекрестно защищенного серотипа 15B после вакцинации PCV21/APA или PCV31/APA. Символы обозначают отношения GMT PD2 по результатам ECL с планками погрешностей, представляющими 95% CI.

На фиг. 31A-31D показаны серотип-специфические титры разведения ОРА до иммунизации (объединенные) (А, В) и PD2 (С, D) у кроликов, иммунизированных PCV. Планки погрешностей представляют 95% CI GMT. PCV21 использовали в качестве эталона для статистических сравнений, \* $p < 0,05$ . На фиг. 31A и 31C показаны данные для 8 общих серотипов во всех оцененных PCV (6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B) и дополнительных 8 общих серотипов для PCV16, PCV21 и PCV31 (8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20B). На фиг. 31B и 31D показаны данные для дополнительных 16 серотипов, не представленных на фиг. 31A и 31C. Пять из них также являются общими серотипами для PCV21 и PCV31 (3, 7F, 19A, 22F, 33F), десять серотипов содержатся исключительно в PCV31 (1, 4, 5, 6A, 6B, 9B, 14, 18C, 19F, 23F). Данные по серотипу 15B включены для оценки перекрестной защиты.

На фиг. 32 показаны титры разведения IgG антител до иммунизации, PD1, PD2 и PD3, определенные по результатам ECL у взрослых макак-резусов (n=8), иммунизированных PCV21. Планки погрешностей представляют 95% CI GMT. Данные серотипа 15B включены для оценки перекрестной защиты.

На фиг. 33 показаны титры разведения ОРА до иммунизации, PD1 (объединенные) и PD3 у макак-резусов, иммунизированных PCV21 (n=8). Планки погрешностей представляют 95% CI GMT. Данные серотипа 15B включены для оценки перекрестной защиты.

На фиг. 34 показаны титры ОРА до иммунизации и PD3 (день 70) для четырех серотипов, не содержащихся в вакцине PCV21, у взрослых макак-резусов, иммунизированных PCV21.

На фиг. 35 показано сравнение PD1 уровней синтеза антител по результатам ECL у взрослых макак-резусов (5 на группу) после вакцинации PCV21 с APA или без него. Символы указывают на отношения GMT PD2 по результатам ECL (PCV21 против PCV21/APA) с планками погрешностей, представляющими 95% CI. Данные серотипа 15B включены для оценки перекрестной защиты.

На фиг. 36 показаны PD1 уровни синтеза антител IgG на серотипы 3, 7F, 19A, 22F и 33F у взрослых макак-резусов (2-5 на группу) после вакцинации PCV21 по сравнению с PCV15 или Pevnar13. Символы обозначают отношения GMT PD2 по результатам ECL с планками погрешностей, представляющими 95% CI.

На фиг. 37 показаны титры разведения IgG антител по результатам ELISA на 6A, 6B и 6C ((до иммунизации и PD1, объединенные) и PD2) у кроликов, иммунизированных лекарственным препаратом на основе моновалентного 6A-CRM197 (А) или 6B-CRM197 (В). Столбцы указывают средние геометрические титры (GMT), а планки погрешностей - 95% доверительные интервалы (CI) GMT.

На фиг. 38 показаны специфичные для серотипов 6A, 6B и 6C титры разведения ОРА ((до иммунизации и PD1, объединенные) и PD2) у кроликов, иммунизированных лекарственными препаратами на основе одновалентного 6A-CRM197 (А) или 6B-CRM197 (В). Столбцы указывают средние геометрические титры (GMT), а планки погрешностей - 95% доверительные интервалы (CI) GMT.

На фиг. 39 показаны специфичные для серотипов 20A и 20B титры разведения ОРА (до иммунизации (объединенные), PD1 и PD2) у кроликов, иммунизированных 20A-CRM197/APA (А) или PCV21 (В). Столбцы указывают средние геометрические титры (GMT), а планки погрешностей - 95% доверительные интервалы (CI) GMT.

### Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к поливалентным иммуногенным композициям, содержащим пневмококковые полисахарид-белковые конъюгаты, где каждый из конъюгатов содержит полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, причем серотипы *S. pneumoniae* являются такими, как определено в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит набор пневмококковых серотипов, выбранных из группы, состоящей из

- (a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B;
- (b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20; и
- (c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит набор пневмококковых серотипов, выбранных из группы, состоящей из

- (a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B;
- (b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20B; и
- (c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20B.

В других вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит набор пневмококковых серотипов, выбранных из группы, состоящей из

- (a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B;
- (b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A; и
- (c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A.

В других вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит

- (i) серотип 6А;
- (ii) серотипы 6А и 6В; или
- (iii) серотип 6С.

В конкретном варианте осуществления изобретение содержит несколько пневмококковых *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, где каждый из конъюгатов содержит полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, причем серотипы *S. pneumoniae* содержат серотипы 3, 6С, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15С, 16F, 17F, 19А, 20А, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F и 35В. Было обнаружено, что указанная композиция является иммуногенной у кроликов и генерирует функциональное антитело, которое убивает бактериальные штаммы вакцинного типа при всех протестированных дозах (пример 43). В другом конкретном варианте осуществления изобретение содержит несколько пневмококковых *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, где каждый из конъюгатов содержит полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, где серотипы *S. pneumoniae* содержат серотипы 3, 7F, 19А, 22F, 33F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15С, 17F, 20, 6А, 15А, 15С, 16F, 23А, 23В, 24F, 31 и 35В. В другом конкретном варианте осуществления изобретение содержит несколько пневмококковых *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, где каждый из конъюгатов содержит полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, причем серотипы *S. pneumoniae* содержат серотипы 3, 7F, 19А, 22F, 33F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15С, 17F, 20В, 6А, 15А, 15С, 16F, 23А, 23В, 24F, 31 и 35В. В другом конкретном варианте осуществления изобретение содержит несколько пневмококковых *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, где каждый из конъюгатов содержит полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, причем серотипы *S. pneumoniae* содержат серотипы 3, 7F, 19А, 22F, 33F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15С, 17F, 20А, 6А, 15А, 15С, 16F, 23А, 23В, 24F, 31 и 35В.

Поливалентные иммуногенные композиции по изобретению полезны для иммунизации пациента против вакцинных серотипов *S. pneumoniae* и в качестве компонента схемы лечения другой(ими) комплементарной(ыми) пневмококковой(ыми) вакциной(ами). Соответственно изобретение относится к способу индукции защитного иммунного ответа у пациента-человека, включающему введение пациенту поливалентной иммуногенной композиции по изобретению и дополнительно включающий введение пациенту поливалентной пневмококковой вакцины в любом порядке. В других вариантах осуществления поливалентные иммуногенные композиции по изобретению вводят пациенту, который ранее был иммунизирован другой поливалентной пневмококковой вакциной.

В вариантах осуществления изобретения конъюгаты по меньшей мере одного пневмококкового серотипа получают по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе, таком как ДМСО. В других вариантах осуществления поливалентная иммуногенная композиция содержит пневмококковые конъюгаты, каждый из которых был получен по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе. В настоящем описании показано, что лекарственные препараты PCV1, PCV7, PCV14, PCV16 и PCV21 (определенные ниже), содержащие лекарственные вещества, каждое из которых было получено по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе, являются устойчивыми к деполимеризации или химической дегградации углевода, а также являются устойчивыми к агрегации белка в составе лекарственного препарата (см. примеры 40 и 45). Использование растворителя ДМСО усиливает ковалентные связи между полисахаридом и белком, образованные при непосредственном участии остатков лизина на поверхности белка-носителя. Улучшенные ковалентные связи обеспечивают непосредственное преимущество в смысле повышения стабильности полисахарид-белкового конъюгата поливалентных иммуногенных композиций, содержащих полисахаридные антигены, конъюгированные в ДМСО.

#### I. Определения и сокращения.

В описании и прилагаемой формуле изобретения применяются следующие сокращения:

- АРА - адъювант на основе фосфата алюминия;
- АРС - антигенпрезентирующая клетка;
- СI - доверительный интервал;
- ДМСО - диметилсульфоксид;
- DS - полисахарид-белковое лекарственное вещество;
- GMC - геометрическая средняя концентрация;
- GMT - средний геометрический титр;
- HPSEC - высокоэффективная эксклюзионная хроматография;
- IM - внутримышечно;
- LOS - липоолигосахарид;
- LPS - липополисахарид;
- MALS - многоугловое рассеяние света;
- MBC - моновалентный смешанный (общий) конъюгат;
- MOPA - мультиплексный анализ опсонофагоцитарных реакций;
- MW - молекулярная масса;
- NMWCО - номинальное отсечение по молекулярной массе;

NZWR - новозеландский белый кролик;  
 OPA - анализ опсонофагоцитоза;  
 PCV - пневмококковая конъюгатная вакцина;  
 PD1 - после дозы 1;  
 PD2 - после дозы 2;  
 PnPs - пневмококковый полисахарид;  
 Ps - полисахарид;  
 PS-20 - полисорбат-20;  
 RI - показатель преломления;  
 UV - ультрафиолет;  
 w/v - мас./об.

Для облегчения понимания изобретения ниже специально приведено определение некоторых технических и научных терминов. Если в настоящем описании отсутствует специальное определение, то все другие технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют значение, обычно понимаемое специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Используемое в описании и в прилагаемой формуле изобретения форма единственного числа включают ссылку на множественное число, если из контекста в явном виде не следует иное.

Ссылка на "или" указывает на одну или обе возможности, если из контекста в явном виде не следует одна из указанных возможностей. В некоторых случаях используется "и/или" для выделения одной или обеих возможностей.

Термины "водный растворитель" или "водные условия", используемые применительно к конъюгации, такой как восстановительное аминирование, относятся к использованию воды в качестве растворителя в реакции конъюгации. Вода может содержать буферы и другие компоненты, за исключением органического растворителя.

Термины "апротонный растворитель", "растворитель ДМСО" или "условия ДМСО", используемые применительно к конъюгации, такой как восстановительное аминирование, относятся к применению апротонного растворителя или комбинации апротонных растворителей (или ДМСО, в зависимости от случая) в качестве растворителя в реакции конъюгации. Апротонный растворитель может содержать некоторое количество воды, например, до 1, 2, 5, 10 или 20%.

Термин "содержит", используемый применительно к иммуногенной композиции по изобретению, относится к включению любых других компонентов, таких как адъюванты и наполнители, или к добавлению одного или более полисахарид-белковых конъюгатов, которые не указаны специальным образом. Термин "состоящий из", используемый применительно к смеси поливалентного полисахарид-белкового конъюгата, относится к смеси, содержащей эти конкретные *S. pneumoniae* полисахарид-белковые конъюгаты, и при этом не содержащей никаких других конъюгатов полисахарида другого серотипа *S. pneumoniae* с белком. "По существу состоит из" и варианты, такие как "по существу состоят из" или "по существу состоящий из", указывают на включение любого из перечисленных элементов или групп элементов и на необязательное включение других элементов, аналогичных или отличающихся по природе от перечисленных элементов, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного режима дозирования, способа или композиции.

"Эффективное количество" композиции по изобретению относится к дозе, необходимой для генерации антител, которое значительно снижает вероятность проявления или серьезность инфицирующей способности микроба, например *S. pneumoniae*, во время последующего заражения.

Используемое в настоящем описании выражение "показано для профилактики пневмококковой инфекции" означает, что вакцина или иммуногенная композиция одобрена одним или более регулирующими органами, такими как Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США, для профилактики одного или более заболеваний, вызванных любым серотипом *S. pneumoniae*, включая без ограничения в общем случае пневмококковое заболевание, пневмококковую пневмонию, пневмококковый менингит, пневмококковую бактериемию, инвазивное заболевание, вызванное *S. pneumoniae*, и средний отит, вызванный *S. pneumoniae*.

"Поливалентная пневмококковая вакцина" представляет собой фармацевтический препарат, содержащий более одного активного агента (например, пневмококковый капсульный полисахарид или пневмококковый полисахарид-белковый конъюгат), который обеспечивает активный иммунитет к заболеванию или патологическому состоянию, вызванному более чем одним серотипом *S. pneumoniae*.

Термин "полисахарид" означает включение любого антигенного сахаридного элемента (или антигенной единицы), обычно используемого в области иммунологических и бактериальных вакцин, включая без ограничения "сахарид", "олигосахарид", "полисахарид", "липосахарид", "липоолигосахарид (LOS)", "липополисахарид (LPS)", "гликозилат", "гликоконъюгат" и т.п.

"PCV1" в контексте настоящего описания относится к 1-валентной пневмококковой конъюгатной вакцине, содержащей один *S. pneumoniae* полисахарид-белковый конъюгат, включающий капсульный полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, где серотип *S. pneumoniae* представляет собой серотип 3 (как показано в примерах 38 и 45). В конкретных вариантах осуществления

белок-носитель представляет собой CRM197.

"PCV7" в контексте настоящего описания относится к 7-валентной пневмококковой конъюгатной вакцине, содержащей семь *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, каждый из которых содержит капсульные полисахариды серотипов *S. pneumoniae*, конъюгированные с белком-носителем, где серотипы *S. pneumoniae* представляют собой 3, 8, 9N, 11A, 19A, 15A и 10A. В конкретных вариантах осуществления белок-носитель одного или более *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов представляет собой CRM197. В других вариантах осуществления белок-носитель каждого из *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов представляет собой CRM197.

"PCV8" в контексте настоящего описания относится к 8-валентной пневмококковой конъюгатной вакцине, содержащей восемь *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, каждый из которых содержит капсульный полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, где серотипы *S. pneumoniae* представляют собой 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B. В конкретных вариантах осуществления белок-носитель одного или более *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов представляет собой CRM197. В других вариантах осуществления белок-носитель каждого из *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов представляет собой CRM197.

"PCV14" в контексте настоящего описания относится к 14-валентной пневмококковой конъюгатной вакцине, содержащей четырнадцать *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, каждый из которых содержит капсульные полисахариды серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированные с белком-носителем, где серотипы *S. pneumoniae* представляют собой 3, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 19A, 20, 22F и 33F. В конкретных вариантах осуществления белок-носитель одного или более *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов представляет собой CRM197. В других вариантах осуществления белок-носитель каждого из *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов представляет собой CRM197.

"PCV15" в контексте настоящего описания относится к 15-валентной пневмококковой конъюгатной вакцине, содержащей пятнадцать *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, каждый из которых содержит капсульные полисахариды серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированные с белком-носителем, где серотипы *S. pneumoniae* представляют собой 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9B, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F. В конкретных вариантах осуществления белок-носитель одного или более *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов представляет собой CRM197. В других вариантах осуществления белок-носитель каждого из *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов представляет собой CRM197.

"PCV16" в контексте настоящего описания относится к 16-валентной пневмококковой конъюгатной вакцине, содержащей шестнадцать *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, каждый из которых содержит капсульный полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, где серотипы *S. pneumoniae* представляют собой 6C, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 20A, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, и по меньшей мере один из следующих серотипов серогруппы 15: 15B, 15C или де-О-ацетилированный 15B. В конкретных вариантах осуществления серотип 15 представляет собой серотип 15C или де-О-ацетилированный 15B. Как показано в настоящем описании (см. пример 3, ниже), де-О-ацетилированный пневмококковый полисахарид серотипа 15B эквивалентен пневмококковому полисахариду серотипа 15C и имеет идентичные спектры ЯМР. В конкретных вариантах осуществления белок-носитель одного или более *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов представляет собой CRM197. В других вариантах осуществления белок-носитель каждого из *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов представляет собой CRM197.

"PCV21" в контексте настоящего описания относится к 21-валентной пневмококковой конъюгатной вакцине, содержащей двадцать один *S. pneumoniae* полисахарид-белковый конъюгат, каждый из которых содержит капсульный полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, где серотипы *S. pneumoniae* представляют собой 3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, и по меньшей мере один из следующих серотипов серогруппы 15: 15B, 15C или де-О-ацетилированный-15B. В конкретных вариантах осуществления серотип 15 представляет собой серотип 15C или де-О-ацетилированный 15B. В конкретных вариантах осуществления белок-носитель одного или более *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов представляет собой CRM197. В других вариантах осуществления белок-носитель каждого из *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов представляет собой CRM197.

Серотипы *S. pneumoniae* 20A и 20B были идентифицированы (Calix, J.J. et al., J. Biol., Химреагент (2012), 287(33):27885-27894) в серогруппе 20 в 2012 г. с помощью генетического анализа. Как указано Calix J.J. et al., эти два серотипа не удавалось идентифицировать ранее с помощью обычных методов серотипирования и коммерчески доступных антител и сегодня имеется ограниченная информация относительно попыток серотипирования серотипов 20A и 20B. Кроме того, распространенность заболеваний, вызываемых 20A или 20B, среди выявленных заболеваний, вызываемых серогруппой 20, остается не совсем понятной. По существу специалист в данной области может выбрать один или оба эти серотипа (20A и/или 20B) для включения в *S. pneumoniae* вакцинную композицию. Также возможно, что вакцина против *S. pneumoniae*, содержащая один полисахаридный антиген серотипа 20, может обеспечить перекрестную защиту от другого антигена (например, вакцина, включающая конъюгаты полисахарида серотипа 20A *S. pneumoniae*, а не серотипа 20B, с белком может обеспечивать перекрестную защиту от инфекции, вызы-

ваемой серотипом 20B *S. pneumoniae*). Следовательно, термин "серотип 20", используемый в настоящем описании, может относиться к композиции, содержащей конъюгаты полисахарида серотипа 20A и/или серотипа 20B с белком.

"СрG-содержащий нуклеотид", "СрG-содержащий олигонуклеотид", "СрG-олигонуклеотид" и аналогичные термины относятся к нуклеотидной молекуле длиной 6-50 нуклеотидов, которая содержит неметилированный фрагмент СрG. См., например, Wang et al., 2003, Vaccine, 21:4297. СрG-содержащие олигонуклеотиды включают модифицированные олигонуклеотиды образованные с помощью любых синтетических межнуклеозидных связей модифицированного основания и/или модифицированного сахара.

"Адьювант" в контексте настоящего описания представляет собой вещество, которое служит для усиления иммуногенности иммуногенной композиции по изобретению. Иммуный адьювант может усиливать иммунный ответ на антиген, который при введении отдельно является слабоиммуногенным, например, не индуцирующим или индуцирующим слабые титры антител или клеточный иммунный ответ, может увеличивать титры антител к антигену и/или позволяет снизить дозу антигена, эффективную для достижения иммунного ответа у человека. Таким образом, адьюванты часто применяются для усиления иммунного ответа и хорошо известны специалисту в данной области.

"Пациент" (альтернативно называемый в настоящем описании "субъектом") относится к млекопитающему, способному быть инфицированным *S. pneumoniae*. В предпочтительных вариантах осуществления пациент является человеком. Пациент может получать профилактическое или терапевтическое лечение. Профилактическое лечение обеспечивает достаточный защитный иммунитет для снижения вероятности возникновения или тяжести пневмококковой инфекции или ее последствий, например пневмококковой пневмонии. Терапевтическое лечение может применяться для уменьшения тяжести или предупреждения рецидива инфекции *S. pneumoniae* или ее клинических эффектов. Профилактическое лечение может осуществляться с помощью поливалентной иммуногенной композиции по изобретению, раскрытой в настоящем описании. Композицию по изобретению можно вводить населению в целом или людям с повышенным риском пневмококковой инфекции, например, пожилым людям или тем, кто живет с пожилыми людьми или заботится о них.

Термин "нуждающийся в лечении" включает подвергавшихся ранее воздействию или инфицированных *S. pneumoniae*, ранее вакцинированных против *S. pneumoniae*, а также склонных к инфекции, или любого, в отношении которого желательно снижение вероятности инфицирования, например, индивидуумов с ослабленным иммунитетом, пожилых индивидуумов, детей, взрослых или здоровых индивидуумов.

"Стабильная" поливалентная иммуногенная композиция представляет собой композицию, которая не демонстрирует существенных изменений, наблюдаемых при температуре охлаждения (например, 2-8 или 4°C) в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 6, 12 и/или 24 месяцев. Кроме того, "стабильная" композиция включает композицию, которая проявляет требуемые свойства при температурах, в том числе при 25 и 37°C, в течение периодов времени, включая 1, 3, 6, 12 и/или 24 месяца. Типичными приемлемыми критериями стабильности являются следующие: изменчивость не более чем на примерно 5%, примерно 10%, примерно 15% или примерно 20% по одному или более показателей из следующих:

- (a) среднечисленная молекулярная масса (Mn) *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов в композиции;
- (b) среднемассовая молекулярная масса (Mw) *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов в композиции;
- (c) общая концентрация полисахарида в композиции;
- (d) максимальное излучение композиции, измеренное методом флуоресцентной спектроскопии с внутренним белком при конкретной длине волны возбуждения, например, 280 нанометров; и
- (e) интенсивность флуоресценции композиции, измеренная методом флуоресцентной спектроскопии с внутренним белком при конкретной длине волны возбуждения.

Термин "стабильный" также может использоваться для обозначения конкретного пневмококкового конъюгата в поливалентной иммуногенной композиции. При таком использовании термин относится к конъюгату, который проявляет требуемые свойства с течением времени, при определенной температуре, и такие свойства изменяются с течением времени и при некоторой температуре не более чем на примерно 5%, на примерно 10%, на примерно 15% или на примерно 20%.

## II. Поливалентные иммуногенные композиции.

Изобретение относится к поливалентным иммуногенным композициям, содержащим несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, где каждый из конъюгатов содержит полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем. Ниже описаны различные аспекты и варианты поливалентных иммуногенных композиций по изобретению.

В одном из вариантов осуществления (вариант E1) изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, каждый из которых содержит капсульный полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, где серотипы *S. pneumoniae* состоят из или по существу состоят из

- (1) 15A,
- (2) 16F, Data</GipSegment>
- (3) одного или более из 23 серотипов, выбранных из: (a) 23A и 23B, (b) 23A и 23F, (c) 23B и 23F, (d) 23A, (e) 23B и (f) 23F, Data</GipSegment>
- (4) 24F, Data</GipSegment>
- (5) 31, и
- (6) 35B.

В подварианте варианта осуществления E1 один или более серотипов серогруппы 23 представляют собой 23A и 23B (т.е. отсутствуют любые другие серотипы серогруппы 23). В дополнительном подварианте варианта осуществления E1 один или более серотипов серогруппы 23 представляют собой 23A и 23F. В другом подварианте варианта осуществления E1 один или более серотипов серогруппы 23 представляют собой 23B и 23F. В еще одном подварианте варианта осуществления E1 23A является единственным серотипом серогруппы 23. В дополнительном подварианте варианта осуществления E1 23B является единственным серотипом серогруппы 23. В еще одном дополнительном подварианте варианта осуществления E1 23F является единственным серотипом серогруппы 23.

Во втором варианте осуществления (вариант E2) изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, включающих капсульный полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, где серотипы *S. pneumoniae* содержат набор серотипов, представленный в варианте осуществления E1 или в любом подварианте варианта осуществления E1, и дополнительно содержат серотип: (1) 6C, (2) 6A или (3) 6A и 6B.

В подварианте варианта осуществления E2 композиция содержит серотип 6C. В дополнительном подварианте варианта осуществления E2 композиция содержит серотипы 6A и 6B и не содержит серотип 6C. В другом подварианте варианта осуществления E2 композиция содержит серотип 6A.

В третьем варианте осуществления (вариант E3) изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, включающих капсульный полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, где серотипы *S. pneumoniae* содержат набор серотипов, приведенный в вариантах осуществления E1 или в любых подвариантах варианта осуществления E1, или в варианте осуществления E2 или любом подварианте варианта осуществления E2, и дополнительно содержат серотипы

- (1) 8,
- (2) 9N, Data</GipSegment>
- (3) 11A
- (4) 12F, Data</GipSegment>
- (5) 15B или 15C,
- (6) 17F и
- (7) 20A и/или 20B.

В четвертом варианте осуществления (вариант E4) изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, включающих капсульный полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, где серотипы *S. pneumoniae* содержат набор серотипов, приведенный в любом из вариантов осуществления E1-E3 или в их любых подвариантах осуществления, и дополнительно содержат серотипы 10A или 39.

В пятом варианте осуществления (вариант E5) изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, описанных выше, где серотипы *S. pneumoniae* содержат, состоят или по существу состоят из 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B.

В шестом варианте осуществления (вариант E6) изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, описанных выше, где серотипы *S. pneumoniae* содержат, состоят или по существу состоят из 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B.

В седьмом варианте осуществления (вариант осуществления E7) изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, описанных выше, где серотипы *S. pneumoniae* содержат, состоят или по существу состоят из 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B.

В восьмом варианте осуществления (вариант осуществления E8) изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, описанных выше, где серотипы *S. pneumoniae* содержат, состоят или по существу состоят из 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B.

В девятом варианте осуществления (вариант осуществления E9) изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, описанных выше, где серотипы *S. pneumoniae* содержат, состоят или по существу состоят из 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B.

югатов, описанных выше, где серотипы *S. pneumoniae* содержат серотипы, приведенные в любом из вариантов осуществления E1-E8 (или любом их подварианте), и дополнительно содержат серотипы 3, 7F и 19A.

В десятом варианте осуществления (вариант осуществления E10) изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, описанных выше, где серотипы *S. pneumoniae* содержат серотипы, приведенные в любом из вариантов осуществления E1-E9 (или любом их подварианте), и дополнительно содержат серотип 22F.

В одиннадцатом варианте осуществления (вариант осуществления E11) изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, описанных выше, где серотипы *S. pneumoniae* содержат серотипы, приведенные в любом из вариантов осуществления E1-E10 (или любом их подварианте), и дополнительно содержат серотип 33F.

В двенадцатом варианте осуществления (вариант осуществления E12) изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, описанных выше, где серотипы *S. pneumoniae* содержат, состоят или по существу состоят из набора серотипов *S. pneumoniae*, выбранных из группы, состоящей из

- (1) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,
- (2) 15A, 16F, 23F, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>
- (3) 15A, 16F, 23A, 23F, 24F, 31 и 35B,
- (4) 15A, 16F, 23A, 24F, 31 и 35B,
- (5) 15A, 16F, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>
- (6) 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B,
- (7) 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>
- (8) 6C, 15A, 16F, 23F, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>
- (9) 6C, 15A, 16F, 23A, 23F, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>
- (10) 6C, 15A, 16F, 23A, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>
- (11) 6C, 15A, 16F, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>
- (12) 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B,
- (13) 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,
- (14) 6A, 15A, 16F, 23F, 23B, 24F, 31 и 35B,
- (15) 6A, 15A, 16F, 23A, 23F, 24F, 31 и 35B,
- (16) 6A, 15A, 16F, 23A, 24F, 31 и 35B,
- (17) 6A, 15A, 16F, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>
- (18) 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B,
- (19) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,
- (20) 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 23B, 24F, 31 и 35B,
- (21) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23F, 24F, 31 и 35B,
- (22) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 24F, 31 и 35B,
- (23) 6A, 6B, 15A, 16F, 23B, 24F, 31 и 35B, и
- (24) 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B.

В тринадцатом варианте осуществления (вариант осуществления E13) изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, описанных выше, где серотипы *S. pneumoniae* содержат, состоят или по существу состоят из набора серотипов *S. pneumoniae*, выбранных из группы, состоящей из

- (1) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (2) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (3) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (4) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (5) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (6) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (7) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (8) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (9) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (10) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (11) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (12) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (13) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (14) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (15) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (16) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (17) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (18) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (19) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B,  
Data</GipSegment>
- (20) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B,

Data</GipSegment>

(21) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B,

Data</GipSegment>

(22) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B,

Data</GipSegment>

(23) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B,

Data</GipSegment>

(24) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B,

Data</GipSegment>

(25) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B,

Data</GipSegment>

(26) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B,

Data</GipSegment>

(27) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B,

Data</GipSegment>

(28) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B,

Data</GipSegment>

(29) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B,

Data</GipSegment>

(30) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B,

Data</GipSegment>

(31) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B, и

(32) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B.

Тринадцатый вариант осуществления (вариант осуществления E13) дополнительно содержит набор серотипов *S. pneumoniae*, строки (1)-(32), где серотип 20A в каждом наборе заменен либо серотипом 20, либо серотипом 20B.

В четырнадцатом варианте осуществления (вариант осуществления E14) изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, описанных выше, где серотипы *S. pneumoniae* содержат, состоят или по существу состоят из набора серотипов *S. pneumoniae*, выбранных из любого набора серотипов, приведенного в варианте осуществления E13, строки (17)-(32), и дополнительно содержат серотипы 23A и/или 23B.

В пятнадцатом варианте осуществления (вариант осуществления E15) изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, описанных выше, где серотипы *S. pneumoniae* содержат, состоят или по существу состоят из набора серотипов *S. pneumoniae*, выбранных из группы, состоящей из

(1) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A,

23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>

(2) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B,

24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (3) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (4) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (5) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (6) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (7) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (8) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (9) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (10) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (11) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (12) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (13) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (14) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (15) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (16) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (17) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (18) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (19) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (20) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (21) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (22) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F,

- 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (23) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F,  
 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (24) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и  
 35B, Data</GipSegment>  
 (25) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F,  
 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (26) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F,  
 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (27) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31  
 и 35B, Data</GipSegment>  
 (28) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F,  
 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (29) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F,  
 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (30) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 и  
 35B, Data</GipSegment>  
 (31) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F,  
 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (32) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F,  
 31 и 35B, Data</GipSegment>  
 (33) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F,  
 15C, 17F и 20B, Data</GipSegment>  
 (34) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F,  
 15C, 17F и 20A,  
 (35) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F,  
 15C, 17F и 20B, Data</GipSegment>  
 (36) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F,  
 15C, 17F и 20B, Data</GipSegment>  
 (37) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A,  
 12F, 15C, 17F и 20A, Data</GipSegment>  
 (38) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A,  
 12F, 15C, 17F и 20B, Data</GipSegment>  
 (39) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F,  
 15C, 17F и 20,  
 (40) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F,  
 15C, 17F и 20,  
 (41) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F,  
 15C, 17F, и 20,  
 (42) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F,  
 15C, 1  
 (43) 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F,  
 15C, 17F, и 20, и  
 (44) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A,  
 12F, 15C, 17F и 20.

В шестнадцатом варианте осуществления (вариант осуществления E16) изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, описанных выше, где серотипы *S. pneumoniae* содержат, состоят или по существу состоят из набора серотипов *S. pneumoniae*, выбранных из любого набора серотипов, приведенного в варианте осуществления E15, строки (17)-(32), и дополнительно содержат серотипы 23A и/или 23B.

В семнадцатом варианте осуществления (вариант осуществления E17), изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, содержащих капсульный полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, где серотипы *S. pneumoniae* содержат набор серотипов, выбранных из группы, состоящей из

- i. 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, Data</GipSegment>
- ii. 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 12F5 17F, и 20A, и
- iii. 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, и 20A;

В подвариантах варианта осуществления E17 иммуногенная композиция не содержит никаких дополнительных *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов.

В восемнадцатом варианте осуществления (вариант осуществления E18), изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, содержащих капсульный полисахарид серотипов *S. pneumoniae* 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B. В подвариантах варианта осуществления E18 иммуногенная композиция не содержит никаких дополнительных *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов.

В девятнадцатом варианте осуществления (вариант осуществления E19) изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, содержащих капсульный полисахарид серотипов *S. pneumoniae* 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A. В подвариантах варианта осуществления E19 иммуногенная композиция не содержит никаких дополнительных *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов.

В двадцатом варианте осуществления (вариант осуществления E20) изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, содержащих капсульный полисахарид серотипов *S. pneumoniae* 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 25A, 15C, 15C. В подвариантах варианта осуществления E20 иммуногенная композиция не содержит никаких дополнительных *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов.

В другом варианте осуществления изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, содержащих капсульный полисахарид серотипов 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A и 15F, 15C, 15C *S. pneumoniae*. В подвариантах этого варианта осуществления (т.е. 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A), иммуногенная композиция не содержит никаких дополнительных *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов.

В другом варианте осуществления изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, содержащих капсульный полисахарид из серотипов 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15F, 15C, 1 *S. pneumoniae*. В подвариантах этого варианта осуществления (т.е. 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20), иммуногенная композиция не содержит никаких дополнительных *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов.

В другом варианте осуществления изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, содержащих капсульный полисахарид серотипов 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20B *S. pneumoniae*. В подвариантах этого варианта осуществления (т.е. 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20B), иммуногенная композиция не содержит никаких дополнительных *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов.

Как показано в настоящем описании (см. пример 3, ниже), де-О-ацетилированный пневмококковый полисахарид серотипа 15B эквивалентен пневмококковому полисахариду серотипа 15C и имеет идентичные спектры ЯМР. Де-О-ацетилированный пневмококковый полисахарид серотипа 15B, описанный и раскрытый в настоящем описании, эквивалентен пневмококковому полисахариду серотипа 15C, и в обоих этих серотипах содержание О-ацетила в повторяющемся звене может находиться в диапазоне 0-5% или в диапазоне 0-4%, или в диапазоне 0-3%, или в диапазоне 0-2%, или в диапазоне 0-1%, или в диапазоне 0-0,5%, или в диапазоне 0-0,1%, или О-ацетил может отсутствовать. Spencer B.L. et al. сообщают о том, что уровень О-ацетилирования 15C может быть невысоким (Spencer, B.L. et al., Clin. Vac. Immuno. (2017), 24(8):1-13). Таким образом, в любом из вариантов осуществления поливалентных иммуногенных композиций, приведенных в настоящем описании, вместо серотипа 15C можно использовать де-О-ацетилированный серотип 15B. Способы де-О-ацетилирования известны в данной области, например, описаны Rajam et al., Clinical. and Vaccine Immunology, 2007, 14(9):1223-1227.

В некоторых вариантах осуществления любая из поливалентных иммуногенных композиций по изобретению, включая варианты осуществления E1-E20 и любой их подвариант, дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

Перекрестная реактивность.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к поливалентным иммуногенным композициям, содержащим *S. pneumoniae* полисахарид-белковые конъюгаты, где каждый из конъюгатов содержит полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, включая серотип 6C, конъюгированный с белком-носителем, где серотип 6C *S. pneumoniae* обеспечивает перекрестную защиту от серотипов 6A и 6B *S. pneumoniae*.



серотип 15С, конъюгированный с белком-носителем, где серотип 15С *S. pneumoniae* обеспечивает перекрестную защиту от серотипа 15В *S. pneumoniae*.

Белок-носитель.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения CRM197 используется в качестве белка-носителя. CRM197 представляет собой нетоксичный вариант (т.е. анатоксин) дифтерийного токсина, имеющий следующую аминокислотную последовательность:

```
GADDVVDSSK SFVMENFSSY HGTKPGYVDS IQKGIQKPKS GTQGNVDDDDW
KEFYSTDNKY DAAGYSVDNE NPLSGKAGGV VKVTYPGLTK VLALKVDNAE
TIKKELGLSL TEPLMEQVGT EEFIKRFGDG ASRVVLSLPLF AEGSSSVEYI
NNWEQAKALS VELEINFETR GKRQDAMYE YMAQACAGNR VRRSVGSSLS
CINLDWDVIR DKTTKKIESL KENGPKNKM SESPNKTVSE EKAKQYLEEF
HQTALEHPEL SELKTVTGTN PVFAGANYAA WAVNVAQVID SETADNLEKT
TAALSILPGI GSVMGADGA VHHNTEEIVA QSIALSSLMV QAQIPLVGL
VDIGFAAYNF VESIINLFQV VHNSYNRPAY SPGHKTQPFLL HDGYAVSWNT
VEDSIIRTGF QGESGHDIKI TAENTPLPIA GVLLPTIPGK LDVNKSKTHI
SVNGRKIRMR CRAIDGDVTF CRPKSPVYVG NGVHANLHVA FHRSSSEKIH
SNEISSDSIG VLGYQKTVDH TKVNSKLSLF FEIKS (SEQ ID NO:1)
```

В одном из вариантов осуществления CRM197 выделяют из культур штамма *Corynebacterium diphtheria* C7 (β197), выращенных в присутствии казиминовых кислот в среде на основе дрожжевого экстракта. В другом варианте осуществления CRM197 получают рекомбинантным методом в соответствии со способами, описанными в США 5614382. Как правило, CRM197 очищают с помощью комбинации методов ультрафильтрации, осаждения сульфатом аммония и ионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления CRM197 получают в *Pseudomonas fluorescens* с использованием Pfenex Expression Technology™ (Pfenex Inc., Сан-Диего, Калифорния).

Другие подходящие белки-носители включают дополнительные инактивированные бактериальные токсины, такие как DT (дифтерийный анатоксин) или фрагмент В DT (DTFB), TT (столбнячный анатоксин) или фрагмент С TT, коклюшный анатоксин, холерный анатоксин (например, как описано в WO 2004/083251), *E. coli* LT, *E. coli* ST и экзотоксин А *Pseudomonas aeruginosa*. В качестве белков-носителей также можно использовать белки наружной мембраны бактерий, такие как комплекс белков наружной мембраны (ОМРС), порины, трансферрин-связывающие белки, пневмококковый поверхностный белок А (PspA; см. WO 02/091998), пневмококковый адгезин (PsaA), пептидазу С5а из стрептококков группы А или группы В или белок D *Haemophilus influenzae*, пневмококковый пневмолизин (Kuo et al., 1995, *Infect. Immun.*, 63, 2706-13), включая детоксифицированный ply, например слитый белок dPLY-GMBS (см. WO 04/081515) или dPLY-формол, PhtX, включая PhtA, PhtB, PhtD, PhtE, и слитые белки Pht, например также могут быть использованы слитые белки PhtDE, слитые PhtBE (см. WO 01/98334 и WO 03/54007). Также можно использовать другие белки, такие как овальбумин, гемоцианин лимфы улитки (KLH), бычий сывороточный альбумин (BSA) или производное очищенного белка туберкулина (PPD), PorB (*N. meningitidis*), PD (белок D *Haemophilus influenzae*; см., например, EP 0594610 В) или их иммунологически функциональные эквиваленты, синтетические пептиды (см. EP 0378881 и EP 0427347), белки теплового шока (см. WO 93/17712 и WO 94/03208), белки коклюша (см. WO 98/58668 и EP 0471177), цитокины, лимфокины, факторы роста или гормоны (см. WO 91/01146), искусственные белки, содержащие несколько человеческих эпитопов CD4+ Т-клеток из различных антигенов, полученных из патогенов (см. Falugi et al., 2001, *Eur. J. Immunol.*, 31:3816-3824), такие как N19 белок (см. Baraldoi et al., 2004, *Infect. Immun.*, 72:4884-7), белки захвата железа (см. WO 01/72337), токсин А или В *S. difficile* (см. WO 00/61761) и флагеллин (см. Ben-Yedidia et al., 1998, *Immunol. Lett.*, 64: 9).

В качестве белка-носителя можно использовать другие мутанты DT, такие как CRM<sub>176</sub>, CRM<sub>228</sub>, CRM<sub>45</sub> (Uchida et al., 1973, *J. Biol. Chem.*, 218:3838-3844); CRM<sub>9</sub>, CRM<sub>45</sub>, CRM<sub>102</sub>, CRM<sub>103</sub> и CRM<sub>107</sub> и с другими мутациями, описанными Nicholls и Youle в *Genetically Engineered Toxins*, ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; делециями или мутациями Glu-148 в Asp, Gln или Ser и/или Ala 158 в Gly и другими мутациями, раскрытыми в патенте США 4709017 или 4950740; мутациями по меньшей мере одного или более остатков Lys 516, Lys 526, Phe 530 и/или Lys 534 и другими мутациями, раскрытыми в патенте США 5917017 или 6455673; или фрагмент, раскрытый в патенте США 5843711. Такие мутанты DT также можно использовать для создания вариантов DTFB, где варианты содержат фрагмент В, содержащий области эпитопа.

В определенных вариантах осуществления белок-носитель выбирают из группы, состоящей из комплекса белков наружной мембраны (ОМРС), столбнячного анатоксина, дифтерийного анатоксина, белка D и CRM197.

В некоторых вариантах осуществления изобретения в поливалентной иммуногенной композиции для одного или более конъюгатов полисахаридного белка можно использовать второй носитель. Второй белок-носитель предпочтительно представляет собой белок, который является нетоксичным и нереакто-

генным и может быть получен в достаточном количестве и с достаточной степенью чистоты. Второй белок-носитель также конъюгирован или соединен с полисахаридом *S. pneumoniae* для усиления иммуногенности антигена. Белки-носители должны поддаваться стандартным процедурам конъюгации. В одном из вариантов осуществления каждый капсульный полисахарид, не конъюгированный с первым белком-носителем, конъюгирован с тем же самым вторым белком-носителем (например, каждая молекула капсульного полисахарида конъюгирована с одним белком-носителем). В другом варианте осуществления капсульные полисахариды, не конъюгированные с первым белком-носителем, конъюгированы с двумя или более белками-носителями (каждая молекула капсульного полисахарида конъюгирована с одним белком-носителем). В таких вариантах осуществления каждый капсульный полисахарид одного и того же серотипа обычно конъюгирован с одним и тем же белком-носителем.

В вариантах осуществления изобретения, включая любой из вариантов осуществления E1-E20 и любые их подварианты, один или более полисахаридов серотипов (включая 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, где это применимо) конъюгированы с CRM197. В дополнительных вариантах осуществления изобретения, включая любой из вариантов осуществления E1-E20 и любых их подварианты, полисахарид каждого из серотипов конъюгирован с CRM197.

Состав полисахарид-белковых конъюгатов по настоящему изобретению может быть получен с помощью известных в данной области способов. Например, отдельные пневмококковые конъюгаты могут быть приготовлены с использованием физиологически приемлемого носителя для получения композиции. Примеры таких носителей включают без ограничения воду, буферный солевой раствор, полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и растворы декстрозы.

В предпочтительном варианте осуществления вакцинальная композиция приготовлена в L-гистидиновом буфере с хлоридом натрия.

В некоторых вариантах осуществления изобретения поливалентная иммуногенная композиция содержит несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, содержащих капсульный полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, и адъювант, где серотипы *S. pneumoniae* являются такими, как раскрыто в настоящем описании. Подходящие адъюванты для усиления эффективности композиции включают без ограничения

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

(2) составы на основе эмульсий масло-в-воде (с или без других специфических иммуностимулирующих агентов, таких как мурамилпептиды (определенные ниже) или компоненты бактериальной клеточной стенки), такие как, например,

(а) MF59 (публикация международной заявки на патент № WO 90/14837), содержащий 5% сквалена, 0,5% твина 80 и 0,5% Span 85 (необязательно содержащий различные количества MTP-PE), приготовленный в виде субмикронных частиц с помощью микрофлюидизатора, такого как микрофлюидизатор модели HOY (Microfluidics, Newton, MA);

(b) SAF, содержащий 10% сквалена, 0,4% твина 80, 5% полимера, блокированного плуроником L121, и thr-MDP, либо микрофлюидизированный в субмикронную эмульсию, либо перемешанный на вортексе с образованием эмульсии с большим размером частиц;

(c) адъювантная система Ribi™ (RAS), (Corixa, Hamilton, MT), содержащая 2% сквалена, 0,2% твина 80 и один или более компонентов бактериальной клеточной стенки из группы, состоящей из 3-О-деацелированного монофосфолипидом A (MPL™), описанного в патенте США 4912094, трегалозодимиколата (TDM) и скелета клеточной стенки (CWS), предпочтительно MPL+CWS (Detox™); и

(d) Montanide ISA;

(3) сапониновые адъюванты, такие как Quil A или STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA) (см., например, патент США 5057540) или частицы, полученные из них, такие как ISCOM (иммуностимулирующие комплексы, образованные комбинацией холестерина, сапонины, фосфолипида и амфипатических белков) и Iscomatrix® (имеющий по существу ту же структуру, что и ISCOM, но без белка);

(4) бактериальные липополисахариды, синтетические аналоги липида A, такие как аминоксилглюкозаминфосфатные соединения (AGP) или их производные или аналоги, которые доступны от Corixa и которые описаны в патенте США 6113918; одним из таких AGP является 2-[(R)-3-тетрадеканоилокситетрадеканоиламино]этил 2-дезоксидезокси-4-О-фосфоно-3-О-[(R)-3-тетрадеканоилокситетрадеканоил]-2-[(R)-3-тетрадеканоилокситетрадеканоиламино]-b-О-глюкопиранозид, который также известен как 529 (ранее известный как RC529), приготовленный в форме водного раствора или в виде стабильной эмульсии;

(5) синтетические полинуклеотиды, такие как олигонуклеотиды, содержащие мотив(ы) CpG (патент США 6207646); и

(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), колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF), колониестимулирующий фактор макрофагов (M-CSF), фактор некроза опухолей (TNF), костимулирующие молекулы B7-1 и B7-2 и т.д.; и

(7) комплемент, такой как тример компонента комплемента C3d.

В другом варианте осуществления адъювант представляет собой смесь 2, 3 или более из вышеуказанных адъювантов, например, SBAS2 (эмульсию масло-в-воде, также содержащую 3-деацелированный монофосфорил-липид А и QS21).

Мурамилные пептиды включают без ограничения N-ацетил-мурамил-L-треонил-D-изоглутамин (thr-MDP), N-ацетил-нормурамил-L-аланин-2-(1'-2'-дипальмитоил-sn)-глицеро-3-гидроксифосфорилоксиэтиламин (MTP-PE) и др.

В определенных вариантах осуществления адъювант представляет собой соль алюминия. Адъювант на основе соли алюминия может представлять собой осажденную квасцами вакцину или адсорбированную квасцами вакцину. Адъюванты с солью алюминия хорошо известны в данной области и описаны, например, в Harlow, E., D. Lane (1988, *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory) и Nicklas, W. (1992, *Aluminum salts, Research in Immunology*, 143:489-493). Соль алюминия включает без ограничения гидратированный оксид алюминия, гидрат оксида алюминия, тригидрат оксида алюминия (ATH), гидрат алюминия, тригидрат алюминия, альгидрогель, Superfos, амфогель, гидроксид алюминия (III), гидроксифосфат сульфат алюминия, адъювант на основе фосфата алюминия (АРА), аморфный оксид алюминия, тригидратированный оксид алюминия или тригидроксиалюминий.

АРА представляет собой водную суспензию гидроксифосфата алюминия. АРА получают смешиванием хлорида алюминия и фосфата натрия в объемном отношении 1:1 для осаждения гидроксифосфата алюминия. После процесса смешивания материал измельчают с помощью смесителя с высоким сдвиговым усилием для достижения монодисперсного распределения частиц по размерам. Затем продукт подвергают диафильтрации против физиологического раствора и стерилизуют паром.

В некоторых вариантах осуществления для адсорбции белков используется коммерчески доступный  $Al(OH)_3$  (например, Alhydrogel или Superfos of Denmark/Accurate Chemical and Scientific Co., Westbury, NY) в соотношении 50-200 мкг белка/мг гидроксида алюминия. Адсорбция белка, в другом варианте осуществления, зависит от значения pI (изоэлектрического pH) белка и pH среды. Белок с более низким значением pI адсорбируется на положительно заряженный ион алюминия сильнее, чем белок с более высоким значением pI. Соли алюминия могут образовывать депо антигена, который медленно высвобождается в течение 2-3 недель, участвовать в неспецифической активации макрофагов и активации комплемента и/или стимулировать механизм врожденного иммунитета (возможно, посредством стимуляции мочевой кислоты). См., например, Lambrecht et al., 2009, *Curr. Opin. Immunol.*, 21:23.

Исходные водные растворы одновалентных конъюгатов, как правило, смешивают вместе и разбавляют до целевых значений, составляющих 4 мкг/мл для всех серотипов, кроме 6В, который разбавляют до целевого значения, составляющего 8 мкг/мл. После разбавления партию стерилизуют на фильтре и добавляют асептически равный объем адъюванта на основе фосфата алюминия для достижения конечной концентрации алюминия 250 мкг/мл. Приготовленную партию с адъювантом разливают в одноразовые флаконы по 0,5 мл на дозу.

В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой CpG-содержащую нуклеотидную последовательность, например, CpG-содержащий олигонуклеотид, в частности CpG-содержащий олигодезоксинуклеотид (CpG ODN). В другом варианте осуществления адъювант представляет собой ODN 1826, который можно приобрести у Coley Pharmaceutical Group.

Способы применения CpG-олигонуклеотидов хорошо известны в данной области и описаны, например, в Sur et al., 1999, *J. Immunol.*, 162:6284-93; Verthelyi, 2006, *Methods Mol. Med.*, 127:139-58; и Yasuda et al., 2006, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.*, 23:89-110.

В альтернативных вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, раскрытых в настоящем описании, например, в любом из вариантов осуществления E1-E20 или в любом их подварианте, и не содержит адъювант.

Составы.

Композиция по изобретению может быть предоставлена во флаконах с единичной дозой, флаконах с множеством доз или в предварительно заполненных стеклянных или пластиковых шприцах.

В другом варианте осуществления композиции по настоящему изобретению вводят перорально и, таким образом, предоставляют в форме, подходящей для перорального введения, т.е. в виде твердого или жидкого препарата. Твердые пероральные составы включают таблетки, капсулы, пилюли, гранулы, пеллеты и т.п. Жидкие пероральные составы включают растворы, суспензии, дисперсии, эмульсии, масла и т.п.

Фармацевтически приемлемые носители для жидких составов представляют собой водные или неводные растворы, суспензии, эмульсии или масла. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и забуференные среды. Примерами масел являются масла животного, растительного или синтетического происхождения, например арахисовое масло, соевое масло, оливковое масло, подсолнечное масло, рыбий жир, другое масло морского происхождения или липид из молока или яиц.

Фармацевтическая композиция может быть изотонической, гипотонической или гипертонической. Однако часто предпочтительно, чтобы при введении фармацевтическая композиция для инфузии или

инъекции была по существу изотонической. Следовательно, для хранения фармацевтическая композиция предпочтительно может быть изотонической или гипертонической. Если для хранения используется гипертоническая фармацевтическая композиция, перед введением она может быть разбавлена до изотонического раствора.

Изотонический агент может представлять собой ионный изотонический агент, такой как соль, или неионный изотонический агент, такой как углевод. Примеры ионных изотонических агентов включают без ограничения NaCl, CaCl<sub>2</sub>, KCl и MgCl<sub>2</sub>. Примеры неионных изотонических агентов включают, ограничения, маннит, сорбит и глицерин.

Также предпочтительно, чтобы по меньшей мере одна фармацевтически приемлемая добавка представляла собой буфер. Для некоторых целей, например, когда фармацевтическая композиция предназначена для инфузии или инъекции, часто желательно, чтобы композиция содержала буфер, который способен буферировать раствор до pH в диапазоне от 4 до 10, например 5 до 9, например от 6 до 8.

Буфер, например, может быть выбран из группы, состоящей из TRIS, ацетатного, глутаматного, лактатного, малеатного, тартратного, фосфатного, цитратного, карбонатного, глицинатного, гистидинового, глицинового, сукцинатного и триэтаноламинового буфера.

Буфер может быть выбран из USP-совместимых буферов для парентерального применения, в частности, когда фармацевтическая композиция предназначена для парентерального применения. Например, буфер может быть выбран из группы, состоящей из одноосновных кислот, таких как уксусная, бензойная, глюконовая, глицериновая и молочная; двухосновных кислот, таких как аконитовая, адипиновая, аскорбиновая, угольная, глутаминовая, яблочная, янтарная и винная, многоосновных кислот, таких как лимонная и фосфорная; и оснований, таких как аммиак, диэтаноламин, глицин, триэтаноламин и TRIS.

Парентеральные носители (для подкожных, внутривенных, внутриартериальных или внутримышечных инъекций) включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера и жирные масла. Носители для внутривенного введения включают жидкости и питательные добавки, электролитные добавки, такие как основанные на декстрозе Рингера, и т.п. Примерами являются стерильные жидкости, такие как вода и масла, с добавлением или без добавления поверхностно-активного вещества и других фармацевтически приемлемых адъювантов. В общем случае, предпочтительными жидкими носителями являются вода, солевой раствор, водные растворы декстрозы и родственных сахаров, гликолей, такие как пропиленгликоли или полиэтиленгликоль, полисорбата 80 (PS-80), полисорбата 20 (PS-20) и полочсамера 188 (P188), в частности, для растворов для инъекций. Примерами масел являются масла животного, растительного или синтетического происхождения, например, арахисовое масло, соевое масло, оливковое масло, подсолнечное масло, рыбий жир, другое масло морского происхождения или липид из молока или яиц.

Составы по изобретению также могут содержать поверхностно-активное вещество. Предпочтительные поверхностно-активные вещества включают без ограничения поверхностно-активные вещества на основе сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана (обычно называемые Твинами), особенно PS-20 и PS-80; сополимеры этиленоксида (EO), пропиленоксида (PO) и/или бутиленоксида (BO), продаваемые под торговой маркой DOWFAX™, такие как линейные блок-сополимеры EO/PO; октоксинолы, которые могут отличаться по количеству повторяющихся этокси(окси-1,2-этандинил) групп, при этом практический интерес представляет октоксинол-9 (тритон X-100 или трет-октилфеноксиполиэтоксизтанол); (октилфенокси)полиэтоксизтанол (IGEPAL CA-630/NP-40); фосфолипиды, такие как фосфатидилхолин (лецитин); этоксилаты нонилфенола, такие как серии Tergitol™ NP; простые полиоксиэтиленовые эфиры жирных спиртов, полученные из лауриловых, цетиловых, стеариловых и олеиловых спиртов (известные как поверхностно-активные вещества Brij), такие как монолауриловый эфир триэтиленгликоля (Brij 30); и сложные эфиры сорбитана (обычно известные как SPAN), такие как сорбитантриолеат (Span 85) и сорбитанмонолаурат. Предпочтительным поверхностно-активным веществом для включения в эмульсию является PS-80.

Могут быть использованы смеси поверхностно-активных веществ, например, смеси PS-80/Span 85. Также пригодна комбинация сложного эфира полиоксиэтиленсорбитана, такого как моноолеат полиоксиэтиленсорбитана (PS-80), и октоксинола, такого как трет-октилфеноксиполиэтоксизтанол (Тритон X-100). Другая полезная комбинация включает лаурет 9 плюс сложный эфир полиоксиэтиленсорбитана и/или октоксинола.

Предпочтительными количествами поверхностно-активных веществ (% по массе) являются: от 0,01 до 1% для сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана (таких как PS-80), в частности, примерно 0,1%; от 0,001 до 0,1% для октил- или нонилфеноксиполиэтоксизтанолов (таких как Тритон X-100 или других детергентов серии Тритон), в частности от 0,005 до 0,02%; от 0,1 до 20% для простых эфиров полиоксиэтилена (таких как лаурет 9), предпочтительно от 0,1 до 10% и, в частности, от 0,1 до 1% или примерно 0,5%.

В некоторых вариантах осуществления композиция по существу состоит из гистидина (20 мМ), физиологического раствора (150 мМ) и 0,2% PS-20 или 0,04% PS-80 с pH 5,8 с 250 мкг/мл АРА (адъюванта на основе фосфата алюминия). Содержание PS-20 может варьировать в пределах от 0,005 до 0,3% (мас./об.), где присутствие PS-20 или PS-80 в составе позволяет контролировать агрегацию во время

имитации приготовления и транспортировки с использованием первичной упаковки. В другом варианте осуществления PS-20 может находиться в диапазоне от 0,025 до 0,8% (мас./об.). В другом варианте осуществления PS-20 может составлять от 0,05 до 0,8% (мас./об.). В другом варианте осуществления PS-20 может составлять от 0,05 до 0,2% (мас./об.). Процесс состоит из комбинирования до 24 серотипов в гистидине, физиологическом растворе и PS-20 или PS-80, а затем комбинирования этого смешанного материала с АРА и физиологическим раствором с antimicrobными консервантами или без них.

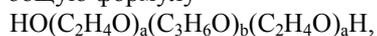
В конкретных вариантах осуществления поливалентная иммуногенная композиция содержит *S. pneumoniae* полисахарид-белковые конъюгаты, где каждый из конъюгатов содержит полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, где серотипы в *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатах содержат любой из наборов серотипов, приведенных в настоящем описании, и дополнительно содержат 20-80 мМ гистидина, pH 5,8 и 150 мМ NaCl. В некоторых вариантах осуществления поливалентная иммуногенная композиция дополнительно содержит от 0,2 до 0,8% мас./об. полисорбата 20.

Для оптимизации различных лекарственных препаратов и лекарственных веществ может потребоваться выбор поверхностно-активного вещества. Для поливалентных вакцин, имеющих 15 или более серотипов, предпочтительными являются PS-20 и P188. Выбор химического состава, используемого для получения конъюгата, также может играть важную роль в стабилизации состава. В частности, когда реакции конъюгации, используемые для получения различных полисахарид-белковых конъюгатов в поливалентной композиции, включают как водный растворитель, так и растворитель ДМСО, стабильность в существенной степени зависит от конкретной системы поверхностно-активных веществ. Повышенную стабильность полисахарид-белковых конъюгатов наблюдали с одним полисорбатом 20 или с полоксамером 188 в сочетании с полиолом.

Точный механизм того, каким образом конкретное детергент защищает биотерапевтическое средство, плохо изучен и не может быть предсказан априори. Возможные механизмы стабилизации включают предпочтительную гидратацию, предпочтительное невключение, конкуренцию на поверхности раздела воздух/жидкость между биотерапевтическим средством и поверхностью, поверхностное натяжение и/или прямую ассоциацию детергента с биотерапевтическим средством для маскировки гидрофобных пятен, которые служат в качестве затравки агрегации.

В композициях по изобретению также может быть использован полоксамер. Полоксамер представляет собой неионный триблок-сополимер, состоящий из центральной гидрофобной цепи полиоксипропилена (поли(пропиленоксида)), фланкированной двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилена (поли(этиленоксида)). Полоксамеры также известны под торговой маркой Pluronic®. Поскольку длины полимерных блоков можно регулировать, существует много разных полоксамеров, которые слегка различаются по своим свойствам. Сополимеры, объединенные общим термином "полоксамер", обычно обозначают буквой "P" (для полоксамера), за которой следуют три цифры, первые две цифры ×100 дают приблизительную молекулярную массу полиоксипропиленового ядра, а последняя цифра ×10 дает процентное содержание полиоксиэтилена (например, P407=полоксамер с молекулярной массой полиоксипропилена 4000 г/моль и 70% содержанием полиоксиэтилена). Для торговой марки Pluronic® кодировка таких сополимеров начинается с буквы, определяющей физическую форму сополимера при комнатной температуре (L=жидкость, P=паста, F=хлопья (твердое вещество)), за которой следуют две или три цифры. Первая цифра (две цифры в трехзначном числе) в числовом обозначении, умноженная на 300, указывает приблизительную молекулярную массу гидрофоба; и последняя цифра ×10 показывает процентное содержание полиоксиэтилена (например, L61=Pluronic® с молекулярной массой полиоксипропилена 1800 г/моль и 10% содержанием полиоксиэтилена). См. патент США 3740421.

Примеры полоксамеров имеют общую формулу



где блоки a и b имеют следующие значения.

Pluronic®	Полоксамер	A	B:	Молекулярная масса
L31		2	16	1100 (средняя)
L35				1900 (средняя)
L44NF	124	12	20	2090-2360
L64				2900 (средняя)
L81				2800 (средняя)
L121				4400 (средняя)
P123		20	70	5750 (средняя)
F68NF	188	80	27	7680-9510
F87NF	237	64	37	6840-8830
F108NF	338	141	44	12700-17400
F127NF	407	101	56	9840-14600

Используемые в настоящем описании единицы измерения молекулярной массы даны в Дальтонах (Да)

или г/моль.

Предпочтительно полоксамер обычно имеет молекулярную массу в диапазоне от 1100 до 17 400 Да, от 7500 до 15000 Да или от 7500 до 10000 Да. Полоксамер может быть выбран из полоксамера 188 или полоксамера 407. Конечная концентрация полоксамера в составах составляет от 0,001 до 5% мас./об. или от 0,025 до 1% мас./об. В определенных аспектах полиол представляет собой пропиленгликоль и находится в конечной концентрации от 1 до 20% мас./об. В определенных аспектах полиол представляет собой полиэтиленгликоль 400 и находится в конечной концентрации от 1 до 20% мас./об.

Подходящими полиолами для составов по изобретению являются полимерные полиолы, в частности простые полиэфирдиолы, включая без ограничения пропиленгликоль и полиэтиленгликоль, монометилловые эфиры полиэтиленгликоля.

Пропиленгликоль доступен в диапазоне молекулярных масс мономера от ~425 до ~2700. Полиэтиленгликоль и монометилловый эфир полиэтиленгликоля также доступны в диапазоне молекулярных масс от ~200 до ~35000, включая без ограничения PEG200, PEG300, PEG400, PEG1000, PEG MME 550, PEG MME 600, PEG MME 2000, PEG MME 3350 и PEG MME 4000. Предпочтительным полиэтиленгликолем является полиэтиленгликоль 400. Конечная концентрация полиола в составах по изобретению может составлять от 1 до 20% мас./об. или от 6 до 20% мас./об.

Состав также содержит рН-буферный солевой раствор. Буфер может быть выбран, например, из группы, состоящей из трис, ацетатного, глутаматного, лактатного, малеатного, тартратного, фосфатного, цитратного, карбонатного, глицинатного, гистидинового, глицинового, сукцинатного, HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), MOPS (3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота), MES (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота) и триэтаноламинного буферов. Буфер способен буферировать раствор до рН в диапазоне от 4 до 10, от 5,2 до 7,5 или от 5,8 до 7,0. В определенном аспекте изобретения буфер выбирают из группы, состоящей из фосфата, сукцината, гистидина, MES, MOPS, HEPES, ацетата или цитрата. Кроме того, буфер может быть выбран, например, из USP-совместимых буферов для парентерального применения, в частности, когда фармацевтическая композиция предназначена для парентерального применения. Концентрации буфера могут варьировать от 1 до 100 мМ. Концентрации буфера могут варьировать от 10 до 80 мМ. Концентрации буфера могут варьировать от 1 до 50 мМ или от 5 до 50 мМ. В определенных аспектах буфер представляет собой гистидин в конечной концентрации от 5 до 50 мМ или сукцинат в конечной концентрации от 1 до 10 мМ. В определенных аспектах гистидин имеет конечную концентрацию  $20 \pm 2$  мМ.

Хотя солевой раствор (т.е. раствор, содержащий NaCl) является предпочтительным, другие соли, подходящие для приготовления состава, включают без ограничения CaCl<sub>2</sub>, KCl и MgCl<sub>2</sub> и их комбинации. Вместо соли могут быть использованы неионные изотонические агенты, включая без ограничения сахарозу, трегалозу, маннит, сорбит и глицерин. Подходящие диапазоны содержания соли включают без ограничения от 25 до 500 мМ или от 40 до 170 мМ. В одном из аспектов солевой раствор представляет собой NaCl, необязательно присутствующий в концентрации от 20 до 170 мМ.

В предпочтительном варианте осуществления композиции содержат L-гистидиновый буфер с хлоридом натрия.

В другом варианте осуществления фармацевтическую композицию доставляют в системе с контролируемым высвобождением. Например, агент можно вводить путем внутривенной инфузии, с помощью трансдермального пластыря, липосом или другими способами введения. В другом варианте используются полимерные материалы; например, в микросферах или имплантатах.

Количество конъюгата в каждой дозе вакцины выбирают таким, чтобы оно вызывало иммунопротективный ответ без значительных побочных эффектов. Такое количество может варьировать в зависимости от пневмококкового серотипа. Обычно для полисахаридных конъюгатов каждая доза каждого полисахарида будет составлять от 0,08 до 100 мкг. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза каждого полисахаридного конъюгата составляет от 0,08 до 10 мкг. В других вариантах осуществления доза составляет от 1 до 5 мкг, от 0,4 до 4 мкг, от 0,4 до 3 мкг, от 0,4 до 2 мкг или от 0,4 до 1 мкг. В некоторых вариантах осуществления доза одного или более полисахаридных конъюгатов составляет 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 или 750 нг или 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,75, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7,5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мкг.

В некоторых вариантах осуществления композиций по изобретению все полисахаридные конъюгаты присутствуют в композиции в одинаковом количестве. В других вариантах осуществления полисахаридные конъюгаты присутствуют в композиции в разных количествах (т.е. по меньшей мере, один полисахаридный конъюгат присутствует в количестве, которое отличается от количества одного или более других полисахаридных конъюгатов в композиции).

Оптимальное количество компонентов для конкретной вакцины может быть установлено с помощью стандартных исследований, включающих наблюдение соответствующих иммунных ответов у субъектов. Например, в другом варианте осуществления дозу для вакцинации человека определяют путем экстраполяции данных, полученных в проведенных на животных исследованиях, на человека. В другом варианте осуществления, дозу определяют опытным путем.

В одном из вариантов осуществления доза соли алюминия составляет 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70, 100,

125, 150, 200, 300, 500 или 700 мкг или 1, 1,2, 1,5, 2, 3,5 мг или более. В еще одном варианте осуществления доза соли алюминия, описанная выше, приведена на мкг рекомбинантного белка.

Композиции по настоящему изобретению также могут включать один или более белков *S. pneumoniae*. Примеры белков *S. pneumoniae*, подходящих для включения, включают белки, которые идентифицированы в публикациях международных заявок на патент № WO 02/083855 и WO 02/053761.

В определенных вариантах осуществления композиции по изобретению вводят субъекту одним или более способами, известными специалисту в данной области, например, парентерально, трансмукозально, трансдермально, внутримышечно, внутривенно, внутрикочно, внутриназально, подкожно, внутрибрюшинно, и приготовлены в виде соответствующих составов. В одном из вариантов осуществления композиции по настоящему изобретению вводят путем эпидермальной инъекции, внутримышечной инъекции, внутривенной, внутриаартериальной, подкожной инъекции или интра-респираторной инъекции жидкого препарата в слизистую оболочку дыхательного тракта. Жидкие составы для инъекций включают растворы и т.п.

#### Способы приготовления

Капсульные полисахариды *Streptococcus pneumoniae* могут быть получены стандартными способами, известными специалистам в данной области. Например, полисахариды могут быть выделены из бактерий и доведены до определенного размера известными способами (см., например, европейские патенты № EP 497524 и EP 497525); и предпочтительно микрофлюидизацией с помощью гомогенизатора или химическим гидролизом. В одном из вариантов осуществления каждый пневмококковый полисахаридный серотип выращивают в среде на основе сои. Затем отдельные полисахариды очищают, используя стандартные этапы, включая центрифугирование, осаждение и ультрафильтрацию. См., например, публикацию заявки на патент США № 2008/0286838 и патент США № 5847112. Размеры полисахаридов могут быть изменены для уменьшения вязкости в образцах полисахаридов и/или для улучшения фильтруемости конъюгированных продуктов с помощью механических или химических способов получения нужного размера. Химический гидролиз можно выполнять с помощью уксусной кислоты. Механический способ получения нужного размера может быть выполнен с помощью гомогенизации под высоким давлением.

Очищенные полисахариды могут быть химически активированы, чтобы сахараиды могли реагировать с белком-носителем. Очищенные полисахариды могут быть связаны с линкером. После активации или связывания с линкером каждый капсульный полисахарид отдельно конъюгируют с белком-носителем с образованием гликоконъюгата. Полисахаридные конъюгаты могут быть получены известными методами сочетания.

Полисахарид может быть связан с линкером с образованием промежуточного соединения полисахарид-линкер, в котором свободный конец линкера представляет собой сложноэфирную группу. Следовательно, линкер представляет собой линкер, в котором по меньшей мере один конец является сложноэфирной группой. Другой конец выбирают таким образом, чтобы он мог реагировать с полисахаридом с образованием промежуточного соединения полисахарид-линкер.

Полисахарид может быть связан с линкером через первичную аминогруппу в полисахариде. В этом случае линкер обычно имеет сложноэфирную группу на обоих концах. Это позволяет осуществлять связывание через взаимодействие одной из сложноэфирных групп с первичной аминогруппой полисахарида по механизму нуклеофильного замещения в ацильной группе. В результате реакции образуется промежуточное соединение полисахарид-линкер, в котором полисахарид связан с линкером через амидную связь. Следовательно, линкер представляет собой бифункциональный линкер, у которого первая сложноэфирная группа участвует в реакции с первичной аминогруппой полисахарида, а вторая сложноэфирная группа участвует в реакции с первичной аминогруппой молекулы-носителя. Типичным линкером является N-гидроксисукцинимидный диэфир адипиновой кислоты (SIDEA).

Связывание также может происходить опосредованно, т.е. через дополнительный линкер, который используется для дериватизации полисахарида перед связыванием с линкером.

Полисахарид связывают с дополнительным линкером с участием карбонильной группы на восстанавливаемом конце полисахарида. Эта реакция сочетания состоит из двух этапов:

- (a1) взаимодействие карбонильной группы с дополнительным линкером; и
- (a2) взаимодействие свободного конца дополнительного линкера с линкером.

В этих вариантах осуществления дополнительный линкер обычно имеет первичную аминогруппу на обоих концах, что позволяет осуществить этап (a1) через взаимодействие одной из первичных аминогрупп с карбонильной группой полисахарида по механизму восстановительного аминирования. Используются первичная аминогруппа, которая реагирует с карбонильной группой полисахарида. Подходящими являются гидразидные группы или гидроксиламиногруппы. На обоих концах дополнительного линкера обычно присутствуют одинаковые первичные аминогруппы. В результате реакции образуется промежуточное соединение полисахарид-дополнительный линкер, в котором полисахарид связан с дополнительным линкером через связь C-N.

Полисахарид может быть связан с дополнительным линкером с помощью другой группы в полисахариде, в частности карбоксильной группы. Эта реакция сочетания состоит из двух этапов:

- (a1) взаимодействие группы с дополнительным линкером; и

(a2) взаимодействие свободного конца дополнительного линкера с линкером.

В этом случае дополнительный линкер обычно имеет на обоих концах первичную аминогруппу, что позволяет осуществить этап (a1) через взаимодействие одной из первичных аминогрупп с карбоксильной группой полисахарида путем активации EDAC. Используется первичная аминогруппа, которая реагирует с EDAC-активированной карбоксильной группой в полисахариде. Подходит гидразидная группа. На обоих концах дополнительного линкера обычно присутствуют одинаковые первичные аминогруппы. В результате реакции образуется промежуточное соединение полисахарид-дополнительный линкер, в котором полисахарид связан с дополнительным линкером через амидную связь.

В одном из вариантов осуществления химическая активация полисахаридов и последующая конъюгация с белком-носителем по механизму восстановительного аминирования может быть достигнута с помощью средств, описанных в патентах США № 4365170, 4673574 и 4902506, США, публикациях заявок на патент США № 2006/0228380, 2007/184072, 2007/0231340 и 2007/0184071 и WO 2006/110381, WO 2008/079653 и WO 2008/143709). Химия может включать активацию пневмококкового полисахарида через взаимодействие с любым окислителем, который окисляет концевую гидроксильную группу до альдегида, таким как периодат (включая периодат натрия, периодат калия или периодную кислоту). Реакция приводит к случайному окислительному расщеплению видциальных гидроксильных групп углеводов с образованием реакционноспособных альдегидных групп.

Реакция сочетания с белком-носителем протекает по механизму восстановительного аминирования через прямое аминирование в остатках лизила белка. Например, конъюгирование может быть осуществлено через взаимодействие смеси активированного полисахарида и белка-носителя с восстановителем, таким как цианоборгидрид натрия, в присутствии никеля. Реакция конъюгации может происходить в водном растворе или в присутствии ДМСО. См., например, US 2015/0231270, US 2011/0195086 и EP 0471177 B1. Затем непрореагировавшие альдегиды кэпируют добавлением сильного восстановителя, такого как боргидрид натрия.

Восстановительное аминирование включает два этапа:

- (1) окисление полисахарида с образованием реакционноспособных альдегидов;
- (2) восстановление имина (основания Шиффа), образующегося между активированным полисахаридом и белком-носителем, с образованием стабильной аминной конъюгатной связи.

Перед окислением размер полисахарида необязательно уменьшается. Могут использоваться механические методы (например, гомогенизация) или химический гидролиз. Химический гидролиз может быть выполнен с использованием уксусной кислоты. Стадия окисления может включать реакцию с периодатом. В контексте настоящего изобретения термин "периодат" включает как периодат, так и периодную кислоту; термин также включает как метапериодат ( $\text{IO}_4^-$ ), так и ортопериодат ( $\text{IO}_6^-$ ) и включает различные соли периодата (например, периодат натрия и периодат калия). В одном из вариантов осуществления капсульный полисахарид окисляется в присутствии метапериодата, предпочтительно в присутствии периодата натрия ( $\text{NaIO}_4$ ). В другом варианте осуществления капсульный полисахарид окисляется в присутствии ортопериодата, предпочтительно в присутствии периодной кислоты.

В одном из вариантов осуществления окисляющий агент представляет собой стабильное нитроксильное или нитроксидное радикальное соединение, такое как пиперидин-N-окси- или пирролидин-N-окси-соединения, в присутствии окислителя для селективного окисления первичных гидроксильных групп (как описано в WO 2014/097099). В указанной реакции действительным окислителем в каталитическом цикле является соль N-оксоаммония. В одном из аспектов указанные стабильные нитроксильные или нитроксидные радикальные соединения представляют собой пиперидин-N-окси- или пирролидин-N-окси-соединения. В одном из аспектов указанное стабильное нитроксильное или нитроксидное радикальное соединение имеет фрагмент TEMPO (2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси) или PROXYL (2,2,5,5-тетраметил-1-пирролидинилокси). В одном из аспектов указанное стабильное соединение с нитроксильным радикалом представляет собой TEMPO или его производное. В одном из аспектов указанный окислитель представляет собой молекулу, содержащую N-галоген-содержащий фрагмент. В одном из аспектов указанный окислитель выбирают из группы, состоящей из N-хлорсукцинимид, N-бромсукцинимид, N-йодсукцинимид, дихлоризоциануровой кислоты, 1,2,3-трихлор-1,2,5-триазинан-2,4,6-триона, дибромизоциануровой кислоты, 1,5-трибром-1,2,3-триазинан-2,4,6-триона, диодидизоциануровой кислоты и 3,5-триод-1,3,5-триазинан-2,4,6-триона.

Предпочтительно, указанный окислитель представляет собой N-хлорсукцинимид.

В определенных аспектах окисляющий агент представляет собой свободный радикал 2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси (TEMPO) и N-хлорсукцинимид (NCS) в качестве соокислителя (как описано в WO 2014/097099). Следовательно, в одном из аспектов гликоконъюгаты *S. pneumoniae* можно получить способом, включающим этапы

- a) взаимодействия сахара с 2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси (TEMPO) и N-хлорсукцинимидом (NCS) в водном растворителе с получением активированного сахара; и
- b) взаимодействия активированного сахара с белком-носителем, содержащим одну или более аминогрупп (ниже указанный способ обозначен как "TEMPO/NCS-восстановительное аминирование").

Необязательно реакцию окисления останавливают добавлением гасящего агента. Гасящий агент

может быть выбран из вицинальных диолов, 1-, 2-аминоспиртов, аминокислот, глутатиона, сульфита, бисульфата, дитионита, метабисульфита, тиосульфата, фосфитов, гипофосфитов или фосфористой кислоты (например, глицерина, этиленгликоля, пропан-1-, 2-диола, бутан-1,2-диола или бутан-2,3-диола, аскорбиновой кислоты).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата полисахарида серотипа 8 *Streptococcus pneumoniae* с белком результате реакции конъюгации в апротонном растворителе, при этом в реакции конъюгации не используется цианоборгидрид. В других вариантах осуществления реакция конъюгации представляет собой восстановление по Шиффу или восстановительное аминирование. В других вариантах осуществления белок представляет собой столбнячный анатоксин, дифтерийный анатоксин или CRM197. В других вариантах осуществления белок представляет собой CRM197. В других вариантах осуществления реакция конъюгации представляет собой восстановительное аминирование. В других вариантах осуществления восстановительное аминирование проводят в диметилсульфоксиде (ДМСО).

В некоторых вариантах осуществления окисленные полисахариды перед конъюгацией имеют молекулярную массу от 30 до 1000 кДа. Молекулярная масса может быть определена методом эксклюзионной хроматографии (SEC) в комбинации с многоугловым детектором рассеяния света (MALS) и детектором показателя преломления (RI). В некоторых вариантах осуществления полисахарид имеет молекулярную массу от 50 до 300 кДа. В некоторых вариантах осуществления полисахарид имеет молекулярную массу от 50 до 1000 кДа. В дополнительных вариантах осуществления полисахарид имеет молекулярную массу от 70 до 900 кДа. В других вариантах осуществления полисахарид имеет молекулярную массу от 100 до 800 кДа. В других вариантах осуществления полисахарид имеет молекулярную массу от 200 до 600 кДа. В других вариантах осуществления полисахарид имеет молекулярную массу от 100 до 1000 кДа; от 100 до 900 кДа; от 100 до 800 кДа; от 100 до 700 кДа; от 100 до 600 кДа; от 100 до 500 кДа; от 100 до 400 кДа; от 100 до 300 кДа; от 150 до 1000 кДа; от 150 до 900 кДа; от 150 до 800 кДа; от 150 до 700 кДа; от 150 до 600 кДа; от 150 до 500 кДа; от 150 до 400 кДа; от 150 до 300 кДа; от 200 до 1000 кДа; от 200 до 900 кДа; от 200 до 800 кДа; от 200 до 700 кДа; от 200 до 600 кДа; от 200 до 500 кДа; от 200 до 400 кДа; от 200 до 300; от 250 до 1000 кДа; от 250 до 900 кДа; от 250 до 800 кДа; от 250 до 700 кДа; от 250 до 600 кДа; от 250 до 500 кДа; от 250 до 400 кДа; от 250 до 350 кДа; от 300 до 1000 кДа; от 300 до 900 кДа; от 300 до 800 кДа; от 300 до 700 кДа; от 300 до 600 кДа; от 300 до 500 кДа; от 300 до 400 кДа; от 400 до 1000 кДа; от 400 до 900 кДа; от 400 до 800 кДа; от 400 до 700 кДа; от 400 до 600 кДа; от 500 до 600 кДа.

Вторым этапом процесса конъюгации является восстановление иминной связи (основание Шиффа) между активированным полисахаридом и белком-носителем с образованием стабильной связи конъюгата (так называемое восстановительное аминирование) с использованием восстановителя. Подходящие восстановители включают цианоборгидриды (такие как цианоборгидрид натрия или боргидрид натрия). В одном из вариантов осуществления восстановитель представляет собой цианоборгидрид натрия.

В определенных вариантах осуществления реакцию восстановительного аминирования проводят в апротонном растворителе (или смеси апротонных растворителей). В одном из вариантов осуществления реакцию восстановления проводят в растворителе ДМСО или ДМФА (диметилформамид). Растворитель ДМСО или ДМФА может быть использован для восстановления активированного полисахарида и белка-носителя, если он лиофилизирован. В одном из вариантов осуществления апротонный растворитель представляет собой ДМСО.

В конце реакции восстановления в конъюгатах могут оставаться непрореагировавшие альдегидные группы, которые могут быть экпированы подходящим экпирующим агентом. В одном из вариантов осуществления экпирующий агент представляет собой боргидрид натрия ( $\text{NaBH}_4$ ). Подходящие альтернативы включают триацетоксиборгидрид натрия или боргидрид натрия или цинка в присутствии кислот Бренстеда или Льюиса), аминные бораны, такие как пиридин-боран, 2-пиколин-боран, 2,6-диборан-метанол, диметиламин-боран, трет-бутилметилпирин-боран, бензиламин-боран или 5-этил-2-метилпиридинборан (PEMB), или боргидридные обменные смолы. После конъюгации (реакции восстановления и, необязательно, экпирования) гликоконъюгаты могут быть очищены (обогащены по количеству полисахарид-белкового конъюгата) различными методами, известными специалисту в данной области. Эти методы включают диализ, операции концентрирования/диафильтрации, фильтрацию в тангенциальном потоке, осаждение/элюирование, колоночную хроматографию (ионообменную хроматографию, мультимодальную ионообменную хроматографию, DEAE или хроматографию гидрофобного взаимодействия) и глубинную фильтрацию. В одном из вариантов осуществления гликоконъюгаты очищают диафильтрацией или ионообменной хроматографией, или эксклюзионной хроматографией.

Гликоконъюгаты, полученные по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе, обычно используются в поливалентных пневмококковых конъюгатных вакцинах. Таким образом, в определенных вариантах осуществления для поливалентных композиций, в которых не все серотипы получают в апротонном растворителе, реакцию восстановления оставшихся серотипов проводят в водном растворителе (например, выбранном из PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор), MES (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-

пиперазинэтансульфоновая кислота), бис-трис, ADA (N-(2-ацетиламино)иминодиуксусная кислота), PIPES (пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфоновая кислота)), MOPSO (3-морфолино-2-гидроксипропансульфоновая кислота), BES (N,N'-бис(2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфоновая кислота), MOPS (3-(N-морфолино)пропансульфонокислота), DIPSO (3-бис(2-гидроксиэтил)амино-2-гидроксипропан-1-сульфонокислота), MOBS (4-(N-морфолино)бутансульфонокислота), HEPPSO (N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N-(2-гидроксипропансульфоновая кислота)), POPSO (пиперазин-1,4-бис(2-гидрокси-3-пропансульфоновая кислота)), TEA (триэаноламин), EPPS (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-пропансульфоновая кислота), бицина при pH от 6,0 до 8,5, от 7,0 до 8,0 или от 7,0 до 7,5).

Конъюгаты капсульного полисахарида *S. pneumoniae* и белка, которые могут быть получены по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе, включают без ограничения серотипы 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B и 39. Конъюгаты капсульного полисахарида *S. pneumoniae* и белка, которые могут быть получены по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе, включают без ограничения серотипы 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B и 39. Конъюгаты капсульного полисахарида *S. pneumoniae* и белка, которые могут быть получены по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе, включают без ограничения серотипы 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B и 39. Полисахариды могут быть использованы в форме олигосахаридов. Их удобно получать путем фрагментации очищенного полисахарида (например, путем гидролиза), за которым обычно следует очистка фрагментов требуемого размера.

В некоторых вариантах осуществления пневмококковые полисахарид-белковые конъюгаты одного или более серотипов 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B и 39 получают по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе. В некоторых вариантах осуществления пневмококковые полисахарид-белковые конъюгаты одного или более серотипов 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B и 39 получают по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе. В некоторых вариантах осуществления пневмококковые полисахарид-белковые конъюгаты одного или более серотипов 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B и 39 получают по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе. В определенных вариантах осуществления каждый из серотипов в поливалентной иммуногенной композиции получают по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе. В некоторых вариантах осуществления полисахариды одного или более серотипов в поливалентной композиции конъюгированы по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе, и полисахариды одного или более серотипов конъюгированы по механизму восстановительного аминирования в водном растворителе. В некоторых вариантах осуществления полисахариды двух или более серотипов в поливалентной композиции конъюгированы по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе. В других вариантах осуществления полисахариды трех или более, четырех или более, пяти или более, шести или более, семи или более, восьми или более, девяти или более, десяти или более, одиннадцати или более, двенадцати или более, тринадцати или более, четырнадцати или более, пятнадцати или более, шестнадцати или более, семнадцати или более, восемнадцати или более, девятнадцати или более, двадцати или более или двадцати одного или более серотипов в поливалентной композиции конъюгированы по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе. В определенных вариантах осуществления полисахариды одного или более серотипов в поливалентной композиции конъюгированы с помощью других химических соединений, которые могут находиться в апротонном растворителе или в водном растворителе.

Таким образом, изобретение относится к поливалентной иммуногенной композиции, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, каждый из которых содержит капсульный полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, где серотипы *S. pneumoniae* являются такими, как раскрыто в настоящем описании (т.е. в разделе II, "Поливалентные иммуногенные композиции"), при этом реакция конъюгации, в результате которой происходит конъюгация полисахарида одного или более полисахарид-белковых конъюгатов с белком-носителем, происходит в апротонном растворителе. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% серотипов в поливалентной композиции получают в апротонном растворителе. Остальные серотипы получают с использованием альтернативной химии и/или в водном растворителе.

Неожиданно было установлено, что применение ДМСО в качестве растворителя во время восстановительного аминирования полисахарид-белковых конъюгатов приводит к высокой стабильности и повышенной иммуногенности этих серотипов по сравнению с теми же конъюгатами, полученными в водных условиях (см. заявки США № 62/463216 и 62/555444). Как показано в настоящем описании (см. пример 40), составы лекарственных препаратов, содержащие пневмококковые конъюгаты по изобретению, полученные по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе (например, ДМСО), обеспечивали высокую физическую и химическую стабильность по сравнению с вакциной, в

которой использовались лекарственные вещества, полученные в протонных (т.е. водных) растворителях во время восстановительного аминирования в процессе конъюгации. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления все конъюгаты пневмококкового полисахарида в поливалентной композиции получают в апротонном растворителе.

В определенных вариантах осуществления изобретения общая концентрация полисахарида в композиции составляет от примерно 0,02 мг/мл до примерно 0,175 мг/мл. В определенных вариантах осуществления изобретения общая концентрация полисахарида в композиции составляет от примерно 0,03 мг/мл до примерно 0,175 мг/мл. В определенных вариантах осуществления изобретения общая концентрация полисахарида в композиции составляет от примерно 0,04 мг/мл до примерно 0,175 мг/мл. В других вариантах осуществления общая концентрация полисахарида в композиции составляет от примерно 0,065 мг/мл до примерно 0,085 мг/мл, от примерно 0,070 мг/мл до примерно 0,080 мг/мл, от примерно 0,065 мг/мл до примерно 0,080 мг/мл, от примерно 0,070 мг/мл до примерно 0,085 мг/мл, от примерно 0,110 мг/мл до примерно 0,128 мг/мл, от примерно 0,110 мг/мл до примерно 0,175 мг/мл, от примерно 0,10 мг/мл до примерно 0,175 мг/мл, от примерно 0,110 мг/мл до примерно 0,170 мг/мл, от примерно 0,115 мг/мл до примерно 0,15 мг/мл, от примерно 0,110 мг/мл до примерно 0,15 мг/мл, от примерно 0,110 мг/мл до примерно 0,125 мг/мл, от примерно 0,150 мг/мл до примерно 0,170 мг/мл, от примерно 0,150 мг/мл до примерно 0,165 мг/мл, от примерно 0,140 мг/мл до примерно 0,170 мг/мл, от примерно 0,130 мг/мл до примерно 0,170 мг/мл, от примерно 0,150 мг/мл до примерно 0,175 мг/мл, от примерно 0,070 мг/мл до примерно 0,170 мг/мл, от примерно 0,065 мг/мл до примерно 0,175 мг/мл или от примерно 0,065 мг/мл до примерно 0,180 мг/мл.

В вариантах осуществления изобретения, где один или более или все полисахарид-белковые конъюгаты в поливалентных иммуногенных композициях получают в апротонном растворителе, общая концентрация полисахарида в композиции стабильна в течение 4 недель или более при 37°C, 4 недель или более при 25°C и 12 недель или более при 4°C.

В определенных вариантах осуществления изобретения, где один или более или все полисахарид-белковые конъюгаты в поливалентных иммуногенных композициях получают в апротонном растворителе, средневесовая молекулярная масса (Mw) всех *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов в композиции (среднее значение для всех конъюгатов в композиции) составляет от примерно 3500 кДа до примерно 4700 кДа, от примерно 3500 кДа до примерно 4600 кДа, от примерно 3500 кДа до примерно 4500 кДа, от примерно 3500 кДа до примерно 4400 кДа, от примерно 3500 кДа до примерно 4300 кДа, от примерно 3500 кДа до примерно 4200 кДа, от примерно 3600 кДа до примерно 4700 кДа, от примерно 3600 кДа до примерно 4600 кДа, от примерно 3600 кДа до примерно 4500 кДа, от примерно 3600 кДа до примерно 4400 кДа, от примерно 3600 кДа до примерно 4300 кДа от примерно 3600 кДа до примерно 4200 кДа, от примерно 3700 кДа до примерно 4700 кДа, от примерно 3700 кДа до примерно 4600 кДа, от примерно 3700 кДа до примерно 4500 кДа, от примерно 3700 кДа до примерно 4400 кДа, от примерно 3700 кДа до примерно 4300 кДа, от примерно 3700 кДа до примерно 4200 кДа, от примерно 3800 кДа до примерно 4700 кДа, от примерно 3800 кДа до примерно 4600 кДа, от примерно 3800 кДа до примерно 4500 кДа, от примерно 3800 кДа до примерно 4400 кДа, от примерно 3800 кДа до примерно 4300 кДа, от примерно 3800 кДа до примерно 4200 кДа, от примерно 3900 кДа до примерно 4700 кДа, от примерно 3900 кДа до примерно 4600 кДа, от примерно 3900 кДа до примерно 4500 кДа, от примерно 3900 кДа до примерно 4400 кДа, от примерно 3900 кДа до примерно 4300 кДа или от примерно 3900 кДа до примерно 4200 кДа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых полисахарид-белковые конъюгаты в поливалентных иммуногенных композициях получают в апротонном растворителе, Mw каждого из *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов в композиции (для одного серотипа) составляет от примерно 1000 кДа до примерно 10000 кДа, от примерно 1500 кДа до примерно 5500 кДа, от примерно 1500 кДа до примерно 5600 кДа, от примерно 1500 кДа до примерно 5700 кДа, от примерно 1500 кДа до примерно 5800 кДа, от примерно 1500 кДа до примерно 5900 кДа, от примерно 1500 кДа до примерно 6000 кДа, от примерно 1000 кДа до примерно 5500 кДа, от примерно 1000 кДа до примерно 5000 кДа, от примерно 1000 кДа до примерно 4000 кДа, от примерно 1000 кДа до примерно 4500 кДа, от примерно 1000 кДа до примерно 4000 кДа или от примерно 1000 кДа до примерно 3500 кДа. В других вариантах осуществления Mw конъюгата одного серотипа в композиции составляет примерно 1000 кДа, примерно 1100 кДа, примерно 1200 кДа, примерно 1300 кДа, примерно 1400 кДа, примерно 1500 кДа, примерно 1600 кДа, примерно 1700 кДа, примерно 1800 кДа, примерно 1900 кДа, примерно 2000 кДа, примерно 2100 кДа, примерно 2200 кДа, примерно 2300 кДа, примерно 2400 кДа, примерно 2500 кДа, примерно 2600 кДа, примерно 2700 кДа, примерно 2800 кДа, примерно 2900 кДа, примерно 3000 кДа, примерно 3100 кДа, примерно 3200 кДа, примерно 3300 кДа, примерно 3400 кДа, примерно 3500 кДа, примерно 3600 кДа, примерно 3700 кДа, примерно 3800 кДа, примерно 3900 кДа, примерно 4000 кДа, примерно 4100 кДа, примерно 4200 кДа, примерно 4200 кДа, примерно 300 кДа, примерно 4400 кДа, примерно 4500 кДа, примерно 4600 кДа, примерно 4700 кДа, примерно 4800 кДа, примерно 4900 кДа, примерно 5000 кДа, примерно 5100 кДа, примерно 5200 кДа, примерно 5300 кДа, примерно 5400 кДа или примерно 5500 кДа.

В определенных вариантах осуществления изобретения полисахарид-белковые конъюгаты в поливалентных иммуногенных композициях получают в апротонном растворителе. Композиции, содержащие более высокий процент полисахаридов *S. pneumoniae*, конъюгированных с белком-носителем в апротонном растворителе (в отличие от получения в протонном растворителе), могут быть предпочтительными. В некоторых вариантах осуществления процент (рассчитанный как количество полисахаридных серотипов, полученных в апротонном растворителе, деленное на общее количество полисахаридных серотипов, где общее количество включает серотипы, полученные в апротонном растворителе или протонном растворителе) конъюгатов определенных серотипов *S. pneumoniae*, полученных в апротонном растворителе, может составлять более 50%, или более 60%, или более 70%, или более 80%, или более 90% или составляют 100%.

В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат полисахарида серотипа 3 с белком в композиции получают в апротонном растворителе и  $M_w$  указанного конъюгата составляет от примерно 1000 кДа до примерно 5000 кДа, или от примерно 1000 кДа до примерно 4000 кДа, или от примерно 1000 кДа до примерно 3000 кДа, или от примерно 1000 кДа до примерно 2500 кДа, или от примерно 1000 кДа до примерно 2000 кДа.

В определенных вариантах осуществления изобретения, в которых один или более или все полисахарид-белковые конъюгаты в поливалентных иммуногенных композициях получают в апротонном растворителе, среднечисловая молекулярная масса ( $M_n$ ) *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов в композиции (средняя для всех конъюгатов в композиции) составляет от примерно 900 кДа до примерно 3000 кДа, от примерно 1000 кДа до примерно 3000 кДа, от примерно 1000 кДа до примерно 2500 кДа, от примерно 1500 кДа до примерно 2500 кДа, от примерно 1800 кДа до примерно 2500 кДа от примерно 1900 кДа до примерно 2500 кДа или от примерно 2000 кДа до примерно 2500 кДа.

В определенных вариантах осуществления изобретения, в которых один или более или все полисахарид-белковые конъюгаты в поливалентных иммуногенных композициях получают в апротонном растворителе,  $M_n$  каждого из *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов в композиции (для одного серотипа) составляет от примерно 700 кДа до примерно 7000 кДа, от примерно 1000 кДа до примерно 6000 кДа, от примерно 1000 кДа до примерно 5000 кДа, от примерно 1000 кДа до примерно 4000 кДа, от примерно 1000 кДа до примерно 3000 кДа, от примерно 900 кДа до примерно 5500 кДа, от примерно 900 кДа до примерно 5000 кДа, от примерно 900 кДа до примерно 4500 кДа, от примерно 900 кДа до примерно 4000 кДа, от примерно 900 кДа до примерно 3500 кДа или от примерно 900 кДа до примерно 3000 кДа.

В вариантах осуществления изобретения  $M_w$  и/или  $M_n$  *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов в композиции остается стабильным в течение 4 недель или более при 37°C, 4 недель или более при 25°C и/или 12 недель или более при 4°C.

В вариантах осуществления изобретения концентрацию полисахарида,  $M_w$  и/или  $M_n$  определяют с помощью HP SEC UV/MALS/RI.

В некотором варианте осуществления изобретения, в которых один или более или все полисахарид-белковые конъюгаты в поливалентных иммуногенных композициях получают в апротонном растворителе, максимум излучения композиции, измеренный методом флуоресцентной спектроскопии с внутренним белком с длиной волны возбуждения 280 нанометров (нм), составляет от примерно 335 нм до примерно 342 нм. В некоторых вариантах осуществления максимум излучения сохраняется в диапазоне от примерно 335 нм до примерно 342 нм, и интенсивность флуоресценции остается стабильной в течение по меньшей мере 1 недели при 37°C. В некоторых вариантах осуществления максимум излучения сохраняется в пределах от примерно 335 нм до примерно 342 нм и интенсивность флуоресценции остается стабильной в течение 1 недели при 37°C.

В некоторых вариантах осуществления все конъюгаты пневмококкового полисахарида в поливалентной композиции получают по механизму восстановительного аминирования в ДМСО. В некоторых подвариантах поливалентная композиция, содержащая полисахаридные конъюгаты, все из которых были получены в среде ДМСО, не содержит адъювант.

Не ограничиваясь какой-либо теорией, один из возможных механизмов усиления иммуногенности, наблюдаемого у гликоконъюгатов, полученных в ДМСО, включает увеличение количества связей между углеводом (капсульным полисахаридом) и остатками лизина на поверхности белка-носителя, что может привести к дополнительным точкам присоединения белка к полисахариду, обеспечивая стабильность и противодействие химической деполимеризации или разрыву пептидной углеводной связи. См., например, Hsieh, Characterization of Saccharide-CRM197 Conjugate Vaccines in Brown F., Corbel M., Griffiths E. (eds): Physico-Chemical Procedures for the Characterization of Vaccines, Dev. Biol. Basel, Karger, 2000, vol. 103, p. 93-104. Дополнительным преимуществом увеличения количества полисахаридно-белковых связей, которые образуются во время конъюгации в растворителе ДМСО, могут обеспечивать дополнительные возможности для успешной презентации пептид-углеводов Т-клеткам. Следует понимать, что из-за генетической изменчивости в человеческой популяции, приводящей к появлению различных способностей и чувствительности нагрузки или связям с конкретными пептидными последовательностями, конъюгированными с углеводными антигенами, такие дополнительные точки присоединения к

белку-носителю позволяют увеличить шансы успешной презентации антигена на поверхности антигенпрезентирующей клетки (АРС), обеспечивая Т-клеточно-зависимый ответ на другой Т-клеточно-независимый антиген. Другой возможный механизм усиления иммуногенности, наблюдаемый при конъюгации в растворителе ДМСО, может быть связан с денатурацией CRM197 в органическом растворителе, в результате которой обнажаются дополнительные остатки лизина, приводя к образованию полисахаридных связей, что увеличивает шансы для презентации гликопептида на поверхности АРС для Т-клеточно-зависимого ответа к различным пептидным эпитопам. См. Avci et al., 2011, *Nature Medicine*, 17:1602-1610.

Еще одним преимуществом конъюгации в органическом растворителе, генерирующем денатурированный CRM197 в конъюгатах, может быть снижение иммунологической интерференции антител к нативным эпитопам CRM197. Дополнительным преимуществом увеличения количества полисахарид-белковых связей, которые образуются во время конъюгации в растворителе ДМСО, может быть образование полисахарид-белковых конъюгатов большего размера, что приводит к усилению иммуногенности. Считается, что композиции по изобретению обеспечивают значительные преимущества в инициации реакции у человека.

В некоторых вариантах осуществления реакцию конъюгации выполняют по механизму восстановительного аминирования, в которой используется никель для обеспечения более эффективной реакции конъюгации и для удаления свободного цианида. Известно, что переходные металлы образуют стабильные комплексы с цианидом и, как известно, улучшают восстановительное метилирование аминокрупп белка и формальдегида с помощью цианоборгидрида натрия (S. Gidley et al., *Biochem. J.*, 1982, 203:331-334; Jentoft et al., *Anal. Biochem.*, 1980, 106:186-190). Благодаря образованию комплекса остаточного ингибирующего цианида добавление никеля увеличивает расход белка во время конъюгации и приводит к образованию более крупных, потенциально более иммуногенных конъюгатов.

Различия в исходных уровнях цианидов в партиях реагентов цианоборгидрида натрия также приводят к противоречивым характеристикам конъюгации, что приводит к различным характеристикам продукта, таким как размер конъюгата и отношение Ps-к-CRM197. Добавление никеля уменьшает изменчивость результатов реакции конъюгации за счет комплексообразования цианида, устраняя различия в партиях цианоборгидрида натрия.

Подходящие альтернативные химические соединения включают активацию сахара тетрафторборатом 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP) с образованием эфира цианата. Таким образом, активированный сахарид может быть связан непосредственно или через спейсерную (линкерную) группу с аминокруппой на белке-носителе. Например, спейсер может представлять собой цистамин или цистеамин для получения тиолированного полисахарида, который может быть связан с носителем через тиоэфирную связь, полученную в результате реакции с малеимид-активированным белком-носителем (например, с использованием GMBS) или галоген-ацетилованным белком-носителем (например, с использованием йодацетимида (например, этил-йодацетимида HCl) или N-сукцинимидилбромацетата или SIAB, или SIA, или SBAP). Предпочтительно цианатный сложный эфир (необязательно полученный с помощью химии CDAP) связывают с дигидразидом гександиамина или адипиновой кислоты (ADH), и аминокпроизводный сахарид конъюгируют с белком-носителем с использованием химии карбодиимида (например, EDAC или EDC) через карбоксильную группу на белке-носителе. Такие конъюгаты описаны в публикациях Международных заявок на патент № WO 93/15760, WO 95/08348 и WO 96/29094; и Chu et al., 1983, *Infect. Immunity*, 40:245-256.

В других подходящих методах используются карбодиимиды, гидразиды, активные эфиры, норборан, п-нитробензойная кислота, N-гидроксисукцинимид, S-NHS, EDC, TSTU. Многие из них описаны в публикации международной патентной заявки № WO 98/42721. Процесс конъюгации может включать карбонильный линкер, который может быть образован в результате реакции свободной гидроксильной группы сахара с CDI (см. See Bethell et al., 1979, *J. Biol. Chem.*, 254:2572-4; Hearn et al., 1981, *J. Chromatogr.*, 218:509-18) с последующей реакцией с белком с образованием карбаматной связи. Это может включать восстановление аномерного конца до первичной гидроксильной группы, необязательную защиту/снятие защиты с первичной гидроксильной группы, реакцию первичной гидроксильной группы с CDI с образованием промежуточного соединения карбамата CDI и связывание промежуточного соединения карбамата CDI с аминокруппой белка.

После конъюгации капсульного полисахарида с белком-носителем полисахарид-белковые конъюгаты очищают (обогащают по количеству полисахарид-белкового конъюгата) одним или более из множества способов. Примеры этих способов хорошо известны специалисту в данной области и включают операции концентрирования/диафильтрации, ультрафильтрации, осаждения/элюирования, колоночную хроматографию и глубинную фильтрацию. См., например, патент США № 6146902.

После очистки отдельных гликоконъюгатов их смешивают с получением иммуногенной композиции по настоящему изобретению. Эти пневмококковые конъюгаты получают каждый отдельно и смешивают в виде состава единичной дозы.

Альтернативный способ характеристики гликоконъюгатов по изобретению заключается в количестве остатков лизина в белке-носителе (например, CRM197), которые становятся конъюгированными с са-

харидом, и это количество конъюгированных лизинов можно охарактеризовать в виде диапазона (степени конъюгации). Доказательства модификации остатков лизина белка-носителя за счет образования ковалентных связей с полисахаридами могут быть получены с помощью аминокислотного анализа с помощью обычных методов, известных специалистам в данной области. Конъюгация приводит к уменьшению количества восстановленных остатков лизина по сравнению с исходным материалом белка-носителя, используемым для получения конъюгатных материалов. В предпочтительном варианте осуществления степень конъюгации гликоконъюгата по изобретению составляет от 2 до 15, от 2 до 13, от 2 до 10, от 2 до 8, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 от 3 до 15, от 3 до 13, от 3 до 10, от 3 до 8, от 3 до 6, от 3 до 5, от 3 до 4, от 5 до 15, от 5 до 10, от 8 до 15 от 8 до 12, от 10 до 15 или от 10 до 12. В одном из вариантов осуществления степень конъюгации гликоконъюгата по изобретению составляет примерно 2, примерно 3, примерно 4, примерно 5, примерно 6, примерно 7, примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 13 примерно 14 или примерно 15. В предпочтительном варианте осуществления степень конъюгации гликоконъюгата по изобретению составляет от 4 до 7. В некоторых таких вариантах осуществления белок-носитель представляет собой CRM197.

Гликоконъюгаты композиций по изобретению также могут быть охарактеризованы отношением (мас./мас.) сахара к белку-носителю (Ps:Pr). В некоторых вариантах осуществления отношение полисахарида к белку-носителю в гликоконъюгатах (мас./мас.) в композиции составляет от 0,5 до 3,0 (например, примерно 0,5, примерно 0,6, примерно 0,7, примерно 0,8, примерно 0,9, примерно 1,0, примерно 1,1, примерно 1,2, примерно 1,3, примерно 1,4, примерно 1,5, примерно 1,6, примерно 1,7, примерно 1,8, примерно 1,9, примерно 2,0, примерно 2,1, примерно 2,2, примерно 2,3, примерно 2,4, примерно 2,5, примерно 2,6, примерно 2,7, примерно 2,8, примерно 2,9 или примерно 3,0). В других вариантах осуществления отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) составляет от 0,5 до 2,5, от 0,5 до 1,5, от 0,8 до 2,5, от 0,5 до 1,0, от 1,0 до 1,5, от 1,0 до 2,0, от 0,8 до 2,4 от 0,8 до 2,3, от 0,8 до 2,2, от 0,8 до 2,1, от 0,8 до 2,0, от 0,8 до 1,9, от 0,8 до 1,8, от 0,8 до 1,7, от 0,8 до 1,6, от 0,8 до 1,5, от 0,8 до 1,4 от 0,8 до 1,3, от 0,9 до 2,4, от 0,9 до 2,3, от 0,9 до 2,2, от 0,9 до 2,1, от 0,9 до 2,0, от 0,9 до 1,9, от 0,9 до 1,8, от 0,9 до 1,7, от 0,9 до 1,6 от 0,9 до 1,5, от 0,9 до 1,4, от 0,9 до 1,3, от 0,9 до 1,2, от 1,0 до 2,4, от 1,0 до 2,3, от 1,0 до 2,2, от 1,0 до 2,1, от 1,0 до 2,0, от 1,0 до 1,9 от 1,0 до 1,8, от 1,0 до 1,7, от 1,0 до 1,6, от 1,0 до 1,5, от 1,0 до 1,4, от 1,0 до 1,3 или от 1,0 до 1,2. В других вариантах осуществления отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) составляет от 0,8 до 1,2. В некоторых таких вариантах осуществления белок-носитель представляет собой CRM197. Гликоконъюгаты и иммуногенные композиции по изобретению могут содержать свободный сахарид, который не конъюгирован ковалентно с белком-носителем, но тем не менее присутствует в гликоконъюгатной композиции. Свободный сахарид может быть нековалентно связан (т.е. нековалентно присоединен к, адсорбирован или захвачен) с гликоконъюгатом.

В конкретных вариантах осуществления отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) для конъюгата серотипа 15A составляет от примерно 1,0 до примерно 2,0, от примерно 1,25 до примерно 1,75 или от примерно 1,3 до примерно 1,7. В других вариантах осуществления отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) для серотипа 15A составляет примерно 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7 или 1,8.

В конкретных вариантах осуществления отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) для конъюгата серотипа 15C составляет от примерно 1,0 до примерно 2,0, от примерно 1,25 до примерно 1,75 или от примерно 1,3 до примерно 1,7. В других вариантах осуществления отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) для серотипа 15C составляет примерно 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7 или 1,8.

В конкретных вариантах осуществления отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) для конъюгата серотипа 33F составляет от примерно 1,0 до примерно 2,0, от примерно 1,25 до примерно 1,75 или от примерно 1,3 до примерно 1,7. В других вариантах осуществления отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) для серотипа 33F составляет примерно 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7 или 1,8.

В конкретных вариантах осуществления отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) для конъюгата серотипа 35B составляет от примерно 1,25 до примерно 2,25, от примерно 1,25 до примерно 2,0 или от примерно 1,3 до примерно 1,8. В других вариантах осуществления отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) для серотипа 33B составляет примерно 1,2, 1,3, 1,3, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2,0.

В конкретных вариантах осуществления отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) для конъюгата серотипа 24F составляет от примерно 0,5 до примерно 1,5, от примерно 0,75 до примерно 1,25 или от примерно 0,8 до примерно 1,0. В других вариантах осуществления отношение сахара к белку-носителю (мас./мас.) для серотипа 24F составляет примерно 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0.

В предпочтительном варианте осуществления гликоконъюгат содержит менее примерно 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 или 15% свободного полисахарида относительно общего количества полисахарида. В предпочтительном варианте осуществления гликоконъюгат содержит менее примерно 25% свободного полисахарида относительно общего количества полисахарида. В предпочтительном варианте осуществления гликоконъюгат содержит менее примерно 20% свободного полисахарида относительно общего количества полисахарида. В предпочтительном варианте осуществления гликоконъюгат содержит менее примерно 15% свободного полисахарида относительно общего количества полисахарида.

#### IV. Способы применения.

Варианты осуществления изобретения также включают одну или более поливалентных иммуноген-

ных композиций, раскрытых в настоящем описании,

- (i) для применения,
- (ii) для применения в качестве лекарственного средства или композиции для, или
- (iii) для применения в приготовлении лекарственного средства
- (a) для терапии (например, человеческого организма);
- (b) в медицине;
- (c) для ингибирования инфекции *Streptococcus pneumoniae*;
- (d) для индукции иммунного ответа или защитного иммунного ответа против *S. pneumoniae*;
- (e) для профилактики инфекции *S. pneumoniae*;
- (f) для предотвращения рецидива инфекции *S. pneumoniae*;
- (g) для снижения прогрессирования, появления или серьезности патологических симптомов, связанных с инфекцией *S. pneumoniae*, включая профилактику связанных с этим осложнений, таких как поражение мозга, потеря слуха и судороги;
- (h) для уменьшения вероятности инфицирования *S. Pneumoniae*; или
- (i) для лечения, профилактики или задержки начала появления, тяжести или прогрессирования пневмококкового заболевания(ий), включая без ограничения пневмококковую пневмонию, пневмококковую бактериемию, пневмококковый менингит, отит и синусит.

В этих применениях поливалентные пневмококковые полисахаридные конъюгатные композиции по изобретению необязательно могут использоваться в комбинации с одним или более адъювантами или без адъюванта.

Соответственно изобретение относится к способам профилактического лечения (т.е. защиты от) инфекции *S. pneumoniae* или пневмококкового заболевания, включающим введение одной или более поливалентных иммуногенных пневмококковых полисахарид-белковых конъюгатов по изобретению нуждающемуся в лечении пациенту.

Композиции и составы по настоящему изобретению могут быть использованы для защиты или лечения человека, восприимчивого к инфекции, например, пневмококковой инфекции, путем введения композиции по изобретению системным путем или через слизистую.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу индукции иммунного ответа на *S. pneumoniae*, включающему введение пациенту иммунологически эффективного количества поливалентной иммуногенной композиции по изобретению. В другом варианте осуществления изобретение относится к способу вакцинации человека против пневмококковой инфекции, включающему этап введения человеку иммуногенно эффективного количества поливалентной иммуногенной композиции по изобретению.

Таким образом, в одном из аспектов изобретение относится к способу

- (1) индукции иммунного ответа у пациента-человека;
- (2) индукции защитного иммунного ответа у пациента-человека;
- (3) вакцинации пациента-человека против инфекции *S. pneumoniae*; или
- (4) снижению вероятности заражения пациента-человека *S. pneumoniae*,

причем способ включает введение пациенту поливалентной иммуногенной композиции по изобретению (т.е. любой поливалентной иммуногенной композиции, раскрытой в настоящем описании, такой как поливалентные иммуногенные композиции, описанные в разделе II, озаглавленном "Поливалентные иммуногенные композиции", см. выше).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу профилактики пневмококковой пневмонии и инвазивного заболевания у взрослых в возрасте 18 лет и старше. В другом варианте осуществления изобретение относится к способу профилактики пневмококковой пневмонии и инвазивного заболевания, вызванного 24 штаммами *Streptococcus pneumoniae* (3, 6A, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B).

В одном из вариантов осуществления вышеупомянутых способов композиция содержит несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, где каждый из конъюгатов содержит полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, причем серотипы *S. pneumoniae* содержат набор серотипов 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A. В одном из вариантов осуществления указанных выше способов композиция содержит несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, где каждый из конъюгатов содержит полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, причем серотипы *S. pneumoniae* содержат набор серотипов: 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20. В одном из вариантов осуществления вышеупомянутых способов композиция содержит несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, где каждый из конъюгатов содержит полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, причем серотипы *S. pneumoniae* содержат набор серотипов 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20B. В другом варианте осуществления вышеупомянутых способов композиция дополнительно содержит конъюгат полисахарида серотипа 6A или 6C *S. pneumoniae* с белком.

Было показано, что пневмококковая конъюгатная вакцина, содержащая серотип 6A, может обеспе-

чивать некоторую перекрестную защиту от серотипа 6С (Cooper et al., Vaccine 29 (2011), 7207-7211). Следовательно, в некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов, изобретение также относится к применению поливалентных иммуногенных композиций, которые не содержат серотип 6С, но вместо него содержат серотип 6А или серотипы 6А и 6В. В других вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит конъюгаты пневмококковых серотипов 6А, 6В и 6С. В конкретных вариантах осуществления вышеупомянутых способов серотипы *S. pneumoniae* содержат набор серотипов, выбранных из группы, состоящей из

- Ia) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A;
- Ib) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A;
- Ic) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A; и
- I-d) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A.

В конкретных вариантах осуществления вышеупомянутого набора серотипов (I-a - I-d) серотип 20 или 20В может быть заменен серотипом 20А.

В других вариантах осуществления вышеупомянутых способов, серотипы *S. pneumoniae* включают набор серотипов, выбранных из группы, состоящей из

- II-a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B;
- II-b) 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B;
- II-c) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B;
- II-d) 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B;
- II-e) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A;
- II-f) 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A;
- II-g) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A;

и

- II-h) 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A.

В конкретных вариантах осуществления вышеупомянутого набора серотипов (II-e -II-h) серотип 20 или 20В может быть заменен серотипом 20А.

В дополнительных вариантах осуществления вышеупомянутых способов серотипы *S. pneumoniae* содержат набор серотипов, указанных в любом из вариантов осуществления Iа), II-a) или II-e), и дополнительно содержат серотипы 6А, 6В и 6С.

Также было показано, что пневмококковая конъюгатная вакцина, содержащая серотип 10А, может обеспечивать некоторую перекрестную защиту от серотипа 39 (см. WO 2017/085586). Следовательно, в некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов изобретение также относится к применению поливалентных иммуногенных композиций, которые не содержат серотип 10А, но вместо него содержат серотип 39. В других вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит пневмококковые конъюгаты серотипов 10А и 39. В конкретных вариантах осуществления вышеупомянутых способов серотипы *S. pneumoniae* содержат набор серотипов, выбранных из группы, состоящей из

- III-a) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A;
- III-b) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A;
- III-c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A;
- III-d) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A;
- III-e) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A;
- III-f) 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A;
- III-g) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A;

а также

- III-h) 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F и 20A.

В конкретных вариантах осуществления вышеупомянутого набора серотипов (II-a-III-h) серотип 20 или 20В может быть заменен серотипом 20А.

В дополнительных вариантах осуществления вышеупомянутых способов серотипы *S. pneumoniae*

содержат набор серотипов, указанных в любом из вариантов осуществления III-a)-III-h), и дополнительно содержат серотип 10A.

Также было показано, что иммуногенные конъюгаты, содержащие капсульный полисахарид серотипа 15B *S. pneumoniae*, ковалентно связанный с белком-носителем, могут обеспечивать некоторую перекрестную защиту против серотипа 15C и/или серотипа 15A (см. WO 2015/110942). Следовательно, в некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов изобретение также относится к применению поливалентных иммуногенных композиций, которые не содержат серотип 15C (или де-О-ацетилованный 15B), но вместо него содержат серотип 15B (т.е. полисахарид серотипа 15B, который не является О-ацетилованным). В других вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит пневмококковые конъюгаты серотипов 15B и 15C (или де-О-ацетилованный 15B). В конкретных вариантах осуществления вышеупомянутых способов серотипы *S. pneumoniae* содержат набор серотипов, выбранных из группы, состоящей из

IV-a) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F и 20A;

IV-b) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F и 20A;

IV-c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F и 20A;

IV-d) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F и 20A;

IV-e) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F и 20A;

IV-f) 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F и 20A;

IV-g) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F и 20A; и

IV-h) 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F и 20A.

В конкретных вариантах осуществления вышеупомянутого набора серотипов (IV-a -IV-h) серотип 20 или 20B может быть заменен серотипом 20A.

В дополнительных вариантах осуществления вышеупомянутых способов серотипы *S. pneumoniae* содержат набор серотипов, указанный в любом из вариантов осуществления IV-a)-VI-h), и дополнительно содержат серотип 15C (и/или де-О-ацетилованный 15B).

Композиции по изобретению можно использовать в способах обеспечения дополнительной защиты от *S. pneumoniae* у пациентов, которые ранее получали поливалентную пневмококковую вакцину. При таком применении композиции по изобретению могут обеспечивать защиту от конкретных серотипов *S. pneumoniae*, против которых пациент ранее не был вакцинирован, или могут обеспечивать дополнительную защиту против серотипов *S. pneumoniae*, против которых пациент был ранее вакцинирован, или могут обеспечивать защиту против серотипов *S. pneumoniae*, против которых пациент ранее не был вакцинирован, и против серотипов *S. pneumoniae*, против которых пациент был ранее вакцинирован.

Таким образом, изобретение относится к способу индукции иммунного ответа, вакцинации или индукции защитного иммунного ответа против *S. pneumoniae* у пациента, включающему введение поливалентной иммуногенной композиции пациенту, причем композиция содержит несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, причем полисахарид-белковые конъюгаты включают капсульный полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, при этом пациент ранее был вакцинирован против *S. pneumoniae*. В вариантах осуществления этого аспекта изобретения поливалентная иммуногенная композиция может представлять собой любую поливалентную иммуногенную композицию, раскрытую в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления способов по изобретению поливалентную иммуногенную композицию вводят пациенту, которого ранее лечили поливалентной пневмококковой вакциной. Поливалентная иммуногенная вакцина может быть любой вакциной, которая показана для профилактики пневмококковой инфекции, вызванной более чем одним серотипом *S. pneumoniae*.

В конкретных вариантах осуществления вышеупомянутого способа пациента ранее лечили поливалентной пневмококковой вакциной, которая показана для профилактики пневмококковой инфекции, вызванной серотипами *S. pneumoniae*, выбранными из группы, состоящей из

- a) 4, 6B, 9B, 14, 18C, 19F и 23F;
- b) 4, 6B, 9B, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F и 19A;
- c) 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F и 23F;
- d) 4, 6B, 9B, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F и 33F;
- e) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F и 20; и
- f) 4, 6B, 9B, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 10A, 11A, 12F и 15B.

В конкретных вариантах осуществления вышеупомянутого способа поливалентная пневмококковая вакцина содержит капсульные полисахариды серотипов *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F и 20A. В конкретных вариантах осуществления вышеупомянутого способа поливалентная пневмококковая вакцина содержит капсульные полисахариды серотипов *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F и 20. В конкретных вариантах осуществления вышеупомянутого способа поливалентная пневмококковая вакцина содержит капсульные полисахариды серотипов *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F и 20B.

В конкретных вариантах осуществления вышеупомянутого способа поливалентная пневмококковая вакцина содержит несколько полисахарид-белковых конъюгатов, содержащих полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем. В других вариантах осуществления поливалентная пневмококковая вакцина содержит несколько капсульных полисахаридов *S. pneumoniae*, которые не конъюгированы с белком-носителем.

В дополнительных вариантах осуществления вышеупомянутого способа пациента ранее лечили PREVJAR® 13 (пневмококковая 13-валентная конъюгатная вакцина [белок CRM197 дифтерийного токсина], Pfizer, Inc., Philadelphia, PA, USA).

В других вариантах осуществления вышеупомянутого способа пациента ранее лечили PNEUMOVAX® 23 (пневмококковая поливалентная вакцина, Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA).

В других вариантах осуществления вышеупомянутого способа пациента ранее лечили SYNFLORIX™ (пневмококковая полисахаридная-конъюгатная вакцина (адсорбированная), GlaxoSmith-Kline Biologicals s.a., Rixensart, Belgium).

В вариантах осуществления вышеупомянутого способа поливалентную иммуногенную композицию по изобретению вводят пациенту в любое время после того, как пациент получил поливалентную пневмококковую вакцину, в соответствии с режимом лечения, назначенным медицинским работником, например врачом. В конкретных вариантах осуществления поливалентную иммуногенную композицию по изобретению вводят пациенту через от 1 месяца до 5 лет после того, как пациент получил поливалентную пневмококковую вакцину, альтернативно, через от 1 месяца до 1 года, от 1 месяца до 2 лет, от 1 месяца до 3 лет, от 1 месяца до 4 лет, от 1 до 6 месяцев, от 2 до 6 месяцев, от 2 месяцев до 1 года, от 1 года до 5 лет, от 6 месяцев до 5 лет, от 6 месяцев до 4 лет, от 6 месяцев до 3 лет, от 6 месяцев до 2 лет, от 6 месяцев до 1 года, от 1 года до 4 лет, от 1 года до 3 лет или от 1 года до 2 лет, после того как пациент получил поливалентную пневмококковую вакцину. В других вариантах осуществления поливалентную иммуногенную композицию вводят пациенту через примерно 1 месяц, примерно 2 месяца, примерно 3 месяца, примерно 4 месяца, примерно 5 месяцев, примерно 6 месяцев, примерно 7 месяцев, примерно 8 месяцев, примерно 9 месяцев, примерно 10 месяцев, примерно 11 месяцев, примерно 1 год, примерно 1,25 года, примерно 1,5 года, примерно 1,75 года, примерно 2 года, примерно 2,25 года, примерно 2,5 года, примерно 2,75 года, примерно 3 года, примерно 3,25 года, примерно 3,5 года, примерно 3,75 года, примерно 4 года, примерно 4,25 года, примерно 4,5 года, примерно 4,75 года или примерно 5 лет после того, как пациент получил поливалентную пневмококковую вакцину.

В дополнительных вариантах осуществления изобретение относится к способу

- (1) индукции иммунного ответа у пациента-человека;
- (2) индукции защитного иммунного ответа у пациента-человека;
- (3) вакцинации пациента-человека против инфекции *S. pneumoniae*; или
- (4) снижения вероятности инфекции *S. pneumoniae* у пациента-человека,

причем способ включает введение поливалентной иммуногенной композиции по изобретению и введение поливалентной пневмококковой вакцины пациенту в любом порядке. Поливалентная пневмококковая вакцина может представлять собой любую вакцину, показанную для профилактики пневмококковой инфекции, вызванной более чем одним серотипом *S. pneumoniae*.

В конкретных вариантах осуществления вышеупомянутого способа пациента лечат поливалентной иммуногенной композицией по изобретению и поливалентной пневмококковой вакциной, которая показана для профилактики пневмококковой инфекции, вызванной серотипами *S. pneumoniae*, выбранными из группы, состоящей из

- a) 4, 6B, 9B, 14, 18C, 19F и 23F;
- b) 4, 6B, 9B, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F и 19A;
- c) 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F и 23F;
- d) 4, 6B, 9B, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F и 33F;
- e) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F и 20; и
- f) 4, 6B, 9B, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 10A, 11A, 12F и 15B.

В конкретных вариантах осуществления вышеупомянутого способа поливалентная пневмококковая вакцина содержит капсульные полисахариды серотипов *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F и 20A.

В конкретных вариантах осуществления вышеупомянутого способа поливалентная пневмококковая вакцина содержит несколько полисахаридно-белковых конъюгатов, содержащих полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем. В других вариантах осуществления поливалентная пневмококковая вакцина содержит несколько капсульных полисахаридов *S. pneumoniae*, которые не конъюгированы с белком-носителем.

В дополнительных вариантах осуществления вышеупомянутого способа пациента лечат поливалентной иммуногенной композицией по изобретению и PREVNAR® 13 (пневмококковая 13-валентная конъюгированная вакцина (Diphtheria CRM197 Protein), Pfizer, Inc., Philadelphia, PA, USA), в любом порядке. В одном из вариантов осуществления пациенту сначала вводят PREVNAR® 13, а затем вводят поливалентную иммуногенную композицию по изобретению. В альтернативных вариантах осуществления пациенту сначала вводят поливалентную иммуногенную композицию по изобретению, а затем вводят PREVNAR® 13.

В дополнительных вариантах осуществления вышеупомянутого способа пациента лечат поливалентной иммуногенной композицией по изобретению и PNEUMOVAX® 23 (пневмококковая поливалентная вакцина, Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA) в любом порядке. В одном из вариантов осуществления пациенту сначала вводят PREVNAR® 23, а затем вводят поливалентную иммуногенную композицию по изобретению. В альтернативных вариантах осуществления пациенту сначала вводят поливалентную иммуногенную композицию по изобретению и затем вводят PNEUMOVAX®23.

В других дополнительных вариантах осуществления вышеупомянутого способа пациента лечат поливалентной иммуногенной композицией по изобретению и SYNFLORIX™ (пневмококковая полисахаридная конъюгированная вакцина (адсорбированная), GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rixensart, Бельгия), в любом порядке. В одном из вариантов осуществления пациенту сначала вводят SYNFLORIX™, а затем вводят поливалентную иммуногенную композицию по изобретению. В альтернативном варианте осуществления пациенту сначала вводят поливалентную иммуногенную композицию по изобретению, а затем вводят SYNFLORIX™.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутого способа поливалентную иммуногенную композицию и поливалентную пневмококковую вакцину вводят одновременно. Как используется в настоящем описании, "одновременное введение" не ограничено введением доз двух композиций одновременно и включает последовательное (один за другим) введение в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления поливалентную иммуногенную композицию и поливалентную пневмококковую вакцину вводят внутримышечно или подкожно в отдельные анатомические участки, например, две разные руки.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного способа временной интервал между введением поливалентной иммуногенной композиции по изобретению и поливалентной пневмококковой вакцины составляет от 4 недель до примерно 1 года. В альтернативных вариантах осуществления временной интервал составляет от примерно 1 месяца до примерно 5 лет.

В одном из вариантов осуществления пациенту вводят сначала поливалентную пневмококковую вакцину, а затем поливалентную иммуногенную композицию по изобретению. В альтернативных вариантах осуществления пациенту сначала вводят поливалентную иммуногенную композицию по изобретению, а затем вводят поливалентную пневмококковую вакцину.

Также предоставляется способ индуцирования иммунного ответа, вакцинации или индуцирования защитного иммунного ответа против *S. pneumoniae* у пациента, включающий

(1) введение поливалентной иммуногенной композиции пациенту, содержащей несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, причем каждый из полисахаридно-белковых конъюгатов содержит капсульный полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем;

(2) ожидание истечения заранее определенного промежутка времени; и

(3) введение пациенту поливалентной пневмококковой вакцины.

В этом способе поливалентная иммуногенная композиция может содержать любую комбинацию *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, раскрытых в настоящем описании, при этом поливалентная пневмококковая вакцина может быть любой вакциной, показанной для профилактики заболеваний, вызываемых более чем одним серотипом *S. pneumoniae*.

Изобретение также относится к способу индукции иммунного ответа, вакцинации или индукции защитного иммунного ответа против *S. pneumoniae* у пациента, включающему

- (1) введение поливалентной пневмококковой вакцины пациенту;
- (2) ожидание истечения заранее определенного промежутка времени; и
- (3) введение поливалентной иммуногенной композиции пациенту,

причем композиция содержит несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, где каждый из полисахарид-белковых конъюгатов содержит капсульный полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем.

В этом способе поливалентная иммуногенная композиция может содержать любую комбинацию *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, раскрытых в настоящем описании, при этом поливалентная пневмококковая вакцина может представлять собой любую вакцину, показанную для профилактики заболевания, вызываемого более чем одним серотипом *S. pneumoniae*.

В некоторых вариантах осуществления описанных выше способов поливалентная пневмококковая вакцина содержит несколько *S. pneumoniae* полисахарид-белковых конъюгатов, где полисахарид-белковые конъюгаты содержат капсульный полисахарид серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем. В альтернативных вариантах осуществления поливалентная пневмококковая вакцина содержит капсульные полисахариды *S. pneumoniae*, которые не конъюгированы с белком-носителем.

В любых вариантах осуществления способов по изобретению (т.е. любом из способов, раскрытых в настоящем описании), способ может дополнительно включать введение пациенту одной или более дополнительных доз поливалентной иммуногенной композиции по изобретению. В таких способах пациент, возможно, уже получал поливалентную пневмококковую вакцину до получения первой дозы поливалентной иммуногенной композиции по настоящему изобретению или, возможно, не был вакцинирован против *S. pneumoniae* до получения поливалентной иммуногенной композиции по изобретению. Таким образом, в одном из вариантов осуществления пациенту, который получил поливалентную пневмококковую вакцину, показанную для профилактики пневмококкового заболевания, вызванного *S. pneumoniae*, вводят две или более доз поливалентной иммуногенной композиции по изобретению. В альтернативных вариантах осуществления пациенту, которого ранее не лечили какой-либо вакциной, показанной для профилактики пневмококкового заболевания, вводят две или более доз поливалентной иммуногенной композиции по изобретению.

В вариантах осуществления описанного выше способа две или более доз представляют собой одну и ту же поливалентную иммуногенную композицию по изобретению. В альтернативных вариантах осуществления две или более доз представляют собой разные поливалентные иммуногенные композиции по изобретению.

В конкретных вариантах осуществления любого из этих способов пациенту вводят две, три или четыре дозы поливалентной иммуногенной композиции по изобретению. В конкретных вариантах осуществления пациент имеет ослабленный иммунитет (например, находится в состоянии иммуносупрессии после трансплантации стволовых клеток), и количество доз равно трем.

В некоторых вариантах осуществления промежутков времени между введением каждой дозы поливалентной иммуногенной композиции по изобретению составляет от примерно 4 недель до примерно 1 года. В альтернативном варианте осуществления промежуток времени между введением каждой дозы поливалентной иммуногенной композиции по изобретению составляет от примерно 1 месяца до примерно 5 лет.

В вариантах осуществления любого из способов по изобретению пациентом, которого лечат композицией(ями) по изобретению, является человек. В определенных вариантах осуществления пациентом-человеком является младенец (приблизительно от 12 до 24 месяцев) или ребенок младшего возраста (приблизительно от 2 до 5 лет). Композиции по настоящему изобретению также подходят для введения детям старшего возраста, подросткам и взрослым (например, в возрасте от 18 до 45 лет, в возрасте от 18 до 50 лет, в возрасте от 18 до 55 лет, в возрасте от 18 до 60 лет или от 18 до 65 лет). В других вариантах осуществления любого из способов по изобретению возраст пациента составляет от 2 до 18 лет. В других вариантах осуществления любого из способов по изобретению пациенту 18 лет или более.

В других вариантах осуществления способов по изобретению пациент-человек является пациентом пожилого возраста. В некоторых вариантах осуществления любого из способов по изобретению пациенту 50 лет или более. В некоторых вариантах осуществления любого из способов по изобретению пациенту 55 лет или более. В некоторых вариантах осуществления любого из способов по изобретению пациенту 60 лет или более. В других вариантах осуществления любого из способов по изобретению пациенту 65 лет. В дополнительных вариантах осуществления любого из способов по изобретению пациенту 70 лет или более.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов по изобретению пациент, подлежащий лечению иммуногенной композицией по изобретению, имеет ослабленный иммунитет.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов по изобретению поливалентную иммуногенную композицию вводят одновременно с вакциной против гриппа. В некоторых вариантах осуществления вакцина против гриппа представляет собой "вакцину против гриппа для пожилых людей", вак-

цину против гриппа высокой дозы, предназначенную для пожилых людей, например людей в возрасте 65 лет и старше.

Изобретение относится к способу индукции защитного иммунного ответа у пациента против пневмококковой инфекции, включающему этап введения пациенту иммунологически эффективного количества любой из поливалентных иммуногенных пневмококковых полисахарид-белковых конъюгатных композиций, раскрытых в настоящем описании. Оптимальное количество компонентов для конкретной вакцины (т.е. поливалентной иммуногенной композиции) может быть установлено с помощью стандартных исследований, включающих наблюдение соответствующих иммунных ответов у субъектов. Например, в другом варианте осуществления дозу для вакцинации человека определяют путем экстраполяции данных, полученных в экспериментах на животных, на человека. В другом осуществлении дозу определяют опытным путем.

Способы по изобретению можно использовать для профилактики и/или уменьшения тяжести основных клинических проявлений синдромов, вызванных микробами, например *S. pneumoniae*, включая как инвазивные инфекции (менингит, пневмония и бактериемия), так и неинвазивные инфекции (острый средний отит и синусит).

Введение композиций по изобретению может включать одно или более из следующего: внутримышечную, внутривенную, внутрикожную или подкожную инъекцию; или введение через слизистую оболочку в ротовую/пищеварительную или дыхательную систему или мочеполовые пути. В одном из вариантов осуществления для лечения пневмонии или среднего отита используется интраназальное введение (поскольку носоглоточное носительство пневмококков может быть более эффективно предотвращено, приводя к ослаблению инфекции на самой ранней стадии). В конкретных вариантах осуществления композиции по изобретению вводят пациенту внутримышечно или подкожно.

Все публикации, упомянутые в настоящем описании, включены в виде ссылки для описания и раскрытия методов и материалов, которые могут быть использованы в связи с настоящим изобретением.

Несмотря на приведенное описание различных вариантов осуществления изобретения со ссылкой на прилагаемые чертежи следует понимать, что изобретение не ограничено этими точными вариантами осуществления и что специалист в данной области техники может внести различные изменения и модификации без отступления от объема или сущности изобретения, которые определены в прилагаемой формуле изобретения.

Приведенные ниже примеры иллюстрируют, но не ограничивают изобретение.

Пример 1. Приготовление капсульных полисахаридов *S. Pneumoniae*.

Способы культивирования пневмококков хорошо известны в данной области. См., например, Chase, 1967, *Methods of Immunology and Immunochemistry*, 1:52. Способы получения пневмококковых капсульных полисахаридов также хорошо известны в данной области. Смотри, например, европейский патент № EP 0497524 B1. Процесс, описанный ниже, как правило соответствует методу, описанному в европейском патенте № EP 0497524 B1 и в целом применим ко всем пневмококковым серотипам.

Изоляты пневмококковых штаммов серотипов 6С, 23В и 31 получали из Центров по контролю и профилактике заболеваний (Атланта, Джорджия). Штаммы серотипов 3, 8, 10А, 11А, 12F, 15В, 22F и 33F получали из Университета Пенсильвании (Dr. Robert Austrian). Штаммы серотипов 17F и 19А получали из FDA Office of Biologics (Dr. John Robbins). Серотип 7F получали из Государственного университета штата Нью-Йорк, Медицинского центра штата Нью-Йорк (Dr. Gerald Schiffman). Не перечисленные выше изоляты пневмококковых серотипов получали из Американской коллекции типовых культур (Manassas, VA). При необходимости подтипы дифференцировали на основе реакции Квеллунга с использованием специфической антисыворотки. См., например, патент США № 5847112. Дополнительно выполняли клональное выделение полученных изолятов путем посева последовательно в два этапа на чашках с агаром, состоящим из среды, свободной от животного компонента, содержащей соевый пептон, дрожжевой экстракт и глюкозу без гемина. Для серотипа 7F использованные чашки с агаром также содержали гемин. Клональные изоляты каждого серотипа дополнительно размножали в жидкой культуре, используя среду, не содержащую животных компонентов, содержащую соевый пептон, дрожжевой экстракт, NEPES, хлорид натрия, бикарбонат натрия, фосфат калия, глюкозу и глицерин, чтобы подготовить предварительные маточные банки клеток.

Получение каждого серотипа пневмококкового полисахарида состояло из размножения клеток и периодической ферментации с последующей химической инактивацией перед последующей очисткой. Банк оттаявших клеток каждого серотипа из пробирки размножали, используя встряхиваемую колбу или культуральную бутылку, содержащую предварительно стерилизованную среду для выращивания без животных компонентов, содержащую соевый пептон или ультрафильтрат соевого пептона, дрожжевой экстракт или ультрафильтрат дрожжевого экстракта, NEPES, хлорид натрия, бикарбонат натрия, фосфат калия и глюкозу. Культуру клеток для размножения выращивали в герметичной встряхиваемой колбе или бутылке для минимизации газообмена в условиях контроля температуры и перемешивания. Для серотипов 3, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15В, 17F, 19А, 20, 22F и 33F банки оттаявших клеток из пробирок размножали с помощью ферментера, содержащего те же среды. Во время размножения клеток этих серотипов контролировали температуру, pH, давление и перемешивание. Воздушный поток в поверхностном

слое также контролировали, поскольку барботирование не использовали. После достижения заданной плотности культуры, измеренной по оптической плотности при 600 нм, часть культуры для размножения клеток переносили в производственный ферментер, содержащий предварительно стерилизованную среду для роста без животных компонентов, содержащую соевый пептон или ультрафильтрат соевого пептона, дрожжевой экстракт или ультрафильтрат дрожжевого экстракта, хлорид натрия, фосфат калия и глюкозу. Температуру, pH, давление и перемешивание контролировали. Воздушный поток в поверхностном слое также контролировали, поскольку барботирование не использовали.

Периодическую ферментацию прекращали путем добавления химического инактивирующего агента, фенола, когда практически вся глюкоза была использована. Чистый фенол добавляли до конечной концентрации 0,8-1,2% для инактивации клеток и высвобождения капсульного полисахарида из клеточной стенки. Первичную инактивацию осуществляли в течение определенного времени в ферментере, в котором также контролировали температуру и перемешивание. После первичной инактивации партию переносили в другой сосуд, где ее выдерживали в течение дополнительного определенного времени при контролируемой температуре и перемешивании для полной инактивации. Инактивацию подтверждали либо чашечными методами подсчета колоний, либо проверкой концентрации фенола и установленного времени. Затем инактивированный бульон очищали.

Пример 2. Очистка пневмококковых полисахаридов.

Процесс очистки пневмококковых полисахаридов состоял из нескольких процессов: центрифугирования, глубокой фильтрации, концентрирования/диафильтрации и осаждения. Все процедуры выполняли при комнатной температуре, если не указано иное.

Инактивированный бульон из культур *S. pneumoniae* из ферментера флокулировали с катионным полимером (таким как BPA-1000, TRETOLITE® (Baker Hughes Inc., Хьюстон, Техас), Spectrum 8160, поли(этиленимином) и Millipore pDADMAC). Катионные полимеры связываются с примесью белков, нуклеиновых кислот и клеточного дебриса. После стадии флокуляции и периода созревания флокулированные твердые вещества удаляли с помощью центрифугирования и нескольких стадий глубокой фильтрации. Осветленный бульон концентрировали и подвергали диафильтрации с использованием фильтра MWCO (отсекающего молекулярную массу) от 100 до 500 кДа. Диафильтрацию осуществляли, используя трис,  $MgCl_2$  буфер и натрий-фосфатный буфер. Диафильтрация удаляла остаточную нуклеиновую кислоту и белок.

Удаление других примесей осуществляли повторным осаждением полисахарида в ацетате натрия и феноле с денатурированным спиртом и/или изопропанолом. Во время этапа осаждения фенолом ацетат натрия в натрий-фосфатном буферном растворе и фенол (сжиженные фенолы или твердые фенолы) загружали в диафильтрованный ретентат. Затем выполняли спиртовое фракционирование полисахарида в две стадии. На первой стадии к препарату добавляли спирт с низким процентным содержанием для осаждения клеточного дебриса и других нежелательных примесей, в то время как неочищенный полисахарид оставался в растворе. Примеси удаляли центрифугированием с последующей стадией глубокой фильтрации. Затем полисахарид извлекали из раствора путем добавления в партию дополнительного количества изопропанола или денатурированного спирта. Осажденный осадок полисахарида извлекали центрифугированием, растирали и высушивали в виде порошка и хранили замороженным при  $-70^{\circ}C$ .

Пример 3. Анализ структурной идентичности некоторых пневмококковых серотипов методом ЯМР.

Образцы для ЯМР-анализа готовили путем растворения порошка полисахарида в оксиде дейтерия ( $D_2O$ ), содержащем 0,01% диметилсульфоксида (ДМСО) и 0,01% натриевой соли 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоната- $d_6$  (DSS- $d_6$ ) в концентрации 5 мг порошка на мл раствора. ДМСО был внутренним стандартом, который использовался для количественного анализа, а DSS- $d_6$  использовался для установки шкалы химического сдвига на 0 ppm. Набор данных одномерной ЯМР для протонов получали при  $50^{\circ}C$ , и часть спектра, содержащая аномерные резонансы, затем избирательно записывали в виде координат x, y в файл ASCII для анализа с использованием рабочей книги Microsoft Excel. Затем координаты Y (т.е. спектральный профиль) сравнивали со спектральными профилями капсульных бактериальных полисахаридов в эталонной базе данных. Эталонные профили получали аналогичным образом на отобранных препаратах каждого серотипа, которые затем обозначили как эталонную партию. Парное сравнение выполняли для y-значений образца и эталонных спектров для получения коэффициента корреляции ( $\rho_{x,y}$ ) в виде меры сходства между спектрами. Значение  $>0,95$  для любого из эталонных спектров принимали за положительную идентификацию структуры полисахарида.

На фиг. 1-4 представлены 600 МГц одномерные спектры  $^1H$  ЯМР капсульных полисахаридов серотипов 6С, 15А, де-О-ацетилированного 15В и 35В *S. pneumoniae* соответственно. Области идентичности  $^1H$  ЯМР, используемые для идентификации серотипов 6С, 15А, де-О-ацетилированного 15В и 35В *S. pneumoniae*, представлены на фиг. 5-8 соответственно.

Структура капсульных полисахаридов серотипов де-О-ацетилированного 15В и 15С *S. pneumoniae*.

Исследования иммуногенности выполняли путем введения PCV21 новозеландским белым кроликам (см. пример 43 ниже). В этих исследованиях вместо серотипа 15С в поливалентной композиции использовали де-О-ацетилированный полисахарид серотипа 15В. Для подтверждения того что де-О-

ацелированный полисахарид 15В является эквивалентным полисахариду серотипа 15С, выполняли ЯМР исследования.

Структурные различия между серотипами капсульного полисахарида проявляются в виде различий в химическом сдвиге в спектре ЯМР. Аномерная область (приблизительно от 4,4 до 6,0 ppm) чувствительна к каждому структурному признаку в повторяющемся звене полисахарида. Различия в стереохимии, составе моносахаридов, О-ацелировании и гликозидной связи влияют на химические сдвиги аномерных сигналов, оставляя эту область спектра уникальной для каждого серотипа. Для де-О-ацелированного полисахарида серотипа 15В полный спектр  $^1\text{H}$  ЯМР оказался идентичным  $^1\text{H}$  ЯМР спектру полисахарида серотипа 15С, указывая на то, что повторяющееся звено обоих полисахаридов состоит из одних и тех же моносахаридных заместителей и участков гликозидной связи (см. фиг. 9В-9С и 10В-10С). Также ясно показано, что стадия де-О-ацелирования удаляет О-ацетатную группу, присутствующую в полисахариде 15В, и что О-ацетатные группы по существу не наблюдаются (см. фиг. 10А-10F).

Пример 4. Приготовление конъюгата серотипа 3 конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 380 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,25 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 12 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 2 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 10% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 1,0 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,3. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 1 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1,6 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ .

Таблица 1

Характеристика конъюгата 3, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования моновалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
186/253 кДа	862/1468 кДа	1,16	8,2	<1%	<1%

Пример 5. Приготовление конъюгата серотипа 6С конъюгацией в ДМСО для исследования моновалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в ДМСО. Затем растворенные растворы полисахарида и CRM197 объединяли и конъюгировали, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как рН, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Окисление полисахарида.

Очищенный порошок пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Отфильтрованный растворенный полисахарид концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до до  $22^{\circ}\text{C}$  и доводили рН до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,10 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при  $22^{\circ}\text{C}$ .

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, рН 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при  $2-8^{\circ}\text{C}$ .

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный путем экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. CRM197 готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 2,2 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,4. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида и CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) и конъюгацию выполняли в течение 15 ч при  $22^{\circ}\text{C}$ .

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 3 ч при  $22^{\circ}\text{C}$ . Партию разводили в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно  $4^{\circ}\text{C}$ . Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации рН. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно  $4^{\circ}\text{C}$  против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, рН 7, используя 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при  $4^{\circ}\text{C}$ , используя 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Ретентатную порцию фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, распределяли по аликвотам и замораживали при  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ .

Таблица 2

Характеристика конъюгата 6С, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования моновалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
144/229 кДа	2038/4182 кДа	1,20	9,2	3,1%	5,8%

Пример 6. Приготовление конъюгата серотипа 6С конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в ДМСО. Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Окисление полисахаридов.

Очищенный порошок пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45-микронный фильтр. Отфильтрованный растворенный полисахарид концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением метапериодата натрия 100 мМ. Количество добавленного метапериодата натрия составило 0,10 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей дифильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахаридов с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps /мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 1,9 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,4. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и выполняли конъюгацию в течение 15 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 3 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлорида натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и заморожены при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Характеристика конъюгата 6С, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования моновалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
144/229 кДа	2104/5006 кДа	1,11	8,4	4,9%	2,2%

Приготовление конъюгата серотипа 6А для исследования моновалентного конъюгата, полученного конъюгацией в ДМСО.

Полисахарид растворяли, химически активировали. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в ДМСО. Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли, и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 200 бар/5 проходов. Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,10 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 1,5 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,4. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 15 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 3 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем для нейтрализации pH добавляли калий-фосфатный буфер. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при ≤-60°C.

Характеристика конъюгата 6А, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования моновалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
238/278 кДа	2565/6310 кДа	1,021	9,2	3%	5%

Пример 7. Приготовление конъюгата серотипа 7F конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 150 бар/7 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,24 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 4 ч при 4°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 2,6 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,5. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 4 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 3 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Характеристика конъюгата 7F, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
76/118 кДа	1817/4026 кДа	1,55	6,7	<1%	3,2%

Пример 8. Приготовление конъюгата серотипа 8 конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 600 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,18 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 4 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 4,0 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,5. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 2 ч при 22°C. Цианоборгидрид натрия не добавляли в реакцию конъюгации, поскольку было отмечено, что добавление цианоборгидрида натрия во время реакции конъюгации может привести к необратимому осаждению серотипа 8. Исключение цианоборгидрида натрия из реакции позволяет избежать осаждения без значительного влияния на характеристики конъюгата.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO

ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр (с предварительным фильтрованием через 0,5-микронный фильтр), затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ .

Таблица 5

Характеристика конъюгата серотипа 8, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
110/128 кДа	1479/2196 кДа	1,17	10,3	3,7%	<1%

Пример 9. Приготовление конъюгата серотипа 9N конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как рН, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали 250 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до  $22^{\circ}\text{C}$  и доводили рН до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,16 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 4 ч при  $22^{\circ}\text{C}$ .

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, рН 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при  $2-8^{\circ}\text{C}$ .

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 3,25 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,5. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 1 ч при  $22^{\circ}\text{C}$ .

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 часа при  $22^{\circ}\text{C}$ . Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно  $4^{\circ}\text{C}$ . Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации рН. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно  $4^{\circ}\text{C}$  против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, рН 7, 30 кДа NMWCO через ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при  $4^{\circ}\text{C}$  через 300 кДа NMWCO

ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ .

Таблица 6

Характеристика конъюгата серотипа 9N, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
195/226 кДа	1407/3134 кДа	1,33	10,1	1,9%	<1%

Пример 10. Приготовление конъюгата серотипа 10A конъюгацией в ДМСО для исследования моновалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как рН, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 200 бар/5 проходов затем на уровне 600 бар/5 проходов для достижения целевой молекулярной массы.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до  $22^{\circ}\text{C}$  и доводили рН до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,15 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при  $22^{\circ}\text{C}$ .

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, рН 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при  $2-8^{\circ}\text{C}$ .

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 5,0 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 2,0. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 4 ч при  $22^{\circ}\text{C}$ .

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 ч при  $22^{\circ}\text{C}$ . Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно  $4^{\circ}\text{C}$ . Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации рН. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно  $4^{\circ}\text{C}$  против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ

хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 7

Характеристика конъюгата серотипа 10А, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования моновалентной вакцины

Mn/Mw	Mn/Mw	Ps:Pr	Расход лизина	Свободный	Свободный
окисленного Ps	конъюгата		(мол/мол CRM197)	Ps/общий Ps	белок/общий белок
76/111 кДа	5137/7061 кДа	1,13	10,1	<1%	15%

Пример 11. Приготовление конъюгата серотипа 10А конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 600 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,16 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 4,0 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,75. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 4 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ

хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 8

Характеристика конъюгата серотипа 10А, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
94/130 кДа	1540/3000 кДа	1,54	7,7	8,5%	<1%

Пример 12. Приготовление конъюгата серотипа 11А конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как рН, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Размер растворенного полисахарида уменьшали кислотным гидролизом, добавляя уксусную кислоту до 200 мМ, инкубируя при 92°C в течение 75 мин, затем нейтрализуя путем добавления холодного калий-фосфатного буфера, рН 7, до 400 мМ.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили рН до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составлял 0,13 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, рН 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 3,5 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,5. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) и конъюгацию проводили в течение 4 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации рН. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ

хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 9

Характеристика конъюгата серотипа 11А, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

Мп/Mw окисленного Ps	Мп/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
63/96 кДа	1584/2804 кДа	0,89	7,4	2,2%	2,8%

Пример 13. Приготовление конъюгата серотипа 12F конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как рН, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Размер растворенного полисахарида уменьшали кислотным гидролизом, добавляя уксусную кислоту до 200 мМ, инкубируя при 90°C в течение 45 мин, затем нейтрализуя путем добавления холодного калий-фосфатного буфера, рН 7, до 400 мМ.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили рН до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,26 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, рН 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Пс/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Рг/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 3,0 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,5. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 4 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 3 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации рН. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ

хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 10

Характеристика конъюгата серотипа 12F, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
54/73 кДа	1766/3119 кДа	1,20	9,6	1,3%	1,5%

Пример 14.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 200 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 1,75 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 20 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 6,0 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 2.0. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 2,5 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO

ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ .

Таблица 11

Характеристика конъюгата серотипа 15А, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
158/200 кДа	6949/9235 кДа	1,05	9,7	10%	5,0%

Пример 15. Приготовление конъюгата серотипа 15А конъюгацией в водной среде для исследования перекрестной защиты 15А/В/С.

Полисахарид растворяли, уменьшали размер, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Затем очищенный CRM197 конъюгировали с активированным полисахаридом, используя хлорид никеля в водной реакционной смеси, и полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как рН, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 200 бар/5 проходов для достижения целевой молекулярной массы. Затем полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до  $22^{\circ}\text{C}$  и доводили рН до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,45 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида. Реакция окисления длилась 20 ч при  $22^{\circ}\text{C}$ . Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, рН 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Дальнейшую активацию получали путем нагревания ультрафильтрованного продукта до  $22^{\circ}\text{C}$  и доведением рН до 5. Активацию выполняли путем добавления 100 мМ раствора метапериодата натрия с концентрацией 2,0 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 20 ч при  $22^{\circ}\text{C}$ . Второй активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, рН 6,4 через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при  $2-8^{\circ}\text{C}$ .

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Раствор окисленного полисахарида смешивали с водой и 1,5 М фосфатом калия, рН 6,0. РН буфера выбирали для улучшения стабильности активированного полисахарида во время реакции конъюгации. Очищенный CRM197, полученным в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), фильтровали через 0,2-микронный фильтр и объединяли с забуференным раствором полисахарида при массовом отношении полисахарида к CRM197, равном 0,6. Массовое отношение полисахарида и фосфата составляли 9,75 г/л и 100 мМ соответственно. Концентрацию полисахарида выбирали для контроля размера получаемого конъюгата. Хлорид никеля добавляли до концентрации примерно 2 мМ, используя 100 мМ раствор хлорида никеля. Добавляли цианоборгидрид натрия (2 моля на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакцию конъюгации проводили в течение 148 ч при  $10^{\circ}\text{C}$ , чтобы максимизировать потребление полисахарида и белка.

Восстановление боргидридом натрия.

После реакции конъюгации партию разбавляли до концентрации полисахарида приблизительно 3,0 г/л, охлаждали до  $2-8^{\circ}\text{C}$  и фильтровали через 1,2 мкм фильтр. Партию подвергали диафильтрации против 100 мМ фосфата калия, рН 7,0, при  $2-8^{\circ}\text{C}$  через 100 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Партию, извлеченную из ретентата, затем разбавляли до концентрации приблизительно 2,0 г полисахарида/л, и доводили рН путем добавления 1,2 М бикарбоната натрия, рН 9,4. Добавляли боргидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида). Затем добавляли 1,5 М фосфат калия, рН 6,0.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. В партию ретентата добавляли полисорбат 20 до концентрации 0,05% (мас./об.), затем партию фильтровали через 0,2-микронный фильтр (с предварительным фильтрованием через 0,5-микронный фильтр).

Партию доводили до концентрации полисахарида 1,0 г/л путем добавления 10 мМ L-гистидинового буфера с 150 мМ хлорида натрия, рН 7,0, в присутствии 0,03% (мас./об.) полисорбата 20. Партию аликвотировали и и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 12

Характеристика конъюгата серотипа 15А, полученного конъюгацией в водной среде, для исследования перекрестной защиты 15А/В/С

Мп/Мw окисленного	Мп/Мw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий	Свободный белок/общий
Ps				Ps	белок
118/154 кДа	465/695 кДа	0,99	4,5	9,6%	<1%

Пример 16. Приготовление конъюгата серотипа 3 конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как рН, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 200 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили рН до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 1,75 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 20 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, рН 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО, которые предварительно нагревали до 34°C. В раствор полисахарида добавляли хлорид натрия до концентрации 50 мМ. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 5,0 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 2,0. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 2 ч при 34°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-

фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 13

Характеристика конъюгата серотипа 15А, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
214/231 кДа	1628/3518 кДа	1,57	7,3	17%	7,8%

Пример 17. Приготовление конъюгата серотипа 15В конъюгацией в ДМСО для исследования перекрестной защиты 15А/В/С.

Полисахарид растворяли, уменьшали размер, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и растворяли в ДМСО. Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполиняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 300 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,20 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 4 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 3,0 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 2,0. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 5 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 часа при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-

фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 14

Характеристика конъюгата серотипа 15В, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования перекрестной защиты 15А/В/С

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
203/255 кДа	2329/3881 кДа	1,67	7,9	3,6%	4,4%

Пример 18. Приготовление конъюгата серотипа 15С конъюгацией в ДМСО для исследования моно-валентной вакцины и исследования перекрестной защиты 15А/В/С.

Полисахарид, полученный из серотипа 15В *Streptococcus pneumoniae*, растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, подвергали мягкому гидролизу в щелочной среде для высвобождения О-ацетильных групп, химически активировали и меняли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли, и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера полисахаридов, гидролиз в щелочной среде и окисление.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 300 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Раствор полисахарида нагревали до 60°C и добавляли натрий-бикарбонатный буфер, pH 9, до конечной концентрации 50 мМ. Партию инкубировали при перемешивании в течение 13 ч при 60°C для высвобождения О-ацетильных групп. Калий-фосфатный буфер, pH 6, добавляли до конечной концентрации 136 мМ для нейтрализации pH и раствор охлаждали до температуры окружающей среды. Затем раствор концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,20 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pt/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида

рида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 3,0 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 2,0. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 4 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретената фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 15

Характеристика конъюгата серотипа 15С, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования моновалентной вакцины и исследования перекрестной защиты 15А/В/С

О-ацетил/Ps	Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps: Pt	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
Не обнаружен	182/246 кДа	1962/4019 кДа	1,3 1	4,8	3,8%	13%

Пример 19. Приготовление конъюгата серотипа 15С конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера, гидролиз в щелочных условиях и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps серотипа 15В растворяли в воде и фильтровали через 0,45-микронный фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 300 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Раствор полисахарида нагревали до 60°C, и добавляли натрий-бикарбонатный буфер, pH 9, до конечной концентрации 50 мМ. Партию инкубировали при перемешивании в течение 13 ч при 60°C для выщелачивания О-ацетильной группы. Добавляли калий-фосфатный буфер, pH 6, до конечной концентрации 136 мМ для нейтрализации pH, и раствор охлаждали до температуры окружающей среды. Затем раствор сконцентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,2 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 1,0 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,3. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 1 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации рН. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 16

Характеристика конъюгата серотипа 15С, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

О-ацетил/Ps	Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
Не обнаружен	182/246 кДа	1540/3230 кДа	1,34	6,6	9,2%	5,7%

Пример 20. Приготовление конъюгата серотипа 16F конъюгацией в водной среде для исследования моновалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, уменьшали размер, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Затем очищенный CRM197 конъюгировали с активированным полисахаридом, используя хлорид никеля в водной реакционной смеси, и полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как рН, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 200 бар/5 проходов затем 500 бар/5 проходов для достижения целевой молекулярной массы. Затем полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили рН до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,15 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль

повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, рН 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Раствор окисленного полисахарида смешивали с водой и 1,5 М фосфата калия, рН 7,0. Выбранная величина рН буфера должна была улучшить стабильность активированного полисахарида во время реакции конъюгации. Очищенный CRM197, полученным в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), фильтровали через 0,2-микронный фильтр и объединяли с забуференным раствором полисахарида при массовом отношении полисахарида к CRM197, равном 0,7. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида и CRM197 в полученном конъюгате. Концентрации полисахарида и фосфатов составляли 7,5 г/л и 100 мМ соответственно. Концентрацию полисахарида выбирали для контроля размера получаемого конъюгата. Затем раствор фильтровали через 0,2-микронный фильтр. Хлорид никеля добавляли до концентрации примерно 2 мМ, используя 100 мМ раствор хлорида никеля. Добавляли цианоборгидрид натрия (2 моля на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакцию конъюгации проводили в течение 122 ч при 22°C, чтобы максимизировать потребление полисахарида и белка.

Восстановление боргидридом натрия.

После реакции конъюгации партию разбавляли до концентрации полисахарида приблизительно 3,0 г/л, охлаждали до 2-8°C и фильтровали через 1,2 мкм фильтр. Партию подвергали диафильтрации против 100 мМ фосфата калия, рН 7,0, при 2-8°C через 100 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Партию, извлеченную из ретентата, затем разбавляли до концентрации приблизительно 2,0 г полисахарида/л, и доводили рН путем добавления 1,2 М бикарбоната натрия, рН 9,4. Добавляли боргидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида). Затем добавляли 1,5 М фосфат калия, рН 6,0.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. В партию ретентата добавляли полисорбат 20 до концентрации 0,05% (мас./об.), затем партию фильтровали через 0,2-микронный фильтр (с предварительным фильтрованием через 0,5-микронный фильтр).

Партию доводили до концентрации полисахарида 1,0 г/л путем добавления 10 мМ L-гистидинового буфера с 150 мМ хлорида натрия, рН 7,0, в присутствии 0,03% (мас./об.) полисорбата 20. Партию аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 17

Характеристика конъюгата серотипа 16F, полученного конъюгацией в водной среде, для исследования моновалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
90/139 кДа	1860/5539 кДа	1,10	3,3	7,0%	<1%

Пример 21. Приготовление конъюгата серотипа 16F конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как рН, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 1000 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили рН до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добав-

ленного метапериодата натрия составляло 0,15 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, рН 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pt/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 2,0 г Ps/L г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,5. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 2 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации рН. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 18

Характеристика конъюгата серотипа 16F, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

Мп/Mw окисленного Ps	Мп/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
91/177 кДа	2075/3966 кДа	1,29	11,0	<1%	<1%

Пример 22. Приготовление конъюгата серотипа 17F конъюгацией в ДМСО для исследования моновалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, довели размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как рН, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 200 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и довели рН до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добав-

ленного метапериодата натрия составляло 0,11 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, рН 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pt/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 2,0 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,5. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 2 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации рН. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, рН 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$

Таблица 19

Характеристика конъюгата серотипа 17F, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования моновалентной вакцины

Мп/Mw окисленного	Мп/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий	Свободный белок/общий
Ps			CRM197)	Ps	белок
179/216 кДа	2630/4632 кДа	1,20	8,0	1,9%	4,5%

Пример 23. Приготовление конъюгата серотипа 17F конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как рН, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 200 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили рН до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добав-

ленного метапериодата натрия составляло 0,11 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pt/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 2,1 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,3. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 2 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 20

Характеристика конъюгата серотипа 17F, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pt	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
150/212 кДа	2650/4110 кДа	1,10	7,7	2,8%	1,5%

Пример 24. Приготовление конъюгата серотипа 19A конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 380 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добав-

ленного метапериодата натрия составляло 0,26 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 20 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pt/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 3,8 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,33. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 1,5 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 3 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 21

Характеристика конъюгата серотипа 19A, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

Мп/Mw окисленного Ps	Мп/Mw конъюгата	Ps:Pt	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
96/186 кДа	1714/3585 кДа	1,22	9,1	7,0%	1,4%

Пример 25. Приготовление конъюгата серотипа 20A конъюгацией в ДМСО исследования моновалентной вакцины.

Полисахарид, ранее определенный как серотип 20A (Calix et al., *Biochemical, Genetic, and Serological Characterization of Two Capsule Subtypes among Streptococcus pneumoniae Serotype 20 Strains*, *J. Biol. Chem.*, 287(33):27885-27894 (2012)), растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 200 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного

буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,11 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 2,0 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,5. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) и конъюгацию проводили в течение 6 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 22

Характеристика конъюгата серотипа 20А, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования моновалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
165/215 кДа	5159/7778 кДа	1,17	6,1	<1%	6,5%

Пример 26. Приготовление конъюгата серотипа 20А конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, довели размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 220 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и довели pH до 5 с помощью натрий-ацетатного

буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,16 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лيوфилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 1,4 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,5. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 4 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 часа при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 23

Характеристика конъюгата серотипа 20A, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
178/215 кДа	2478/3863 кДа	1,10	8,3	1,0%	1,0%

Пример 27. Приготовление конъюгата серотипа 22F конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, довели размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 400 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и довели pH до 5 с помощью натрий-ацетатного

буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,12 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 часа при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 1,8 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,3. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 1 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 24

Характеристика конъюгата серотипа 22F, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

Мп/Mw окисленного Ps	Мп/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
170/196 кДа	1800/3970 кДа	1,13	7,0	<1%	1,1%

Пример 28. Приготовление конъюгата серотипа 23A конъюгацией в ДМСО для исследования моновалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, довели размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Размер растворенного полисахарида уменьшали с помощью кислотного гидролиза путем добавления уксусной кислоты до 200 мМ, инкубации при 90°C в течение 1,5 ч, затем нейтрализации путем добавления холодного калий-фосфатного буфера, pH 7, до 400 мМ.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и довели pH до 5 с помощью натрий-ацетатного

буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,20 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. В раствор полисахарида добавляли хлорид натрия до концентрации 50 мМ. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 3,0 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,5. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 2 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 3 часов при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 25

Характеристика конъюгата серотипа 23А, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования моновалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
70/97 кДа	2183/3837 кДа	1,20	11,8	<1%	<1%

Пример 29. Приготовление конъюгата серотипа 23А конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, довели размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Размер растворенного полисахарида уменьшали с помощью кислотного гидролиза путем добавления уксусной кислоты до 200 мМ, инкубации при 90°C в течение 1,5 ч, затем нейтрализации путем добавления холодного калий-фосфата буфера, pH 7, до 400 мМ.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,20 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 3,5 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,5. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 2 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 часа при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 26

Характеристика конъюгата серотипа 23A, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
116/175 кДа	2156/4933 кДа	1,12	6,3	3,3%	2,1%

Пример 30. Приготовление конъюгата серотипа 23B конъюгацией в ДМСО для исследования моновалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 400 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,10 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. В раствор полисахарида добавляли хлорид натрия до конечной концентрации 50 мМ. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 5,0 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,5. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 2 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 часа при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 27

Характеристика конъюгата серотипа 23В, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования моновалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
155/179 кДа	1322/3299 кДа	1,28	6,2	13%	5,1%

Пример 31. Приготовление конъюгата серотипа 23В конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддерживая на уровне 400 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды

через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,13 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 5,0 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,5. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 4 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 28

Характеристика конъюгата серотипа 23В, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
172/197 кДа	1076/2514 кДа	1,26	7,4	12%	3,2%

Пример 32. Приготовление конъюгата серотипа 24F конъюгацией в ДМСО для исследования моновалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Размер растворенного полисахарида уменьшали с помощью кислотного гидролиза путем добавления уксусной кислоты до 200 мМ, инкубации при 92°C в течение 50 мин, затем нейтрализации путем добавления холодного калий-фосфатного буфера, pH 7, до 400 мМ.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды

через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,18 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 2 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 10% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. В раствор полисахарида добавляли хлорид натрия до конечной концентрации 50 мМ. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 1,5 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,5. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 2 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 29

Характеристика конъюгата серотипа 24F, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования моновалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
56/100 кДа	2233/4875 кДа	0,94	7,3	4,4%	1,4%

Пример 33. Приготовление конъюгата серотипа 31 конъюгацией в ДМСО для исследования моновалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Размер растворенного полисахарида уменьшали с помощью кислотного гидролиза путем добавления уксусной кислоты до 200 мМ, инкубацией при 90°C в течение 30 мин, затем нейтрализации путем добавления холодного калий-фосфатного буфера, pH 7, до 400 мМ.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,16 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно.

Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 4,0 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,5. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 1 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 часа при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 30

Характеристика конъюгата серотипа 31, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования моновалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
96/119 кДа	1818/2999 кДа	1,15	9,5	<1%	<1%

Пример 34. Приготовление конъюгата серотипа 3 конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддер-

живая на уровне 400 бар/5 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,12 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 3,5 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,5. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 1 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 часа при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 31

Характеристика конъюгата серотипа 31, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
149/186 кДа	2354/5971 кДа	1,26	8,9	<1%	1,8%

Пример 35. Приготовление конъюгата серотипа 33F конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид гомогенизировали для уменьшения молекулярной массы Ps. Давление при гомогенизации и количество проходов через гомогенизатор контролировали, поддер-

живая на уровне 350 бар/4 проходов.

Полисахарид уменьшенного размера концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,12 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 1,8 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,75. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 4 ч при 22°C.

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 32

Характеристика конъюгата серотипа 33F, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
186/220 кДа	1630/2470 кДа	1,28	8,4	1,3%	5,4%

Пример 36. Приготовление конъюгата серотипа 35B конъюгацией в ДМСО для исследования моновалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,05 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pr/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 10 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 1,3. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 2,5 ч при 22°C. Во время инкубации в реакции конъюгации боргидрид натрия добавляли два раза (0,025 моля на повторяющееся звено полисахарида).

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1,5 ч при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 33

Характеристика конъюгата серотипа 35В, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования моновалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
48/82 кДа	5494/7385 кДа	1,26	4,5	1,8%	11%

Пример 37. Приготовление конъюгата серотипа 35В конъюгацией в ДМСО для исследования поливалентной вакцины.

Полисахарид растворяли, доводили размер до целевой молекулярной массы, химически активировали и заменяли буфер ультрафильтрацией. Активированный полисахарид и очищенный CRM197 лиофилизировали отдельно и повторно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Затем растворы повторно растворенных полисахарида и CRM197 объединяли и выполняли конъюгацию, как описано ниже. Полученный конъюгат очищали ультрафильтрацией перед окончательной фильтрацией через 0,2-микронный фильтр. Несколько параметров процесса на каждой стадии, таких как pH, температура, концентрация и время, контролировали для получения конъюгатов с требуемыми характеристиками.

Уменьшение размера и окисление полисахаридов.

Порошок очищенного пневмококкового капсульного Ps растворяли в воде и фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Растворенный полисахарид концентрировали и подвергали диафильтрации против воды через 10 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Затем раствор полисахарида нагревали до 22°C и доводили pH до 5 с помощью натрий-ацетатного буфера, чтобы минимизировать уменьшение размера полисахарида вследствие активации. Активацию

полисахарида инициировали добавлением 100 мМ раствора метапериодата натрия. Количество добавленного метапериодата натрия составляло 0,05 моля метапериодата натрия на моль повторяющегося звена полисахарида для достижения целевого уровня активации полисахарида (молей альдегида на моль повторяющегося звена полисахарида). Реакция окисления длилась 2 ч при 22°C.

Активированный продукт подвергали диафильтрации против 10 мМ фосфата калия, pH 6,4, с последующей диафильтрацией против воды через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком. Ультрафильтрацию выполняли при 2-8°C.

Конъюгация полисахарида с CRM197.

Очищенный CRM197, полученный в результате экспрессии в *Pseudomonas fluorescens*, как описано ранее (WO 2012/173876 A1), подвергали диафильтрации против 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком и фильтровали через 0,2-микронный фильтр.

Активированные полисахариды готовили для лиофилизации в концентрации 6 мг Ps/мл с концентрацией сахарозы 5% мас./об. Готовили состав CRM197 для лиофилизации в концентрации 6 мг Pt/мл с концентрацией сахарозы 1% мас./об.

Приготовленные растворы Ps и CRM197 лиофилизировали отдельно. Лиофилизированные материалы Ps и CRM197 повторно растворяли по отдельности в равных объемах ДМСО. Растворы полисахарида и CRM197 смешивали до достижения концентрации полисахарида 5,25 г Ps/л и массового отношения полисахарида к CRM197 3,5. Массовое отношение выбирали для контроля соотношения полисахарида к CRM197 в полученном конъюгате. Добавляли цианоборгидрид натрия (1 моль на моль повторяющегося звена полисахарида), и конъюгацию проводили в течение 3 ч при 22°C. Во время инкубации в реакции конъюгации боргидрид натрия добавляли два раза (0,0375 моля на повторяющееся звено полисахарида).

Восстановление боргидридом натрия.

Боргидрид натрия (2 моль на моль повторяющегося звена полисахарида) добавляли после реакции конъюгации и инкубировали в течение 1 часа при 22°C. Партию разбавляли в 150 мМ хлориде натрия с приблизительно 0,025% (мас./об.) полисорбатом 20 при приблизительно 4°C. Затем добавляли калий-фосфатный буфер для нейтрализации pH. Партию концентрировали и подвергали диафильтрации при приблизительно 4°C против 150 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата калия, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Окончательная фильтрация и хранение продукта.

Затем партию концентрировали и подвергали диафильтрации против 10 мМ гистидина в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20 при 4°C через 300 кДа NMWCO ультрафильтрационную мембрану с тангенциальным потоком.

Партию ретентата фильтровали через 0,2-микронный фильтр, затем разбавляли 10 мМ гистидином в 150 мМ хлориде натрия, pH 7,0, в присутствии 0,015% (мас./об.) полисорбата 20, аликвотировали и замораживали при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Таблица 34

Характеристика конъюгата серотипа 35В, полученного конъюгацией в ДМСО, для исследования поливалентной вакцины

Mn/Mw окисленного Ps	Mn/Mw конъюгата	Ps:Pr	Расход лизина (мол/мол CRM197)	Свободный Ps/общий Ps	Свободный белок/общий белок
48/82 кДа	1287/2585 кДа	2,1	6,9	7,8%	4,6%

Некоторые методы конъюгации в водной среде не были описаны для всех серотипов, используемых в примерах 38-51. Для методов конъюгации в водной среде, которые не раскрыты в настоящей заявке, аналогичные методы можно найти в WO 2018/156491.

Пример 38. Состав пневмококковых конъюгатных вакцин.

Индивидуальные пневмококковые полисахарид-белковые конъюгаты, приготовленные с использованием различных химий, как описано в выше приведенных примерах использовали для получения составов 1-, 7-, 8-, 14-, 15-, 16-, 21- и 31-валентных пневмококковых конъюгатных вакцин, обозначенных PCV1, PCV7, PCV8, PCV14, PCV15, PCV16, PCV21 и PCV31 соответственно.

Вакцинный лекарственный продукт PCV1 состоял из серотипа 3 конъюгированного по механизму восстановительного аминирования либо в протонном (водном) растворителе, либо апротонном (ДМСО) растворителе, и был приготовлен в составе с 20 мМ L-гистидином, pH 5,8, 150 мМ NaCl и 0,1% (мас./об.) PS-20 с целевой конечной концентрацией в вакцине 84 мкг/мл (мас./об.) пневмококкового полисахарида (PnPs).

Вакцинный лекарственный продукт PCV7 состоял из 3, 8, 9N, 10A, 11A, 15A и 19A, конъюгированных по механизму восстановительного аминирования либо в протонном (водном) растворителе, либо в апротонном (например, ДМСО) растворителе и был приготовлен в составе с 20 мМ L-гистидином,

pH 5,8, 150 mM NaCl и 0,1% (мас./об.) PS-20. Каждый полисахарид-белковый конъюгат в PCV7 использовали в концентрации 12 мкг/мл (мас./об.) пневмококкового полисахарида (PnPs) с получением целевой конечной концентрации в вакцине 84 мкг/мл PnPs.

Вакцинный лекарственный продукт PCV8 состоял из серотипов 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, конъюгированных по механизму восстановительного аминирования либо в апротонном растворителе (например, ДМСО), и был приготовлен в составе с 20 mM L-гистидином, pH 5,8, 150 mM NaCl и 0,2% (мас./об.) PS-20. Каждый полисахарид-белковый конъюгат в PCV8 использовали в концентрации 4 мкг/мл (мас./об.) пневмококкового полисахарида (PnPs) с получением целевой конечной концентрации в вакцине 32 мкг/мл PnPs.

Вакцинный лекарственный продукт PCV14 состоял из серотипов 3, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F и 33F, конъюгированных по механизму восстановительного аминирования либо в протонном (водном) растворителе, либо апротонном (например, ДМСО) растворителе и был приготовлен в составе с 20 mM L-гистидином, pH 5,8, 150 mM NaCl и 0,1% (мас./об.) PS-20. Каждый полисахарид-белковый конъюгат в PCV14 использовали в концентрации 6 мкг/мл (мас./об.) пневмококкового полисахарида (PnPs) с получением целевой конечной концентрации в вакцине 84 мкг/мл PnPs.

Вакцинный лекарственный препарат PCV15 состоял из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, конъюгированных в протонном (водном) растворителе и был приготовлен в составе с 20 mM L-гистидином, pH 5,8, 150 mM NaCl и 0,2% (мас./об.) PS-20. Каждый полисахарид-белковый конъюгат использовали в концентрации 4 мкг/мл (мас./об.) пневмококкового полисахарида (PnPs), за исключением 6B, который использовали в концентрации 8 мкг/мл, с получением целевой конечной концентрации в вакцине 64 мкг/мл PnPs.

Вакцинный лекарственный препарат PCV16 состоял из серотипов 6C, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 20A, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, конъюгированных по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе (например, ДМСО) и был приготовлен в составе с 20 mM L-гистидином, pH 5,8, 150 mM NaCl и 0,2% (мас./об.) PS-20. Каждый полисахарид-белковый конъюгат использовали в концентрации 4 или 8 мкг/мл (мас./об.) пневмококкового полисахарида (PnPs) с получением целевой конечной концентрации в вакцине 64 мкг/мл или 128 мкг/мл PnPs.

Вакцинный лекарственный препарат PCV21 состоял из серотипов 3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, конъюгированных по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе (например, ДМСО) и был приготовлен в составе с 20 mM L-гистидином, pH 5,8, 150 mM NaCl и PS-20 различной концентрации, как определено в каждом примере. Каждый полисахарид-белковый конъюгат использовали в концентрации 4 мкг/мл (мас./об.) или 8 мкг/мл (мас./об.) пневмококкового полисахарида (PnPs) с получением целевой конечной концентрации в вакцине 84 или 168 мкг/мл PnPs. В некоторых примерах PCV21 содержала 250 мкг [Al]/мл в виде фосфата алюминия.

Вакцинный лекарственный препарат PCV31 состоял из серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9B, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F и 35B, конъюгированных по механизму восстановительного аминирования либо в протонном (водном) растворителе, либо апротонном растворителе (например, ДМСО) и был приготовлен в составе с 20 mM L-гистидином, pH 5,8 150 mM NaCl и 0,2% PS-20. Каждый полисахарид-белковый конъюгат использовали в концентрации 4 мкг/мл (мас./об.) пневмококкового полисахарида (PnPs), за исключением 6B, который использовали в концентрации 8 мкг/мл PnPs, с получением целевой конечной концентрации в вакцине 128 мкг/мл PnPs. В некоторых примерах PCV31 содержал 250 мкг [Al]/мл в виде фосфата алюминия.

Дополнительные составы лекарственных препаратов моновалентных PCV получали с использованием конъюгата пневмококкового полисахарида серотипа 6A, 6B, 6C, 10A, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 20A, 23A, 23B, 24F, 31 или 35B с белком. Дополнительные подробности описаны в конкретных примерах для этих составов.

Для приготовления состава лекарственного препарата PCV требуемые объемы исходных конъюгатов, необходимые для получения указанной конечной концентрации (мас./об.) пневмококкового полисахарида (также называемого PnPs), рассчитывали, исходя из объема партии и концентрации исходного полисахарида.

Процесс приготовления состава состоял из приготовления исходной смеси конъюгатов с 1X-4X конечной концентрацией смесей PnPs в 10-80 mM гистидине, 0,0-0,8% (мас./об.) PS-20 и 150 mM хлорида натрия, pH 5,8.

Гистидин pH 5,8, PS-20 (если использовался) и 150 mM раствора хлорида натрия готовили и добавляли в сосуд для приготовления препарата. Отдельные пневмококковые полисахарид-белковые конъюгаты, хранящиеся в замороженном виде, оттаивали при 2-8°C и затем добавляли в сосуд для приготовления препарата. Во время добавления полисахарид-белкового конъюгата в буфер для приготовления состава (смеси конъюгатов) содержимое сосуда перемешивали до получения гомогенной смеси с помощью магнитного стержня или магнитного колеса. После внесения всех добавок и перемешивания раствора смесь конъюгатов пропускали через стерилизующие фильтры и собирали в сосуд с адьювантом на основе фосфата алюминия или без него. В некоторых случаях стерилизующие фильтры чередовали с 150 mM хло-

рида натрия для доведения партии до целевой концентрации.

Композиции заливали в пластиковые шприцы, стеклянные шприцы или флаконы.

Пример 39. Оценка стабильности пневмококковых конъюгатных вакцин.

PCV16 (128 мкг/мл PnPs) или два лекарственных препарата пневмококковой конъюгатной вакцины PCV21 (PnPs 84 или 168 мкг/мл) заливали в шприцы или флаконы. Полисахарид-белковые конъюгаты получали по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе (например, ДМСО) и готовили в составе с 20 мМ L-гистидина, pH 5,8, 150 мМ NaCl и 0,2% (мас./об.) PS-20. Эти лекарственные препараты выдерживали при 25 или 37°C сроком до четырех недель и при 4°C сроком до двенадцати недель. В некоторых случаях шприцы помещали на платформу с горизонтальным вращением и встряхивали в течение до 18 ч после хранения в течение 1 недели при 4, 25 или 37°C. Таким образом имитировали стресс, возникающий при транспортировке и обработке, который может сопровождать производство и распределение лекарственного препарата. Для оценки стабильности лекарственных препаратов PCV16 или PCV21 использовали методы HPSEC UV/MALS/RI: высокоэффективную эксклюзионную хроматографию (HPSEC) с двумя колонками Shodex (803 и 806), соединенными вместе последовательно, и УФ-детектирование многоугольного рассеяния света (MALS) и показателя преломления (RI) для измерения концентрации и молярной массы составов лекарственных препаратов PCV при хранении. Концентрацию рассчитывали для каждого временного интервала по ширине пика и затем интегрировали по всем интервалам для получения конечного значения концентрации. Рассеяние света пропорционально произведению молекулярной массы и концентрации аналита. Молярную массу или молекулярную массу в каждом интервале рассчитывали из сигналов детектора. Средневзвешенную ( $M_w$ ) или среднечисленную ( $M_n$ ) молекулярную массу рассчитывается по всем интервалам для пика и записывали в виде средней молекулярной массы.

Хранение может привести к повреждению белка и/или углеводов в конъюгатной вакцине. Углеводные антигены, которые содержат фосфодиэфирные связи в основной цепи или другие нестабильные элементы в повторяющемся звене полисахарида, во время хранения в течение длительного времени и под воздействием температуры могут подвергаться деполимеризации через гидролиз. Кроме того, во время хранения и под воздействием физических нагрузок белок-носитель или углевод, который используется в конъюгатной вакцине, могут агрегировать.

Как показано на фиг. 11, лекарственные препараты PCV16 и PCV21 были стабильными в течение 4 недель при 25°C и 37°C и вплоть до 12 недель при 4°C независимо от концентрации полисахарида. Более того, при горизонтальном перемешивании после термического стресса лекарственные препараты PCV16 и PCV21 оказались стабильными. Потери количества антигена при этих термических и физических нагрузках из-за неспецифической адсорбции на стенках контейнеров или сосудов не наблюдалось. Кроме того, не наблюдалось агрегации лекарственного продукта, которая могла бы повлиять на его эффективность на колонке (например, необратимое связывание с колонкой или невозможность вхождения/выхода из разделительных колонок) при оценке общей дозы вакцины (фиг. 12).

HPSEC UV/MALS/RI использовали для измерения молекулярной массы полисахарид-белкового конъюгата. Если полисахарид-белковые конъюгаты в лекарственном продукте разлагаются или деполимеризуются, уменьшение молекулярной массы будет очевидным, и, если происходит агрегация лекарственного продукта, произойдет увеличение молекулярной массы. Это измерение позволяет получить дополнительную характеристику качества вакцинного лекарственного продукта или промежуточного продукта. Как показано на фиг. 13, лекарственные препараты PCV16 и PCV21, содержащие лекарственные вещества, каждое из которых получали по схеме восстановительного аминирования в апротонном растворителе (например, ДМСО), были устойчивы к деполимеризации или химической дегградации углевода и устойчивы к агрегации белка в составе лекарственного продукта. Это указывает на то, что лекарственные препараты PCV16 и PCV21, в которых используются полисахарид-белковые конъюгаты, полученные по схеме восстановительного аминирования в апротонном растворителе, таком как ДМСО, являются стабильными при повышенной температуре и физических нагрузках. Составы демонстрируют высокую стабильность как в количественном, так и качественном отношении. Состав не теряет общую дозу из-за неспецифической адсорбции на боковой поверхности контейнеров или других поверхностях, и состав не деградирует и не агрегирует, о чем свидетельствует стабильная молекулярная масса вакцинного лекарственного продукта (средневесовая молекулярная масса ( $M_w$ ) и среднечисленная молекулярная масса ( $M_n$ )).

Пример 40. Влияние химии конъюгации на стабильность пневмококковой конъюгатной вакцины.

Для приготовления 15- и 16-валентных пневмококковых конъюгатных вакцин, обозначенных PCV15 и PCV16, с концентрацией 64 мкг/мл использовали отдельные пневмококковые полисахарид-белковые конъюгаты, полученные с использованием разных химических сред, как описано выше в примерах. Вакцинный лекарственный продукт PCV15 содержал серотипы 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F и 33F, конъюгированные по механизму восстановительного аминирования в протонном растворителе (все водные) и был приготовлен в 20 мМ L-гистидине, pH 5,8, 150 мМ NaCl и 0,2% мас./об. PS-20 (см. пример 38). Лекарственный продукт PCV16 содержал серотипы 6C, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 20A, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, конъюгированные по механизму восстановитель-

ного аминирования в апротонном растворителе (например, все ДМСО) и был приготовлен в 20 мМ L-гистидине, pH 5,8, 150 мМ NaCl и 0,2% (мас./об.) PS-20 (см. пример 38). Каждый полисахарид-белковый конъюгат использовали в концентрации 4 мкг/мл (мас./об.) пневмококкового полисахарида (PnPs) за исключением 6В в PCV15, который использовали в концентрации при 8 мкг/мл, с получением в каждой вакцине конечной концентрации 64 мкг/мл PnPs.

Заполненные вакциной контейнеры помещали при 4°C или 37°C на срок до 1 недели. Флуоресцентную спектроскопию с внутренним белком (IPFS) использовали для оценки стабильности белка-носителя, CRM197, конъюгированного с пневмококковым полисахаридом, в композициях PCV15 или PCV16 при хранении в течение до 1 недели при 4°C и 37°C. Спектры флуоресцентного излучения (Em 290-400 нм) неразбавленных образцов собирали с помощью спектрофлуориметра Jasco FP-6500 при комнатной температуре в кварцевой кювете с длиной пути 1 см. Использовали длину волны возбуждения 280 нм со скоростью сканирования 100 нм/мин и полосой пропускания возбуждения и излучения 3 нм.

Как показано на фиг. 14, состав лекарственного средства, содержащий лекарственные вещества, приготовленные по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе (например, все в ДМСО), показал превосходную физическую и химическую стабильность по сравнению с вакциной, в которой использовались лекарственные вещества, приготовленные в протонном растворителе во время конъюгации по механизму восстановительного аминирования (все водные конъюгаты). Интенсивность флуоресценции лекарственного продукта PCV15 при концентрации 64 мкг/мл PnPs, приготовленного по механизму восстановительного аминирования в протонном растворителе (полностью водном) в процессе конъюгации, снизилась всего за 16 ч при 37°C, а максимальное излучение вакцины сместилась с 332 нм в сторону 338 нм. Вакцинный лекарственный продукт PCV16 при концентрации 64 мкг/мл PnPs, в котором использовались лекарственные вещества, приготовленные по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе (например, все в ДМСО), не показал изменения интенсивности флуоресценции или максимума излучения 338 нм. Следует понимать, что результирующая интенсивность сигнала и максимум излучения, полученные в результате измерения IPFS, обусловлены общей стабильностью отдельных лекарственных веществ в поливалентном комплексном лекарственном продукте. Было показано, что вакцинный лекарственный продукт, в котором используются лекарственные вещества, приготовленные в апротонном растворителе, остаются стабильными, в то время как вакцинный лекарственный продукт, в котором используются лекарственные вещества, приготовленные в протонном растворителе, является нестабильным.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, такая стабильность могла быть связана с конъюгацией в ДМСО, приводящей к разрыву и денатурации белка-носителя. Конъюгация с денатурированным белком-носителем блокировала бы конформацию в денатурированном состоянии после конъюгации. Если это так, то рассматриваемое исследование также указывает на то, что в экспериментах по изучению влияния стресса, описанных в настоящем описании, окончательная конформация остается стабильной. Поэтому предпочтительно использовать вакцину с конъюгатом, в основном приготовленную в апротонных растворителях, для обеспечения адекватного и стабильного вакцинного лекарственного продукта.

Если в состав вакцинного лекарственного продукта входит смесь лекарственных веществ, гликоконъюгатов или полисахарид-белковых конъюгатов, полученных в процессе конъюгации в различных растворителях по механизму восстановительного аминирования (водные или ДМСО), то средний максимум или интенсивность излучения, измеренные для состава лекарственного продукта, будут взвешенными из-за вклада излучения каждого водного полисахарид-белкового конъюгата при 332 нм и излучения каждого неводного полисахарид-белкового конъюгата при 338 нм. Можно ожидать, что изменение будет наблюдаться в максимумах либо интенсивности, либо излучения при повышенной температуре, полученных для такой смеси в составе поливалентного лекарственного продукта, в которой используются полисахарид-белковые конъюгаты, не все из которых были получены по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе. Поэтому предпочтительно использовать вакцину с конъюгатом, в основном приготовленным в апротонных растворителях, для обеспечения адекватного и стабильного вакцинного лекарственного продукта.

Пример 41. Обобщенные исследования иммуногенности у кроликов моновалентных препаратов выбранных серотипов.

Взрослых новозеландских белых кроликов (NZWR, n=3/группу) иммунизировали внутримышечно (IM) 0,25 мл или 0,5 мл (только для 15С) соответствующей моновалентной конъюгатной вакциной в день 0 и день 14 (с чередованием сторон). Моновалентные пневмококковые вакцины, приготовленные в 20 мМ L-гистидине, pH 5,8, 150 мМ NaCl и 0,2% (мас./об.) PS-20 способом приготовления, описанным в примере 38, дозировали следующим образом:

(1) 1 мкг PnPs (6С, 10А, 15А, 16F, 17F, 20А, 23А, 23В, 24F, 31 или 35В, каждый из которых конъюгирован с CRM197) с 62,5 мкг адьюванта на основе фосфата алюминия (АРА) на каждую иммунизацию; или

(2) 2 мкг PnPs (15С-CRM197 с 125 мкг АРА на иммунизацию.

Сыворотки собирали до начала исследования (до иммунизации) и в дни 14 (после введения дозы 1,

PD1) и 28 (после введения дозы 2, PD2). NZWR находились под по меньшей мере ежедневным наблюдением обученного персонала по уходу за животными на наличие признаков заболевания или дистресса. Составы вакцин считались безопасными и хорошо переносимыми NZWR, поскольку не было отмечено побочных эффектов, связанных с вакцинами. Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с рекомендациями Руководства по уходу и использованию лабораторных животных Национальных институтов здравоохранения. Протокол проведения экспериментов с NZWR был одобрен институциональными комитетами по уходу за животными и их использованию в Merck & Co., Inc. (Кенилворт, Нью-Джерси) и Covance (Денвер, Пенсильвания).

Сыворотки, полученные от NZWR, тестировали в анализах ELISA для оценки иммуногенности IgG с использованием концентрации покрытия 1-2 мг/мл соответствующего PnPs. Функциональные антитела определяли с помощью анализов опсонофагоцитоза (OPA) на основе ранее описанных протоколов, доступных онлайн в Справочной лаборатории по бактериальным респираторным патогенам в Университете Алабамы в Бирмингеме с помощью программного обеспечения Opsotiter® 3 (UAB Research Foundation, Caro-Aguilar et al., Immunogenicity differences of a 15-valent pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (PCV15) based on vaccine dose, route of immunization and mouse strain, *Vaccine*, 35(6):865-72 (2017); Burton et al., Development and validation of a fourfold multiplexed opsonization assay (MOPA4) for pneumococcal antibodies, *Clin. Vaccine Immunol.*, 13(9):1004-9 (2006)).

Было обнаружено, что все моновалентные пневмококковые конъюгатные вакцины являются иммуногенными для кроликов (фиг. 15) и генерируют функциональное антитело, которое убивает соответствующий бактериальный штамм (фиг. 16).

Пример 42. Оценка перекрестной защиты серотипов 15A, 15B, 15C.

Кроликов иммунизировали 15A-CRM197/APA, 15B-CRM197/APA или 15C-CRM197/APA для оценки перекрестной реактивности между каждым серотипом.

Взрослых новозеландских белых кроликов (NZWR, n=3/группу) иммунизировали внутримышечно (IM) 0,5 мл соответствующей моновалентной конъюгатной вакциной в день 0 и день 14 (с чередованием сторон). Моновалентную пневмококковую конъюгатную вакцину, приготовленную в 20 mM L-гистидине, pH 5,8, 150 mM NaCl и 0,2% (мас./об.) PS-20 способом приготовления, описанным в примере 38, вводили в дозе 2 мкг PnPs (15A, 15B или 15C, каждый конъюгированный с CRM197) с 125 мкг APA на иммунизацию. Сыворотки собирали до начала исследования (до иммунизации) и в дни 14 (после введения дозы 1, PD1) и 28 (после введения дозы 2, PD2). NZWR находились под по меньшей мере ежедневным наблюдением обученного персонала по уходу за животными на наличие признаков заболевания или дистресса. Составы вакцин были признаны безопасными и хорошо переносимыми NZWR, поскольку не было отмечено каких-либо побочных явлений, связанных с вакциной. Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с рекомендациями Руководства по уходу и использованию лабораторных животных национальных институтов здравоохранения. Протокол проведения экспериментов с NZWR был одобрен институциональными комитетами по уходу за животными и использованию в обеих компаниях Merck и Co., Inc. и Covance (Денвер, Пенсильвания).

Сыворотки, полученные от NZWR, тестировали в анализах ELISA для оценки иммуногенности IgG с использованием концентрации покрытия 1-2 мг/мл соответствующего PnPs. Функциональное антитело определяли с помощью OPA на основе ранее описанных протоколов, доступных онлайн в Справочной лаборатории по бактериальным респираторным патогенам в Университете Алабамы в Бирмингеме с помощью программного обеспечения Opsotiter® 3 (UAB Research Foundation (Caro-Aguilar et al., 2017; Burton et al., 2006)).

Все три моновалентные пневмококковые конъюгатные вакцины серогруппы 15 были признаны иммуногенными у кроликов (фиг. 17) и генерировали функциональные антитела, которые убивали соответствующий бактериальный штамм (фиг. 18). Кроме того, кролики, иммунизированные моновалентными пневмококковыми конъюгированными вакцинами серогруппы 15, имели эквивалентные титры IgG и OPA PD2 на гомологичный и гетерологичный полисахарид и бактериальный штамм соответственно. Кролики, иммунизированные 15A-CRM197/APA, 15B-CRM197/APA или 15C-CRM197/APA, имели перекрестную реактивность к каждому пневмококковому полисахариду (15A, 15B, 15C) (фиг. 17). Анализ log-преобразованных данных IgG, полученных после введения дозы 2 (PD2), односторонним ANOVA с тестом Тьюки множественного сравнения (P-значение 0,354) не показал существенных различий в титрах IgG серогруппы 15. Кроме того, кролики, иммунизированные 15A-CRM197/APA, 15B-CRM197/APA или 15C-CRM197/APA, имели перекрестную реактивность к каждому штамму бактерий *S. pneumoniae* (15A, 15B, 15C), так как все гипериммунные кроличьи сыворотки имели функциональные антитела к каждому оцениваемому штамму и убивали бактерии (фиг. 18). Аналогично анализ log-преобразованных OPA данных, полученных после введения дозы 2 (PD2), односторонним ANOVA с тестом Тьюки множественного сравнения (P-значение=0,054) не показал существенных различий в титрах OPA серогруппы 15.

Пример 43. Иммуногенность PCV21 у новозеландских белых кроликов.

Взрослых новозеландских белых кроликов (NZWR, n=5/группу) иммунизировали внутримышечно 0,1-0,5 мл пневмококковой конъюгированной вакцины в дни 0 и 14 (с чередованием сторон). Пневмокок-

ковую вакцину PCV21, приготовленную в 20 мм L-гистидине, pH 5,8, 150 мМ NaCl, и 0,2% (мас./об.) PS-20 способом приготовления, описанным в примере 38, вводили в дозах по 4, 2, 1, 0,4, 0,08 или 0,016 мкг PnPs (3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F или 35B, каждый конъюгирован с CRM197) на иммунизацию. Сыворотки собирали до начала исследования (до иммунизации) и в дни 14 (после дозы 1, PD1) и 28 (после дозы 2, PD2). NZWR находились под по меньшей мере ежедневным наблюдением обученного персонала по уходу за животными на наличие признаков заболевания или дистресса. Составы вакцин были признаны безопасными и хорошо переносимыми NZWR, поскольку не было отмечено каких-либо побочных явлений, связанных с вакциной. Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с рекомендациями Руководства по уходу и использованию лабораторных животных национальных институтов здравоохранения. Протокол проведения экспериментов с NZWR был одобрен институциональными комитетами по уходу за животными и использованию в обеих компаниях Merck и Co., Inc. и Covance (Денвер, Пенсильвания).

Сыворотки, полученные от NZWR оценивали на иммуногенность IgG с помощью мультиплексного анализа электрохемилюминесценции (ECL). Этот анализ был разработан для работы с сывороткой кролика на основе анализа человеческой сыворотки, описанного Marchese et al. (Optimization and validation of a multiplex, electrochemiluminescence-based detection assay for the quantitation of immunoglobulin G serotype-specific antipneumococcal antibodies in human serum, *Clin. Vaccine Immunol.*, 16(3):387-96 (2009)) с помощью способа, разработанного MesoScale Discovery (подразделение MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD), в котором используется SULFO-TAG™ метка, испускающая свет в ответ на электрохимическую стимуляцию. SULFO-TAG™-меченный анти-кроличий IgG использовали в качестве вторичного антитела для тестирования образцов сыворотки NZWR. Функциональные антитела определяли с помощью мультиплексного анализа опсонофагоцитарных реакций (MOPA) на основе ранее описанных протоколов, доступных онлайн в Справочной лаборатории по бактериальным респираторным патогенам в Университете Алабамы в Бирмингеме с помощью программного обеспечения Opsotiter® 3 (UAB Research Foundation, Caro-Aguilar et al, 2017, см. выше, Burton et al., 2006, см. выше).

Было обнаружено, что PCV21 пневмококковые конъюгатные вакцины являются иммуногенными у кроликов (фиг. 19A, 19B, 20A и 20B) и генерируют функциональные антитела, которые убивают бактериальные штаммы вакцинного типа (фиг. 21A и 21B) во всех испытанных дозах.

Сопоставимую иммуногенность PD1 наблюдали для PCV21 в дозах 4, 2, 1 и 0,4 мкг на PnPs, за исключением 24F, который имел более высокую иммуногенность в дозе 2 мкг по сравнению с дозами 4 или 1 мкг, и 15A, 15B и 15C, которые имели более высокую иммуногенность в дозе 0,4 мкг по сравнению с дозой 2 мкг (фиг. 19A и 19B). Таким образом, при более высоких дозах PnPs (0,4-4 мкг/PnPs) реакция на дозу вакцины была незначительной. Более низкая иммуногенность наблюдалась при дозах вакцины 0,08 и 0,016 мкг PnPs, так как содержание многих серотипов было значительно ниже, чем в 2 мкг дозе вакцины.

Сопоставимую иммуногенность PD2 наблюдали для PCV21 в дозах 4, 2, 1 и 0,4 мкг на PnPs (фиг. 20A и 20B).

В целом для PCV21 в дозах 4, 2, 1 и 0,4 мкг на PnPs наблюдали сопоставимые титры MOPA PD2 с тенденцией, наблюдаемой у титров MOPA, к снижению для доз PnPs вакцины 0,08 и 0,016 мкг, хотя многие из них не достигли статистической значимости (данные не показаны). PCV21 в дозе 2 мкг на PnPs был выбран в качестве репрезентативного набора данных для MOPA. В частности, кролики, иммунизированные PCV21 в дозе 2 мкг, имели значительно более высокие титры MOPA PD1 для всех серотипов по сравнению с сыворотками кроликов до иммунизации, за исключением серотипа 3 (фиг. 21A). Следует отметить, что сыворотки кроликов до иммунизации из этого исследования имели более высокие фоновые титры для серотипов 16F, 31 и 35B. Кролики, иммунизированные PCV21 в дозе 2 мкг, имели значительно более высокие титры MOPA PD2 для всех серотипов по сравнению с сыворотками кроликов до иммунизации (фиг. 21B). Log-преобразованные данные анализировали односторонним ANOVA с помощью критерия Даннетта для определения значимости.

Пример 44. Материалы и методы.

Тестирование свободных полисахаридов.

Свободный полисахарид (полисахарид, который не конъюгирован с CRM197) в образце конъюгата измеряли сначала осаждением свободного белка и конъюгатов дезоксихолатом (DOC) и соляной кислотой. Затем осадки фильтровали, и фильтраты анализировали на концентрацию свободного полисахарида с помощью HPSEC/UV/MALS/RI. Свободный полисахарид рассчитывали в виде процента от общего полисахарида, измеренного с помощью HPSEC/UV/MALS/RI.

Тестирование свободного белка.

Свободный полисахарид, конъюгат полисахарид-CRM197 и свободный CRM197 в образцах конъюгата разделяли с помощью капиллярного электрофореза в режиме мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЕКС). Вкратце, образцы смешивали с рабочим буфером МЕКС, содержащим 25 мМ бората, 100 мМ SDS, pH 9,3, и разделяли в предварительно подготовленном капилляре из плавленого кремния без покрытия. Разделение контролировали при 200 нм и выполняли количественное определе-

ние свободного CRM197 с помощью стандартной кривой CRM197. Результаты по свободному белку представлены в виде процента от общего содержания белка, определенного с помощью процедуры HPSEC/UV/MALS/RI.

Анализ молекулярной массы и концентрации конъюгатов с помощью анализа HPSEC/UV/MALS/RI

Образцы конъюгата инъецировали и разделяли с помощью высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (HPSEC). Детектирование осуществляли последовательно с помощью ультрафиолетового (UV) детектора, детекторов многоугольного рассеяния света (MALS) и показателя преломления (RI). Концентрацию белка рассчитывали по UV280, используя коэффициент экстинкции. Концентрацию полисахарида деконволютировали из сигнала RI (обеспечиваемого как белком, так и полисахаридом), используя коэффициенты  $dn/dc$ , которые представляют собой изменение показателя преломления раствора с изменением концентрации растворенного вещества, выраженной в мл/г. Среднюю молекулярную массу образцов рассчитывали с помощью программного обеспечения Astra (Wyatt Technology Corporation, Санта-Барбара, Калифорния), используя информацию об измеренной концентрации и рассеянии света по всему пику образца. Имеется несколько форм выражения средних значений молекулярной массы для полидисперсных молекул. Например, среднечисленная молекулярная масса  $M_n$ , средневесовая молекулярная масса  $M_w$  и z-средняя молекулярная масса  $M_z$  (Molecules, 2015, 20, 10313-10341). Если не указано иное, молекулярные массы представляют собой средневесовые молекулярные массы.

Определение расхода лизина в конъюгированном белке как меры количества ковалентных связей между полисахаридом и белком-носителем.

Аминокислотный анализ Waters AccQ-Tag (AAA) использовали для измерения степени конъюгации в образцах конъюгата. Образцы гидролизуют с помощью кислотного гидролиза в паровой фазе на рабочей станции Eldex для разделения белков-носителей на составляющие их аминокислоты. Свободные аминокислоты дериватизировали с использованием 6-аминохинолил-N-гидроксисукцинимидил карбамата (AQC). Затем дериватизированные образцы анализировали с помощью UPLC с УФ-детектированием на колонке C18. Среднюю концентрацию белка получали с использованием репрезентативных аминокислот, отличных от лизина. Расход лизина во время конъюгации (т.е. потерю лизина) определяли по разнице между средним измеренным количеством лизина в конъюгате и ожидаемым количеством лизина в исходном белке.

Пример 45. Влияние процесса конъюгации на стабильность пневмококковой конъюгатной вакцины.

Отдельные пневмококковые полисахарид-белковые конъюгаты, приготовленные с использованием различных растворителей (водного или ДМСО) по механизму восстановительного аминирования, как описано в примерах выше, использовали для приготовления 1-, 7-, 14- и 21-валентных пневмококковых конъюгатных вакцинных лекарственных продуктов, обозначенных как PCV1, PCV7, PCV14 и PCV21, в концентрации 84 мкг/мл.

Контейнеры, наполненные вакцинным лекарственным продуктом, помещали при 4 или 37°C на срок до 7 дней. Флуоресцентную спектроскопию с внутренним белком (IPFS) использовали для оценки стабильности белка-носителя CRM197, конъюгированного с пневмококковым полисахаридом, в композициях PCV1, PCV7, PCV14 или PCV21 при хранении до 4°C и 37°C. Спектры флуоресцентного излучения (Em 290-400 нм) неразбавленных образцов получали с помощью спектрофлуориметра Jasco FP-6500 при комнатной температуре в кварцевой кювете с длиной пути 1 см. Использовали длину волны возбуждения 280 нм со скоростью сканирования 100 нм/мин и полосой пропускания возбуждения и излучения 3 нм.

Как показано на фиг. 22A-22C, составы лекарственного продукта, в котором все полисахарид-белковые конъюгаты получены по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе (например, ДМСО), имели превосходную физическую и химическую стабильность по сравнению с вакциной, в которой все полисахарид-белковые конъюгаты получены методом конъюгации в водном растворителе (протонной) по механизму восстановительного аминирования. Всего за 16 ч при 37°C интенсивность флуоресценции лекарственных продуктов PCV1, PCV7 и PCV14, полученных с использованием всех полисахарид-белковых конъюгатов, приготовленных по механизму восстановительного аминирования в водном растворителе при концентрации 84 мкг/мл PnPs, была снижена, и максимум эмиссии вакцины был смещен с 332 нм в сторону 338 нм. Вакцинные лекарственные препараты PCV1, PCV7 и PCV14 с концентрацией 84 мкг/мл PnPs, в которых используются лекарственные вещества, полученные по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе (например, ДМСО), не показали изменения интенсивности флуоресценции или максимума излучения при 338 нм. Кроме того, был изучен лекарственный препарат PCV21, который был приготовлен в составе с 20 мМ L-гистидином, pH 5,8, 150 мМ NaCl и 0,1% (мас./об.) PS-20, как описано в примере 38, и содержал полисахарид-белковые конъюгаты, полученные по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе (например, ДМСО). Исследование показало превосходную физическую и химическую стабильность после хранения при 37°C. PCV21 не показал изменения интенсивности флуоресценции или максимума излучения при 338 нм (фиг. 22D).

Следует понимать, что полученная интенсивность сигнала и максимум излучения, полученные из измерения IPFS (пример 40), обусловлены суммарной стабильностью отдельных полисахарид-белковых

конъюгатов в поливалентном комплексном лекарственном продукте. Было показано, что вакцинный лекарственный продукт, в котором все полисахарид-белковые конъюгаты приготовлены в апротонном растворителе, является стабильным, в то время как вакцинный лекарственный продукт, в котором все лекарственные вещества приготовлены в протонном растворителе, является нестабильным в стрессовых условиях. Если в состав вакцинного лекарственного препарата входит смесь полисахарид-белковых конъюгатов, полученных в результате процесса конъюгации как в протонном, так и в апротонном растворителе, то средний максимум или интенсивность излучения, измеренные для лекарственного препарата, будут взвешенными с учетом вклада излучения каждого протонного полисахарид-белкового конъюгата при 332 нм и излучения каждого апротонного полисахарид-белкового конъюгата при 338 нм. Можно ожидать, что в такой смеси взвешенное изменение будет происходить в максимумах интенсивности или излучения при повышенной температуре из-за присутствия полисахарид-белковых конъюгатов, полученных в процессе протонной конъюгации.

Как показано на фиг. 23, для оценки стабильности лекарственного продукта PCV21, приготовленного при 0,04 мг/мл PnPs, использовали анализ траекторий наночастиц (NTA). Этот метод собирает видео о непосредственно отслеживаемых популяциях наночастиц по мере их движения по типу броуновского движения для экстраполяции размера и концентрации частиц. 635 нм лазер класса 1 фокусирует 80 мкм красный лазерный луч через жидкий образец, освещая частицы как быстро диффундирующие световые точки. Камера CCD записывает видео со скоростью 30 кадров в секунду, отслеживая движение каждой отдельной освещенной частицы с течением времени. Системное программное обеспечение идентифицирует центр каждой отдельной частицы из видео и отслеживает независимо пройденное расстояние для определения среднеквадратичного смещения. Это отслеживание выполняется одновременно для каждой частицы в популяции выборки в каждом кадре, пока не будут проанализированы необработанные данные, собранные из всего видео. При одновременном измерении среднеквадратичного смещения каждой отдельной отслеживаемой частицы ее коэффициент диффузии (Dt) и сферический эквивалентный гидродинамический радиус (rh) определяют с помощью уравнения Стокса-Эйнштейна. Затем программное обеспечение представляет эти накопленные данные в виде распределения размера частиц и концентрации. Собирают необработанные данные не только о размере и концентрации частиц, но также об интенсивности или яркости отдельной частицы. Все эти данные аппроксимируют и наносят на график по отдельности в виде зависимости интенсивности частиц от размера частиц и концентрации частиц от их размера, а затем в виде трехмерных контурных графиков сравнения размера частиц, концентрации и интенсивности всех популяций частиц.

Конъюгатная вакцина, состоящая из белка-носителя и полисахаридного антигена, может вместе или по отдельности быть восприимчивой к агрегации в диапазоне размеров частиц 10-1000 нм, что делает NTA подходящим методом, указывающим на стабильность, для оценки и количественного определения явлений агрегации. После хранения лекарственного продукта при 4°C и 37°C в течение 1 недели, результаты NTA не показали значительного скопления лекарственного продукта в составах, содержащих PS-20 в концентрациях 0,025, 0,05, 0,1, 0,15 и 0,2% мас./об. PS20 (как показано на фиг. 23). Однако после перемешивания составов в течение 6 ч при 4°C композиция, которая не содержала полисорбат 20, оказалась неэффективной в отношении уменьшения агрегации лекарственного продукта, вызванного перемешиванием, о чем свидетельствует увеличенный размер частиц D90, расширенное распределение частиц по размерам и увеличенная интенсивность частиц, согласно результатам NTA. Поэтому предпочтительно поддерживать полисорбат 20 на уровне от 0,025 до 0,2% или выше (мас./об.) для стабилизации лекарственного продукта во время обычного производства, хранения, доставки и обработки.

Как описано в примере 39, для измерения молекулярной массы 21-валентного (PCV21) полисахарид-белкового конъюгатного лекарственного продукта, приготовленного в составе с 20 mM L-гистидин, pH 5,8, 150 mM NaCl и от 0 до 0,2% (мас./об.) PS-20 по способу приготовления, описанному в примере 38, использовали HPSEC UV/MALS/RI. Композиции помещали при 4 или 37°C на срок до одной недели. В некоторых случаях шприцы помещали на платформу с горизонтальным вращением и встряхивали в течение до 6 ч после хранения в течение 1 недели при 4 или 37°C. Таким образом имитировали стресс, возникающий при транспортировке и обработке, который может сопровождать производство и доставку лекарственного продукта. В случае деградации или деполимеризации полисахарид-белковых конъюгатов в лекарственных продуктах произошло бы видимое снижение молекулярной массы, а в случае агрегации состава лекарственного продукта происходило бы увеличение молекулярной массы. Это измерение обеспечивает дополнительную характеристику качества вакцинного лекарственного продукта или полисахарид-белковых конъюгатов в зависимости от концентрации PS-20. Как показано на фиг. 24, лекарственные препараты PCV21, в которых все лекарственные вещества приготовлены по механизму восстановительного аминирования в апротонном растворителе (например, ДМСО), были устойчивы к деполимеризации или химической деградации углевода и устойчивы к агрегации белка в средстве лекарственного продукта, вызываемых термической обработкой, при от 0,05 до 0,15% PS-20. В совокупности это указывает на то, что лекарственный препарат PCV21 стабилен при повышенной температуре и физических нагрузках, если приготовлен с использованием PS-20 в количестве от 0,025 до 0,2% или выше.

Пример 46. PCV21 защита мышей от заражения.

Молодых самок мышей Swiss Webster (6-8 недель, n=10 на группу) иммунизировали внутривентриально (IP) 0,1-0,5 мл 21-валентной пневмококковой конъюгатной вакциной (PCV21) в дни 0, 14 и 28. Пневмококковую вакцину PCV21 вводили в дозах 4, 2, 0,4, 0,08 или 0,016 мкг PnPs (3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, каждый конъюгированный с CRM197) на иммунизацию. Мыши находились под по меньшей мере ежедневным наблюдением обученного персонала по уходу за животными на наличие признаков заболевания или дистресса. Вакцины считались безопасными и хорошо переносимыми мышами, поскольку не было отмечено побочных эффектов, связанных с вакциной. На 52-й день мышам подвергали интратрахеальному заражению серотипа 24F *Streptococcus pneumoniae*. Культуры в экспоненциальной фазе *S. pneumoniae* центрифугировали, промывали и суспендировали в стерильном PBS. Перед заражением мышам анестезировали изофлураном.  $10^5$  КОЕ *S. pneumoniae* в 0,1 мл PBS помещали в горло мышам, вертикально подвешенных за их резцы. Аспирацию бактерий вызвали мягким вытягиванием языка наружу и закрытием ноздрей. Мышей взвешивали ежедневно и умерщвляли, если потеря веса превышала 20% от исходного значения. Кровь собирали через 24, 48 и 72 ч для оценки бактериемии. Мыши находились под наблюдением, осуществляемым по меньшей мере два раза в сутки обученным персоналом по уходу за животными на наличие признаков заболевания или дистресса. Все эксперименты на животных проводили в строгом соответствии с рекомендациями Руководства по уходу и использованию лабораторных животных национальных институтов здравоохранения. Протокол экспериментов на мышах был одобрен институциональным комитетом по уходу и использованию животных Merck & Co., Inc.

Сыворотки мышам оценивали на иммуногенность IgG с помощью мультиплексного анализа электрохемиллюминесценции (ECL). Этот анализ был разработан для использования мышинной сыворотки на основе анализа на человеческой сыворотке, описанного Marchese et al., Clin. Vaccine Immunol. (2009), 16 (3):387-96, с использованием метода, разработанного MesoScale Discovery (подразделение MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD), в котором используется метка SULFO-TAG™, излучающая свет при электрохимической стимуляции. Меченный SULFO-TAG™ анти-мышинный IgG использовали в качестве вторичного антитела для тестирования образцов мышинной сыворотки. Функциональное антитело определяли с помощью мультиплексного анализа опсонифагоцитарных реакций (MOPA) на основе ранее описанных протоколов на [www.vaccine.uab.edu](http://www.vaccine.uab.edu) и программного обеспечения Opsotiter® 3, принадлежащего и лицензированного Исследовательским фондом Университета Алабамы (UAB) (см. Caro-Aguilar I. et al., Vaccine (2017), 35 (6):865-72; и Burton R.L., Nahm M.H., Clin. Vaccine Immunol. (2006), 13(9):1004-9).

Иммунизация PCV21 генерировала титры антител у мышам Swiss Webster для всех серотипов в вакцине (данные не представлены). PCV21 также оказался иммуногенным у мышам Balb/c и CD1 (данные не показаны). Мыши Swiss Webster, иммунизированные PCV21, также были защищены от заражения серотипом 24F *S. pneumoniae* (фиг. 25). Логарифмический ранговый критерий Мантела-Кокса указывает на то, что все иммунизированные группы PCV21 были в значительной степени защищены от заражения по сравнению с группой, получавшей наивную терапию ( $P < 0,05$ ). Аналогично в группах мышам, иммунизированных PCV21, бактериемия практически отсутствовала, что было значительно меньше по сравнению с группой наивных животных (данные не показаны).

Пример 47. Иммуногенность PCV и функциональное антитело у кроликов.

Взрослых новозеландских белых кроликов (NZWR, n=5 на группу) иммунизировали внутримышечно (IM) 0,1 мл PCV в день 0 и день 14 (чередующиеся стороны). PCV вводили в дозах 0,4 мкг PnPs на серотип на иммунизацию с 25 мкг [Al] в форме адьюванта на основе фосфата алюминия (APA). В случае PCV31, концентрацию серотипа 6B в дозе удваивали до 0,8 мкг PnPs на иммунизацию. PCV21 (как описано в примере 38) включает очищенные полисахариды серотипов 3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31 33F и 35B, каждый из которых конъюгирован с CRM197. Каждый полисахарид-белковый конъюгат готовили без адьюванта или с ним с концентрацией 250 мкг/мл в форме фосфата алюминия или APA для оценки действия адьюванта (PCV21/APA). Также готовили составы PCV с более низкой валентностью (как описано в примере 38), в которые включали 8 новых ST (PCV8: 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, каждый из которых конъюгирован с CRM197, без адьювантов), 16 ST не содержится ни в одном лицензированном PCV (PCV16: 6C, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 20, 23A, 23B, 24F, 31 и 35B, каждый конъюгированный с CRM197, без адьювантов) или PCV31 (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F и 35B каждый из которых конъюгирован с CRM197, содержит 250 мкг [Al]/мл в форме фосфата алюминия) для оценки супрессии носителя по мере увеличения валентности вакцины (PCV31/APA). В каждой вакцине использовали полисахарид-белковые конъюгаты, составленные в виде 4 мкг/мл (мас./об.) пневмококкового полисахарида (PnPs), за исключением 6B, содержание которого в составе довели до 8 мкг/мл (мас./об.) пневмококкового полисахарида (PnPs) в PCV31 или PCV31/APA. Конечная концентрация пневмококкового полисахарида (PnPs) в каждой вакцине составляла 128 мкг/мл PnPs в PCV31, 84 мкг/мл PnPs в PCV21, 64 мкг/мл в PCV16 и 32 мкг/мл в PCV8.

Сыворотки собирали до начала исследования (до иммунизации) и в дни 14 (PD1) и 28 (PD2). NZWR находились под по меньшей мере ежедневным наблюдением обученного персонала по уходу за живот-

ными на наличие признаков заболевания или дистресса. Композиции вакцин считались безопасными и хорошо переносимыми NZWR, поскольку не было отмечено побочных эффектов, связанных с вакцинами. Все эксперименты на животных проводили в строгом соответствии с рекомендациями Руководства по уходу и использованию лабораторных животных национальных институтов здравоохранения. Протокол эксперимента NZWR был одобрен институциональными комитетами по уходу за животными и их использованию в Merck & Co., Inc и Covance (Денвер, Пенсильвания).

Сыворотки кроликов оценивали на иммуногенность IgG с помощью мультиплексного анализа электрохемилюминесценции (ECL). Этот анализ был разработан для использования кроличьей сыворотки на основе анализа человеческой сыворотки, описанного Marchese et al., *Clin. Vaccine Immunol.* (2009), 16(3):387-96, с использованием метода, разработанного MesoScale Discovery (подразделение MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD), в котором используется метка SULFO-TAG™, излучающая свет при электрохимической стимуляции. Меченные SULFO-TAG™ анти-кроличьи IgG использовали в качестве вторичного антитела для тестирования образцов сыворотки NZWR. Функциональное антитело определяли с помощью мультиплексного анализа опсонофагоцитарных реакций (MOPA) на основе ранее описанных протоколов на [www.vaccine.uab.edu](http://www.vaccine.uab.edu) и программного обеспечения OpsoTiter® 3, принадлежащего и лицензированного Исследовательским фондом Университета Алабамы (UAB) (см. Caro-Aguilar I. et al., *Vaccine* (2017), 35(6):865-72; и Burton R.L., Nahm M.H., *Clin. Vaccine Immunol.* (2006), 13(9):1004-9).

Кроличьи сыворотки тестировали в виде пула до иммунизации и PD1 и отдельно PD2 в мультиплексных анализах электрохемилюминесценции для определения титров антител. PCV генерировали титры антител у кроликов для всех серотипов после иммунизации вакциной (данные не показаны). Полисахарид серотипа 15B не был включен в PCV16, PCV21 или PCV31, однако титры антител к серотипу 15B наблюдались после иммунизации как PCV16, PCV21, так и PCV31.

PCV21 без адьюванта обладал сравнимой или значительно более высокой иммуногенностью (серотипность 3, 7F, 10A, 19A, 23A и 23B) по сравнению с PCV21 с APA (фиг. 26A, 26B и 28), что свидетельствует об отсутствии дополнительной пользы от иммуногенности у кроликов с APA, включенной в вакцину.

Эпитопическая супрессия, индуцированная носителем, относится к интерференции с ответом антитела на антиген (такой как капсульный полисахарид), который связан с тем же белком-носителем (таким как CRM197). Считается, что интерференция возникает из-за конкуренции за ограниченное число специфичных для носителя праймированных Т-хелперов. В результате может наблюдаться снижение ответа на капсульный полисахарид. Pfizer обнаружил снижение иммуногенности общих серотипов в вакцинах по мере увеличения валентности вакцины с 7-валентной до 13-валентной [Сравнение IgG-антитела GMC Prevnar (7 валентная) с Prevnar13 (табл. 9, с. 29 PCV13 монографии)]. Таким образом, цель эксперимента состояла в исследовании иммуногенности PCV с более низкой валентностью по сравнению с PCV21 (фиг. 27A-27C). PCV8 (8 новых серотипов) показал сопоставимую с PCV21 иммуногенность для 8 общих серотипов (фиг. 29). PCV16 (PCV21 минус 5 перекрывающихся серотипов из PCV15) показал сопоставимую с PCV21 иммуногенность для 15 из 16 общих серотипов (фиг. 29). Серотип 31 показал более высокую иммуногенность в отношении PCV16 (фиг. 29). В целом у NZWR не наблюдали серьезных тенденций супрессии носителя, вызываемой PCV21. PCV31/APA показал сопоставимую с PCV21/APA иммуногенность для 12 из 21 общей серотипности. 10 серотипов (6C, 7F, 9N, 12F, 15A, 15B (не в PCV21), 15C, 17F, 19A и 23A) обладали более высокой иммуногенностью в PCV31 в 2,9-11 раз (фиг. 30). В целом у NZWR не наблюдали серьезных тенденций супрессии носителя, вызываемой PCV31.

Было обнаружено, что PCV являются иммуногенными у кроликов и генерируют функциональные антитела, которые убивают бактериальные штаммы вакцинного типа. Сыворотки кроликов тестировали в мультиплексных анализах опсонофагоцитарных реакций (MOPA) для определения функциональных титров антител. PCV21 имел сопоставимые или более высокие титры OPA PDA по сравнению с PCV21/APA, PCV8 и PCV16 (фиг. 31). Log-преобразованные данные анализировали односторонним ANOVA с помощью критерия Даннетта для определения значимости. PCV21 имел значительно более высокие титры OPA для серотипа 16F по сравнению с PCV8 и для серотипов 12F, 23A и 19A по сравнению с PCV21/APA. PCV31 имел значительно более высокие титры OPA для серотипа 23A по сравнению с PCV21.

Пример 48. Иммуногенность PCV21 у взрослых макак-резусов.

PCV21 также оценивали на моделях иммуногенности у взрослых макак-резусов. Макак-резусы были внутримышечно иммунизированы PCV21 в дни 0, 28 и 56. PCV21 вводили в дозах 1 мкг PnPs в объеме 0,25 мл (3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31 33F и 35B, каждый конъюгированный с CRM197) на одну иммунизацию. Сыворотки собирали до начала исследования (до иммунизации, день 0) и в дни 14 (PD1), 28, 42 (PD2), 56, 70 (PD3) и 84.

Сыворотку резусов оценивали на иммуногенность IgG с помощью мультиплексного анализа электрохемилюминесценции (ECL). Этот анализ был разработан для использования сыворотки резусов на основе анализа человеческой сыворотки, описанного Marchese et al. и Skinner et al. (Marchese RD et al., *Clin. Vaccine Immunol.* (2009), 16(3):387-96; и Skinner, J.M. et al., *Vaccine* (2011), 29(48):8870-8876) с ис-

пользованием метода, разработанного MesoScale Discovery (подразделение MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD), в котором используется метка SULFO-TAG™, излучающая свет при электрохимической стимуляции. Меченный SULFO-TAG™ античеловеческий IgG использовали в качестве вторичного антитела для тестирования образцов сыворотки резусов. Функциональное антитело определяли с помощью мультиплексного анализа опсонофагоцитарных реакций (МОРА) на основе ранее описанных протоколов на [www.vaccine.uab.edu](http://www.vaccine.uab.edu) и программного обеспечения Opsotiter® 3, принадлежащего и лицензированного Исследовательским фондом Университета Алабамы (UAB) (см. Caro-Aguilar I. et al., Vaccine (2017), 35 (6):865-72; и Burton R.L., Nahm M.H., Clin. Vaccine Immunol. (2006), 13(9):1004-9).

Было обнаружено, что PCV21 является иммуногенным у взрослых обезьян и генерирует функциональные антитела, которые убивают бактериальные штаммы вакцинного типа во всех протестированных временных точках (фиг. 32 и 33). Также следует отметить, что PCV21, который содержит полисахаридные конъюгаты 15A-CRM197 и 15C-CRM197, также обеспечивает перекрестную реактивность по отношению к 15B, о чем свидетельствуют результаты ECL. PCV21 был иммуногенным у обезьян после одной дозы вакцины (фиг. 32). Большинство серотипов достигли своего максимального титра в точке PD1, за исключением ST 6C, 12F и 24F, которые были эффективны после дополнительных иммунизаций. Взрослые макаки-резусы показали более высокие титры ранее существовавших антител по сравнению с предыдущими исследованиями PCV у малышей макаках-резусов. Титры ранее существовавших антител были наиболее очевидны при тестировании образцов сывороток методом МОРА, что затрудняло определение титра опсонофагоцитов. Все моменты времени исследования были протестированы методом МОРА в виде объединенных или отдельных образцов, но для облегчения просмотра показаны данные только до иммунизации, PD1 и PD3 (фиг. 33), так как титры ОРА между PD1 и PD3 не дали существенных различий.

PCV21 иммунизированные сыворотки макака-резусов оценивали на перекрестную защиту от других бактерий *S. pneumoniae* (фиг. 34). Сыворотка макак, иммунизированных PCV21, имела перекрестную защиту от серотипов 6A, 6B и 23F, но не от 19F. Перекрестная защита от 6A и 6B, вероятно, обусловлена иммунизацией полисахаридным конъюгатом 6C-CRM197 в составе поливалентного PCV21. Аналогичным образом иммунизация полисахаридными конъюгатами 23A-CRM197 и 23B-CRM197 в составе поливалентного PCV приводила к перекрестной защите от серотипа 23F. Иммунизация PCV21, содержащим полисахаридный конъюгат 19A-CRM197, не обеспечивала перекрестную защиту от 19F.

Пример 49. Иммуногенность PCV21 у взрослых макак-резусов. Оценка супрессии адьюванта и переносчика.

Другое исследование на обезьянах включало оценку PCV21 с АРА и без него и сравнение общей серогенной иммуногенности для оценки супрессии носителя. Взрослых макак-резусов (n=5 на группу) иммунизировали внутримышечно вакцинами половинной человеческой дозой в день 0 исследования. PCV21 вводили в дозе 1 мкг PnPs в объеме 0,25 мл (3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31 33F и 35B, каждый конъюгированный с CRM197) на одну иммунизацию. Одна группа включала PCV21 с адьювантом в количестве 62,5 мкг [Al] в форме фосфата алюминия. Другая группа включала PCV15, вводимую в дозе 1 мкг PnPs в объеме 0,25 мл (1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F, каждый из которых конъюгирован с CRM197, причем доза 6B составляла 2 мкг) на одну иммунизацию и с адьювантом в количестве 62,5 мкг [Al] в форме фосфата алюминия. Другая группа включала Pevnar13® (PCV13), вводимый в дозе 1,1 мкг PnPs в объеме 0,25 мл (1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, каждый из которых конъюгирован с CRM197, причем доза 6B составляла 2,2 мкг) на одну иммунизацию. Сыворотки собирали до начала исследования (до иммунизации, день 0) и в день 28.

Было обнаружено, что PCV21 является иммуногенным у взрослых обезьян и генерирует функциональные антитела, которые убивают бактериальные штаммы вакцинного типа. PCV21 без адьюванта показала сопоставимую или значительно более высокую иммуногенность (серотипы 15A и 15B) по сравнению с PCV21 с АРА (фиг. 35). PCV21 не включала серотип 15B.

PCV21 иммунизированных обезьян сравнивали с обезьянами, иммунизированными PCV15 и Pevnar13. PCV21 и PCV15 имеют 5 общих серотипов (3, 7F, 19A, 22F, 33F); у обезьян, иммунизированных PCV21 или PCV15, не было различий в иммуногенности этих 5 серотипов (фиг. 36). PCV21 и Pevnar13 имеют 3 общих серотипа (3, 7F, 19A); в иммуногенности серотипов 7F и 19A не было различий. Pevnar13 иммунизированные обезьяны имели более низкие титры антител к серотипу 3 по сравнению с PCV21 (фиг. 36). Это открытие согласуется с клиническими данными для PCV15 у человека, что свидетельствует о том, что серотип 3 является более иммуногенным в вакцине Merck PCV15. Вместе, эти результаты предполагают, что супрессия носителей не наблюдается у взрослых макак-резусов, иммунизированных PCV21, по сравнению с таковой у Pevnar13 или PCV15.

Пример 50. Перекрестная реактивность серотипов 6A, 6B и 6C - моновалентное исследование.

Моновалентный лекарственный продукт получали с использованием пневмококкового полисахаридного конъюгата 6A-CRM197 или пневмококкового полисахаридного конъюгата 6B-CRM197, который готовили в составе с 20 мМ гистидином, pH 5,8, 150 мМ хлорида натрия и 0,1% мас./об. полисорбата 20

(PS-20) при целевой концентрации общего полисахарида 4,0 мкг/мл любого серотипа. Конъюгаты получали путем конъюгации белка CRM197 отдельно с каждым типом пневмококкового полисахарида (PnPs) (-6A или -6B). Требуемый объем исходных конъюгатов, необходимый для получения целевой концентрации отдельных серотипов, рассчитывали на основе объема партии и концентрации отдельных исходных полисахаридов. Отдельные конъюгаты добавляли к раствору гистидина, хлорида натрия и PS-20 с получением смеси 2X конъюгата. Сосуд для приготовления препарата, содержащий смесь 2X конъюгата, смешивали с помощью магнитной мешалки и выполняли стерильную фильтрацию в другой сосуд. Затем стерильную отфильтрованную смесь 2X разбавляли солевым раствором для достижения требуемых целевых концентраций общего полисахарида и наполнителя. Затем составы помещали во флаконы и хранили при 2-8°C.

Кроликов иммунизировали 6A-CRM197 или 6B-CRM197 для оценки перекрестной реактивности в серогруппе 6. Взрослых новозеландских белых кроликов (NZWR, n=3/группу) иммунизировали внутримышечно (IM) 0,25 мл соответствующей моновалентной конъюгатной вакцины в день 0 и день 14 (с чередованием сторон). Моновалентную пневмококковую конъюгатную вакцину, приготовленную в составе с 20 mM L-гистидиним, pH 5,8, 150 mM NaCl и 0,1% (мас./об.) PS-20 с помощью способа приготовления, описанного в примере 38, вводили в дозе 1 мкг PnPs (6A или 6B, каждый конъюгированный с CRM197). Сыворотки собирали до начала исследования (до иммунизации) и в дни 14 (после введения дозы 1, PD1) и 28 (после введения дозы 2, PD2). NZWR находились под по меньшей мере ежедневным наблюдением обученного персонала по уходу за животными на наличие признаков заболевания или дистресса. Композиции вакцин считались безопасными и хорошо переносимыми NZWR, поскольку не было отмечено побочных эффектов, связанных с вакцинами. Все эксперименты на животных проводили в строгом соответствии с рекомендациями Руководства по уходу и использованию лабораторных животных национальных институтов здравоохранения. Протокол эксперимента NZWR был одобрен институциональными комитетами по уходу за животными и их использованию в Merck & Co., Inc и Covance (Денвер, Пенсильвания).

Сыворотки NZWR тестировали в анализах ELISA для оценки иммуногенности IgG с использованием соответствующей концентрации покрытия 2 мкг/мл PnPs. Функциональное антитело определяли с помощью анализов опсонофагоцитоза (OPA) на основе ранее описанных протоколов на [www.vaccine.uab.edu](http://www.vaccine.uab.edu) и программного обеспечения Opsotiter® 3, принадлежащего и лицензированного UAB Research Foundation (см. Caro-Aguilar I. et al., *Vaccine* (2017), 35(6):865-72; и Burton R.L., Nam M.H., *Clin. Vaccine Immunol.* (2006), 13(9):1004-9).

Обнаружено, что и 6A-CRM197, и 6B-CRM197 являются иммуногенными у кроликов (фиг. 37) и генерируют функциональное антитело, которое убивает соответствующий бактериальный штамм (фиг. 38). Кроме того, кролики, иммунизированные моновалентными пневмококковыми конъюгатными вакцинами серогруппы 6, имели эквивалентные титры IgG PD2 и результаты OPA для гомологичного и гетерологичного полисахарида и бактериального штамма соответственно. Все кролики, иммунизированные 6A-CRM197 или 6B-CRM197, обладали перекрестной реактивностью к каждому пневмококковому полисахариду (PnPs 6A, PnPs 6B и PnPs 6C) (фиг. 37). При использовании log-преобразованных данных IgG после введения дозы 2 (PD2), проанализированных с помощью одностороннего ANOVA, не наблюдали значимых различий в титрах IgG в серогруппе 6. Кроме того, кролики, иммунизированные 6A-CRM197 или 6B-CRM197, имели перекрестную реактивность к каждому бактериальному штамму *S. pneumoniae* (6A, 6B и 6C), поскольку все гипериммунные кроличью сыворотки имели функциональное антитело к каждому оцениваемому штамму и убивали бактерии (фиг. 38). Аналогично данные OPA, полученные после дозы 2 (PD2), логарифмически проанализированные с односторонним ANOVA, не показали значимых различий в титрах OPA в серогруппе 6.

Пример 51. Перекрестная реактивность серотипов 20A и 20B - моновалентное исследование.

Моновалентный лекарственный продукт готовили с использованием пневмококкового полисахаридного конъюгата 20A-CRM197 в составе с 20 mM гистидином, pH 5,8, 150 mM хлоридом натрия и 0,2% мас./об. полисорбатом-20 (PS-20) с концентрацией 4,0 мкг/мл. Состав готовили с 250,0 мкг [Al]/мл в виде фосфата алюминия в качестве адьюванта (20A-CRM197/APA). Конъюгат готовили конъюгацией белка CRM197 отдельно с пневмококковым полисахаридом (PnPs) типа 20. Требуемый объем исходного конъюгата, необходимый для получения целевой концентрации отдельного серотипа, рассчитывали на основе объема партии и концентрации отдельного исходного полисахарида. Одиночный конъюгат добавляли к раствору гистидина, хлорида натрия и PS-20 с получением смеси 4X конъюгата при 16,0 мкг/мл. Сосуд для состава, содержащий смесь конъюгата, смешивали с помощью магнитной мешалки и выполняли стерильную фильтрацию в другой сосуд. Затем стерильно отфильтрованную смесь 4X добавляли в другой сосуд, содержащий адьювант на основе фосфата алюминия до достижения требуемых целевых концентраций полисахарида, наполнителя и адьюванта. Затем составы помещали в стеклянные флаконы и хранили при 2-8°C.

Кроликов иммунизировали 20A-CRM197/APA или PCV21 для оценки перекрестной реактивности серогруппы 20. Взрослых новозеландских белых кроликов (NZWR, n=3/группу) иммунизировали внутримышечно (IM) пневмококковой конъюгатной вакциной в день 0 и день 14 (чередующиеся стороны).

Моновалентную пневмококковую конъюгатную вакцину, приготовленную, как описано выше, вводили в дозе 1 мкг PnPs в 0,25 мл (ST20A, конъюгированный с CRM197 и 62,5 мкг [Al] в форме фосфата алюминия, использовали в качестве адьюванта), поливалентная пневмококковая конъюгатная вакцина PCV21 (84 мкг/мл PnPs, приготовленная в составе с 20 мМ L-гистидином, pH 5,8, 150 мМ NaCl и 0,2% (мас./об.) PS-20 способом приготовления, описанным в примере 38, вводили в дозе 0,4 мкг PnPs в 0,1 мл (серотипы 3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F и 35B, каждый из которых конъюгирован с CRM197). Сыворотки собирали до начала исследования (до иммунизации) и в дни 14 (после введения дозы 1, PD1) и 28 (после введения дозы 2, PD2). NZWR находились под по меньшей мере ежедневным наблюдением обученного персонала по уходу за животными на наличие признаков заболевания или дистресса. Композиции вакцин считались безопасными и хорошо переносимыми NZWR, поскольку не было отмечено побочных эффектов, связанных с вакцинами. Все эксперименты на животных проводили в строгом соответствии с рекомендациями Руководства по уходу и использованию лабораторных животных национальных институтов здравоохранения. Протокол эксперимента NZWR был одобрен институциональными комитетами по уходу за животными и их использованию в Merck & Co., Inc и Covance (Денвер, Пенсильвания).

Сыворотки NZWR тестировали в анализах опсонофагоцитоза (OPA) для оценки функциональных антител на основе ранее описанных протоколов на [www.vaccine.uab.edu](http://www.vaccine.uab.edu) и программного обеспечения Opsotiter® 3, принадлежащего и лицензированного UAB Research Foundation (см. Caro-Aguilar I. et al., Vaccine (2017), 35(6):865-72; и Burton R.L., Nahm M.H., Clin. Vaccine Immunol. (2006), 13(9):1004-9).

Кролики, иммунизированные как моновалентными вакцинами 20A-CRM197/APA, так и поливалентными вакцинами PCV21, генерировали функциональные антитела, которые убивали оба серотипа *S. pneumoniae* 20A и 20B (фиг. 39). Это говорит о том, что серотипы 20A и 20B имеют общее структурное сходство, что обеспечивает перекрестную реактивность внутри серогруппы.

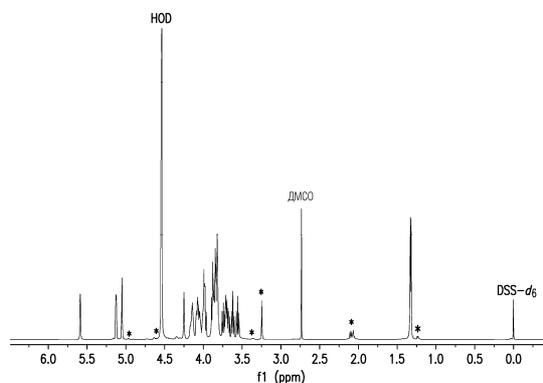
#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Поливалентная иммуногенная композиция, содержащая конъюгаты полисахаридов *S. pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов содержит полисахарид конкретного серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, где серотипы *S. pneumoniae* состоят из 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, де-О-ацетилированного 15B, 17F и 20, и белок-носитель представляет собой CRM197.

2. Поливалентная иммуногенная композиция по п.1, в которой де-О-ацетилированный полисахарид 15B имеет содержание О-ацетила в расчете на повторяющееся звено менее 5%.

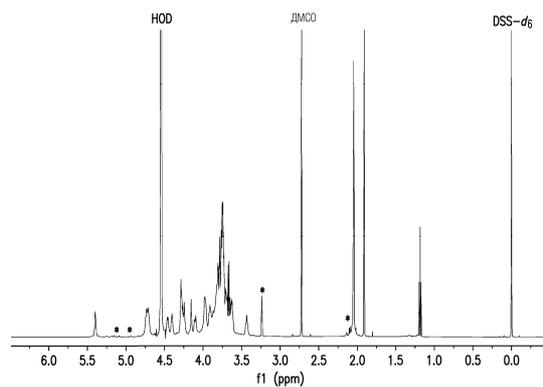
3. Поливалентная иммуногенная композиция, содержащая конъюгаты полисахаридов *S. pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов содержит полисахарид конкретного серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, где серотипы *S. pneumoniae* состоят из 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F и 20, и белок-носитель представляет собой CRM197.

4. Поливалентная иммуногенная композиция, содержащая конъюгаты полисахаридов *S. pneumoniae* с белком-носителем, где каждый из конъюгатов содержит полисахарид конкретного серотипа *S. pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем, где серотипы *S. pneumoniae* состоят из 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F и 20, и белок-носитель представляет собой CRM197.

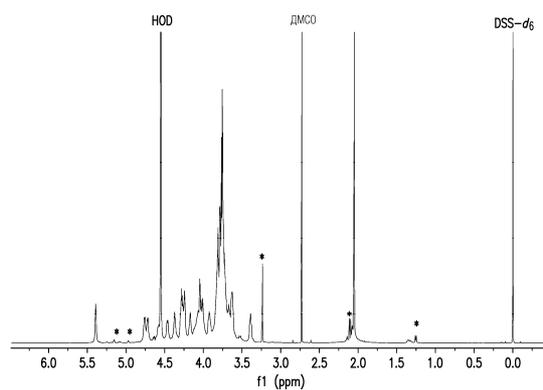


Фиг. 1

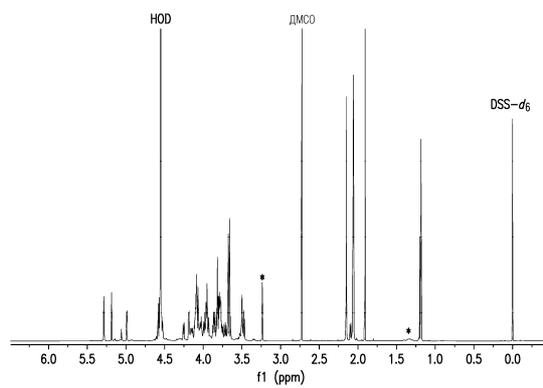
043489



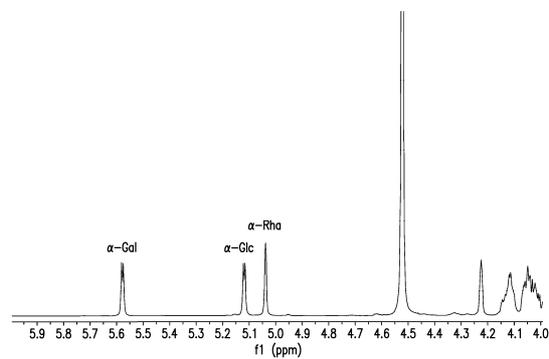
Фиг. 2



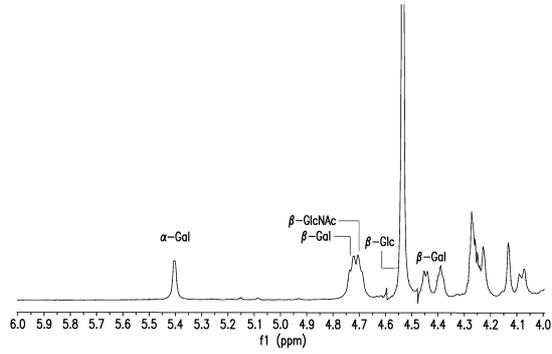
Фиг. 3



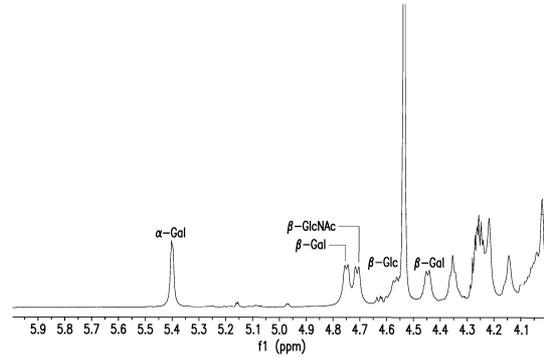
Фиг. 4



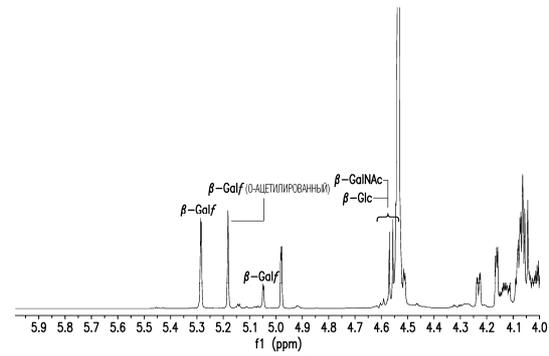
Фиг. 5



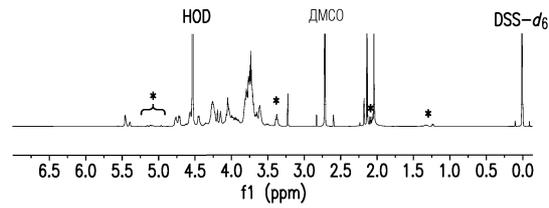
Фиг. 6



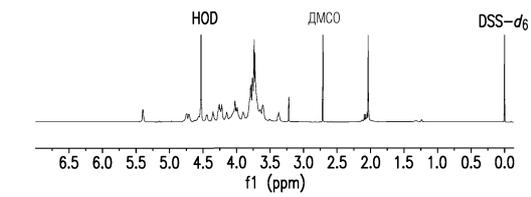
Фиг. 7



Фиг. 8

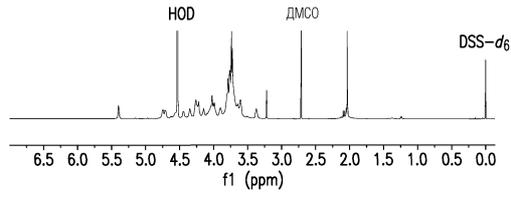


Фиг. 9А

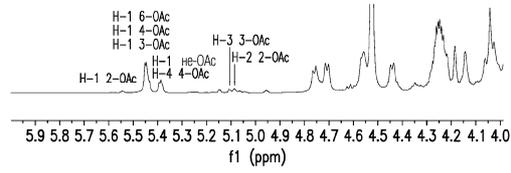


Фиг. 9В

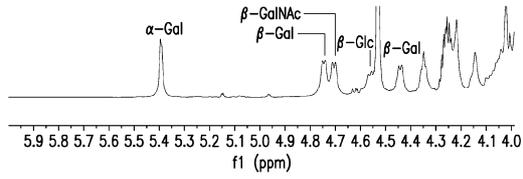
043489



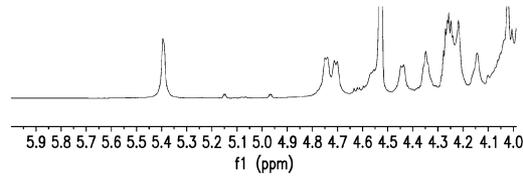
Фиг. 9С



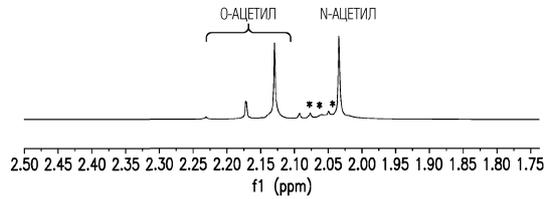
Фиг. 10А



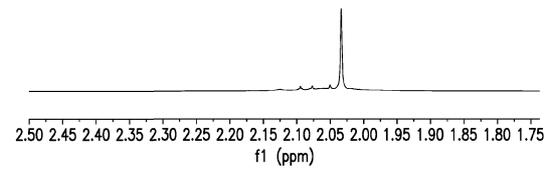
Фиг. 10В



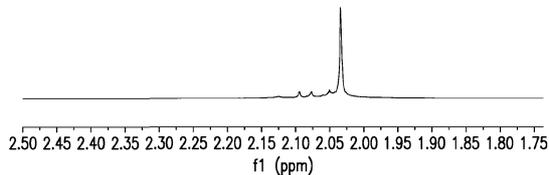
Фиг. 10С



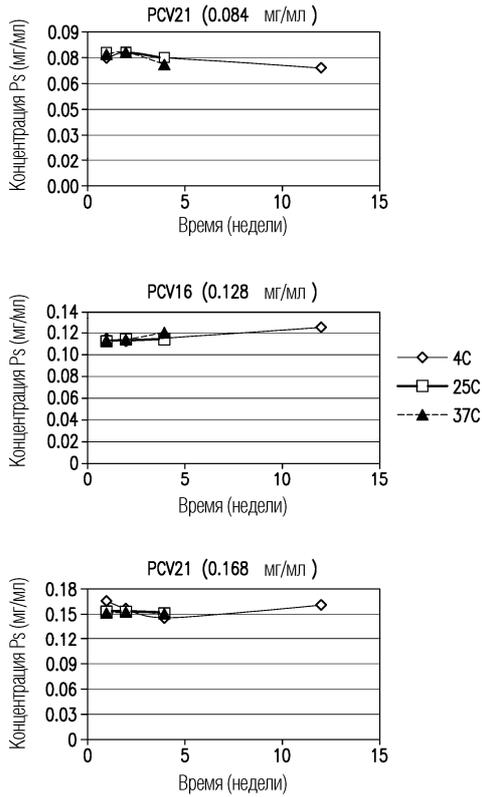
Фиг. 10D



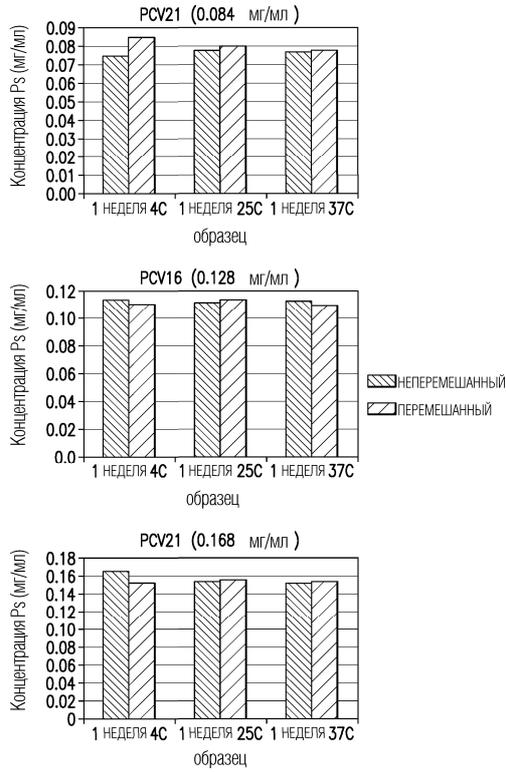
Фиг. 10E



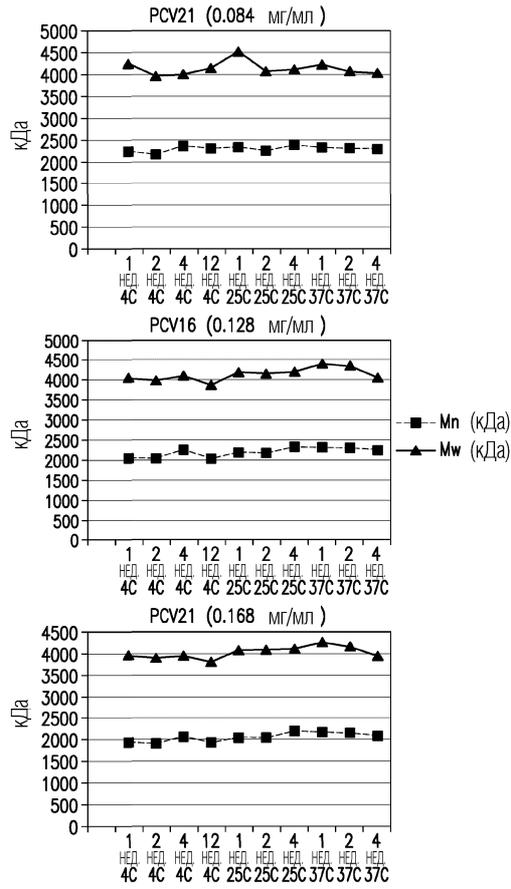
Фиг. 10F



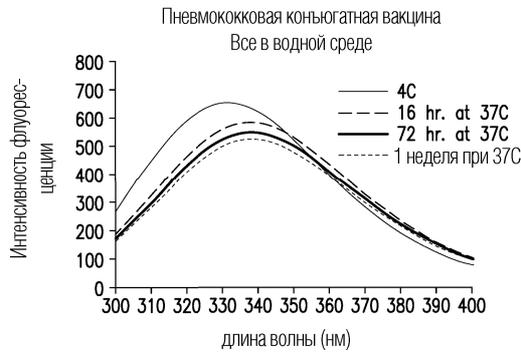
Фиг. 11



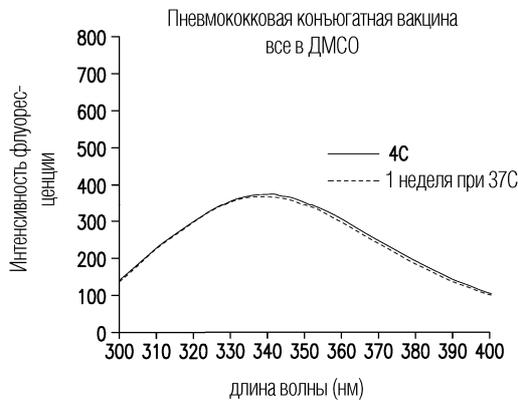
Фиг. 12



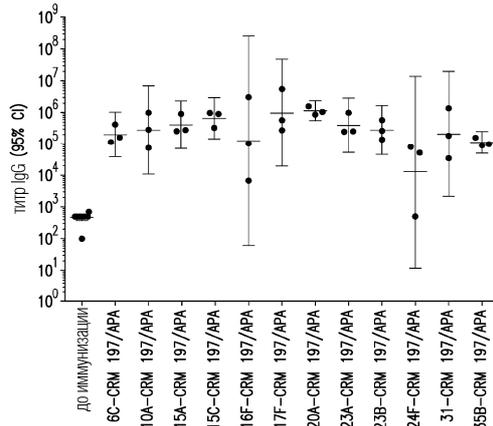
Фиг. 13



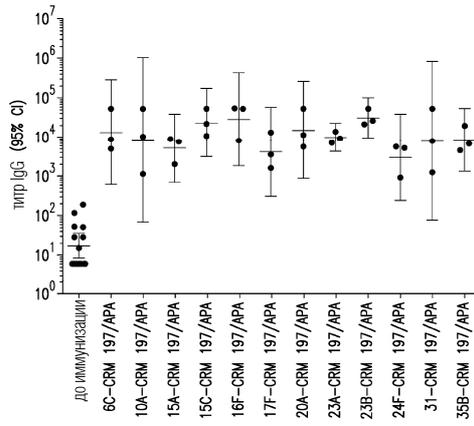
Фиг. 14А



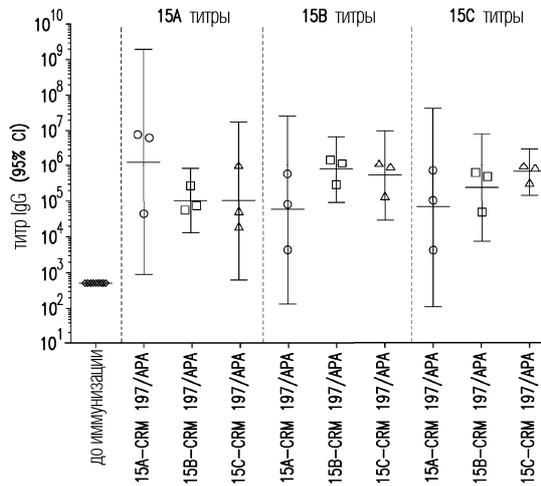
Фиг. 14В



Фиг. 15

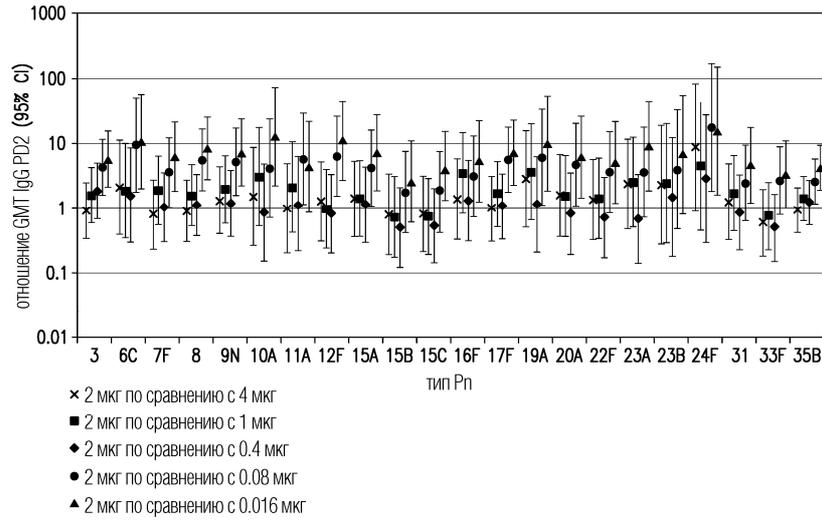


Фиг. 16



Фиг. 17

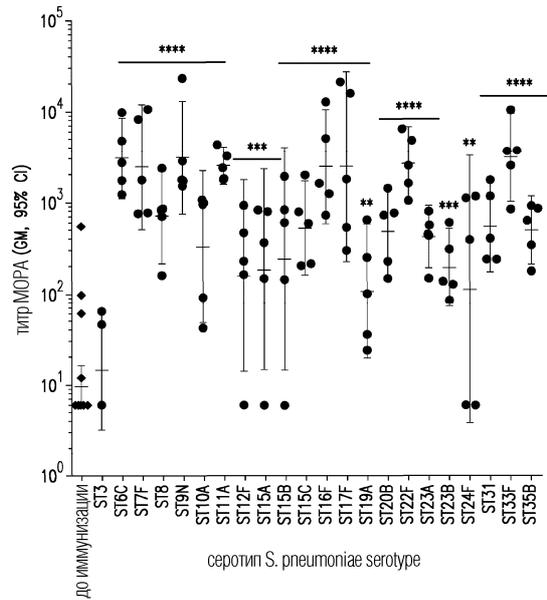




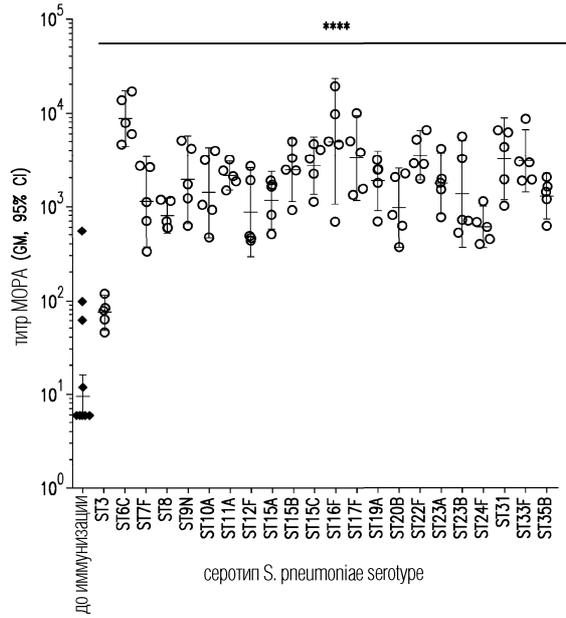
Фиг. 20А

серотип	2 мкг по сравнению с 4 мкг	2 мкг по сравнению с 1 мкг	2 мкг по сравнению с 0.4 мкг	2 мкг по сравнению с 0.08 мкг	2 мкг по сравнению с 0.016 мкг
3	0.91 (0.34, 2.5)	1.58 (0.59, 4.3)	1.86 (0.69, 5.0)	4.3 (1.59, 12.0)	5.7 (2.1, 15.0)
6С	2.1 (0.39, 11.0)	1.87(0.35, 10)	1.6 (0.3, 8.6)	9.6 (1.79, 51)	11 (1.98, 56)
7F	0.8 (0.23, 2.7)	1.88 (0.55, 6.4)	1.03 (0.3, 3.5)	3.6 (1.05, 12)	6.2 (1.83, 21)
8	0.9 (0.3, 2.7)	1.57 (0.53, 4.7)	1.1 (0.37, 3.3)	5.5 (1.84, 17)	8.3 (2.8, 25)
9N	1.31 (0.4, 4.3)	1.92 (0.58, 6.3)	1.17 (0.36, 3.8)	5.1 (1.56, 17)	7.1 (2.2, 23)
10А	1.49 (0.26, 8.6)	3 (0.53, 17)	0.84 (0.15, 4.8)	4.1 (0.71, 23)	13 (2.2, 72)
11А	0.98 (0.2, 4.9)	2.1 (0.42, 10)	1.09 (0.22, 5.4)	5.7 (1.15, 29)	4.3 (0.86, 22)
12F	1.28 (0.31, 5.2)	0.96 (0.24, 3.9)	0.8 (0.2, 3.3)	6.3 (1.53, 26)	11 (2.7, 45)
15А	1.39 (0.36, 5.3)	1.39 (0.36, 5.3)	1.12 (0.29, 4.3)	4.1 (1.06, 16)	7.1 (1.85, 27)
15В	0.79 (0.19, 3.3)	0.72 (0.17, 3)	0.49 (0.12, 2.1)	1.75 (0.41, 7.4)	2.5 (0.6, 11)
15С	0.81 (0.21, 3.1)	0.74 (0.19, 2.9)	0.53 (0.14, 2)	1.92 (0.5, 7.4)	3.9 (1.03, 15)
16F	1.37 (0.33, 5.8)	3.5 (0.83, 15)	1.31 (0.31, 5.5)	3.1 (0.73, 13)	5.2 (1.24, 22)
17F	0.99 (0.31, 3.1)	1.65 (0.52, 5.2)	1.06 (0.33, 3.4)	5.6 (1.76, 18)	7.1 (2.3, 23)
19А	2.8 (0.51, 16)	3.6 (0.65, 20)	1.13 (0.21, 6.2)	6.1 (1.0, 33)	9.8 (1.78, 54)
20А	1.59 (0.37, 6.8)	1.53 (0.36, 6.5)	0.83 (0.19, 3.5)	4.7 (1.1, 20)	6.2 (1.45, 26)
22F	1.34 (0.32, 5.7)	1.42 (0.34, 6)	0.72 (0.17, 3)	3.6 (0.84, 15)	5.1 (1.2, 21)
23А	2.4 (0.48, 12)	2.5 (0.51, 12)	0.67 (0.14, 3.3)	3.6 (0.74, 18)	9.1 (1.84, 45)
23В	2.3 (0.28, 19)	2.4 (0.29, 20)	1.49 (0.18, 12)	4 (0.48, 33)	6.8 (0.82, 56)
24F	8.6 (0.9, 83)	4.5 (0.46, 43)	2.9 (0.3, 28)	18 (1.85, 172)	16 (1.61, 150)
31	1.26 (0.33, 4.8)	1.17 (0.45, 6.5)	0.86 (0.23, 3.3)	2.5 (0.64, 9.4)	4.7 (1.22, 18)
33F	0.6 (0.18, 1.97)	0.77 (0.23, 2.5)	0.5 (0.15, 1.65)	2.7 (0.81, 8.9)	3.4 (1.02, 11)
35В	0.94 (0.43, 2.1)	1.41 (0.64, 3.1)	1.24 (0.56, 2.8)	2.6 (1.18, 5.8)	4.3 (1.94, 9.6)

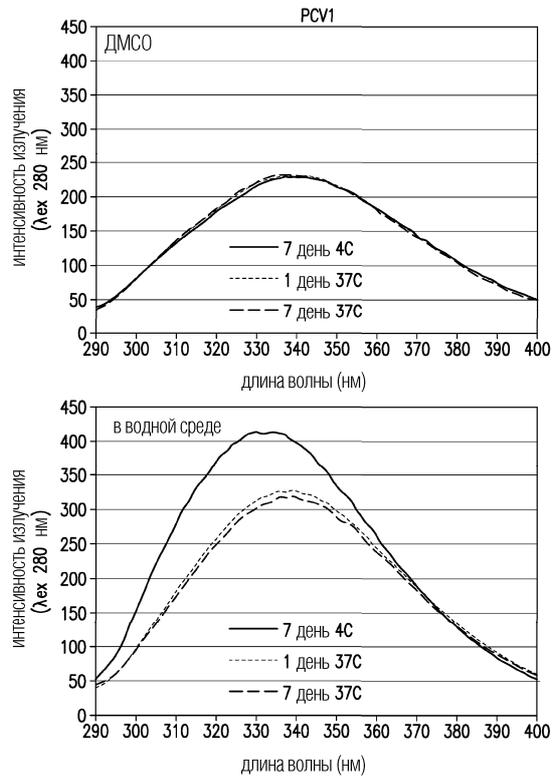
Фиг. 20В



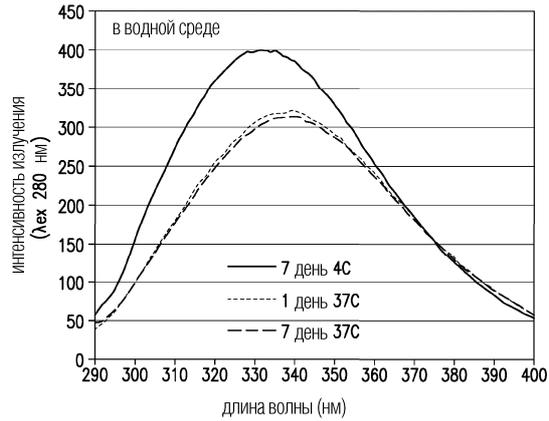
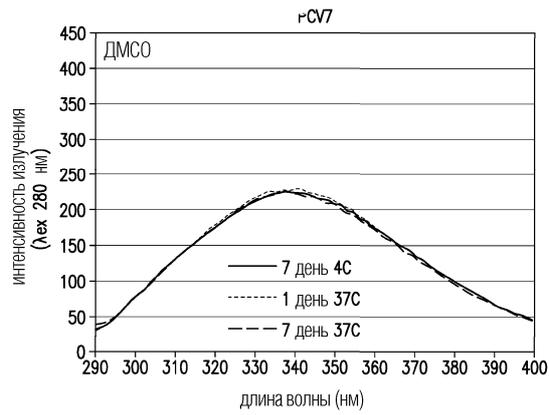
Фиг. 21А



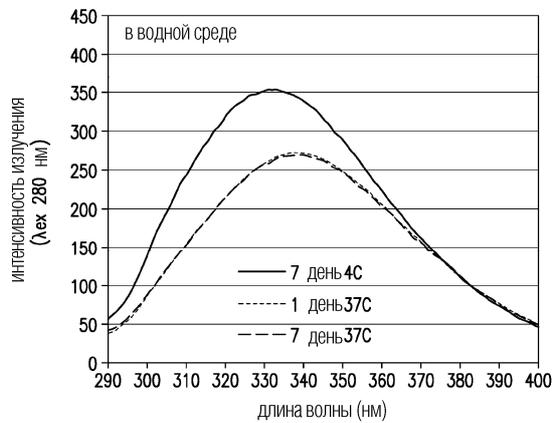
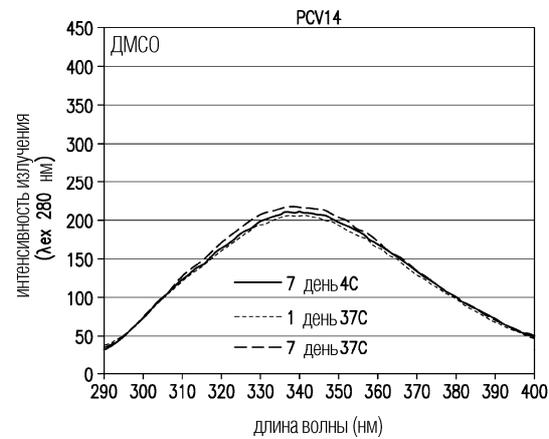
Фиг. 21В



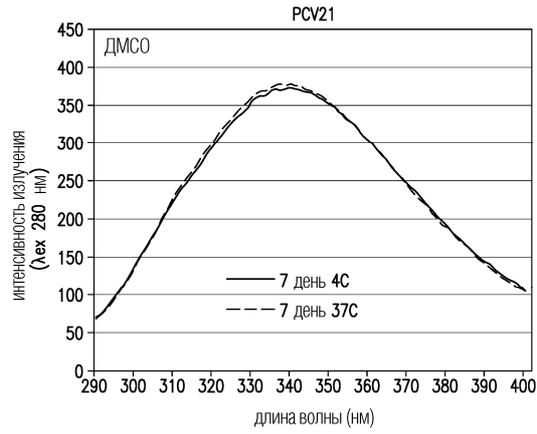
Фиг. 22А



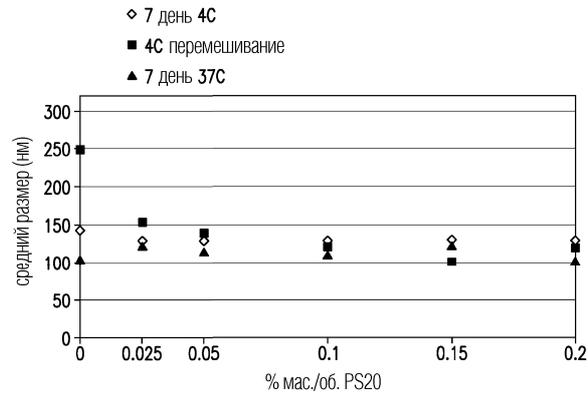
Фиг. 22В



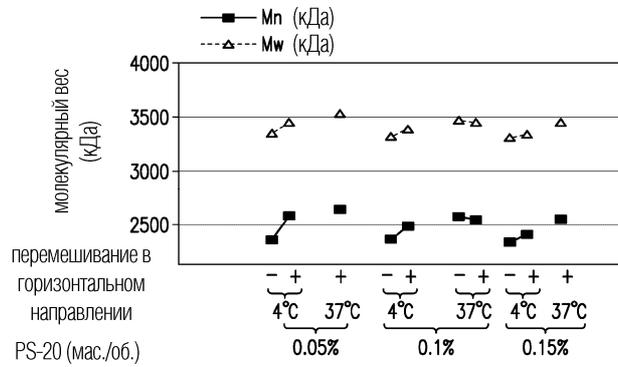
Фиг. 22С



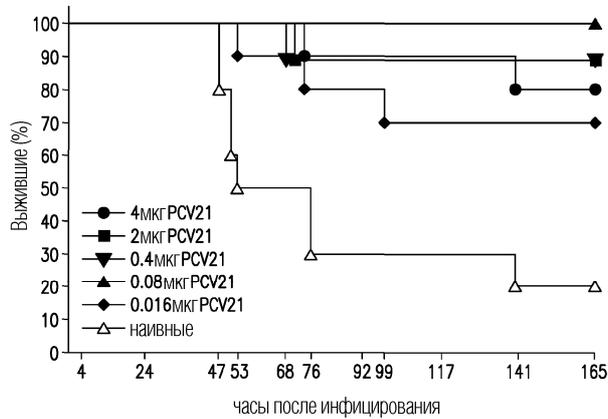
Фиг. 22D



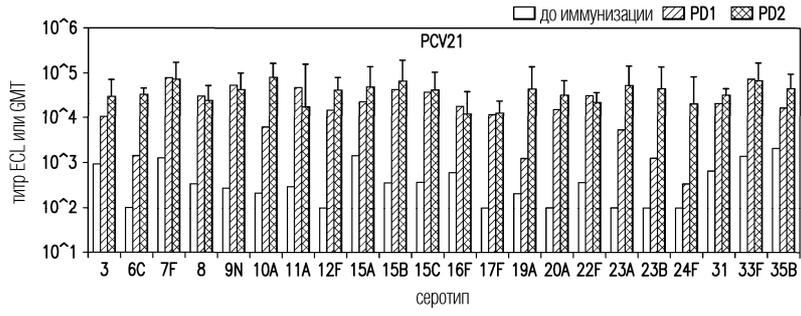
Фиг. 23



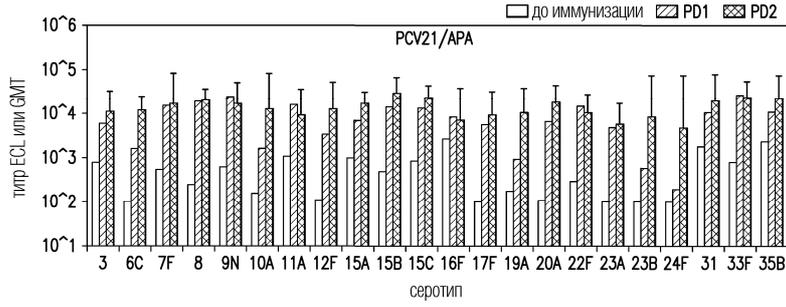
Фиг. 24



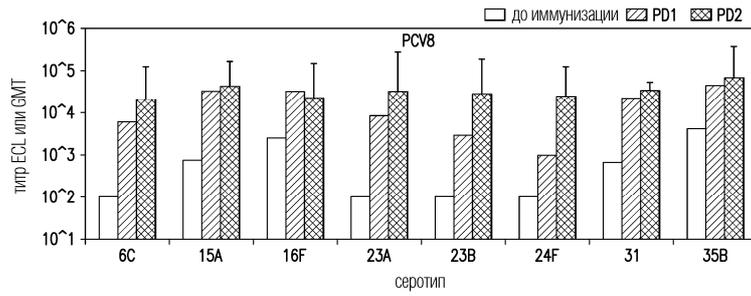
Фиг. 25



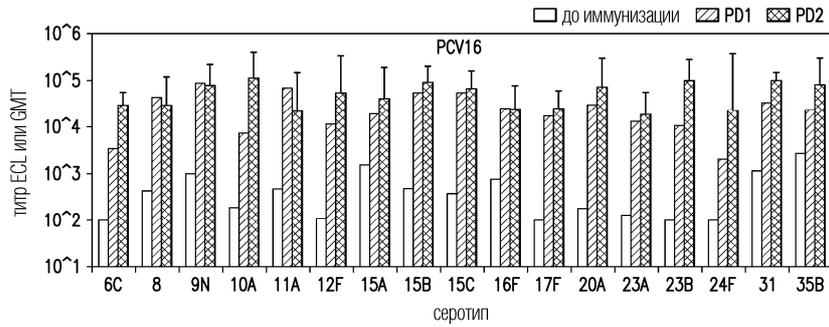
Фиг. 26А



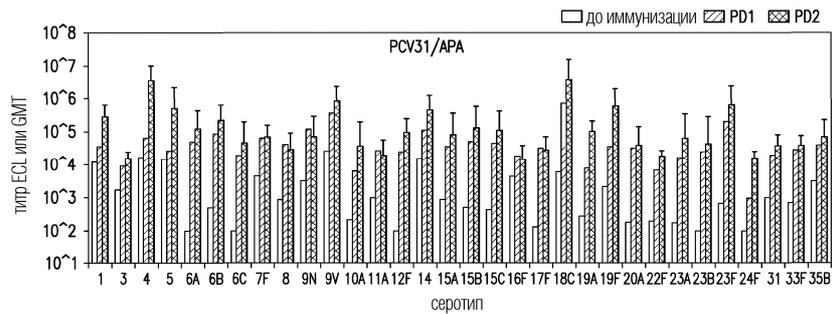
Фиг. 26В



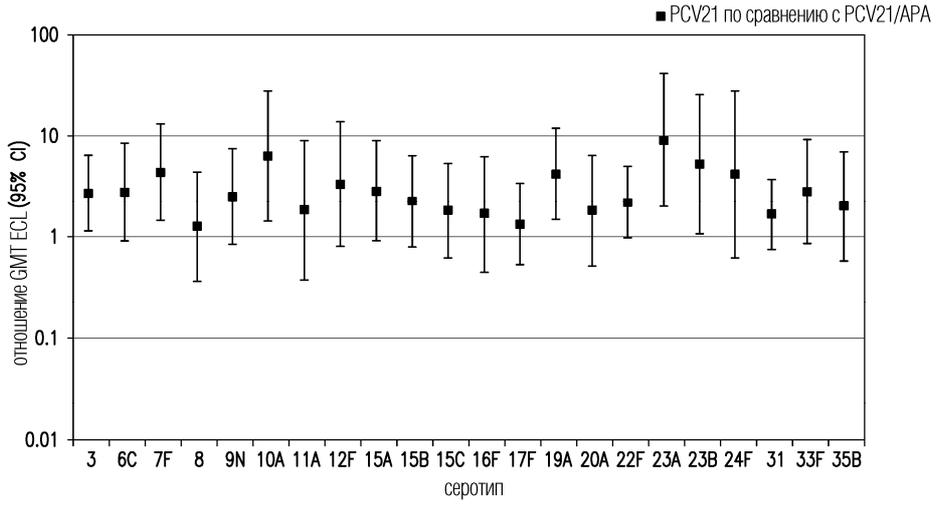
Фиг. 27А



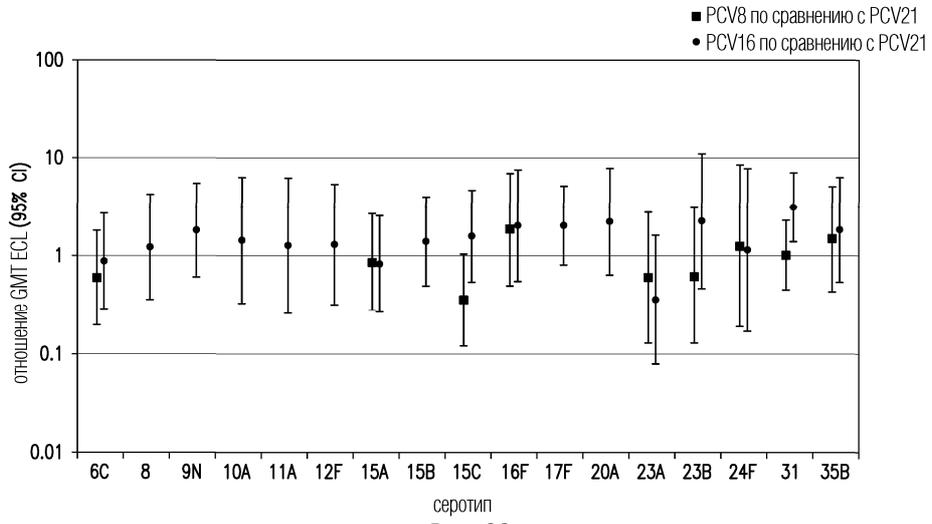
Фиг. 27В



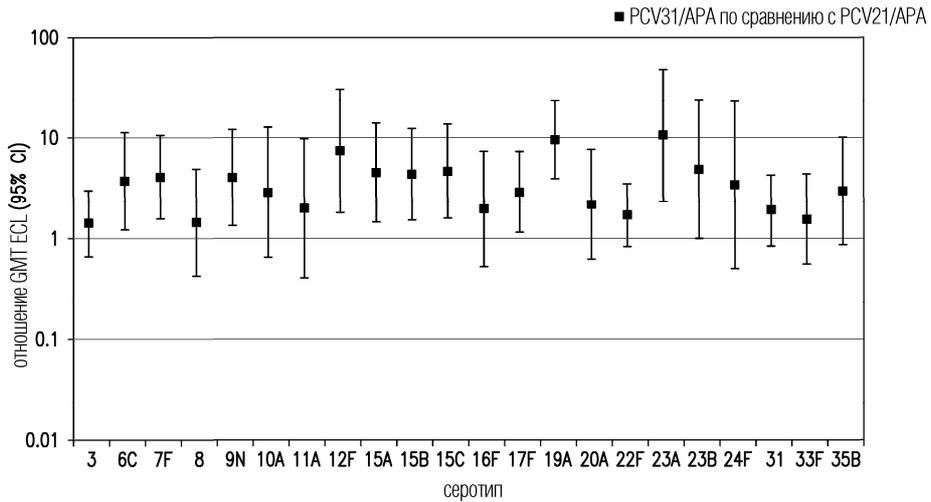
Фиг. 27С



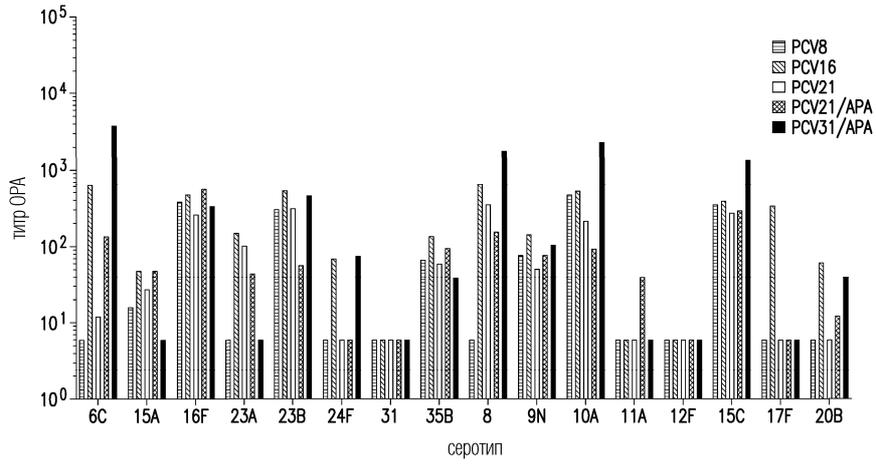
Фиг. 28



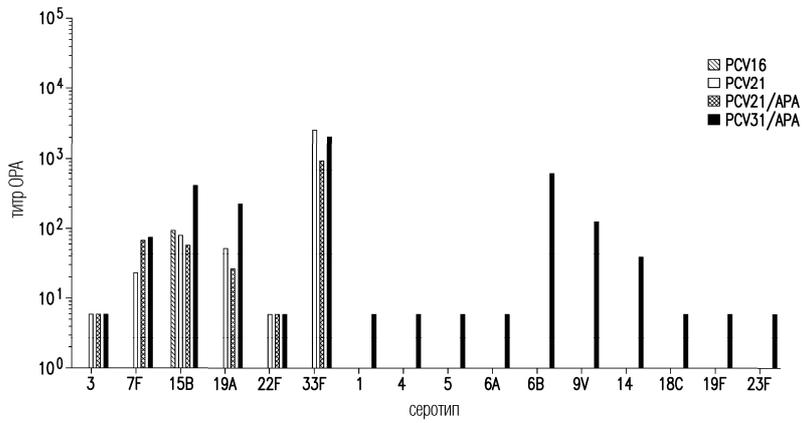
Фиг. 29



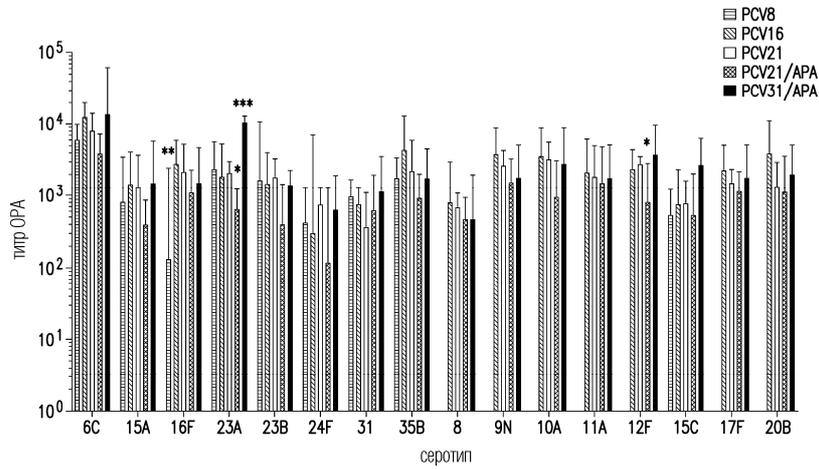
Фиг. 30



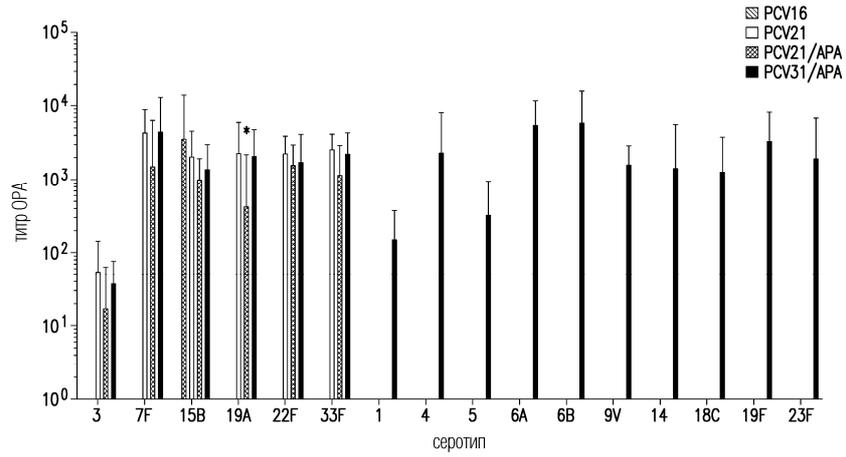
Фиг. 31А



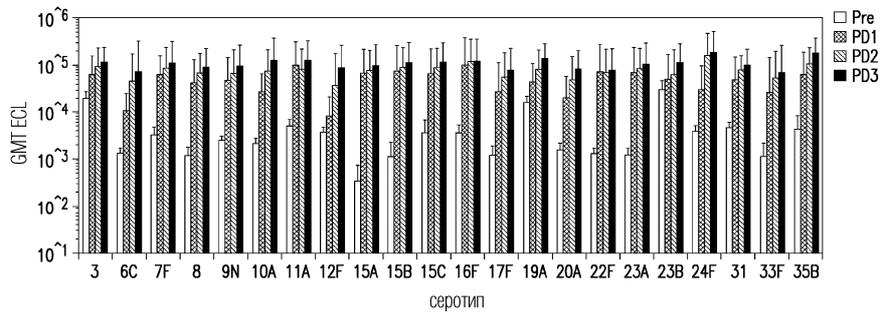
Фиг. 31В



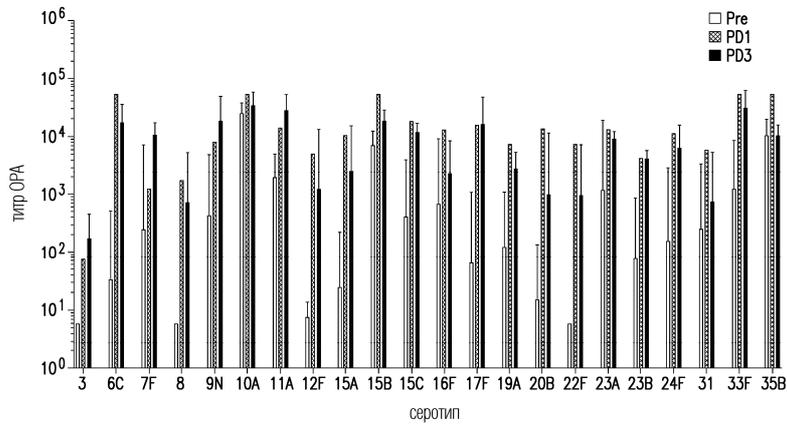
Фиг. 31С



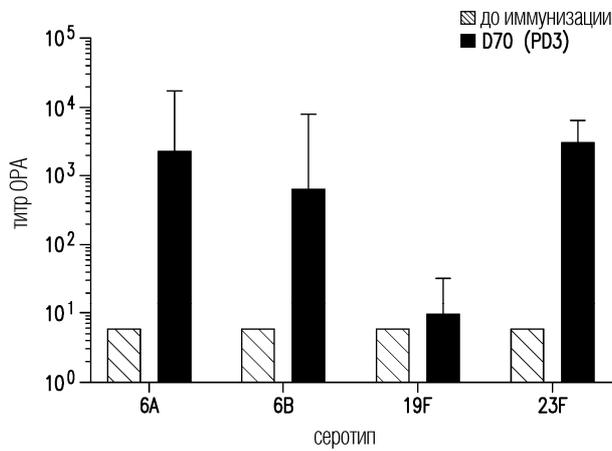
Фиг. 31D



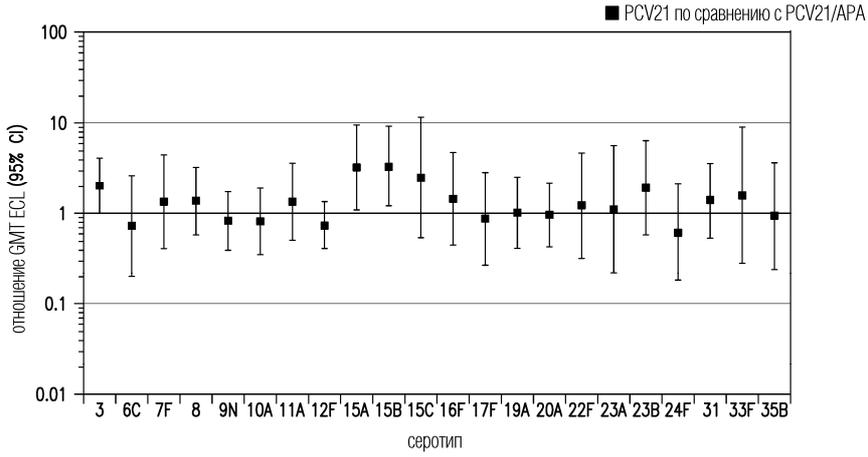
Фиг. 32



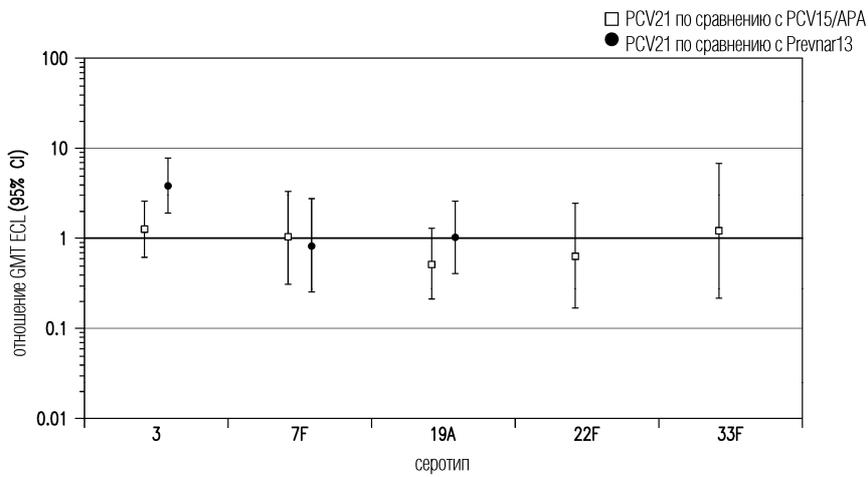
Фиг. 33



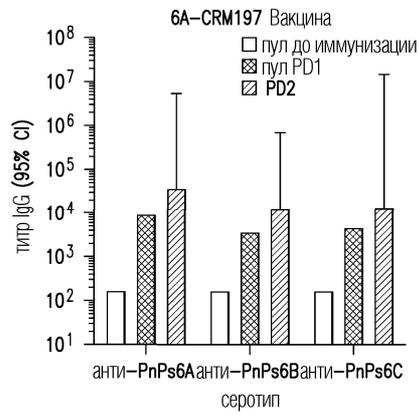
Фиг. 34



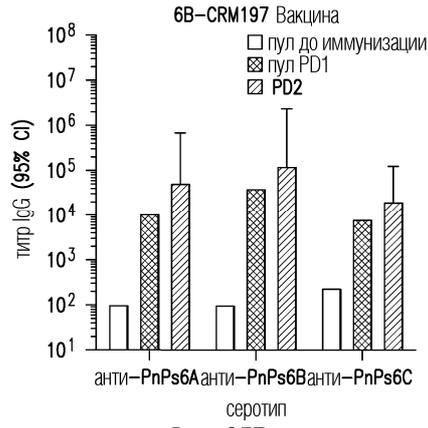
Фиг. 35



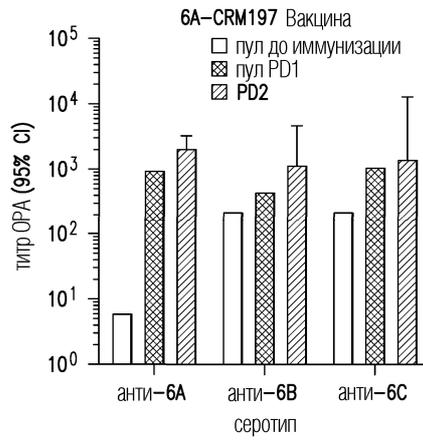
Фиг. 36



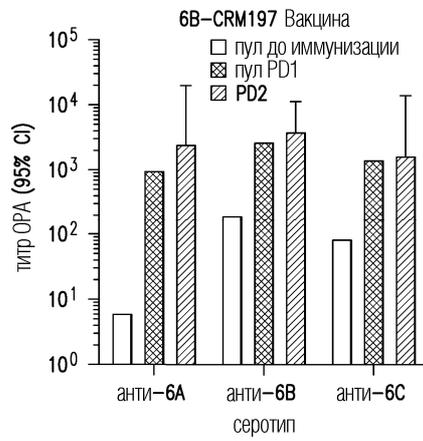
Фиг. 37A



Фиг. 37B



Фиг. 38A



Фиг. 38B

